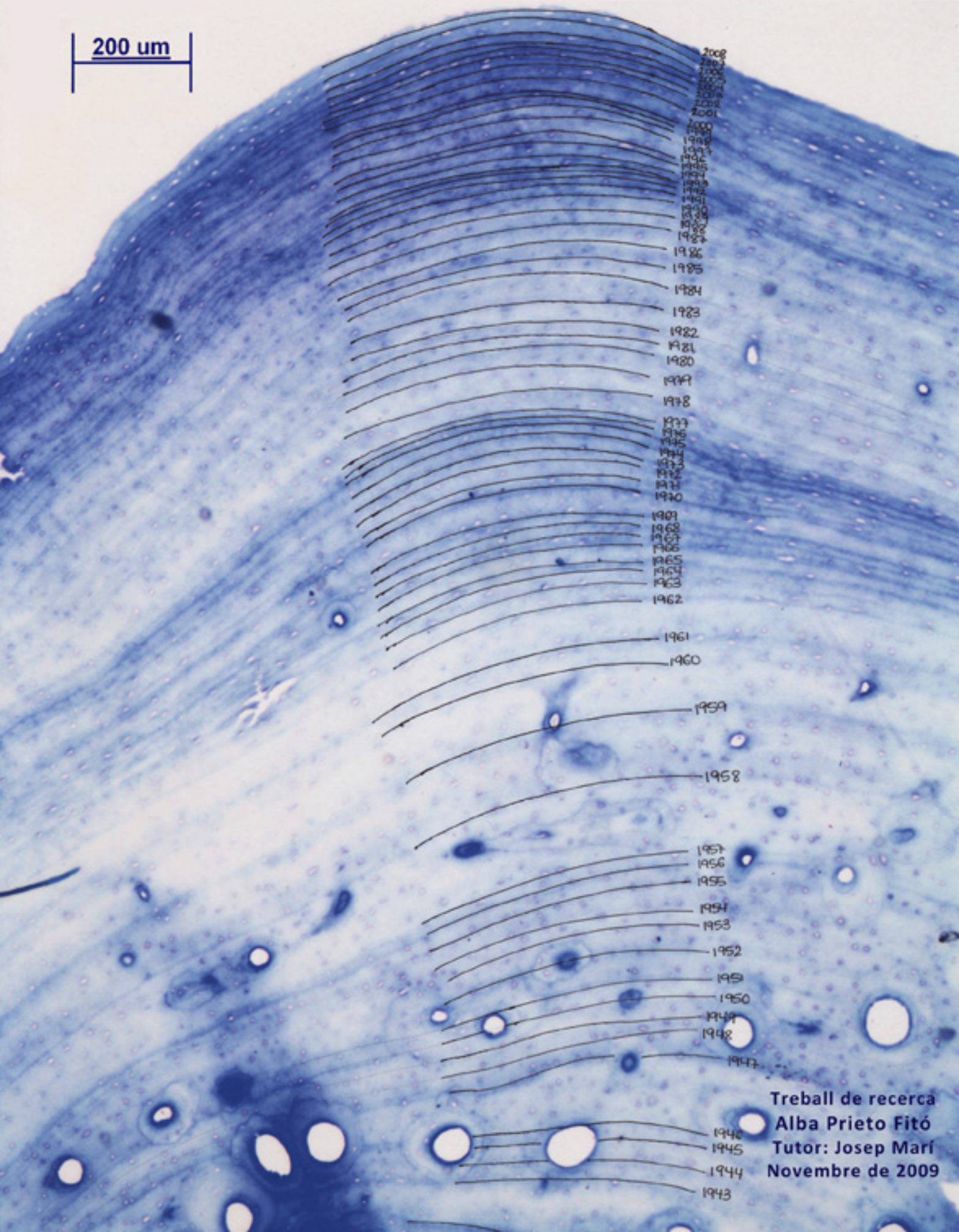
Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània (II)



Treball de recerca
Alba Prieto Fitó
Tutor: Josep Marí
Novembre de 2009

Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània (II)

Treball de recerca

Alba Prieto Fitó

Tutor: Josep Marí

Novembre de 2009

ÍNDEX

Pàg.

Pròleg i objectius..... 3

1. **Introducció..... 5**
   1.1. Antecedents..... 5
      1.1.1. Determinació de l'edat en tortugues..... 5
      1.1.2. Tècnica de datació basada en els escuts epidèrmics..... 6
      1.1.3. Osteocronologia..... 9
      1.1.4. Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània..... 11
   1.2. Estructura òssia: Constitució i formació dels anells de creixement..... 14
      1.2.1. Histologia del teixit ossi..... 14
      1.2.2. Formació dels anells de creixement..... 18

2. **Selecció dels millors mètodes d'osteocronologia..... 20**
   2.1. Metodologia..... 20
   2.2. Resultats i discussió..... 20

3. **Altres determinacions..... 25**
   3.1. Inteferència de Nomarski..... 25
      3.1.1. Metodologia..... 25
      3.1.2. Resultats i discussió..... 26

4. **Aplicació dels mètodes dendrològics..... 27**
   4.1. Metodologia..... 27
      4.1.1. Validació de les datacions individuals mitjançant el mètode *Skeleton plot*..... 27
         4.1.1.1. Identificació: Recompte dels anells en diferents radis d'una mateixa mostra..... 28
         4.1.1.2. Datació..... 30
         4.1.1.3. Llistat d'anells característics..... 31
         4.1.1.4. Skeleton plot..... 32
         4.1.1.5. Datació creuada..... 37
      4.1.2. Relació entre l'evolució del pes dels últims anys i els anells de creixement..... 41
   4.2. Resultats i discussió..... 42

5. **Conclusions..... 43**

6. **Bibliografia..... 44**

Annex 1..... 46

Annex 2..... 49

Pròleg i objectius

El tema del meu treball de recerca s'inclou en un dels projectes d'investigació de la biologia de la tortuga mediterrània (*Testudo hermanni*) que es porten a terme al *Pati de les tortugues*[1] de l'Escola, en estreta col·laboració amb el Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC). Aquest projecte, relacionat amb la datació de l'edat de les tortugues, es va iniciar fa dos cursos en un treball de recerca anterior quan un alumne (Eudald Pascual, 2008), malgrat no era l'objectiu del seu treball[2], es va interessar en conèixer l'edat de les tortugues del Pati. Aprofitant una visita al CRARC, va preguntar a Joaquim Soler (director tècnic del CRARC) que li va explicar els nombrosos mètodes existents per a la datació, basats en els anells de creixement anuals que es formen a les plaques còrnies de la closca, en les dimensions i en el sexe dels animals[3]. Li va advertir, però, que el primer no és un mètode fiable més enllà dels 12 anys i que els altres dos són molt poc exactes. Malgrat tot, l'Eudald va insistir als responsables del CRARC perquè, aprofitant el seu ull d'experts, aventuressin una edat aproximada per a les dues tortugues més velles. Tant en Joaquim com l'Albert[4] coincidiren en adjudicar uns 50 anys a la tortuga de mida més gran i uns 70-80 a la més vella, afegint que no es podia saber perquè l'únic sistema fiable i exacte per a determinar la longevitat de les tortugues no es pot aplicar a exemplars vius, ja que s'ha de fer a partir d'una preparació microscòpica d'un tall transversal d'os llarg (húmer o fèmur) per observar-ne les línies anuals de creixement.

Precisament, en les revisions periòdiques anuals dels últims anys (per part d'Albert Martínez del CRARC) li van diagnosticar un empitjorament d'un problema ocular (dipòsits de colesterol) a la tortuga més vella (7492), que en l'últim any ja li provocava una ceguesa de més del 75%. Finalment, va morir en el decurs de la hibernació del 2008, motiu pel qual el David Bretones va interessar-se per estudiar la longevitat i datació biològica i, especialment, per portar a terme un mètode molt complex anomenat osteocronologia o skeletocronologia.

En el treball de recerca "Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània" de David Bretones es varen aplicar les metodologies més utilitzades en cronologia esquelètica[5] i unes variants de tinció en os sense descalcificar (toluïdina i tricròmica) que, precisament, es van manifestar com les tècniques més vàlides. Tot i el complex treball metodològic realitzat, varen quedar alguns aspectes inacabats: l'estudi aprofundit de les tècniques de tinció amb blau de toluïdina i tinció tricròmica, la comprovació de la validesa del material obtingut (si es creu convenient, la repetició de la preparació d'algunes mostres) i

[1] Indret de l'escola amb arbres i un bassal que des de juny de 2003 és instal·lació col·laboradora del DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya), arran de les tasques realitzades en treballs de recerca anteriors.
[2] L'objectiu principal del seu treball de recerca estava relacionat amb les variacions de pes durant el procés d'hibernació de les tortugues.
[3] Aquests mètodes seran aprofundits en l'apartat 1.1. d'aquest treball.
[4] L'Albert Martínez Silvestre és el responsable científic del CRARC.
[5] la tècnica d'abrasió, la tècnica de microtomia sobre os descalcificat i tenyit amb hematoxilina, la tècnica de microtomia en sec i observació directa i fins i tot l'observació amb microscopi de llum polaritzada.

l'observació d'una mostra al microscopi interferencial de Nomarski. Tant bon punt el David Bretones ho va notificar en l'exposició oral del seu treball de recerca, vaig trobar que era un tema molt interessant que em permetria aprofundir en la histologia òssia i d'altra banda, en uns mètodes tant complexos com són els d'osteocronologia, la fiabilitat dels quals encara no ha estat determinada per a tortugues de més de 20 anys.

Així doncs, aquest treball es presenta com un aprofundiment dels resultats obtinguts a partir dels mètodes realitzats en el treball de recerca anterior. Els objectius que es pretenen assolir són:

- Analitzar el conjunt de mostres i determinar quin és el millor mètode de tots els que es van aplicar en el treball de recerca anterior (David Bretones, 2009);
- Comprovar si s'obtenen els mateixos resultats en el recompte dels anells de la mostra tenyida amb blau de toluïdina que en la mostra ja analitzada muntada en bàlsam del Canadà;
- Determinar si els mètodes dendrològics són aplicables a la osteocronologia, tant pel que fa a la tècnica de recompte com en relació a la possible informació ecològica (creixement i vida de l'animal);
- Decidir si els mètodes osteocronològics són aplicables per a la datació de tortugues de més de 20 anys, com ja es va apuntar en el treball de recerca abans esmentat, mitjançant la intravalidació de les mostres corresponents al millor mètode de tots els analitzats (inclòs el d'Interferència de Nomarski).

Tant en el treball anterior com en aquest, ha estat necessari consultar experts de diversos àmbits, de manera que ens posàrem en contacte amb alguns departaments de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (Biologia Animal, Biologia Cel·lular i Ecologia) i amb la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana (Campus de Bellvitge) de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Aquest treball comença amb una introducció teòrica en la qual s'inclou una breu explicació dels diferents mètodes que permeten determinar l'edat de les tortugues, remarcant la importància de la tècnica de datació basada en els escuts epidèrmics i de l'osteocronologia. Seguidament, es presenten els conceptes, relacionats amb la histologia òssia, necessaris per a analitzar el material obtingut. A partir d'aquest punt, comença la part experimental del treball, per tal d'intentar assolir els objectius esmentats.

1. Introducció

1.1. Antecedents

1.1.1. Determinació de l'edat en tortugues

L'únic mètode precís per conèixer l'edat d'una tortuga és el seguiment d'individus prèviament marcats quan són cries. Tots els altres mètodes existents per a la datació presenten dificultats en la seva aplicació i interpretació. La importància en conèixer l'edat de les tortugues radica en la influencia que aquesta té en l'estudi biològic de les mateixes (Zug, 1991).

Per nosaltres, conèixer l'edat de la tortuga 7492 té una importància afegida per diverses raons. En primer lloc, és una tortuga a la que se li han fet molts estudis: ha format part (juntament amb les altres 3 tortugues adultes que continuen al Pati de les tortugues de l'escola) d'una investigació de 3 anys consecutius sobre les variacions de pes durant el període d'hibernació (Alba Vendrell, 2006; Laia Herrerias, 2007; Eudald Pascual, 2008). D'altra banda, és la primera tortuga mediterrània de les que han estat a l'escola que hi ha fet niu (Laia Herrerias, 2007); ha format part d'un estudi de filogenètica evolutiva a partir de l'anàlisi d'ADN mitocondrial[6]; s'ha fet un seguiment exhaustiu del seu procés progressiu de ceguera amb visites periòdiques al CRARC (Laia Herrerias, 2007; Eudald Pascual, 2008). I, per últim, la seva mort ens ha proporcionat l'oportunitat de realitzar un estudi osteocronològic, tenint en compte que es tracta d'un mètode que no ha estat aplicat en tortugues de més de 20 anys d'edat i que a aquesta, per les seves característiques morfològiques i la closca especialment llimada, se li havia suposat una edat d'uns 70 anys. Representa, doncs, tot un repte que ens proposaren en Joaquim Soler i l'Albert Martínez del CRARC.

Els mètodes existents per a determinar l'edat de les tortugues són:

- <u>Control real de l'edat amb mostres d'edat coneguda:</u> Mètode basat en tècniques que requereixen un marcatge i un seguiment dels individus des de l'edat zero fins a la seva mort. Es pot dur a terme amb animals en estat salvatge o amb animals captius i en ambdós casos s'obtenen resultats molt precisos. Si es treballa amb animals que viuen en estat salvatge, hem de tenir en compte que les poblacions han de ser molt nombroses per tal de tenir prou individus que arribin a l'edat adulta. També cal que estiguin marcats correctament: amb tinta a les plaques dorsals o marginals quan són petits i amb marques a les plaques marginals o amb microxips quan són adults (veure annex 2). D'altra banda, si els animals viuen en captivitat, el seu patró de creixement es pot veure alterat per les possibles dificultats en la reproducció de l'hàbitat natural i per la possibilitat de no haver hibernat cada any, com correspondria.

- <u>Mètodes d'estimació de l'edat segons la mida:</u> Sabent que les tortugues creixen des del seu naixement fins que assoleixen la maduresa sexual, podem relacionar la seva mida amb la seva edat. Les tècniques que es basen en aquest principi són poc fiables

[6] Dirigit per el Dr. Salvador Carranza de l'Institut de Biologia Evolutiva del CSIC (Centre Superior d'Investigacions Científiques)

ja que individus d'una mateixa mida poden tenir diferents edats i viceversa. Un exemple de la poca fiabilitat del mètode n'és la tortuga que estem intentant datar, ja que tot i la seva avançada edat, era bastant petita. Així doncs, la variabilitat en la mida inicial de les cries i el ritme de creixement de cada individu són la causa incontrolable de la poca precisió d'aquests mètodes. Nosaltres ho hem pogut comprovar també amb tortugues nascudes a l'escola, entre les quals hi ha tortugues de diferent edat que no es distingeixen i tortugues nascudes al mateix any de mides força diferents (Èlia Faixó, 2009).

- Mètodes d'estimació de l'edat per marcadors del creixement: Els marcadors de creixement més importants en tortugues són les zones de creixement de la closca (escuts) i les marques òssies. Les tècniques de determinació de l'edat de les tortugues basades en aquests marcadors són les més fiables. Donada la seva importància les comentarem més detalladament en els apartats 1.1.2. i 1.1.3 d'aquest treball.

- Mètodes d'estimació de l'edat basats en modificacions estructurals: Aquests mètodes es fonamenten en l'estudi del desgast dels escuts de la closca, dels canvis de l'esquelet i dels canvis de tonalitat. L'avaluació de l'edat de tortugues en funció del grau de desgast per abrasió dels seus escuts tan sols ens permet obtenir l'edat aproximada d'una població o grup de tortugues i no es recomana utilitzar-la per estudis a llarg termini. La tècnica basada en els canvis en la forma, l'estructura i la mida dels ossos al llarg de la vida de l'animal exigeix accés al seu esquelet, motiu pel qual és un mètode utilitzat principalment en arqueologia i en l'anàlisi de fòssils. Finalment, els diferents colors o canvis de tonalitat observats en tortugues només ens permeten discriminar entre juvenils i adults (Zug, 1991). Tot i així, hi ha experts herpetòlegs que afinen bastant amb les seves observacions i la seva experiència[7] (David Bretones, 2009).

1.1.2. Tècnica de datació basada en els escuts epidèrmics

La closca de les tortugues està composta per una capa inferior òssia revestida per una pell especialment consistent, a damunt de la qual es troben els escuts ossis (Fig.1). Els escuts ens proporcionen un senyal extern de les fases de creixement de les tortugues ja que el seu desenvolupament respon a canvis estacionals, i aquesta periodicitat es pot utilitzar per estimar-ne l'edat. Les tortugues que viuen en zones on el clima és temperat tenen una única fase de creixement anual, donat que hi ha una diferència estacional marcada. Així doncs, en aquest cas cada cicle de creixement de l'escut es pot associar a un any (Zug, 1991).

Depenent de l'espècie es poden distingir dos patrons de creixement diferents:

- Tortugues que mantenen tots els escuts a mesura que aquests es van formant (Fig.1, esquerra).

[7] És el cas del Joaquim Soler i l'Albert Martínez, responsables del CRARC, que calcularen una edat molt apropiada a la tortuga que ens ocupa.

- Tortugues que, a partir del segon cicle de creixement, perden l'escut més vell quan se'n forma un de nou (Fig.1, dreta).

Pel que fa als individus que pertanyen al primer grup, el recompte d'escuts ens permet saber quants cicles de creixement han tingut. En canvi, en el segon cas és necessari fer un recompte dels solcs per obtenir aquesta informació (Zug, 1991).

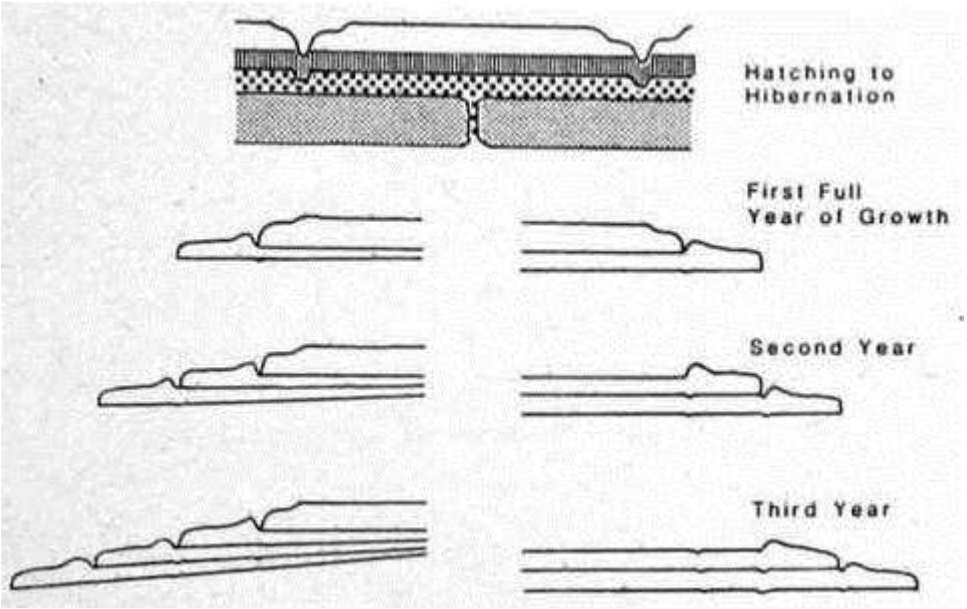


Figura 1: Representació del creixement epitelial cíclic de l'escut de les tortugues. La seqüència de l'esquerra mostra un patró on no es perd l'escut i la de la dreta un patró que el perd. L'àrea blanca representa cèl·lules mortes (escut), la zona ratllada és l'epidermis, la zona puntejada és la dermis i l'àrea grisa inferior representa els ossos de la closca (extreta de Zug, 1991).

Des d'un punt de vista morfològic, els escuts de les espècies de tortugues que segueixen el primer patró de creixement, es caracteritzen en el naixement de les mateixes per una placa uniformement granulada (zona aerolar) envoltada per un estret cordó perifèric, d'aspecte llis (Fig. 2). En els anys posteriors, el creixement es du a terme cap a la perifèria de la zona aerolar amb una important deriva espacial. En els períodes de creixement actiu els escuts cornis mostren un creixement en forma d'anells concèntrics al voltant de la zona aerolar, i en els períodes d'aturada de creixement registren solcs. Aquesta morfologia dels dipòsits cornis es manté de forma pràcticament idèntica fins a la maduresa sexual, aproximadament entre els 11 i 15 anys per l'espècie *Testudo hermanni.* D'ençà d'aquest moment, una caiguda brusca de la taxa de creixement en alçada es manifesta a nivell dels escuts mitjançant una superposició gairebé vertical dels anells cornis anuals, els quals esdevenen molt estrets, sovint desdoblegats i de distinció molt difícil, si no impossible (Cheylan, 1979).

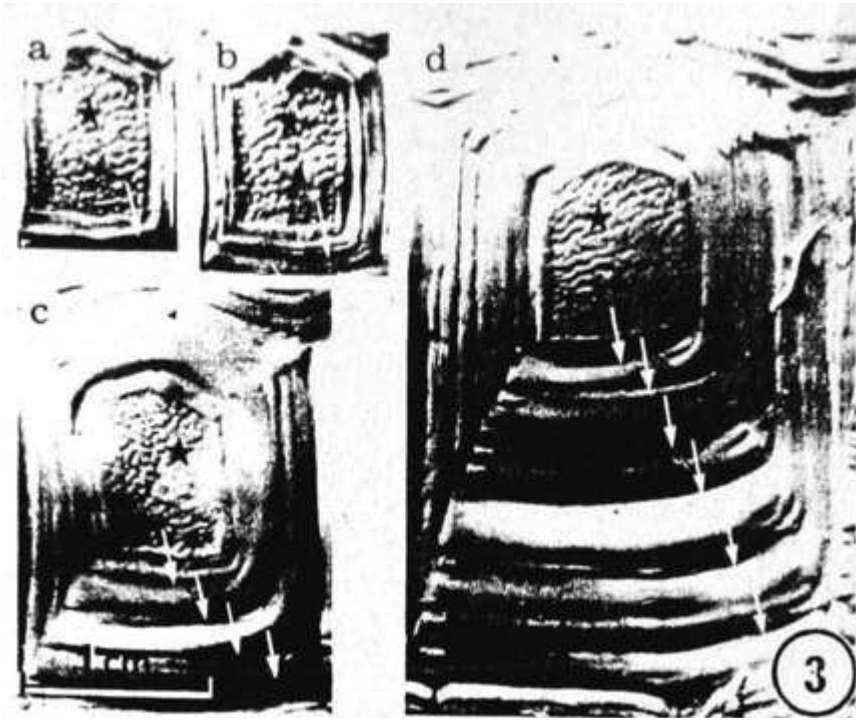


Figura 2: Escuts costals de *Testudo hermanni robertmertensi* d'edat coneguda. La placa central embrionària està marcada amb un estel. a) tortuga de 7 mesos; presència d'un inici de placa de creixement (fletxa), el solc de la primera hibernació encara és difícil de distingir en aquest estadi. b) tortuga d'1 any; el primer solc d'hibernació es distingeix (fletxa). c) tortuga de 4 anys; tres marques de creixement principals que separen tres solcs clarament visibles. El quart solcs correspondrà a la perifèria actual de l'escut. Es veuen diversos solcs secundaris. d) tortuga de 6 anys; 6 marques de creixement anual (fletxes)

La utilització del recompte d'escuts o solcs com a criteri de datació de tortugues, tot i ser un mètode molt utilitzat presenta alguns inconvenients.

- No és útil en espècies que no segueixen un patró de creixement cíclic, és a dir, estacional.
- És poc precís en individus adults, ja que un cop s'ha aturat el creixement o aquest és mínim, el recompte d'anells o solcs és més complex i menys fiable. A més, els individus que són molt vells poden haver perdut algun escut a causa del desgast de la closca (Zug, 1991). En general, la distinció dels anells és possible en els mascles fins als 10 o 12 anys i a les femelles fins als 13 o 15, tot i que aquest factor és variable depenent de l'individu. En edat adulta, el recompte dels anells només és possible en la meitat dels animals (Cheylan, 1979). Això també ho hem pogut corroborar amb les 4 tortugues mediterrànies adultes de l'escola (Eudald Pascual, 2008).
- En el cas que l'espècie estudiada presenti un patró de creixement amb pèrdua d'escuts cal fer un recompte dels solcs, una tasca que comporta més dificultats que el recompte d'escuts, ja que la formació de solcs no està relacionada exclusivament a cicles de creixement, sinó que també poden formar-se degut a malalties o altres alteracions que puguin tenir lloc durant una mateixa fase de creixement.
- La fiabilitat d'aquest mètode varia molt entre diferents espècies ja que la identificació dels solcs o dels escuts presenta diferents nivells de dificultat (Zug, 1991).

Per comprovar la fiabilitat del mètode en tortugues que encara no han assolit la maduresa sexual, hem trobat interessant fer un estudi comparatiu entre les marques de creixement en els escuts costals de les tortugues que hibernen i les que no. Per fer-ho hem estudiat 4 tortugues: M1 i E2 (no hibernen) ; E4 i B1 (hibernen). La E2 i la E4 tenen un any i la B1 i la M1 dos anys. És per aquest motiu que hem comparat la E4 amb la E1 i la B1 amb la M1 (Figura 3).

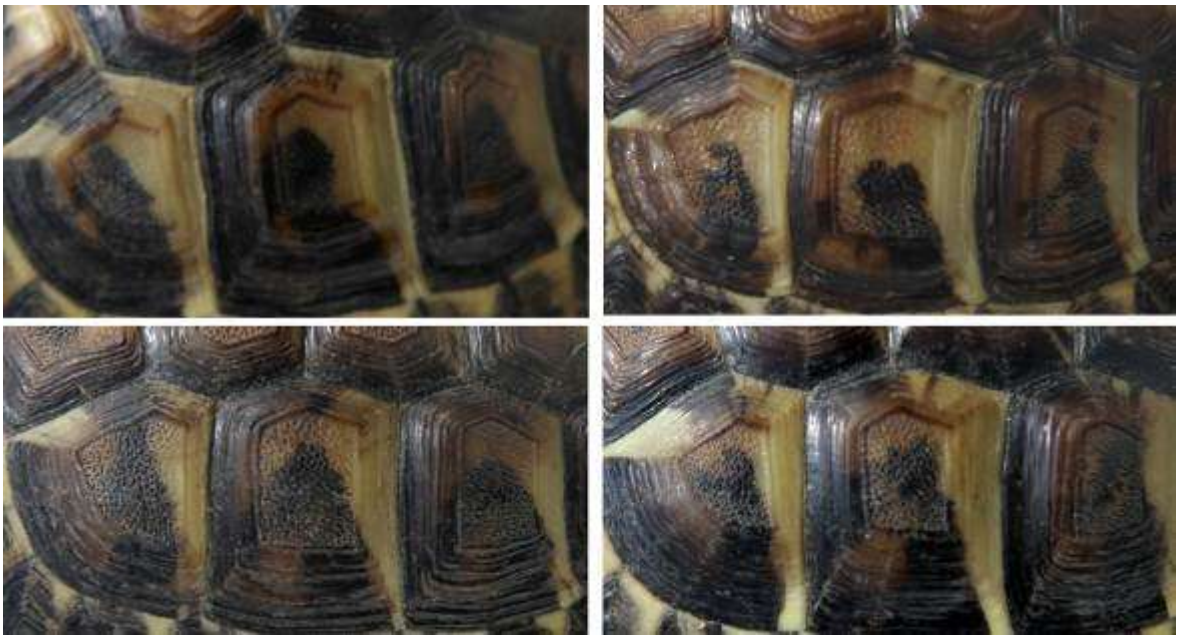


Figura 3: Escuts costals de les tortugues, d'esquerra a dreta i de dalt a baix: B1, M1, E4 i E2. Les marques de creixement són més pronunciades en la B1 i la E4.

Hem pogut observar que les marques són una mica més accentuades en les tortugues que han hibernat (E4 i B1) que en les que no ho han fet (E2 i M1). Tot i així, en tots els casos podem distingir nombroses marques indicadores del creixement intra-anual, fet que reflecteix la dificultat que comporta la datació de les tortugues mitjançant aquest mètode.

1.1.3. Osteocronologia

Els rèptils presenten marques de creixement cíclic en la major part dels seus ossos. En els escamats, es poden veure directament per transparència en els ossos plans (sobretot serps) o en talls transversals dels ossos llargs (llangardaixos). Actualment, la periodicitat anual d'aquestes marques s'estableix freqüentment pels animals salvatges, de manera que constitueixen un bon criteri d'edat. Anomenem esqueletocronologia al mètode consistent a avaluar l'edat a partir d'aquestes formacions cícliques (Castanet,1977). Nosaltres, però, ens hi referim amb el nom d'osteocronologia, com ja es va explicar en un treball anterior (David Bretones, 2009), per dos motius. El primer és que el considerem igual de vàlid que el d'esqueletocronologia, per estar citat en estudis de talls transversals de falanges en amfibis (David Bretones, 2009). D'altra banda, volem relacionar aquest mètode amb el conegut per a l'estudi dels anells dels arbres (la dendrocronologia), ja que en aquest treball (tal i com s'ha explicat en el pròleg) es pretén aplicar les mateixes tècniques d'estudi amb l'objectiu d'esbrinar algun fet rellevant del passat d'aquest animal, analitzant les característiques i l'amplada dels diferents anells de creixement.

Els elements de l'esquelet creixen a mesura que es va depositant os en la seva superfície exterior. Aquest creixement és periòdic responent a canvis estacionals que mostren períodes de creixement i de no creixement. La periodicitat estacional correspon a una unitat de temps específica i es pot utilitzar per estimar l'edat (Zug, 1991).
L'observació d'una secció de l'os ens mostra un patró de creixement que alterna capes clares i fosques (Fig. 4). Les zones clares es formen en períodes de creixement ràpid i les fosques corresponen a períodes de creixement lent o de no creixement. Les fosques són més estretes i s'anomenen LAG[8]. Una zona clara i una de fosca consecutives conformen un cicle de creixement complet i s'anomenen MSG[9] (Zug, 1991).

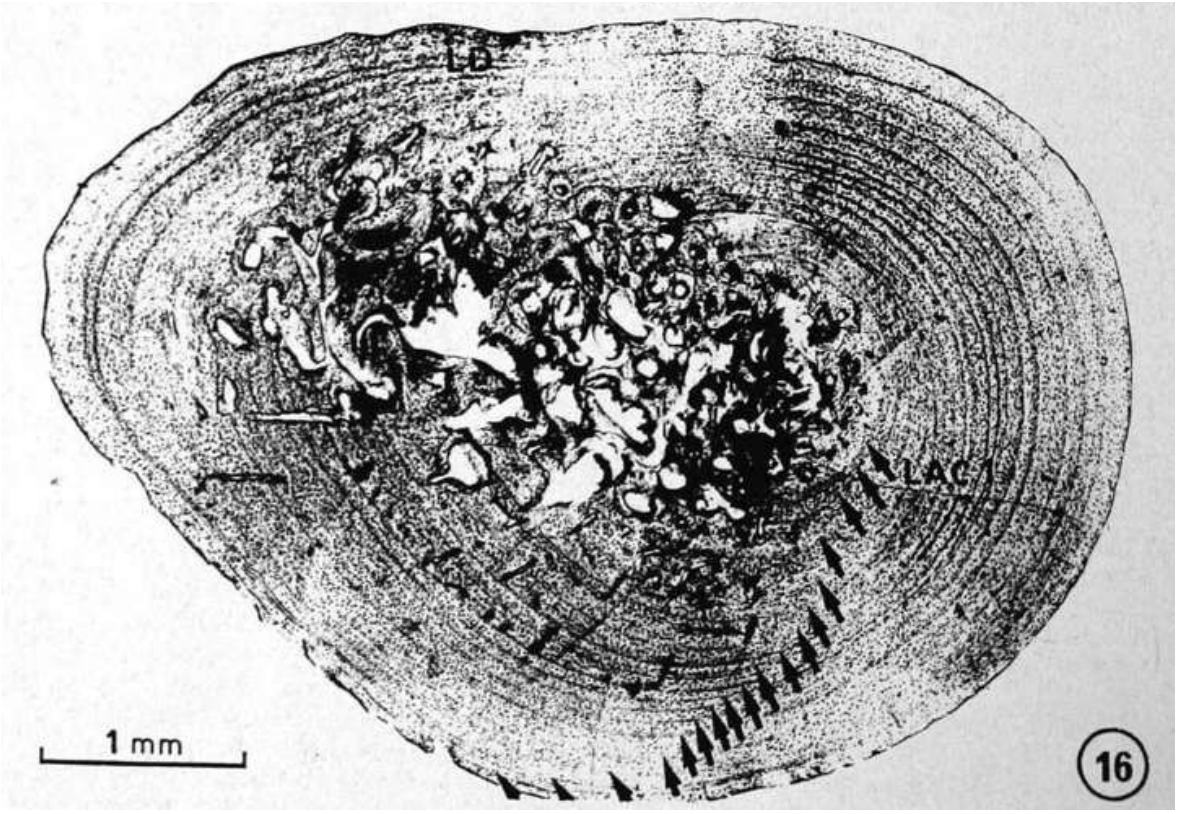


Figura 4: Diàfisi femoral amb hematoxilina. Podem observar totes les LAC (19 contant la de la perifèria). La LAG 17 és doble. En el sector central encara hi queda una mica d'os fibrós embrionari, fet que permet afirmar que la primera LAG observada correspon a la primera hibernació (extreta de Cheylan, 1979).

Per determinar l'edat, es conten i es medeixen les MSGs ja que s'assumeix que cada cicle de creixement correspon a un interval de temps específic i invariable, equivalent a un any en tortugues de zones temperades. Emperò, a l'hora de procedir amb el mètode, cal tenir en compte que només s'han de comptar les MSGs periòstiques perquè les capes endòstiques creixen de forma acíclica (Zug, 1991).

La metodologia necessària per preparar les mostres de l'os que permeten contar les capes de creixement és molt complexa i ha estat l'objectiu principal d'un treball anterior

[8] Lines of Arrested Growth (Línies d'aturada de creixement)
[9] Mark of Skeletal Growth (Marca de creixement esquelètic)

(David Bretones, 2009), en el qual s'ha realitzat un estudi exhaustiu de totes elles, de manera que en aquest treball no les repetirem.

En estudis duts a terme amb les diferents espècies de tortugues, es constata que les LAG observades en seccions de diversos ossos plans (mandíbula i plaques de la closca) són menys nombroses que als ossos llargs (húmer i fèmur) degut al fenomen de la reabsorció. A més, la mesura de les LAG en aquests ossos és difícil mentre que en els ossos llargs és més fàcil i rigorosa (Cheylan, 1979). Això és una justificació suplementària de l'elecció dels ossos llargs en aquest treball.

La fiabilitat d'aquest mètode és equivalent a la tècnica dels escuts ja que ambdues teories es basen en el mateix principi. Tot i així, aquesta tècnica pot presentar els següents problemes (Zug, 1991):

- La pèrdua d'alguna LAG o MSG per reabsorció o remodelació.
- La presència de LAGs discontinues i irregulars (no visibles en totes les parts d'un mateix tall de l'os)
- La presència d'MSGs irregulars, compactes o no visibles.

Quan es presenten els problemes esmentats s'han d'aplicar metodologies addicionals que permetin esbrinar l'edat amb la màxima precisió. Tot i així, cal tenir en compte que la determinació de l'edat mitjançant aquesta metodologia sempre serà per defecte, és a dir, que el nombre de marques de creixement òssies sempre serà igual o inferior a l'edat real de la tortuga, però en cap cas pot ser superior.

L'osteocronologia és el mètode que s'aplica i s'estudia en aquest treball per esbrinar l'edat d'una tortuga mediterrània. Més endavant, s'explicaran alguns dels mètodes utilitzats més enllà del simple recompte de MSGs.

1.1.4. Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània: antecedents

L'osteocronologia és el mètode més fiable i exacte per a determinar la longevitat de les tortugues mediterrànies, però presenta el problema de no ser aplicable a exemplars vius, ja que s'ha de fer a partir d'una preparació microscòpica d'un tall transversal d'os llarg (húmer o fèmur) per observar-ne les línies anuals de creixement. Els ossos llargs s'han mostrat les millors mostres per a avaluar l'edat de les tortugues, però inclús en húmers i fèmurs hi ha alguns aspectes problemàtics que poden dificultar el recompte, com reabsorcions i remodelacions de l'os, LAGs discontinues, capes de creixement no visibles, LAG i MSG irregulars i compactació de diverses marques de creixement, com acabem de veure en l'apartat anterior.

Fins l'any passat, aquesta tècnica no s'havia portat a terme en tortugues de més de 20 anys d'edat, fet que va portar al meu company David Bretones a aventurar-se a datar una tortuga de l'escola que havia mort recentment, a la qual els experts del CRARC li havien suposat uns 70 anys. L'objectiu del treball era esbrinar si es podia determinar pel mètode d'osteocronologia l'edat exacta d'una tortuga mediterrània i, en cas afirmatiu, intentar

determinar quin dels mètodes d'osteocronologia resulta el més adequat.

El treball és bàsicament metodològic i en ell es duen a terme tres metodologies d'osteocronologia, que són les més utilitzades en cronologia esquelètica (Castanet i Cheylan, 1979; Zug, 1991): per abrasió o desgast, microtomia amb descalcificació (Fig. 5) i microtomia en sec. A més, es van incorporar unes noves variants de tinció en os sense descalcificar (toluïdina i tricròmica) i una observació al MES d'electrons retrodispersats. Més tard, es va dur a terme la observació al microscopi de les mostres i es van obtenir diferents resultats en funció de la tècnica utilitzada (Figs. 5 a 8).

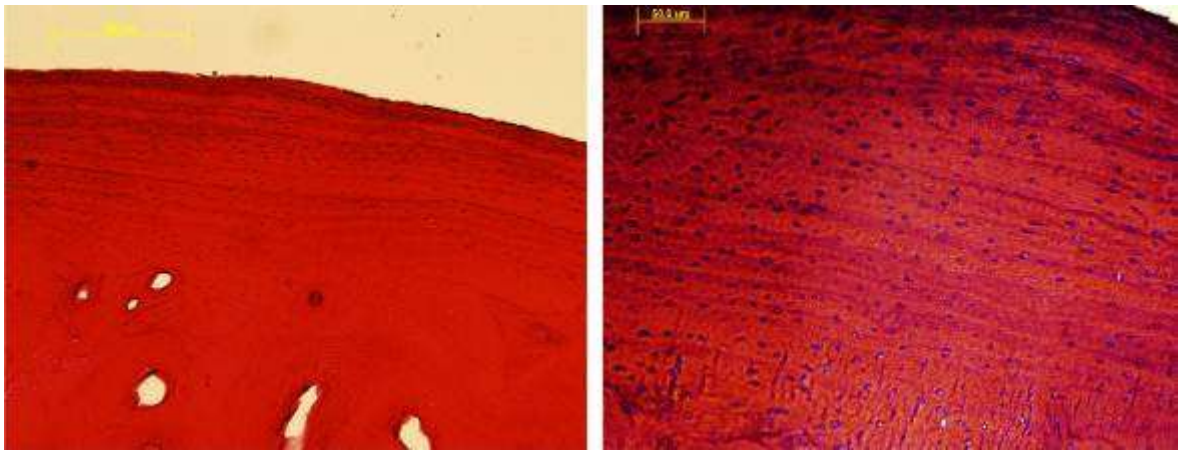


Figura 5: Microfotografies corresponents a la mostra T70B1 de tall transversal d'húmer obtinguda amb el mètode 2 (microtomia amb descalcificació), amb doble tinció hematoxilina – eosina. Les imatges han estat obtingudes amb l'equip Olympus DP70 del laboratori de Microfotografia del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la UB (extretes del treball de recerca: Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània)

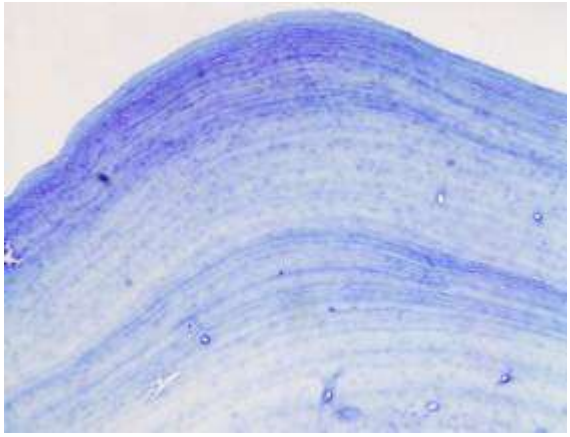


Figura 6: Microfotografia de la mostra T70B3 de tall transversal d'húmer que mostra el resultat de la tinció amb blau de toluïdina per evidenciar les marques de creixement. (extreta del treball de recerca: Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània)

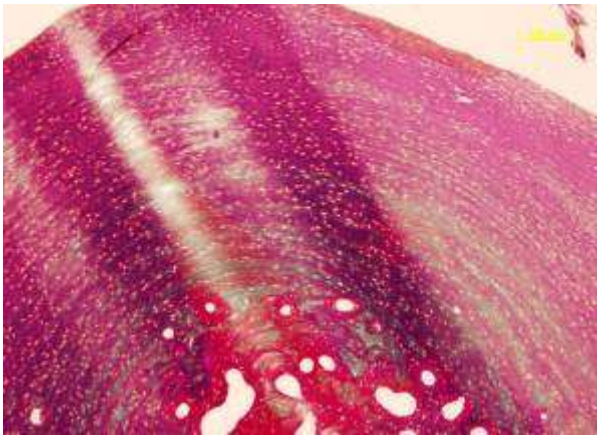


Figura 7: Microfotografia de la mostra T70B3 de tall transversal d'húmer que mostra el resultat de la tinció tricròmica per evidenciar les marques de creixement. (extreta del treball de recerca: Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània)

La tecnologia més estudiada va ser el mètode d'abrasió o desgast amb bàlsam del Canadà (Fig. 8), ja que va ser la primera que va presentar línies de creixement clarament visibles. Tanmateix, les tècniques de tinció en os sense descalcificar (toluïdina i tricròmica) es van manifestar com les tècniques més vàlides i que, malgrat no varen poder ser estudiades en profunditat[10], van permetre confirmar visualment que les línies observades amb el mètode d'abrasió o desgast muntades (sense tenyir) amb bàlsam del Canadà i marcades per a facilitar-ne el recompte, corresponien a veritables marques.

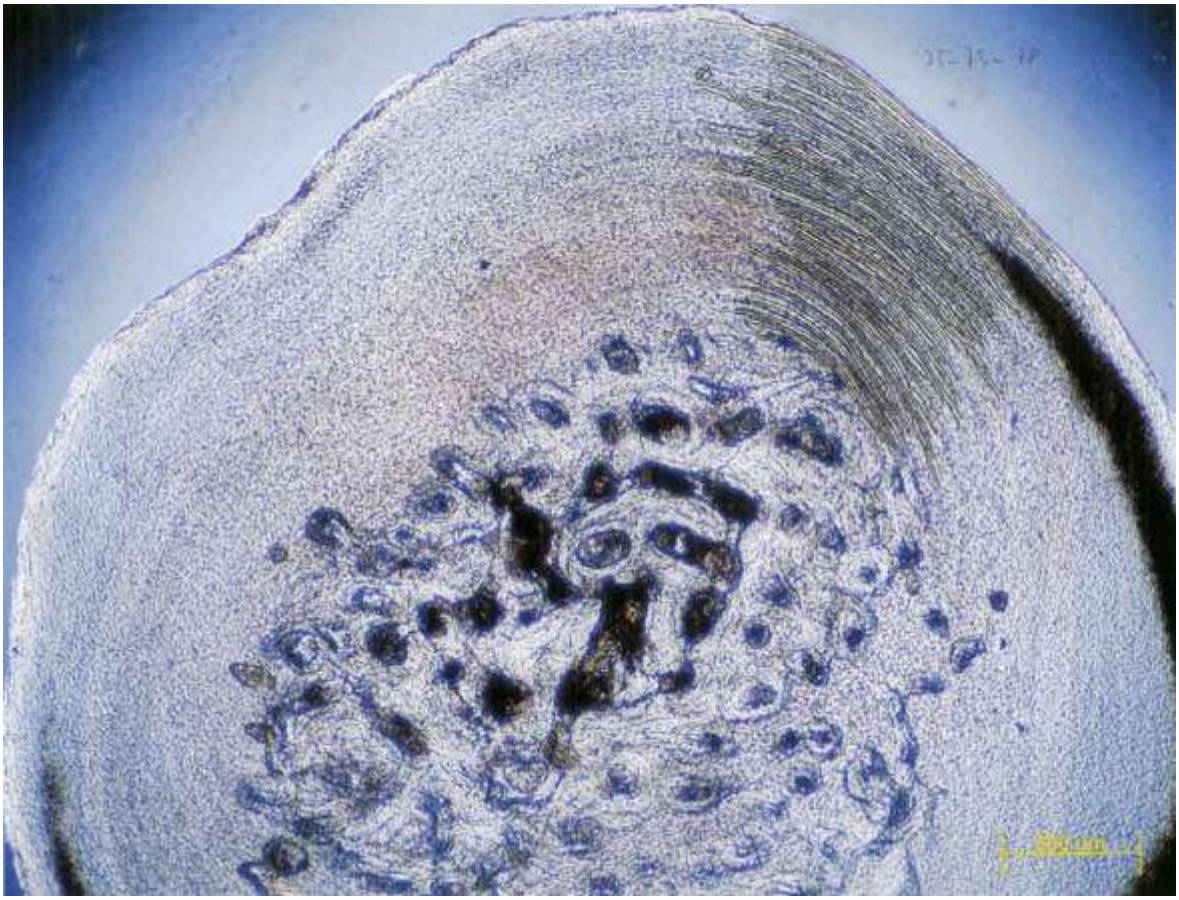


Figura 8: Microfotografia de la mostra T70B4 de tall transversal d'húmer obtinguda amb el mètode d'abrasió, muntada amb bàlsam del Canadà, amb els anells de creixement marcats en llapis i contats (extreta del treball de recerca: Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània)

Tot i la feina feta, hi va haver qüestions plantejades al llarg del treball que no van ser resoltes: comprovar que els espais entre dues línies (LAG) corresponen tots realment a un any, determinar si s'ha produït alguna reabsorció o remodelació de l'os o fins i tot detectar alguna possible duplicació, estudiar meticulosament les mostres amb tinció tricròmica i amb blau de toluïdina i determinar si els resultats obtinguts en la preparació amb Bàlsam del Canadà també concorda amb els d'aquests mètodes de tinció. També caldria analitzar la possible relació d'unes línies més fines (detectades en les mostres observades amb MES) amb les petites marques que s'observen entremig de les marques

[10] El David Bretones va disposar d'elles quan estava a punt d'entregar el treball de recerca, de manera que no va tenir temps d'analitzar-les

anuals de creixement de les escames còrnies de la closca (Figura 3) i també amb un creixement no lineal detectat en tortugues petites (Berta Ollé, 2008).

Totes aquestes tasques inacabades són les que donen peu al meu treball, basat fonamentalment en l'estudi del material ja obtingut i en la comprovació de la possibilitat de datar una tortuga mediterrània de més de 20 anys mitjançant el mètode d'osteocronologia. Tanmateix, també hi ha la pretensió d'anar una mica més enllà amb aquest tema, determinant si és possible l'aplicació dels mètodes dendrològics a l'osteocronologia i intentant extreure, a part de l'edat de l'animal, informació de com va viure. Per això després d'una bona anàlisi histològica sobre les particularitats del creixement ossi i, en concret, de la formació dels anells de creixement, s'aplicaran mètodes d'ecologia per realitzar el recompte i l'anàlisi dels anells de creixement sobre les mostres seleccionades.

1.2. Estructura òssia: Constitució i formació dels anells de creixement

1.2.1. Histologia del teixit ossi

El teixit ossi és un tipus especialitzat de teixit connectiu, la matriu extracel·lular del qual es troba majoritàriament mineralitzada. Contràriament al que s'havia pensat en un principi, és un teixit viu capaç de dur a terme processos de reabsorció, aposició[11] i reconstrucció (Diego Ferrer, 1975).

Tot i que el teixit ossi presenta sempre una estructura similar, té certes variacions en funció de la regió de l'os que constitueix. Així podem diferenciar entre teixit ossi compacte i teixit ossi esponjós o reticular (Diego Ferrer, 1975).

- **Teixit ossi esponjós o reticular**: Està format per primes trabècules[12] envoltades per cèl·lules de revestiment ossi. Es localitza a l'interior dels ossos del crani, vèrtebres, estèrnum i pelvis i també al final dels ossos llargs. La seva funció és proporcionar rigidesa i suport.

- **Teixit ossi compacte o dens**: Es localitza en porcions externes de tots els ossos i ramificacions dels ossos llargs. Posseeix una estructura dura i predomini de matriu òssia, que és un material intercel·lular calcificat. S'hi localitzen els osteòcits dintre de les llacunes al voltant dels conductes de Havers. A l'igual que l'os esponjós, proveeix rigidesa i suport i, a més, forma una capa exterior sòlida sobre els ossos, la qual cosa evita que siguin fàcilment trencats o estellats.

[11] Engruiximent de la membrana cel·lular pel dipòsit superficial de substàncies diverses
[12] Renglera o làmina de cèl·lules que travessa un meat o espai intercel·lular

Aquests teixits constitueixen diferents parts dels ossos. Així, la diàfisi[13] està constituïda per teixit ossi compacte i l'epífisi (cadascuna de les extremitats dels ossos llargs que s'uneix a la part mitjana o diàfisi per un cartílag que ulteriorment s'ossifica) està formada per teixit esponjós (Diego Ferrer, 1975).

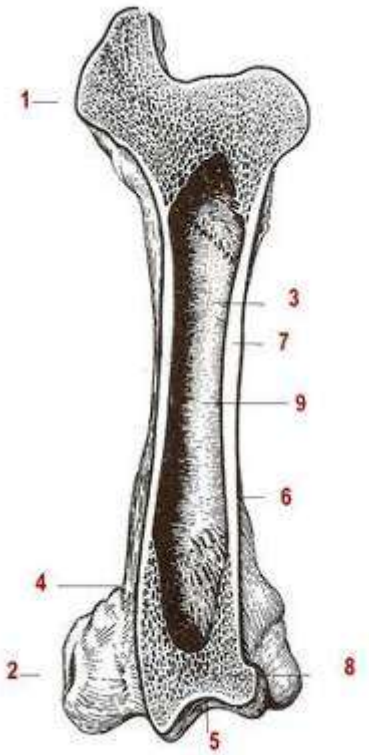


Figura 9: Parts d'un os llarg d'animal vertebrat (com els utilitzats en aquest estudi):

- Diàfisi **[1]:** Part mitjana de l'os ubicada entre les epífisis.
- Epífisi **[2]:** Extremitats d'un os llarg.
- Cavitat medul·lar **[3]**: Espai envoltat d'os compacte, ocupat per medul·la òssia (substància tova).
- Cartílag epificiari **[4]**: Cartílag hialí que separa la diàfisi de l'epífisi, és lloc on creix l'os en longitud.
- Cartílag articular **[5]**: Hialí, recobreix la superfície articular.
- Periosti **[6]**: Membrana fibrosa que cobreix la superfície d'un os.
- Endosti **[9]**: Recobreix la cavitat medul·lar.
- Os compacte **[7]**: Làmines òssies sense cavitats intermèdies.
- Os esponjós o reticular**[8]**: Làmines amb diferents orientacions, formen una xarxa en la que es troba la medul·la òssia.

Químicament, el teixit ossi es caracteritza pel seu baix contingut en aigua (18%) i un 27% de matèria orgànica. El 55% restant correspon a sals, principalment fosfocarbonat de calci (95%), fosfat magnèsic i fluorur de calci.
A nivell estructural distingim dues parts fonamentals que constitueixen el teixit ossi: les cèl·lules i la substància fonamental. (Diego Ferrer, 1975)

a) **<u>Cèl·lules òssies:</u>** Podem diferenciar entre quatre tipus de cèl·lules òssies, segons el període evolutiu en el que es troben:

- **Cèl·lules osteoprogenitores:** Són cèl·lules indiferenciades amb caràcter de fibroblasts[14]. Durant la formació de l'os aquestes cèl·lules pateixen divisió i tenen la capacitat de diferenciar-se en cèl·lules formadores de l'os (osteoblasts). Es troben tant a les superfícies internes com externes dels ossos (cèl·lules periòstiques i cèl·lules endòstiques)

- **Osteoblasts:** són cèl·lules diferenciades que sintetitzen el col·lagen i la substància fonamental òssia, la qual constitueix l'os inicial no mineralitzat o

[13] Cos o part mitjana dels ossos llargs
[14] Cèl·lula allargada i plana, amb prolongacions en forma de llança, que es troba en les diferents varietats del teixit conjuntiu

osteoide, contribuint així a la formació de l'os. També són responsables de la calcificació de la matriu òssia mitjançant la secreció de petites vesícules que contenen una gran quantitat de fosfatasa alcalina. Tenen forma cuboide o polièdrica i s'agrupen de forma monoestratificada (en un sol nivell). D'altra banda, es comuniquen entre ells per mitjà de prolongacions citoplasmàtiques o nexes.

- **Osteòcits:** Són les cèl·lules òssies madures, tenen forma aplanada i estan envoltades per la matriu òssia que han secretat anteriorment com a osteoblasts. De fet, podem considerar un osteòcit com un osteoblast diferenciat. Són els responsables del manteniment de la matriu òssia. A més, tenen la capacitat de sintetitzar i reabsorbir, limitadament, la matriu.

- **Osteoclasts:** Són unes cèl·lules mòbils, multinucleades i de gran mida, la funció de les quals és la reabsorció òssia. Quan els osteoclasts estan actius descansen sobre la superfície òssia on es produirà la reabsorció. Com a conseqüència de la seva activitat, immediatament a sota dels osteoblasts es formen unes excavacions poc profundes anomenades llacunes de reabsorció. Els osteoclasts reabsorbeixen les trabècules, van formant teixit ossi en forma de làmines i donen lloc a la medul·la òssia definitiva.

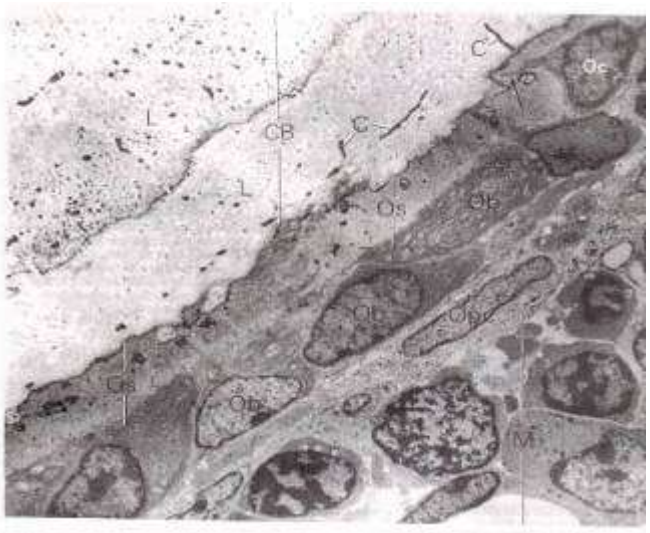


Figura 10: Teixit ossi
(M) Cavitat medul·lar,
(Opc) cèl·lules osteoprogenitores,
(Ob) osteoblasts,
(Os) osteoide,
(Oc) osteòcit,
(CB) Matriu òssia calcificada,
(C) petits canals,
(L) límit entre dues làmines.

b) **<u>Substància fonamental:</u>** La substància fonamental té com a funció primordial aconseguir una màxima capacitat mecànica de resistència amb una quantitat mínima de matèria. Té un aspecte diferent en el teixit ossi compacte i en el teixit ossi esponjós, ja explicats anteriorment. En canvi, en ambdós casos la seva estructura laminar és idèntica. Per descriure-la ens referirem a l'os compacte, que és el que ens interessa més en aquest treball i diferenciarem els següents elements:

- **Conductes de Havers:** Representen un sistema de petits canals que, en forma de xarxa tridimensional, s'estenen per tot l'os, comunicant la regió periòstica amb la medul·lar. Aquests conductes es disposen predominantment en paral·lel a l'eix de l'os en els ossos llargs, radials en els ossos amples i en forma desigual en els curts. Els més prims deixen pas a un vas capil·lar i els més gruixuts contenen petites arterioles i osteoblasts.

- **Làmines:** Constitueixen la trama fonamental del teixit i són les encarregades de dotar-lo dels seus caràcters específics. Estan constituïdes per feixos de fibres de col·lagen que es distribueixen en forma de capes, les quals s'agrupen donant lloc als anomenats sistemes de làmines. En els ossos compactes adults distingim diferents sistemes de làmines:
    - Làmines fonamentals externes, que es disposen sobre la superfície de l'os formant una sèrie de circumferències
    - Làmines fonamentals internes, que revesteixen el conducte medul·lar segons un sistema similar de circumferències
    - Sistemes laminars de Havers, que són aquells que en forma de capes concèntriques es disposen al voltant dels conductes de Havers
    - Sistemes de làmines intermediaris, que són fragments dels sistemes anteriors que no han estat reabsorbits

  Entre els sistemes de làmines trobem la substància fonamental amorfa, composta per polisacàrids àcids. Recobrint els sistemes es disposen cristalls d'hidroxiapatit formant així un conjunt sòlid que dota el teixit de la seva capacitat de resistència a la tracció, torsió i flexió.

- **Llacunes òssies i els sistemes de conductes calcòfors:** Les llacunes òssies són petites cavitats del tamany d'una cèl·lula comunicades entre sí pels anomenats conductes calcòfors. De fet són els motlles que es formen al voltant de les cèl·lules degut a la calcificació. Queden buits en el moment en que la cèl·lula s'atrofia o es mor.

- **Periosti i fibres de Sharpey:** El periosti és una coberta fibrosa de l'os sense calcificar que l'uneix amb els lligaments i tendons. És una membrana de teixit conjuntiu dens compost per fibres col·lògenes entrecreuades. Les fibres de col·lagen del periosti directament en contacte amb l'os i que són l'element d'unió entre l'os i el periosti s'anomenen fibres de Sharpey (Diego Ferrer, 1975).

  Aquestes fibres tenen un paper fonamental en la formació dels anells de creixement.

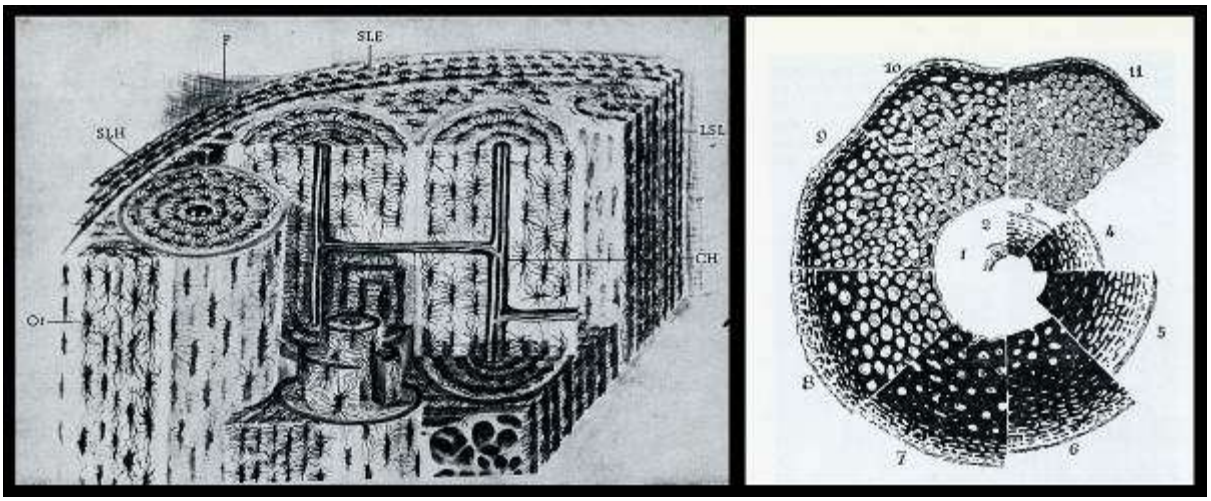


Figura 11: A l'esquerra: Esquema d'un fragment de teixit ossi. SLE, sistema de làmines circumferencials externes; SLH, sistemes de làmines de Havers (secció transversal); CH, conductes de Havers; Ot, osteòcits; P, periosti; LSLS, làmines en secció longitudinal. A la dreta: tall semi esquemàtic que explica la construcció progressiva de la diàfisis d'un os llarg. A la perifèria el periosti, en negre l'os periòstic; al centre, el canal medul·lar; els petits cercles concèntrics representen els sistemes de Havers (extreta de Diego Ferrer, 1975)

1.2.2. Formació dels anells de creixement

Recordem que un dipòsit anual de creixement ossi (MSG) comprèn típicament: A) Una zona ampla, opaca, rica en cèl·lules i eventualment en vasos sanguinis. Aquesta zona es forma com a conseqüència d'un període de velocitat de creixement relativament elevada. B) Un *annulus* estret i transparent que conté sovint una línia d'aturada de creixement (LAG), molt cromòfila. L'*annulus* es redueix sovint a aquesta LAG i indica un alentiment o una aturada total del creixement ossi.

L'os, perfectament cilíndric en els animals joves, va adquirint un perfil oval en els adults. Això és degut a que la osteogènesi és més intensa en un sector de la corona de la diàfisi, i dóna lloc a marques de creixement descentrades. En aquesta zona, la vascularització és més abundant i té lloc una destrucció progressiva de les zones i de les LAGs més profundes (Fig. 4).

Més detalladament, les corticals diafisàries dels ossos llargs de les tortugues ofereixen l'aspecte següent:

- Zones: des de la cavitat medul·lar cap a la perifèria, trobem contra la paret endostal una placa de gruix variable d'os endostal i algunes capes òssies sense rec sanguini. Es tracta d'os perfectament laminar. La primera zona de la cortical profunda té nombrosos canals vasculars primaris i secundaris. Entre aquests canals trobem l'os primari i fibres entrecreuades amb cèl·lules voluminoses repartides sense ordre. Aquesta estructura evidencia una gran velocitat de creixement i sovint es relaciona amb el període embrionari i els primers dies de vida (Fig. 12). En individus adults, aquest os rudimentari gairebé ha desaparegut (Fig. 4). De fet, ha estat reemplaçat per files d'os endostal laminar que ocupen gran part de la cavitat medul·lar. També s'observa la presència de sistemes de Havers secundaris. Aquests envaeixen progressivament la zona òssia primària més perifèrica. Aquesta reabsorció pot

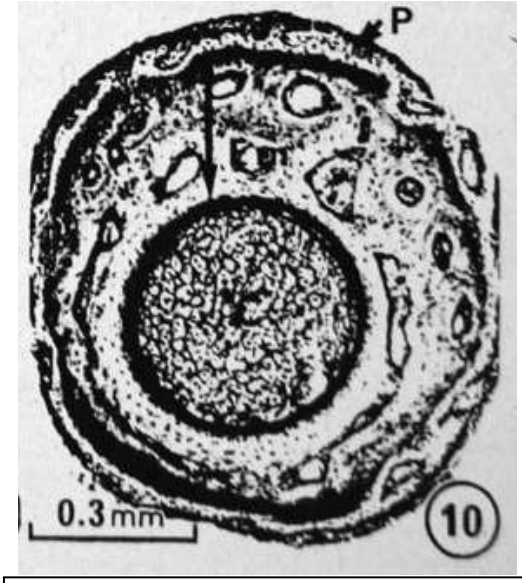


Figura 12 : Tall transversal del fèmur d'un embrió nat mort de *Testudo hermanni robertmertensi*, té una diàfisi femoral constituïda per os rudimentari S'observen els canals entre els quals trobem l'os primari i fibres entrecreuades amb cèl·lules voluminoses repartides sense ordre (extret de Castanet i Cheylan, 1979)

significar la desaparició completa de les primeres capes de creixement i s'haurà de tenir en compte per la determinació exacta de l'edat. Després d'aquesta corona d'os embrionari transitori, les 11 o 12 zones següents presenten un aspecte similar. Les dues o tres primeres són menys amples que les altres. La vascularització primària d'aquestes capes domina sobretot en un sector de la corona. Sota llum polaritzada, aquestes zones encara estan constituïdes per os fibrós que va evolucionant en zones superiors a os de fibres paral·leles, evidenciant un alentiment de la velocitat del dipòsit ossi. La llum polaritzada també ens revela l'existència de nombroses fibres de Sharpey radials (Castanet i Cheylan, 1979).

Les cèl·lules, més petites que les de l'os embrionari, tendeixen a agrupar-se al començament de cada zona. El límit entre dues zones consecutives (a nivell de les LAG) és pobre en cèl·lules. Aquesta repartició diferencial accentua l'expressió del fenomen del creixement cíclic. Els vasos sanguinis es situen també al començament de cada zona. Les microradiografies mostren que la mineralització de les diferents zones és pràcticament equivalent; tanmateix la distribució heterogènia de les cèl·lules ens pot induir a pensar que hi ha variacions que no es tradueixen a l'estat real de la mineralització (Castanet i Cheylan, 1979).

- LAG: La frontera entre dues zones consecutives apareix sota llum polaritzada com una línia neta, fosca o il·luminada, en oposició amb les zones (Fig. 4). En talls d'ossos descalcificats, tintats amb hematoxilina, aquestes línies molt cromòfiles són totalment comparables a les LAG descrites pels amfibis, els llangardaixos i les tortugues. A nosaltres, però, el mètode de tinció amb hematoxilina no és el que ens ha donat millor resultat, com veurem tot seguit. En microradiografies les LAG es mostren lleugerament hipermineralitzades. A ambdós costats de les mateixes no hi ha os laminar. En alguns casos les LAG poden aparèixer dobles o triples. Aquest fenomen té lloc essencialment a les regions amb velocitat de creixement més elevada. La divisió d'una LAG en dues o tres constitueix un grup de LAG que contarà només per una sola hibernació. Tot i així, les marques de creixement esquelètic del conjunt de les tortugues es troben generalment separades i fàcils de diferenciar per coloració amb hematoxilina. L'anàlisi histològica mostra que aquestes formacions tenen una periodicitat anual vinculada al cicle hibernació-estivació (Castanet i Cheylan, 1979).

2. Selecció dels millors mètodes

2.1. Metodologia

Després d'haver llegit i estudiat amb deteniment el treball de recerca anterior, calia valorar la qualitat del material i destriar els mètodes que havien donat més bon resultat, és a dir, aquells en que les marques de creixement eren més clares.

Per tal de portar-ho a terme, vam analitzar mètode per mètode tot el material que havíem obtingut, és a dir, les microfotografies realitzades al laboratori de l'escola, les realitzades al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i les electromicrofotografies realitzades al Servei de Microscopia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Les microfotografies realitzades a l'escola es varen descartar perquè les captures realitzades amb la Moticam 352 del laboratori de biologia quedaven molt lluny de la qualitat assolida amb l'equip de microfotografia del Departament de Biologia Cel·lular.

S'analitzaren un total de 54 microfotografies i 25 electromicrofotografies i de cada tècnica es va realitzar una selecció prèvia de 3 imatges amb tres grau d'ampliació diferents. Posteriorment, es va seleccionar el millor mètode i es varen escollir d'aquest les imatges per a realitzar els recomptes de línies, tal i com s'havia fet amb la mostra de Bàlsam del Canadà en un treball anterior (David Bretones, 2009). És a dir, resseguint les marques amb tinta sobre fotografies ampliades.

2.2. Resultats i discussió

Els tipus o grups de preparacions dels quals s'han analitzat les microfotografies, seguint el mateix ordre cronològic en que es van obtenir, són els següents:

- Tècnica de desgast (abrasió) sobre os sense descalcificar muntada en aigua (Fig. 13).
- Tècnica de desgast sobre os sense descalcificar muntada en bàlsam del Canadà (Fig.14)
- Tècnica de desgast sobre os sense descalcificar muntada en bàlsam del Canadà i observada amb microscopi de llum polaritzada (Fig. 15)
- Tècnica de tinció amb hematoxilina-eosina sobre os prèviament descalcificat i inclòs en parafina (Fig. 16)
- Tècnica de tinció tricròmica sobre os sense descalcificar (Fig. 17)
- Tècnica de tinció amb blau de toluïdina sobre os sense descalcificar (Fig.18)
- Tècnica d'observació al MER amb electrons retrodispersats (Fig. 19)

La tècnica de desgast (abrasió) sobre os sense descalcificar muntada en aigua, la de tinció amb hematoxilina-eosina sobre os prèviament descalcificat i inclòs en parafina i la de desgast sobre os sense descalcificar muntada i observada amb llum polaritzada no havien resultat gaire satisfactòries, ja que tot i que es distingien clarament anells en

algunes parts de l'os, en d'altres era del tot impossible diferenciar-los.

Figura 13. Microfotografies de tall transversal d'húmer de *Testudo hermanni,* amb la tècnica d'abrasió i mostra muntada en aigua. Selecció de tres imatges entre un total de 11.

Figura 14. Microfotografies de tall transversal d'húmer de *Testudo hermanni,* amb la tècnica d'abrasió i mostra muntada en bàlsam del Canadà. Selecció de tres imatges entre un total de 14.

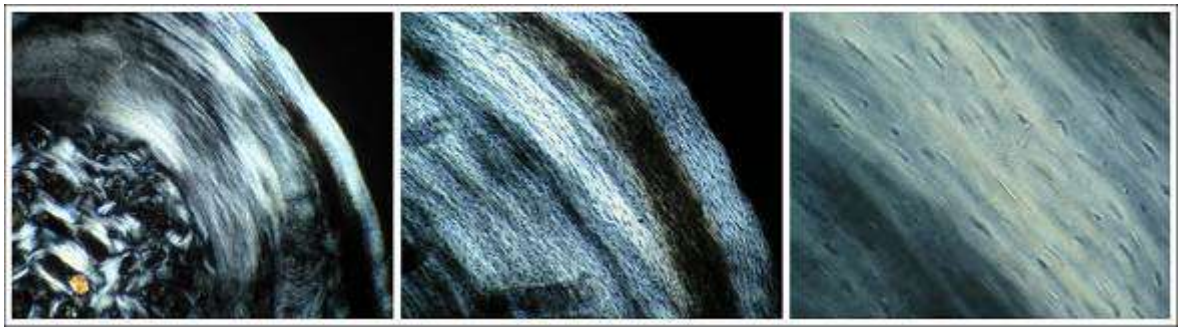


Figura 15. Microfotografies de tall transversal d'húmer de *Testudo hermanni,* amb la tècnica d'abrasió i mostra muntada en bàlsam del Canadà i observada amb microscopi de llum polaritzada al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Selecció de tres imatges entre un total de 9.

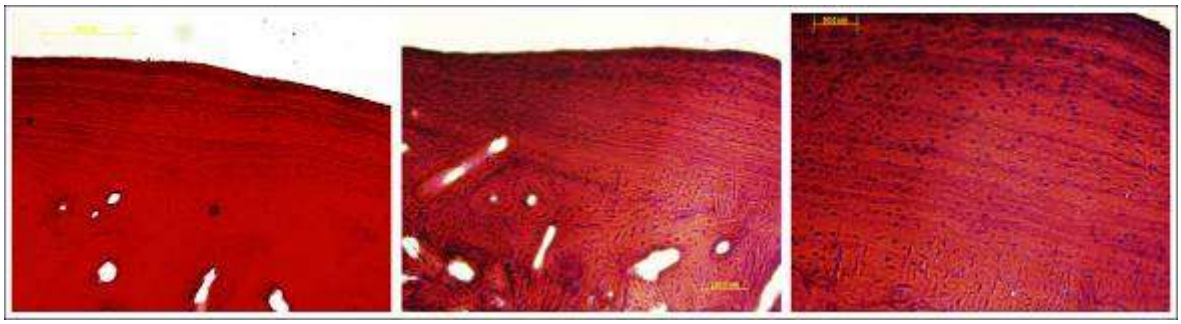


Figura 16. Microfotografies de tall transversal d'húmer de *Testudo hermanni,* amb la tècnica de tinció amb hematoxilina-eosina sobre os descalcificat inclòs en parafina. Selecció de tres imatges entre un total de 9. Procés realitzat al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

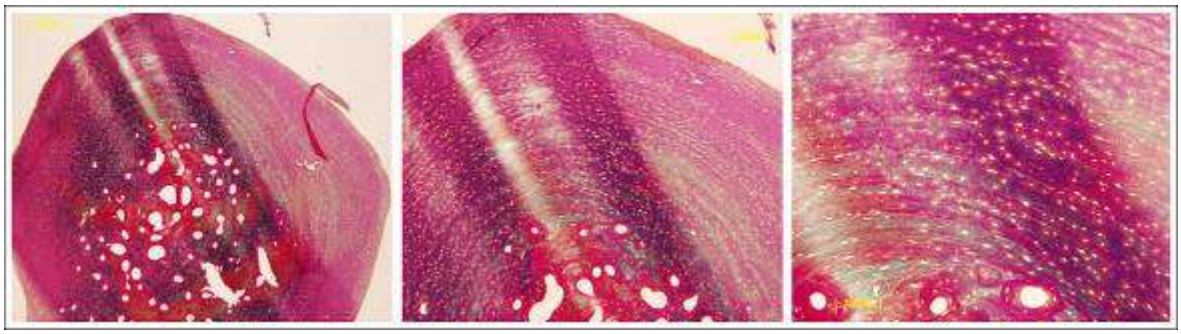


Figura 17. Microfotografies de tall transversal d'húmer de *Testudo hermanni,* amb la tècnica de tinció tricròmica sobre os sense descalcificar, tallat i polit prèviament amb un equip EXACT a la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Universitat de Barcelona. Selecció de tres imatges entre un total de 11.

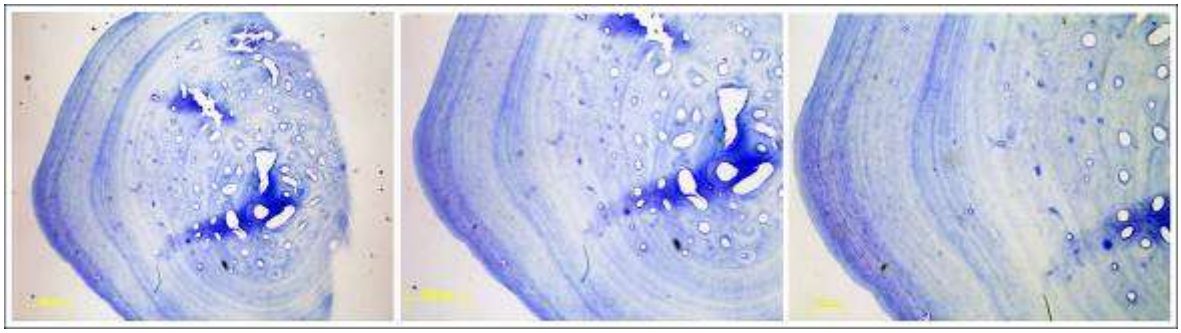


Figura 18. Microfotografies de tall transversal d'húmer de *Testudo hermanni,* amb la tècnica de tinció amb blau de toluïdina sobre os sense descalcificar, tallat i polit prèviament amb un equip EXACT a la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Universitat de Barcelona. Selecció de tres imatges entre un total de 11.

D'altra banda, el mètode d'abrasió o desgast va permetre l'observació nítida de les línies de creixement del tall de l'os de la tortuga. A partir d'aquesta mostra (veure *antecedents* a l'apartat 1.1.4), el David Bretones va poder contar entre 73 i 78 anells, xifres que coincideixen amb l'edat aproximada que els experts del CRARC havien suposat a la tortuga en qüestió.

Les dues variants de tinció en os sense descalcificar que es van incorporar (toluïdina i tricròmica), precisament, s'han manifestat com les tècniques més vàlides. És per aquest motiu que seran les tècniques rigorosament estudiades en la part pràctica d'aquest treball.

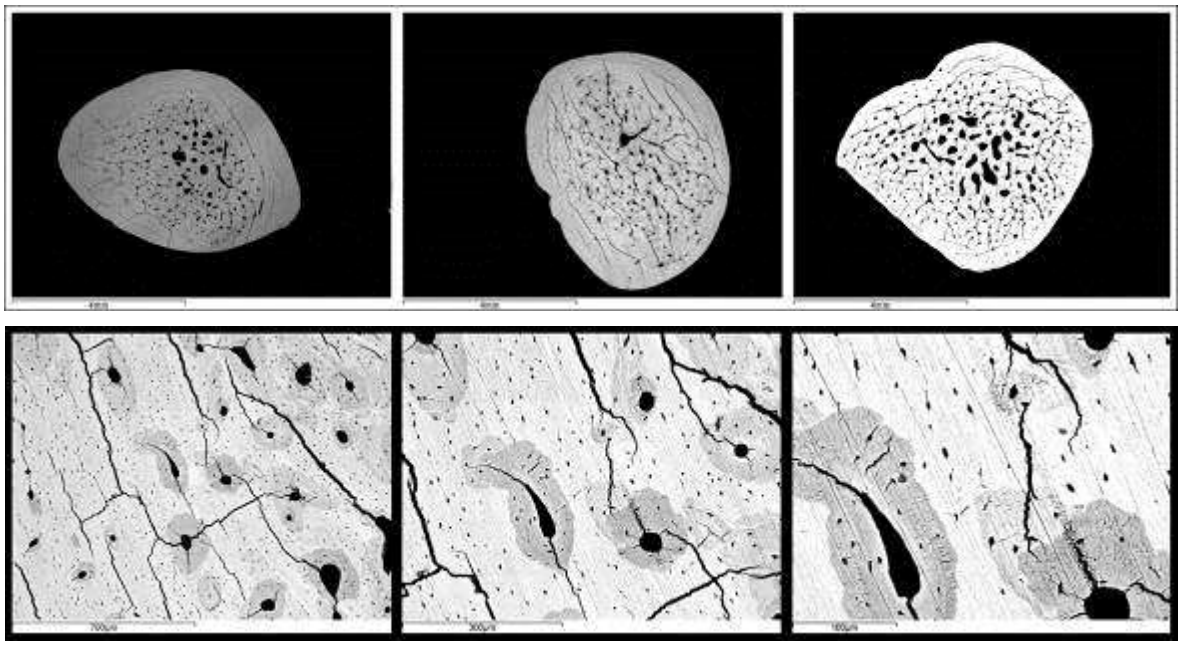


Figura 19. Electromicrografies de tall transversal de fèmur de *Testudo hermanni. A dalt:* seccions completes vistes al MER amb electrons retrodispersats (a mínim augment) de les mostres corresponents a les porcions proximal, mitjana i distal (respectivament, d'esquerra a dreta: T70C1, T70C2, T70C3) del fèmur, en les quals es pot observar clarament que la mostra mitjana tée menys teixit vascular. A baix: successives ampliacions de T70C2. Selecció de sis imatges entre un total de 25. Imatges obtingudes al Servei de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona

Per poder interpretar la informació que ens proporciona la figura 19, varem concertar una visita amb la doctora Manzanares de la unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Li preguntàrem si les línies observades amb microscòpia electrònica corresponen a veritables línies de creixement i ens va explicar que no totes ho són, sinó que algunes (marcades amb color blanc) corresponen a artefactes de la preparació. A més, ens va explicar que el seu color blanc està causat pel dipòsit de pols, fet que evidencia que es tracta de solcs produïts en la preparació. Tot i així, ens ha comentat que també s'observen algunes línies que són marques reals de creixement (marcades amb color negre i més estretes). D'altra banda, a partir de les imatges obtingudes per d'aquest mètode, ens ha mostrat les diferents capes de teixits de l'os, diferenciant les velles (d'un color més clar) de les més joves (més fosques, que envolten els vasos sanguinis). Tanmateix, com que no és un mètode gaire adient, observant els resultats obtinguts, ens va recomanat no repetir-lo ni donar-li més importància pel que fa la determinació de l'edat de la tortuga[15].

[15] Les línies més estretes entre dues de més gruixudes (Figura 19, a baix, a la dreta) podrien indicar que el creixement durant el període actiu tampoc és del tot uniforme, sinó que segueix un mena de ritmes, com també ho suggereixen les marques intra-anuals que s'observen entremig de les marques de creixement de la caparassa (Figura 3).

Un cop seleccionades les millors imatges obtingudes mitjançant les dues tècniques que es manifesten més vàlides (tinció en os sense descalcificar: toluïdina i tricròmica), és necessari marcar els anells de creixement que apareixen a les fotografies corresponents amb la finalitat de verificar la validesa de cada tècnica. Així doncs, hem fet, molt curosament, el recompte dels anells de dues mostres: la mostra T70B3 tenyida amb blau de toluïdina (Fig.21) i la mostra T70B3 amb tinció tricròmica (Fig.20).

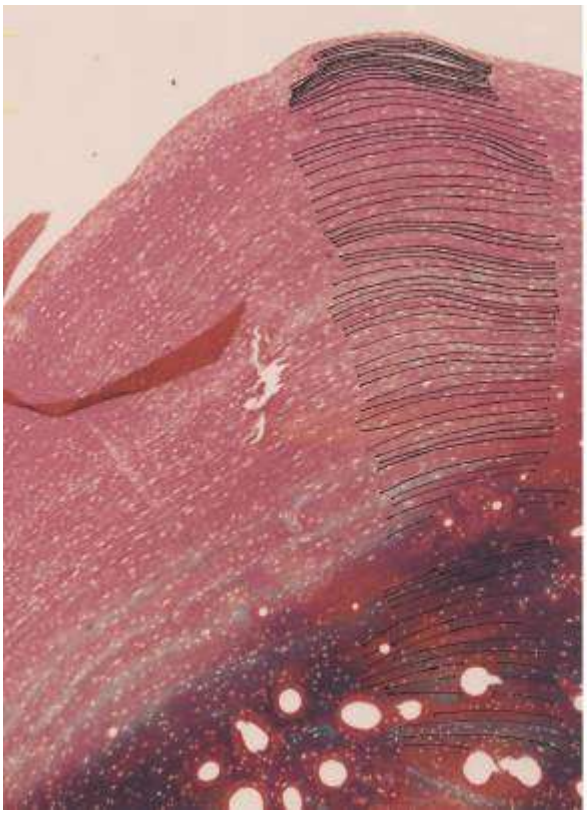


Figura 20: Microfotografia de la mostra T70B3 de tall transversal d'húmer que mostra el contatge de les marques de creixement del mètode amb tinció tricròmica.

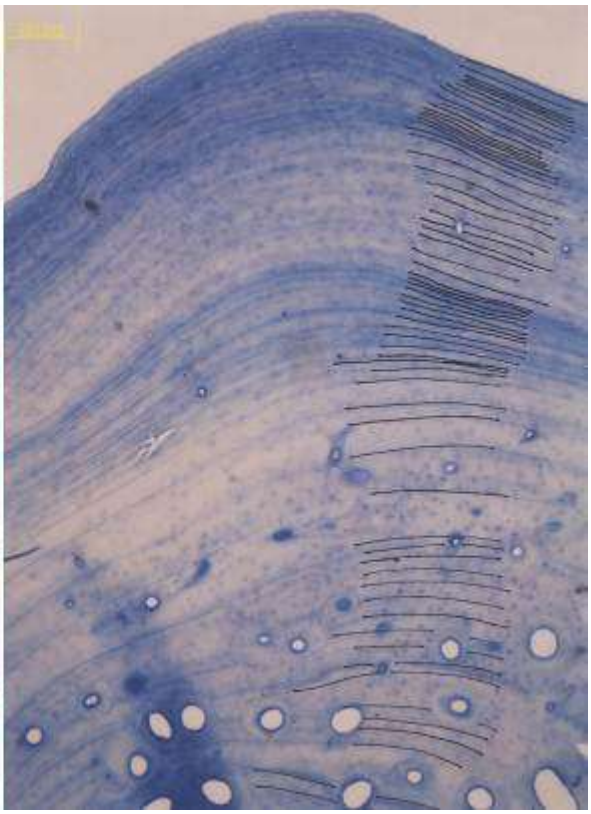


Figura 21: Microfotografia de la mostra T70B3 de tall transversal d'húmer que mostra el contatge de les marques de creixement del mètode amb tinció amb blau de toluïdina.

Es pot concloure que el mètode de tinció tricròmica no sembla el més adequat, ja que les marques de creixement són poc clares i precises, factor que s'accentua quan ho comparem a l'excel·lent nitidesa del mètode amb tinció amb blau de toluïdina. És per aquest motiu que, de tots els mètodes analitzats fins aquí, hem considerat que el de tinció amb blau de toluïdina era el millor candidat per a l'aplicació dels mètodes dendrològics (veure Apartat 4). Abans, però, calia incorporar una nova metodologia d'observació que havia quedat pendent, la d'interferència de Nomarski, per decidir quina era finalment l'escollida.

3. Altres determinacions

3.1. Interferència de Nomarski

3.1.1. Metodologia

El microscopi d'interferència es basa en principis similars als del microscopi de contrast de fases, però té l'avantatge de donar resultats quantitatius. Amb aquest instrument és possible determinar canvis en l'índex de refracció[16], mentre que el microscopi de fase tan sols revela les discontinuïtats més notables. A mes, les variacions de fase es poden reflectir en canvis de color tan accentuats que una cèl·lula vivent és susceptible d'assemblar-se a una preparació acolorida.

El microscopi de Nomarski és un tipus especial de microscopi d'interferència, en el qual un raig de llum únic travessa l'objecte i l'objectiu, però després es divideix en dos rajos que interfereixen entre sí per mitjà d'un prisma birefringent. S'utilitzen també filtres que actuen com a polaritzador i analitzador i un prisma compensador situat en el condensador del microscopi. La imatge resultant té un aspecte de relleu característic i presenta avantatges sobre l'òptica comú de contrast de fase. Aquest microscopi és particularment útil en l'estudi *in vivo* de cèl·lules en mitosi.

L'observació de talls de tres seccions equidistants d'os (proximal, mitjana i distal) que es va realitzar en un treball de recerca anterior (David Bretones, 2009) ens han servit també per a comprovar quina de les zones de l'os és la més idònia per a estudiar les línies, resultant que de les tres mostres, la T70C2 (mitjana) era la que es podia obtenir millor resultat i per tant la que s'hauria d'utilitzar sempre ja que d'aquesta manera la mostra conté menys teixit vascular (que està més centralitzat) i les marques perifèriques, al no estar tan juntes com passa en el cas de les dues mostres proximal i distal, s'observen millor (Fig. 19).

Per tal de dur a terme l'observació amb el microscopi de Nomarski, vàrem anar al Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, ja que a l'escola no disposem d'aquest tipus de microscopi. Utilitzàrem dues mostres, una procedent del processat per a microscòpia electrònica corresponent a la mostra T70C2, de fèmur, i una segona, la mostra T70B4, d'húmer i muntada en bàlsam del Canadà. Ambdues van ser preparades en un treball de recerca anterior (David Bretones, 2009), però la destinada a l'observació al microscopi electrònic estava inclosa en plàstic, de manera que va ser necessari realitzar un tall i posteriorment, polir-lo amb paper de vidre especial[17]. Tot aquest procés es va portar a terme al Departament d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona amb la direcció i ajuda de la Dra. Manzanares.

[16] Quocient entre la velocitat de les ones electromagnètiques en el buit i la velocitat d'aquestes en un medi material determinat.

[17] Per realitzar el tall es va utilitzar una serra de banda Exact (descrita al treball de recerca de David Bretones) i també una polidora Exact.

3.1.2. Resultats i discussió

Figura 22: Observació de les mostres al microscopi d'interferència de Nomarski. La sensació de relleu (3D) s'aconsegueix amb l'ajustament d'un cargol frontal (imatge esquerra). Les imatges eren capturades per una càmera connectada al microscopi i provista de visor de pantalla digital en temps real (imatge dreta).

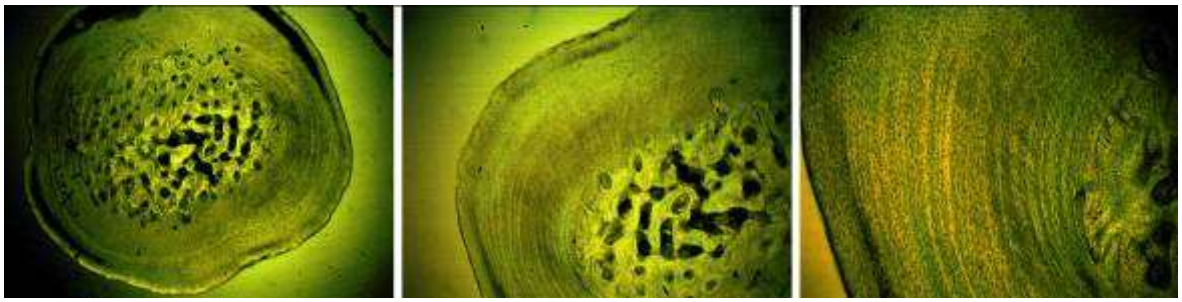


Figura 23: Microfotografia de la mostra T70B4 de tall transversal d'húmer obtinguda amb l'observació al microscopi de Nomarski.

La mostra T70C2, procedent de l'observació amb microscopi electrònic no va donar gaire bon resultat, possiblement per la gran quantitat d'esquerdes originades al haver estat diverses hores al buit. Aquest procés és requerit per a l'observació amb microscopia electrònica. La mostra T70B4, per altra banda, era la mateixa que s'havia utilitzat en les altres tècniques osteocronològiques i era, per tant, la més adequada per a comparar-les.

L'observació interferencial de Nomarski (Fig. 23) ens recorda la de microscopi de llum polaritzada (Fig.15), però la primera presenta molta més sensació de relleu i més nitidesa.

Observant la mostra muntada en bàlsam del Canadà vam poder detectar, tal i com es mostra en les figures 22 i 23, nombroses marques de creixement. Cal remarcar que els anells eren molt més accentuats en l'observació directa que en les fotografies realitzades. Tot i així, malgrat que és un mètode vàlid, les marques no arriben al grau de nitidesa de les tenyides amb blau de toluïdina, que és, finalment, la que hem seleccionat per aplicar els mètodes dendrocronològics.

4. Aplicació dels mètodes dendrocronològics

La paraula dendrocronologia deriva del grec *dendron* -arbre-, *crono* -temps- i *logo* -coneixement- i denomina una disciplina científica dotada d'un conjunt de principis, tècniques i mètodes que permeten datar els anells de creixement anuals, extreure, separar i interpretar la informació que contenen dels diferents factors que han influït en el seu creixement.

4.1. Metodologia

Com a part experimental del treball i amb la finalitat de fer la intravalidació del material obtingut en cada mostra del treball de recerca anterior, utilitzarem els mètodes dendrocronològics, ja que és en aquest àmbit on la tècnica del recompte dels anells està més desenvolupada. Per poder obtenir la informació que necessitàvem sobre el tema vam anar a visitar una experta en dendrocronologia: la Doctora Emília Gutiérrez del Departament d'Ecologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. La doctora Gutiérrez ens va dir que primerament, caldria determinar si realment cada línea correspon a un any, si hi ha anys absents (anells de creixement que no es veuen a causa de reabsorcions o de la proximitat entre diferents marques de creixement) i si cal tenir en compte les marques de creixement de la part central de l'ós (si és un teixit que creix o es manté intacte a mesura que la tortuga creix).

Pel que fa a la periodicitat de la formació de marques de creixement, com ja s'ha esmentat en la introducció, cal tenir en compte que les tortugues que viuen en zones on el clima és temperat tenen una única fase de creixement anual, donat que en aquests indrets hi ha una diferència estacional marcada. D'aquesta manera, l'interval de temps entre dues marques de creixement del tipus de tortugues esmentat és equivalent a un any (Zug, 1991). Aquesta correlació ha estat comprovada amb animals d'edat coneguda (Castanet i Cheylan, 1979). Així doncs, en el cas de la tortuga estudiada, cada anell es pot associar a un any.

Les altres qüestions plantejades seran resoltes amb els procediments que utilitzarem a continuació.

4.1.1. Validació de les datacions individuals mitjançant el mètode *Skeleton plot* (Datació creuada)

La datació creuada és la pràctica més important del conjunt de mètodes dendrocronològics i el seu objectiu és detectar i corregir la falta de sincronització entre les sèries d'anells (Gutiérrez, 2008).
Els arbres utilitzats en la datació creuada, cros-datació o inter-datació, han de formar anells anuals. I un o uns pocs factors ambientals (climàtics) han de dominar limitant el creixement sobre una regió gran. En aquestes condicions, els arbres sensibles a la variabilitat del clima reaccionen mostrant els efectes d'aquest factor. Quan els arbres creixen en condicions òptimes, en l'àrea del centre de la seva distribució geogràfica, o

fora d'ella però en bones condicions ambientals, les sèries d'anells anuals solen mostrar una baixa variabilitat interanual, es tracta de sèries complaents. Fora d'aquestes àrees o hàbitats on les condicions ambientals (clima) no són tan benignes la variabilitat interanual és elevada com a conseqüència del major efecte limitant d'aquestes condicions sobre el creixement (sèries sensibles). Aquestes sèries són més fàcils de datar ja que presenten tot un conjunt d'anells característics comuns a tots o a la majoria dels arbres de la regió.

La tortuga 7492 compleix, aparentment, els factors requerits per aplicar el mètode dendrocronològic, donat que viu en una zona temperada, de manera que la formació dels anells és anual (Zug, 1991). Aquesta correlació ha estat comprovada, com ja hem dit, amb exemplars de *Testudo hermanni* d'edat coneguda (Castanet i Cheylan, 1979). Ara bé, hem dit "aparentment" perquè, així com en el cas dels arbres -que estan fixos en un indret- el clima és l'única variable a tenir en compte, en els animals -que tenen mobilitat i un tipus de nutrició diferent- la variabilitat interanual és més difícil d'interpretar. Per exemple, una zona (espai entre dos anells) més ampla és indicador de més creixement, però no sabem si aquest és degut al clima o a que l'animal ha trobat un indret (o unes condicions) amb més aliment. Aquesta interpretació es complica encara més si tenim en compte que aquests animals poden haver viscut en captivitat, on les condicions de vida poden dependre de molts altres factors. Malgrat aquesta dificultat per a poder interpretar les causes, el que sí sembla clar és que es podrà utilitzar la variabilitat trobada com indicador de si les condicions de vida de l'animal en un període determinat han estat relativament bones o més aviat dolentes.

4.1.1.1. Identificació: Recompte dels anells en diferents radis d'una mateixa mostra.

Per iniciar la comprovació de la certesa de l'anàlisi del material obtingut, primerament, és necessari comptar els anells de creixement d'una mateixa mostra en diverses parts (radis) de la mateixa. Aquest procediment ens permetria saber si hi ha alguns anells que, tot i que no s'hagin vist en altres parts del tall de l'os, són presents i cal tenir-los en compte[18].

Així com la tècnica amb tinció tricròmica no mostrava amb gaire nitidesa les línies de creixement, el mètode amb tinció amb blau de toluïdina ha resultat ser el més fiable i en el que les línies de creixement són més clares i diferenciades. És per aquest motiu que realitzarem el recompte dels anells en diferents radis únicament en aquesta mostra (Fig.24).

El nombre d'anells comptats en diferents parts del tall de l'os ha estat diferent, però la diferència no ha resultat ser gaire àmplia. Tot i així, realitzant el recompte de les marques de creixement s'ha pogut observar el problema que plantejava la doctora Gutiérrez: l'existència d'anells de creixement que no són visibles en determinades parts de l'os a causa de reabsorcions o la proximitat entre diferents marques de creixement.

[18]La doctora Gutiérrez ens ha explicat que és possible que hi hagi marques de creixement clarament observables en una part de l'os i indistingibles en d'altres.

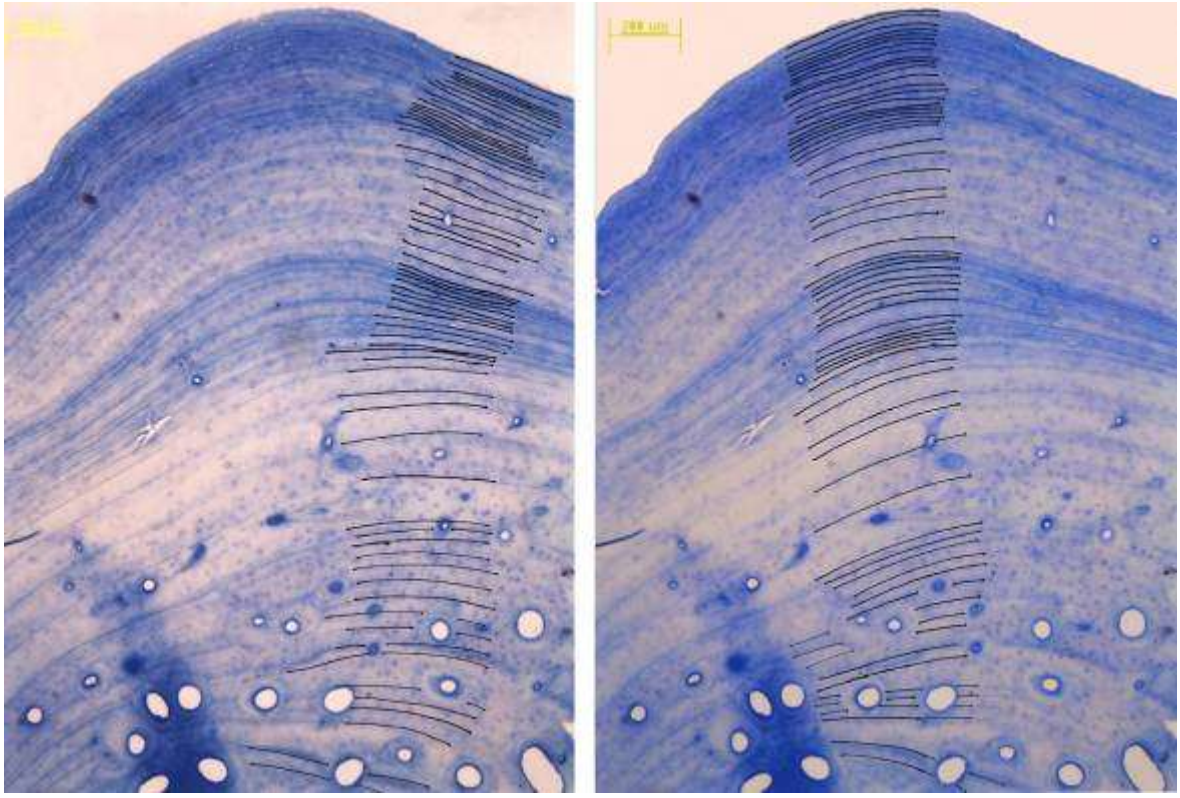


Figura 24: Recompte dels anells des de dos radis diferents de la mostra amb tinció amb blau de toluïdina. Al llarg del treball anomenarem al radi 1; mostra 1 i al radi 2; mostra 2.

Un cop comptats els anells, ens hem trobat amb el problema que la imatge en la qual havíem efectuat el recompte estava retallada, de manera que no contenia la part central de l'os completa. Com que no teníem gaire clar si les línies centrals eren veritables línies de creixement o corresponien a marques de posteriors sistemes de Havers, ho hem consultat amb la doctora Manzanares de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Universitat de Barcelona. Ella ens ha comentat que aquestes línies no són marques fetes pels nous sistemes de Havers, sinó que corresponen a restes d'antics anells de creixement. Per tant aquesta zona de l'os també l'hem de tenir en compte, ja que en aquesta part també hi ha anells, com hem pogut observar en una altra microfotografia del tall no tant ampliada (Fig.25). Tenint en compte el factor esmentat, hem pogut contar uns 70 anells de creixement en total, sumant els 6 detectats a la part central de l'os i els 64 contats anteriorment a la imatge d'un fragment més ampliada (Fig.24).

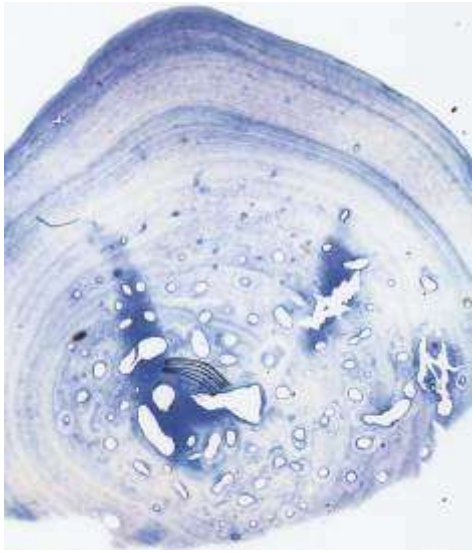


Figura 25: Imatge completa del tall de l'os amb tinció amb blau de toluïdina. Es mostren en negre 6 marques centrals de creixement, no visibles en la figura 24.

4.1.1.2. Datació

La datació de les seqüències d'anells dels arbres ve facilitada perquè és una seqüència que està ancorada en el temps, ja que l'últim anell correspon a l'últim any de creixement (Stokes & Smiley 1968). De manera que retrocedint cap a enrere en la seqüència d'anells, és a dir en el temps, es va assignant a cadascun d'ells l'any de calendari durant el qual es va formar.

Pel que fa a les tortugues, tenint en compte que l'os creix en sentit de dins a fora (tal i com s'explica a l'article de Cheylan i Castanet, i com ens van confirmar els experts del CRARC) també és possible datar l'últim anell, és a dir, posar l'any real. Aquest fet ens permet datar la resta d'anells observats en el tall de l'os (Fig. 26)

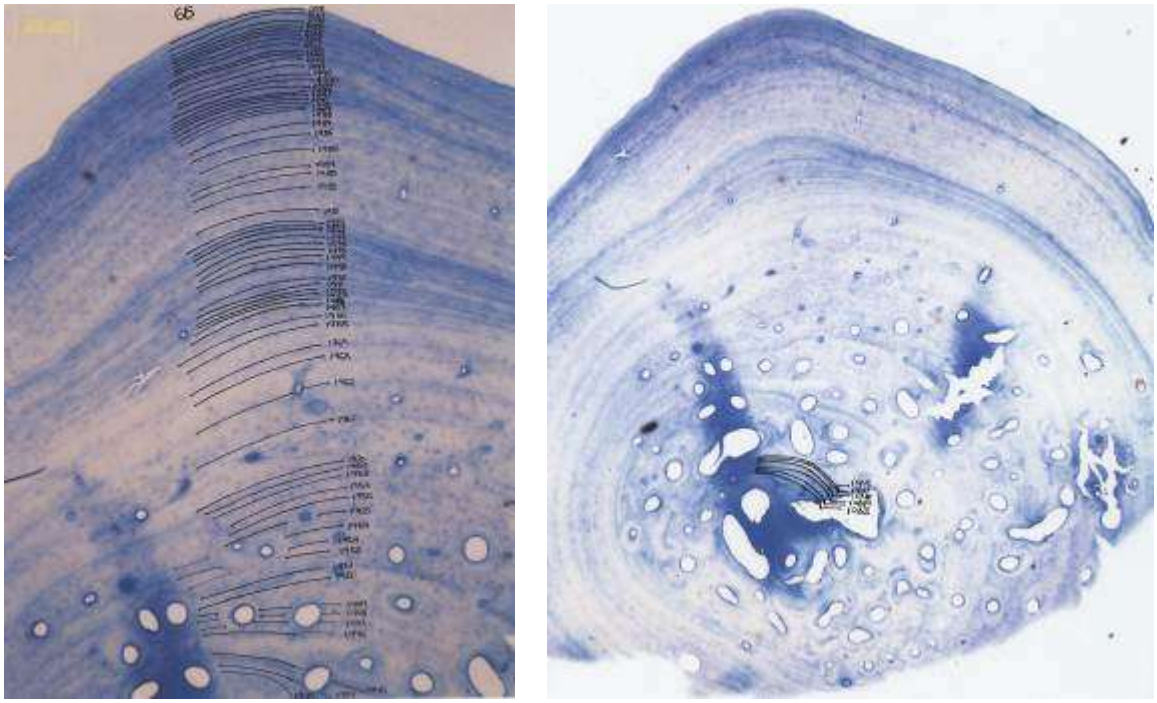


Figura 26: Datació del radi 2 de la mostra tenyida amb blau de toluïdina, la qual ens permet contar una edat aproximada de 72 anys.

Els anys marcats en aquestes imatges representen l'acabament del període d'hibernació (febrer o març), que també es correspon amb l'època de l'any en què es va trobar morta la tortuga (vegeu Apartat 4.1.2).

Les tres últimes marques de creixement corresponen als tres últims anys de vida de la tortuga, durant els quals va viure a l'escola (Fig. 27). Observant amb deteniment aquests anells, detectem que les zones entre les marques esmentades, a excepció de la última (que és gairebé inexistent, vegeu Apartat 4.1.2) són més amples que en els anys anteriors. Això vindria a indicar que la tortuga havia estat ben alimentada durant els períodes actius que va viure al pati de les tortugues de l'escola.

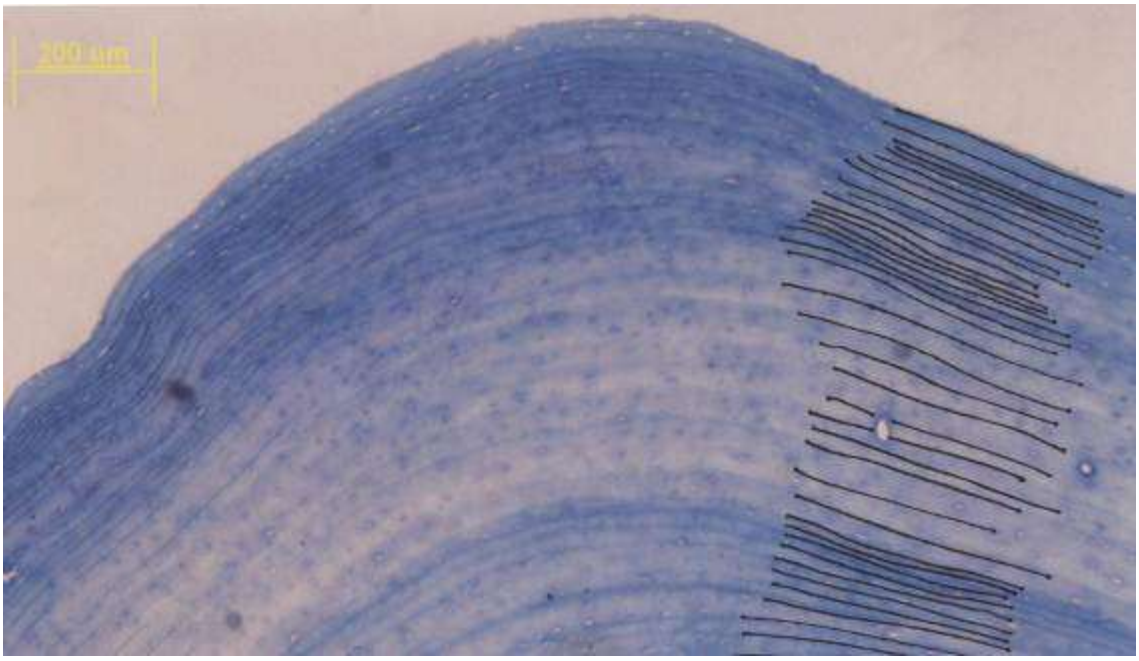


Figura 27: Part més externa de la mostra tenyida amb blau de toluïdina, en la qual podem observar que les zones entre les 3 últimes LAG són més gruixudes que les anteriors.

4.1.1.3. Llistat d'anells característics

Després de realitzar la datació dels anells, cal fer una taula, en la qual es mostra el número de cada anell i la seva característica principal de cadascuna de les marques de creixement corresponents. Analitzarem els dos radis de la mostra amb blau de toluïdina. Dividirem els anells entre:

- Estrets, característica simbolitzada amb una E;
- Amples, propietat marcada amb una A.

Nº	Any	Mostra 1	Mostra 2	Nº	Any	Mostra 1	Mostra 2	Nº	Any	Mostra 1	Mostra 2
0	2008	E	E	**22**	1986	A	A	**44**	1964	A	A
1	2007	A	E	**23**	1985	A	A	**45**	1963	A	A
2	2006	A	A	**24**	1984	A	A	**46**	1962	A	A
3	2005	E	E	**25**	1983	A	A	**47**	1961	A	A
4	2004	E	E	**26**	1982	A	A	**48**	1960	A	A
5	2003	E	E	**27**	1981	A	A	**49**	1959	A	A
6	2002	E	E	**28**	1980	A	A	**50**	1958	A	A
7	2001	E	E	**29**	1979	E	E	**51**	1957	A	A
8	2000	E	A	**30**	1978	E	E	**52**	1956	A	A
9	1999	E	E	**31**	1977	E	E	**53**	1955	A	A
10	1998	E	E	**32**	1976	E	E	**54**	1954	A	A

11	1997	E	E	**33**	1975	E	E	**55**	1953	A	A
12	1996	E	E	**34**	1974	E	E	**56**	1952	A	A
13	1995	E	E	**35**	1973	E	E	**57**	1951	A	A
14	1994	E	E	**36**	1972	E	A	**58**	1950	A	A
15	1993	E	E	**37**	1971	E	E	**59**	1949	A	A
16	1992	E	E	**38**	1970	E	E	**60**	1948	A	A
17	1991	E	E	**39**	1969	E	E	**61**	1947	A	A
18	1990	A	E	**40**	1968	E	E	**62**	1946	A	A
19	1989	A	E	**41**	1967	A	E	**63**	1945	A	A
20	1988	A	E	**42**	1966	A	A	**64**	1944		A
21	1987	A	A	**43**	1965	A	A	**65**	1943		A

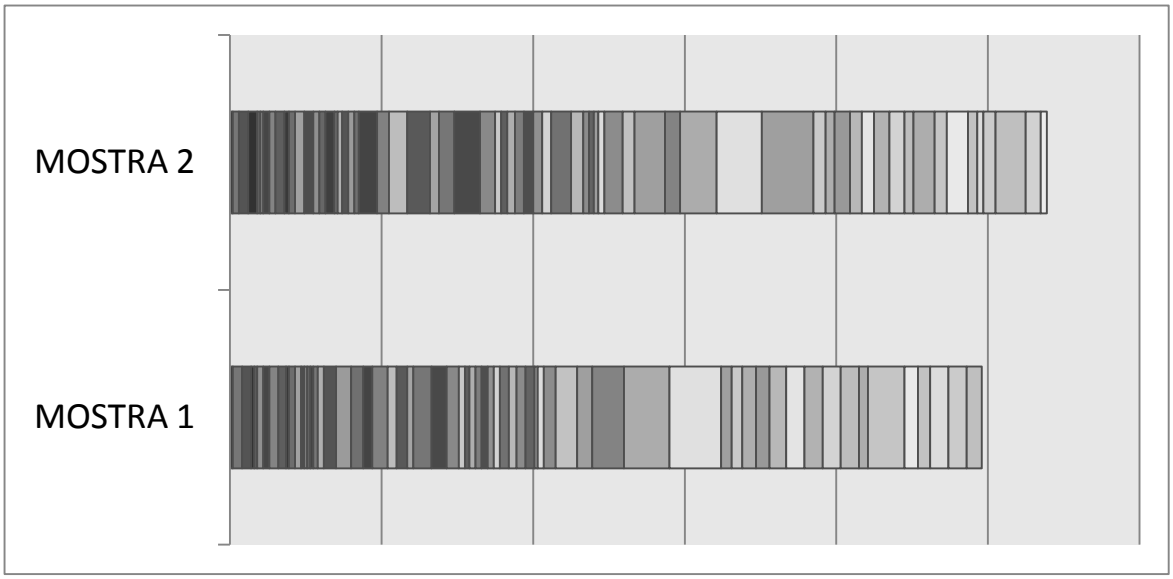
Podem observar poques diferències entre l'amplada de les zones dels dos radis. En ambdós casos trobem cinc sèries d'anells clarament diferenciades: 2 sèries estretes, on els anells estan més junts i 3 sèries amples, on la distància entre els anells és més gran. Aquestes sèries les tindrem en compte en el mètode *skeleton plot* i en la datació creuada que realitzarem a continuació.

4.1.1.4. Skeleton plot

El gruix dels anells de creixement pot variar entre les mostres, però la seqüència ha de seguir un mateix patró en tractar-se d'un mateix individu. El gràfic que registra les variacions principals en el gruix dels anells d'una mostra, destacant els que es desvien significativament de la mitjana, ja sigui per estrets com per amples, s'anomena *skeleton plot*. Mitjançant l'elaboració i comparació dels gràfics *skeleton plot* de les nostres dues mostres podem identificar els anys crítics per creixement molt bo o molt limitat i per tant datar-los amb precisió. Tot i que en dendrologia aquest mètode es basa en la mesura dels anells de creixement, en el nostre cas hem mesurat les zones clares de les nostres mostres, ja que aquesta mesura ens dóna la mateixa informació i la podem fer amb més precisió. Els resultats corresponents són:

Nº	Any	Mostra 1 (mm)	Mostra 2 (mm)	Nº	Any	Mostra 1 (mm)	Mostra 2 (mm)	Nº	Any	Mostra 1 (mm)	Mostra 2 (mm)
0	2008	1	1	**22**	1986	5	4	**44**	1964	5	10
1	2007	3	2	**23**	1985	3	6	**45**	1963	10,5	5
2	2006	3	3	**24**	1984	3,5	7,5	**46**	1962	15	12
3	2005	1	3	**25**	1983	2	3	**47**	1961	17	15
4	2004	1	1	**26**	1982	6	5	**48**	1960	3,5	17
5	2003	2	1	**27**	1981	5	8,5	**49**	1959	3,5	4
6	2002	2	2	**28**	1980	4	5	**50**	1958	4,5	3
7	2001	3	2	**29**	1979	2	2	**51**	1957	4,5	5
8	2000	2,5	3	**30**	1978	1,5	2	**52**	1956	5,5	4
9	1999	1	1,5	**31**	1977	2	2,5	**53**	1955	6	4
10	1998	2	2	**32**	1976	2	3	**54**	1954	6	5
11	1997	2	3	**33**	1975	2	3	**55**	1953	6	5
12	1996	1	3	**34**	1974	2	3	**56**	1952	6	3
13	1995	1	2	**35**	1973	2	3	**57**	1951	3	7
14	1994	1	2	**36**	1972	3	6,5	**58**	1950	12	4
15	1993	1	3	**37**	1971	2,5	4	**59**	1949	4,5	7
16	1992	1,5	1	**38**	1970	3	2	**60**	1948	4	3
17	1991	2	1,5	**39**	1969	3	1,5	**61**	1947	6	2
18	1990	4	2	**40**	1968	1	1,5	**62**	1946	6	4
19	1989	5	2	**41**	1967	2	2	**63**	1945	5	10
20	1988	4	1,5	**42**	1966	4	6	**64**	1944		5
21	1987	3	6	**43**	1965	7	4	**65**	1943		2

La representació gràfica d'aquestes dades és la següent:



Per poder identificar els anys crítics en un o altre sentit, calculem el gruix mitjà de les zones de cada mostra i la diferència entre aquest valor i el gruix individual de cada zona:

- Valor promig mostra 1: 3,875 mm
- Valor promig mostra 2: 4,083 mm

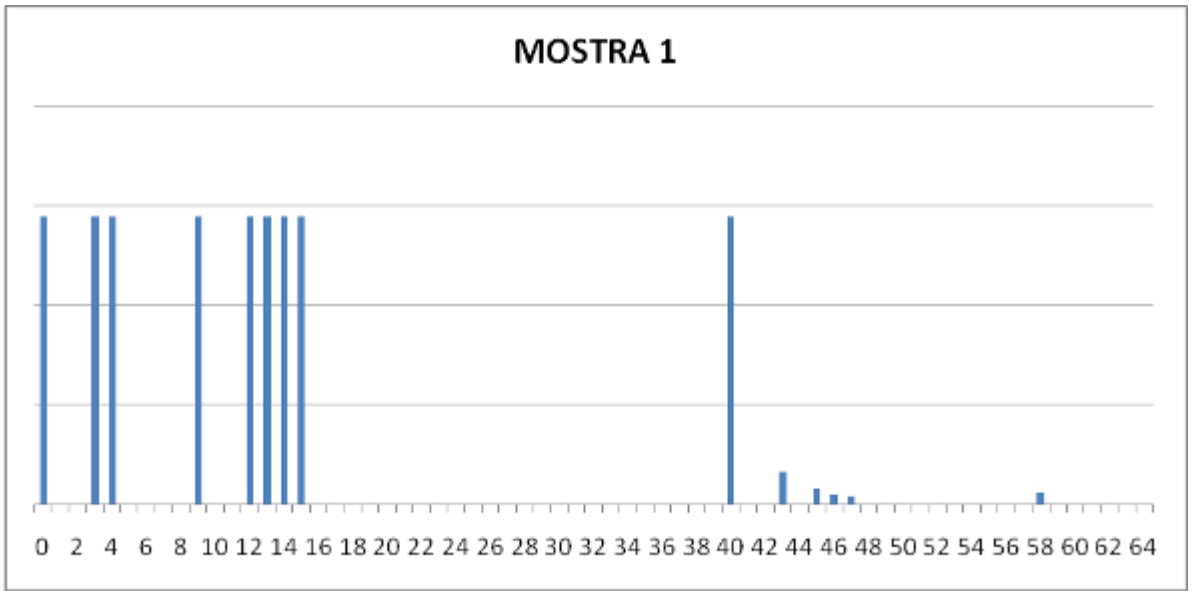
La taula següent registra les desviació del gruix de cada zona respecte al promig. Hem assenyalat amb color groc les desviacions més significatives per baix (zones molt estretes) i amb color verd les desviacions superiors (zones molt amples) més marcades.

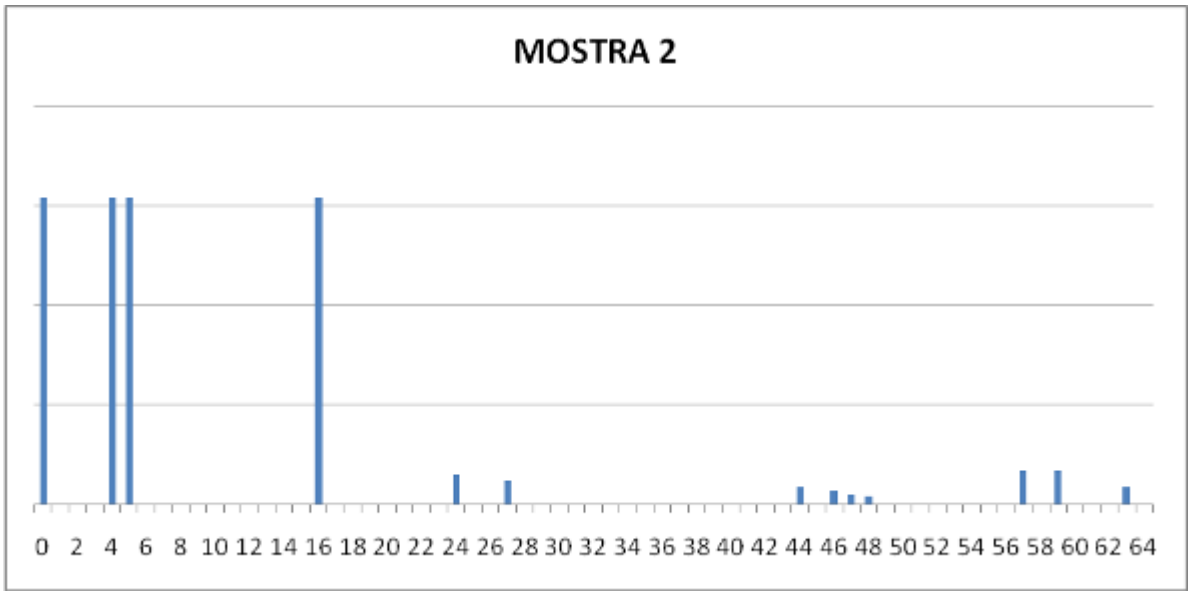
Zona	Any	Gruix zones mostra 1 (mm)	Gruix zones mostra 2 (mm)	Desviació promig mostra 1 (mm)	Desviació promig mostra 2 (mm)
0	2008	1	1	-2,875	-3,083
1	2007	3	2	-0,875	-2,083
2	2006	3	3	-0,875	-1,083
3	2005	1	3	-2,875	-1,083
4	2004	1	1	-2,875	-3,083
5	2003	2	1	-1,875	-3,083
6	2002	2	2	-1,875	-2,083
7	2001	3	2	-0,875	-2,083
8	2000	2,5	3	-1,375	-1,083
9	1999	1	1,5	-2,875	-2,583
10	1998	2	2	-1,875	-2,083
11	1997	2	3	-1,875	-1,083
12	1996	1	3	-2,875	-1,083
13	1995	1	2	-2,875	-2,083
14	1994	1	2	-2,875	-2,083
15	1993	1	3	-2,875	-1,083

16	1992	1,5	1	-2,375	-3,083
17	1991	2	1,5	-1,875	-2,583
18	1990	4	2	0,125	-2,083
19	1989	5	2	1,125	-2,083
20	1988	4	1,5	0,125	-2,583
21	1987	3	6	-0,875	1,917
22	1986	5	4	1,125	-0,083
23	1985	3	6	-0,875	1,917
24	1984	3,5	7,5	-0,375	3,417
25	1983	2	3	-1,875	-1,083
26	1982	6	5	2,125	0,917
27	1981	5	8,5	1,125	4,417
28	1980	4	5	0,125	0,917
29	1979	2	2	-1,875	-2,083
30	1978	1,5	2	-2,375	-2,083
31	1977	2	2,5	-1,875	-1,583
32	1976	2	3	-1,875	-1,083
33	1975	2	3	-1,875	-1,083
34	1974	2	3	-1,875	-1,083
35	1973	2	3	-1,875	-1,083
36	1972	3	6,5	-0,875	2,417
37	1971	2,5	4	-1,375	-0,083
38	1970	3	2	-0,875	-2,083
39	1969	3	1,5	-0,875	-2,583
40	1968	1	1,5	-2,875	-2,583
41	1967	2	2	-1,875	-2,083
42	1966	4	6	0,125	1,917
43	1965	7	4	3,125	-0,083
44	1964	5	10	1,125	5,917
45	1963	10,5	5	6,625	0,917
46	1962	15	12	11,125	7,917
47	1961	17	15	13,125	10,917
48	1960	3,5	17	-0,375	12,917
49	1959	3,5	4	-0,375	-0,083
50	1958	4,5	3	0,625	-1,083
51	1957	4,5	5	0,625	0,917
52	1956	5,5	4	1,625	-0,083
53	1955	6	4	2,125	-0,083
54	1954	6	5	2,125	0,917
55	1953	6	5	2,125	0,917
56	1952	6	3	2,125	-1,083
57	1951	3	7	-0,875	2,917
58	1950	12	4	8,125	-0,083
59	1949	4,5	7	0,625	2,917

60	1948	4	3	0,125	-1,083
61	1947	6	2	2,125	-2,083
62	1946	6	4	2,125	-0,083
63	1945	5	10	1,125	5,917
64	1944		5	-3,875	0,917
65	1943		2	-3,875	-2,083

Finalment, elaborem el gràfic *skeleton plot* posant a l'eix d'abcisses el número de cada zona i a l'eix d'ordenades un valor que assignem a la diferència entre el gruix de la zona i el promig. S'assignen a les zones més primes els valors resultants de multiplicar per -1 la desviació corresponent, i a les zones més gruixudes els valors obtinguts calculant la inversa de la desviació corresponent. D'aquesta manera, a les zones més primes els corresponen els valors més alts i a les més gruixudes els valors més baixos. Només es representen les desviacions més importants.





La comparació dels dos gràfics ens permet arribar a les conclusions següents:

- Es ratifica la presencia de 5 sèries diferenciades de creixement, tal i com ja havíem vist en l'apartat anterior. Utilitzarem els anells limítrofs de cada sèrie en la datació creuada.
- La mostra 1 es mostra més detallada en els anells representatius dels darrers anys de vida de la tortuga, mentre que la mostra 2 ens dóna informació més precisa dels primers anys de vida de la tortuga així com en algunes etapes intermèdies. Aquest fenomen ens confirma l' interès d'analitzar més d'un radi per millorar la precisió dels resultats finals.
- Cal destacar la presència en l'*skeleton plot* de la mostra 1 d'una zona molt petita a l'anell 40 que no té cap mena de correspondència en la mostra 2. D'altra banda, a la mostra 2 trobem 2 zones molt grans en els anells 24 i 27 que no tenen correspondència amb la mostra 1. Intentarem trobar una explicació a aquests resultats en l'anàlisi detallada de cada sèrie que farem en la datació creuada.

4.1.1.5. Datació creuada

A mode de comprovació de la fiabilitat de les datacions individuals de les seqüències d'anells, és necessari dur a terme la comparació de les dades individuals. Aquest procés s'anomena interdatació o datació creuada. Es basa en la sincronia que hi ha en el patró d'anells característics dels individus que han crescut sota les mateixes condicions climàtiques durant un període comú.

En aquest cas disposem únicament d'un individu, de manera que utilitzarem la datació creuada per trobar un patró vàlid per les datacions obtingudes amb l'anàlisi de dos radis de la mostra tenyida amb blau de toluïdina.

Tal i com s'ha descrit anteriorment, el mètode de datació creuada es basa en la sincronització de determinats anells. Més concretament, quan es produeix un canvi important en l'aspecte de les marques de creixement, és a dir, en l'amplada de les zones, donant lloc a l'inici d'una sèrie de marques de creixement de característiques semblants, es pot afirmar que el primer anell d'aquesta sèrie és el mateix pels dos radis que analitzem. Això implica que l'anell en qüestió es va formar el mateix any.

Als dos radis objecte del nostre estudi observem cinc sèries molt marcades, ja esmentades anteriorment. Això ens permet sincronitzar els anells següents:

Sèrie	Mostra 1		Mostra 2	
1	Anell 17	1991	Anell 20	1988
2	Anell 27	1981	Anell 27	1981
3	Anell 42	1966	Anell 43	1965
4	Anell 47	1961	Anell 48	1960
5	Anell 63	1945	Anell 65	1943

Un cop feta aquesta sincronització d'anells, hem d'assignar un nombre d'anys a cada sèrie. Aquesta assignació sempre es fa per defecte, és a dir que hem d'escollir l'opció que representa més anys. Així doncs, en el nostre cas el resultat és el següent:

Sèrie	Mostra seleccionada	Anys sèrie
1	2	21
2	1	10
3	2	16
4	1 o 2	5
5	2	17

La diferència entre els anells de les dues mostres a la segona sèrie es correspon amb l'observació feta a l'skeleton plot. La mostra 2 presenta dos anells menys en aquesta sèrie, i tal com hem vist en l'skeleton plot, té dues zones molt grans dins de la mateixa que no s'observen a la mostra 1. Això pot indicar que, en realitat, les 2 zones amples de la mostra 2 representen 2 períodes de creixement cadascuna.

Mitjançant la datació creuada podem dir que l'edat de la tortuga, obtinguda a partir de la suma dels anys de cada sèrie i afegint-hi els 6 anys de la part central, no representats en aquestes mostres però prèviament identificats, és de 75 anys (Fig. 28 i 29)

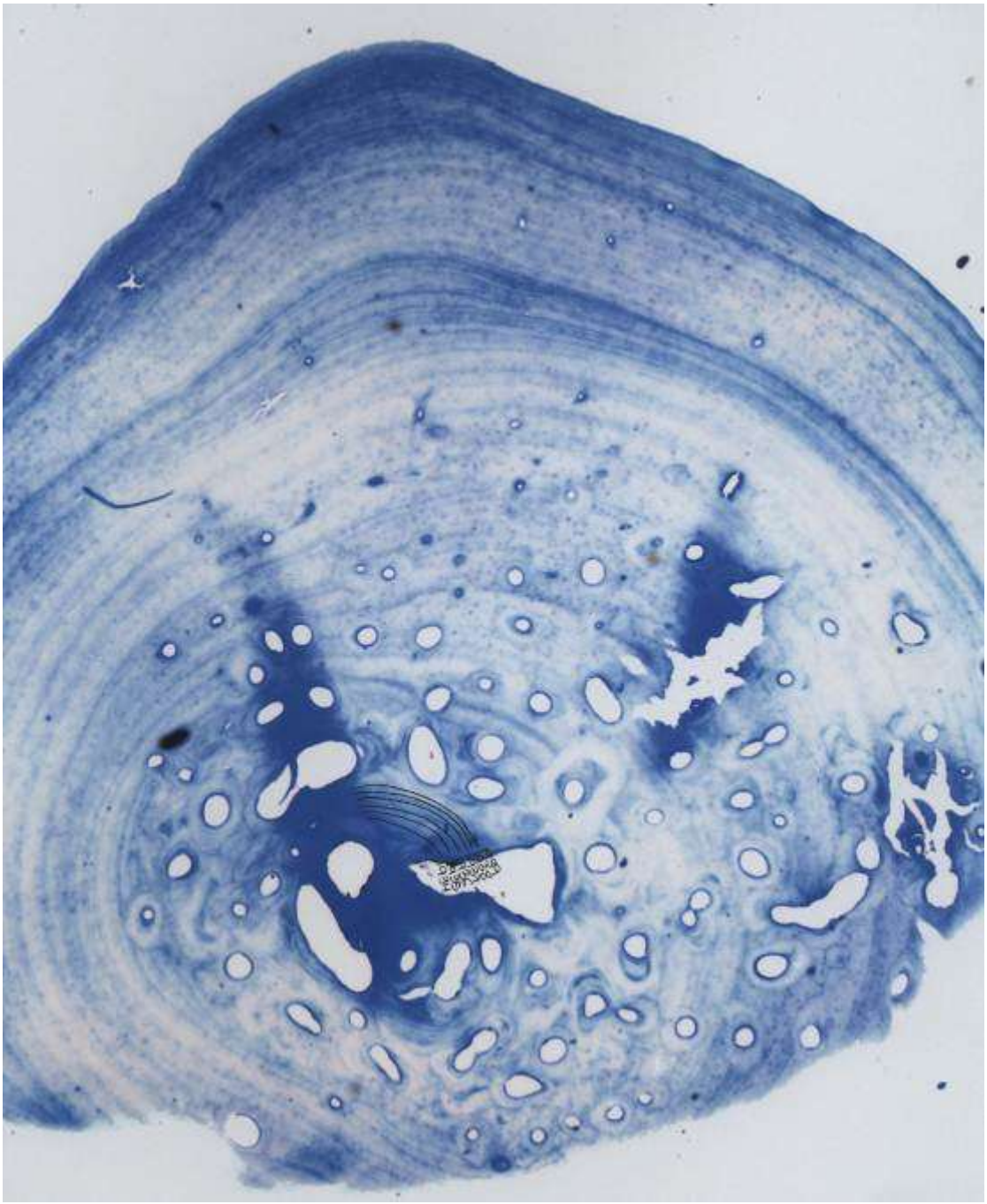


Figura 28: Recompte i datació final dels 6 primers anells de creixement, corresponents a la mostra amb tinció amb blau de toluïdina, no observables en la figura 29, la qual està més ampliada. Després d'aquest últim contatge deduïm que la tortuga va néixer el 1934 i per tant, té 75 anys.

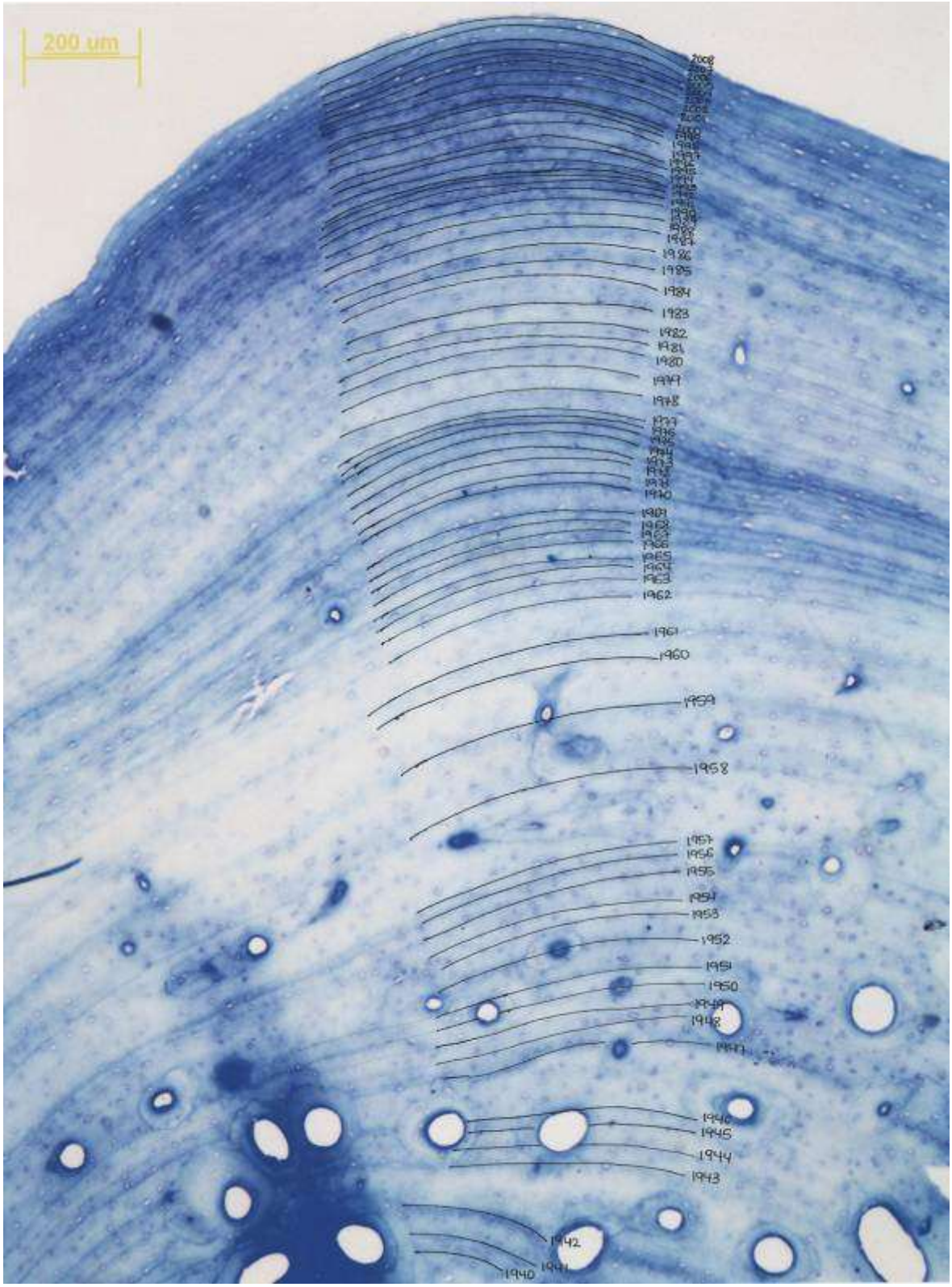


Figura 29: Recompte i datació final dels anells de la mostra tenyida amb blau de toluïdina. Falten els 6 anells de creixement centrals, corresponents als 6 primers anys de vida de l'individu, els quals estan representants en la figura 28.

4.1.2. Relació entre l'evolució del pes dels últims anys i els anells de creixement

Un cop verificada l'existència dels anells, seria convenient observar amb deteniment les zones clares i fosques del tall de l'os. Tal i com ja s'ha comentat en la introducció, les zones clares són més amples i corresponen a períodes de creixement ràpid, i les fosques són estretes i corresponen a períodes de creixement lent o sense creixement. Més tard, caldria analitzar-les comparant el patró de creixement de les diferents tortugues entre sí, per veure si els períodes de poc creixement són una característica de la població (època de fam i de inadequades condicions ambientals) o, contràriament, són característics de la tortuga (malaltia, per exemple).

Alhora de realitzar aquest estudi cal tenir present que únicament podem interpretar amb fiabilitat els últims anys de la vida de la tortuga estudiada (del 2005 al 2008), durant els quals va residir a l'escola, ja que disposem de dades que podem comparar amb altres tortugues. La gràfica que recull aquestes dades presenta una comparació entre l'evolució de pes de les diferents tortugues que viuen al pati de les tortugues de l'escola (veure gràfica Annex 1).

Podem observar que des del novembre del 2005 al maig del 2007 el pes de la tortuga estudiada (7492) seguia la pauta normal, és a dir, amb fluctuacions importants durant el període actiu i amb valors aproximadament constants en els períodes d'hibernació. A partir del maig del 2007 i fins la seva mort, però, el seu pes va anar disminuint notablement, fet que podria explicar la última marca de creixement molt estreta en les mostres analitzades, la qual respon a una disminució del ritme de creixement. Les causes d'aquesta disminució de pes es van detectar en treballs de recerca anteriors (Laia Herrerias, 2007 i Eudald Pascual, 2008). S'havia observat que la tortuga tenia dificultats per trobar el menjar, factor estretament associat a la seva ceguesa de més del 75 %. Un altre element relacionat amb la seva mort és la vellesa de l'animal, ja que l'edat de 70 anys no és fàcilment assolible per una tortuga mediterrània (Soler i Martínez, 2005). No coneixem cap altra causa de la seva mort perquè no se li va fer necròpsia, com s'ha fet en un altre cas (veure Annex 2).

D'altra banda, trobem un espai més ampli entre anells del 2006 i el 2007. Aquest fet indica una millora en les condicions de vida de l'individu, proporcionada, segurament, per una atenció especial en l'alimentació de les tortugues del pati durant el període primavera-estiu de l'any 2006 (Marta Lozano, 2007: "Autosuficiència alimentària de la tortuga mediterrània").

De la resta d'anys només podem fer suposicions, però sembla que va passar per períodes llargs en què va tenir poc accés a l'aliment.

4.2. Resultats i discussió

Amb l'aplicació dels mètodes dendrocronològics hem obtingut els següents resultats:

En els dos radis de la mostra analitzada hem observat algunes línies de creixement que tot i que no es veien en algunes parts del tall de l'os, es diferenciaven clarament en d'altres, de manera que les hem hagut de tenir en compte alhora de determinar l'edat de la tortuga. A més, cap radi dels analitzats contenia totes les marques de creixement, sinó que així com en algunes zones de l'os la mostra 1 (radi 1) comprenia més radis que la mostra 2 (radi 2), en d'altres zones de l'os la mostra 2 en tenia més que la 1. Així doncs, hem comprovat la necessitat d'analitzar més d'un radi de la mateixa mostra perquè els resultats obtinguts siguin vàlids.

La tortuga estudiada presenta el següent patró de creixement: 2 períodes d'alt creixement, marcats per les zones clares més amples de l'os, i 3 períodes de creixement limitat, representats per les zones més estretes de l'os. Tot i que desconeixem les causes d'aquesta variació de la velocitat de creixement donat que la tortuga només va viure a l'escola els últims tres anys de vida, podem associar el primer període d'alt creixement al detectat en totes les tortugues abans d'arribar a la maduresa sexual. D'altra banda, podem associar els períodes de baix creixement a èpoques d'inadequades condicions ambientals, en les quals l'aliment era escàs. En concret, aquest animal ha passat per dos períodes especialment crítics de més de 10 anys cadascun (1962-1977 i 1991-2005), que podrien explicar les seves mides inferiors a la mitjana (Eudald Pascual, 2008).

Tanmateix, així com quan va començar a viure a l'escola el seu patró de creixement coincidia amb el de les altres tortugues, al final, degut a la malaltia que patia, aquest es va alterar.

L'edat de la tortuga és de 75 anys, sumant tots els anells de creixement observats en la mostra tenyida amb blau de toluïdina, a partir de l'aplicació de la datació creuada. Aquesta dada coincideix amb la que va trobar el David Bretones mitjançant l'anàlisi de la mostra muntada en bàlsam del Canadà. Malgrat aquesta coincidència en els resultats, cal tenir en compte que el grau de seguretat és ara molt superior degut a la major nitidesa de les LAG (línies d'aturada de creixement) en les mostres tenyides amb blau de toluïdina (en relació a les no tenyides muntades en bàlsam del Canadà) i a l'aplicació de les tècniques dendrocronològiques de datació creuada. Estudis recents (Goshe et al. 2009) realitzats sobre talls transversals d'húmer de tortugues marines, reforcen la hipòtesi que per a la datació correcta per cronologia esquelètica és més segur fer-ho sobre mostres tenyides que sobre mostres sense tenyir (però la tinció la fan sobre mostres d'os descalcificades i en tortugues que no superen els 20 anys d'edat). En el nostre cas, com ja hem comentat, els millors resultats els hem obtingut en mostres sense descalcificar i tenyides amb blau de toluïdina i no tenim coneixement que s'hagi aplicat aquesta tècnica de tinció en *Testudo hermanni* anteriorment. Creiem que potser és per això que alguns autors pensen que l'osteocronologia no permet datar tortugues de més d'uns 20 anys.

5. Conclusions

Després d'estudiar les mostres procedents de diferents metodologies osteocronològiques i de l'anàlisi i aplicació dels mètodes dendrocronològics a una selecció de les mateixes, podem concloure que:

- Havent analitzat el conjunt de mostres obtingudes en un treball de recerca anterior (David Bretones, 2009) i havent seleccionat les tres millors microfotografies de cada mètode, podem considerar que la metodologia en la que les marques de creixement són més nítides és la de la tinció amb blau de toluïdina sobre mostra d'os sense descalcificar.

- A partir de l'anàlisi de la mostra tenyida amb blau de toluïdina mitjançant el mètode de recompte directe (el mateix mètode que va utilitzar David Bretones en la mostra muntada en bàlsam del Canadà) hem contat entre 70 i 72 anells. Després d'aplicar els mètodes dendrològics, el recompte final i més exacte és de 75 anells, que correspondrien a 75 anys. Tenint en compte que el David havia contat entre 73 i 78 anells amb l'anàlisi de la mostra muntada amb bàlsam del Canadà, podem concloure que s'obtenen els mateixos resultats amb els dos mètodes, però amb un grau de fiabilitat diferent.

- Els mètodes dendrològics són aplicables a la osteocronologia, tant pel que fa a la tècnica de recompte com en relació a la informació ecològica, és a dir, al creixement i la vida de l'animal. Així doncs, podem associar les zones més amples de l'os a períodes en que la velocitat de creixement és elevada, i d'altra banda, podem relacionar les zones més estretes amb períodes d'aturada de creixement o de creixement limitat, de la mateixa manera que passa amb els arbres. Ara bé, en el cas dels animals, pel fet de ser mòbils, no es poden conèixer les causes de les variacions de creixement observades.

- Tenint en compte que fins al moment no s'havia aplicat aquest mètode per a la datació de tortugues de més de 20 anys d'edat i al fet que hem pogut determinar que la tortuga estudiada té 75 anys, podem afirmar que els mètodes osteocronològics són aplicables per a la datació de tortugues d'edats avançades.

6. Bibliografia

BRETONES, DAVID (2009). *Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. [En línia]. [Consultat sovint]. Disponible a Internet: http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114

CAMPELO, F., NABAIS, C., FREITAS, H., AND GUTIÉRREZ, E. (2007). *Climatic significance of tree-ring width and intra-annual density fluctuations in Pinus pinea from a dry Mediterranean area in Portugal.* Ann. For. Sci. 64(2): 229-238. doi: 10.1007/ BF00118210.

CAMPELO, F., GUTIÉRREZ, E. RIBAS, M., NABAIS, C. AND FREITAS, H., (2007). *Relationships between climate and double rings in quercus ilex from northeast Spain*. Can. J. For. Res. 37(2): 1915-1923. doi: 10.1139/ X07-050.

CASTANET, J. et CHEYLAN, M. (1979). *Les marques de croissance des os et des écailles comme indicateur de l'âge chez Testudo hermanni et Testudo Graeca (Reptilia. Chelonia. Testudinidae) Can. J. Zool. 57: 1649-1665*

DE ROBERTIS, E.D.P., DE ROBERTIS, E.M.F. (1981). *Biologia Cel·lular i molecular.* Desena edició. Barcelona: "El ateneo".

DÍAZ, H. & Ortiz, J.C. (1995). Contribución a la Historia Natural de *Pleurodema thaul* Lesson. ¿Es el Esfuerzo Reproductivo Determinado por la Edad?. Noticiero de Biología 3 (3): 131. [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.geocities.com/RainForest/3532/tesis.html>

DURFORT, M. (2006). *Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals.* Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

FAIXÓ, Èlia (2009). *Optimització del sistema d'incubació artificial per a la reproducció de la tortuga mediterrània.* Treball de recerca de Batxillerat. Escola Mestral. [En línia]. [Consultat sovint]. Disponible a Internet: http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114

FERRER, Diego (1975). *Esquemas de histología.* Quarta Edición. Editorial Espaxs.

GOSHE, L.R., AVENS, L., BYBEE, J., HOHN, A.A. (2009). *An Evaluation of Histological Techniques Used in Skeletochonological Age Estimation of Sea Turtles.* Chelonian Conservation and Biology, 2009, 8(2): 217-222.

GUTIÉRREZ, Emilia (2008). *La dendrocronología: métodos y aplicaciones* en *"Arqueología nautica mediterrània"* X.Nieto i M.A. Cau (eds.) pp. 303-315

HERRERIAS, Laia (2007). *Hibernació i reproducció de Testudo hermanni.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. (Premi CIRIT 2007). [En línia]. [Consultat sovint]. Disponible a Internet: http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114

JUÁREZ, A., ARDISSON, P. (2005). *Anillos de crecimiento: Fuente natural de información biológica y ambiental.* Avance y perspectiva nº24.

LOZANO, Marta (2007). *Autosuficiència alimentària de la tortuga mediterrània.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 72 pp. (Premi CIRIT 2007). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

MANZANARES, M.C., CALERO, M.I., FRANCH, J., JIMENEZ, M.P., SERRA, I. (1997). Optimisation of a Scheduled Study for Undecalcified Samples. Microscopy and Analysis nº31.

OLLÉ, Berta (2008). *Reproducció de la tortuga mediterrània a l'escola*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 58 pp. [En línia]. Disponible a Internet: http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

PASCUAL, Eudald (2008). *Variacions de pes durant el procés d'hibernació de Testudo hermanni.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. Premi al Fòrum de treballs de recerca del Baix Llobregat. [En línia]. [Consultat sovint]. Disponible a Internet: http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114

SOLER, J., MARTÍNEZ, A. (2005). *La tortuga mediterrània a Catalunya.* Col·lecció Natura,3. Edicions l'Agulla de cultura popular. Tarragona.

ZUG, George R. (1991). "Age determination in turtles". *Herpetological Circular Num. 20. Pp: iv + 1-28.*

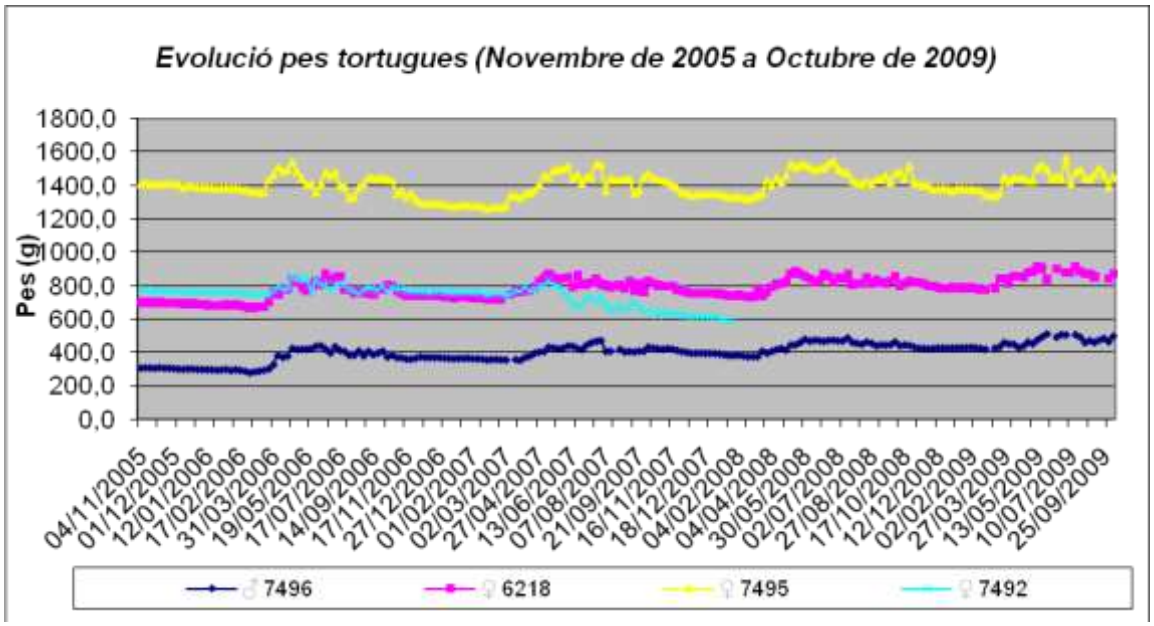
ANNEX 1: Manteniment i actualització del banc de dades del projecte *Pati de les tortugues.*

1.1. Dades de pes i biomètriques

Des de fa uns quants anys es fa un seguiment de les variacions de pes de les tortugues adultes (tant del període actiu com durant la hibernació). Aquestes dades es van incorporant a un fitxer (iniciat el 4 de novembre de 2005) per tal de mantenir-lo permanentment actualitzat.

També es guarden els registres de temperatura (a nivell de superfície i a nivell d'on s'enterren les tortugues per a hibernar i/o a nivell dels ous de la incubadora). Aquestes dades són enregistrades periòdicament de forma intermitent (des de desembre de 2004) amb enregistradors DataLogger Escort i guardats en una carpeta (My Logger Data) que es va actualitzant amb els treballs de recerca dels últims anys, per tal de poder ser utilitzades en qualsevol moment en treballs actuals o futurs. Així com un arxiu digitalitzat de les radiografies practicades a 4 tortugues petites estacionalment.

A continuació es presenta la gràfica de l'evolució de les variacions de pes de les 4 tortugues adultes (3 a partir de gener de 2008) dels últims 4 anys, en el que es distingeixen els valors fluctuants dels períodes actius, dels més estables dels períodes d'hibernació.



També es guarda un registre de les dades de pes i biomètriques de les tortugues nascudes a l'escola (i també dels ous). Aquests arxius es van actualitzant periòdicament, per a possibles estudis posteriors a més llarg termini i també per a fer consultes per als actuals (treball de Jordina Colom).

Els noms dels arxius, guardats a la carpeta general, són: Dades tortugues petites (TR0910)a, Pes tortugues grans (TR0910)a

1.2. Seguiment radiològic del procés d'ossificació en *Testudo Hermanni*

En un primer moment, ens proposàrem a realitzar un estudi sobre el procés d'ossificació de les tortugues adultes (M1, M2, B1 i B2). Per poder-lo dur a terme i facilitar la tasca, vàrem etiquetar cada radiografia, tenint en compte la següent numeració (iniciada el curs passat):

Cada radiografia té un codi amb les següents característiques: **nna_ddmmaaaaN1N2d,** on:

- **nn** correspon a la sessió (en ordre cronològic)
- **a** és l'ordre dintre de la sessió (a, b, c, d)
- **ddmmaaaa** la data
- **N1N2** fa referència al nom de les tortugues (M1M2 O B1B2)
- **d** es refereix a la posició del cos de les tortugues en el moment de fer les radiografies (d: dalt o dorsiventral, b: des de baix o ventrodorsal)

(extret del treball de l'Èlia Faixó: "Optimització del sistema d'incubació artificial per a la reproducció de la tortuga mediterrània a l'escola").

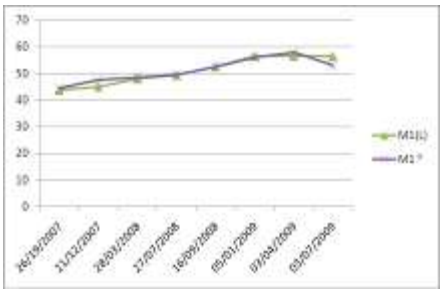
Es realitza una sessió cada 3 mesos, és a dir, 4 a l'any que fem coincidir aproximadament amb els solsticis i equinoccis dels canvis estacionals perquè sigui més fàcilment recordable. També cal fer constar que no disposarem de les radiografies de les tortugues que hivernen (B1, B2) durant el solstici d'hivern.

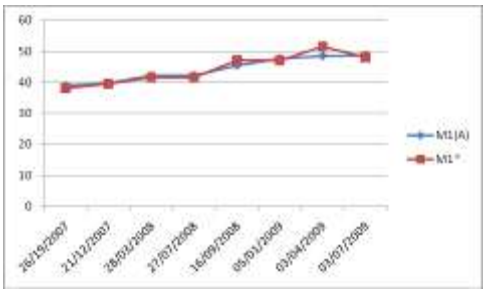
A partir d'aquesta informació, vam procedir a realitzar les mesures d'allargada i amplada de les radiografies[19]. Posteriorment, vam realitzar una comparació d'aquestes dades obtingudes amb les mesurades directament amb el peu de rei un cop cada quinze dies. D'aquesta manera, podríem comprovar que les mesures fetes fossin realment fiables, ja que han estat agafades cada any per alumnes diferents.

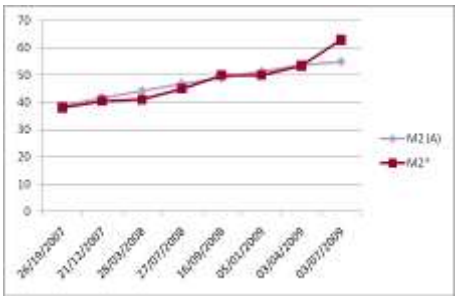
Els resultats són visualment satisfactoris (tal i com es mostra a les primeres 6 figures següents), ja que en general les mesures preses amb el peu de rei coincidien amb les obtingudes mesurant les marques òssies de les radiografies (caldrà fer un estudi més acurat de correlació més endavant). Tot i així, alhora de realitzar les mesures de les radiografies, van sorgir diversos problemes que ens van dificultar la tasca. Un d'ells era

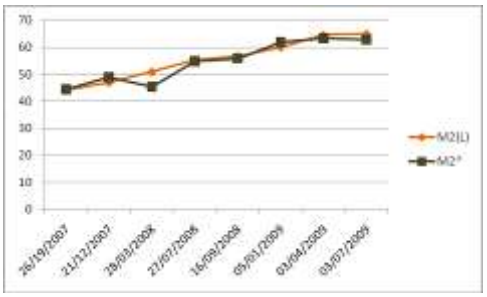
[19] Per fer-ho, vam utilitzar un regle de 30 cm de llarg i vam posar les radiografies de manera que la llum solar (o un banc de llum) deixés veure els detalls d'aquestes.

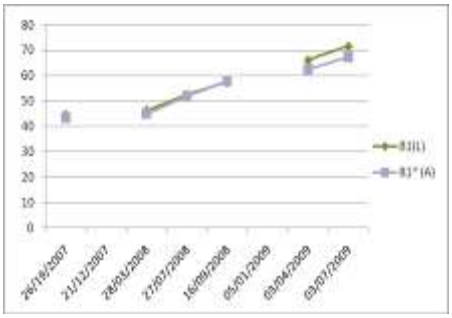
que no es podia apreciar gaire bé on acabava i començava la closca ja que algunes radiografies eren molt fosques. En tot cas, associem aquests problemes com a causes de les diferències trobades entre les mesures obtingudes amb cadascun dels mètodes (últimes dues figures).

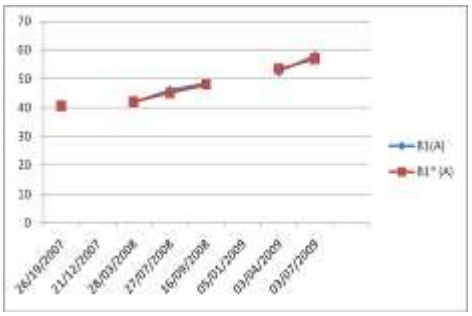


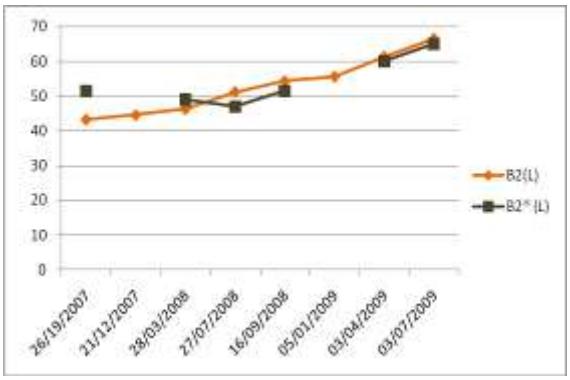


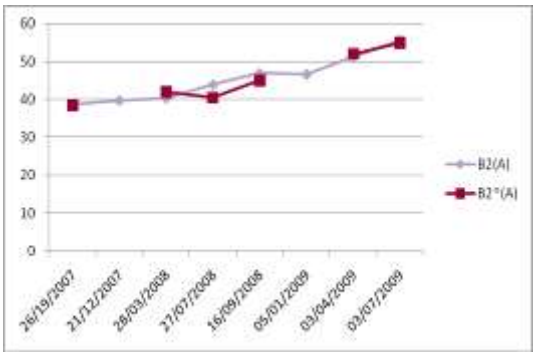












Aquestes dades, juntamemnt amb les de les radiografies escanejades, es guarden a la carpeta *Radiografies* de la carpeta general *"Pati de les tortugues_ originals"*

ANNEX 2 : Cronologia de les tasques portades a terme al pati de les tortugues i de les visites conjuntes realitzades durant el període que va des d'abril del 2009 fins l'octubre del 2009.

En aquesta cronologia no s'inclouen les tasques setmanals de control de pes, vigilància i alimentació de les tortugues petites que estan als terraris, ni els Emails que s'han intercanviat (juntament amb el nostre tutor) amb Joaquim Soler i Albert Martínez (CRARC de Masquefa), Dra. Mercè Durfort (Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona), Dra. Cristina Manzanares (Departament d'Anatomia i Embriologia Humana del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona) i amb la Dra. Emilia Gutiérrez (Departament d'Ecologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona).

Es transcriuen íntegrament les anotacions realitzades (conjuntament amb Jordina Colom i Ariadna Simón) a les llibretes de camp[20], complementades amb alguna petita explicació quan es considera oportú; també es presenten algunes fotografies d'alguns aspectes o tasques que no entren a formar part directa dels nostres treballs, però que han estat portades a terme per nosaltres durant aquest període de temps.

07/04/09- L'Èlia Faixó, el David Bretones i la Laura Pascual ens ensenyen a diferenciar les tortugues. A més a més de com agafar-les, pesar-les, amidar-les... I a reconèixer les plantes (*Taraxacum* i altres) que cal anar trasplantant. A partir d'ara serem nosaltres les responsables del pati (fins que algú ens agafi el relleu, després del treball de recerca). Per altra banda, anem a fer la sessió estacional de radiografies a la clínica veterinària de Sant Vicenç dels Horts de Francisco Bretones.

22/05/2009- Ens disposem a preparar el terrari per les 8 tortugues més joves (M1, M2, B1, B2, E1, E2, E3 i E4), a més preparem un desnivell amb la mateixa sorra del terrari destinat a la pròxima posta d'ous. D'altre banda replantem plantes al pati entre les quals hi trobem dent de lleó, per l'alimentació de les tortugues grans (6218, 7495, 7496) i a més també les plantem al terrari per l'alimentació de les tortugues petites (M1, M2, B1, B2, E1, E2, E3 i E4).

Ens han ajudat dues alumnes de 2n d'ESO (Clara Peña i Clara Vila), que també s'han encarregat de preparar plantes per les tortugues del pati (en el seu treball de "petites investigadores") i de vigilar les tortugues per detectar les postes.

27/05/2009- Les alumnes de 2n d'ESO descobreixen a la tortuga mitjana fent niu en la zona habitual de posta (extrem NE del pati).

[20] Cadascun de nosaltres tenia la seva llibreta de notes i al laboratori n'hi havia una altra on hi deixàvem constància de les tasques realitzades a l'Escola.

28/05/2009- Primera troballa d'ous (exactament 4) al lloc on es va veure la tortuga fer niu el dia anterior (de vegades en fan més d'un, abans de decidir-se a posar ous), marcats del número 1 fins al 4. Es posen en marxa els sensors d'humitat i de temperatura a la incubadora del laboratori de biologia.

02/06/2009- Es veu la tortuga gran fer niu, primer davant del menjador sense resultat i desprès al lloc que havíem preparat del costat del bassal.

04/06/2009- Troballa de quatre ous més corresponents a la segona posta, els quals són numerats des del número 5 fins al 8. S'observa que el numero 8 està malmès, esquerdat i el número 6 també una mica.

05/06/2009- Hem posat Topiònic a l'ou número 8 per desinfectar les esquerdes i posteriorment aplicar-li parafina. La parafina utilitzada ja està fosa, prèviament preparada per al seu ús (Explicat al treball de Jordina Colom).

15/06/2009- Al veure que la parafina aplicada la setmana anterior no havia donat cap resultat es va procedir a aplicar parafina en estat sòlid i fosa al moment, ja que al estar més concentrada cobreix totalment l'àrea de les esquerdes.

01/07/2009- Dediquem tot el dia al pati: En primer lloc canviem una de les bombes (la del brollador) perquè l'anterior, que ja havia estat reparada el curs passat, va deixar de funcionar. Abans de posar-la, però li vàrem "fabricar" un filtre de malla més petita, per tal d'evitar que succionés petits peixos i capgrossos del bassal

Realitzem la descàrrega dels sensors HT3 (del terrari) HT5 (del terrari inferior gran) T4 i T5 (de la incubadora) i el T3 (del terrari exterior). A més hem canviat la pila del T3.

Procedim, d'altra banda, a l'aplicació prèvia del tractament per algues filamentoses als aquaris del laboratori (per assegurar-nos que no perjudicava als peixos i plantes aquàtiques). Per poder-ho aplicar vam calcular la quantitat adequada en funció del volum de cada un:

- Aquari gran, el qual té un volum de 40L. Com que s'ha d'aplicar 20 mL d'antialgues per cada 1000mL d'aigua, vàrem aplicar 0,8 mL.
- Aquari petit, el qual té un volum de 15L, de manera que hem aplicar-li 0,34 mL del producte esmentat.

(Per poder saber la concentració del producte hem hagut de traduir les instruccions de l'alemany al català).

Hem detectat que l'ou número 6 (segona posta) també està en mal estat a causa de petites esquerdes ocasionades a la seva posta, i per aquest motiu hem netejat els altres ous i els hem posat en una capsa nova amb vermiculita. Pel que fa a l'ou número 8 l'hem trobat envoltat de petites larves d'algun insecte que estudiarem posteriorment. Hem deduït, per tant, que l'ou està malmès irreversiblement.

02/07/2009- Sortida a Santa Fe del Montseny i a les instal·lacions d'*Aquàtiques Vilassar*, al Maresme. La primera per a observar diversos aspectes de biologia (estatges de

vegetació, vegetació aquàtica, flora criptogàmica...) en un ambient natural, i la segona per adquirir algunes plantes per al bassal del Pati de les tortugues. En ambdós casos dedicàrem força temps a perfeccionar els nostres coneixements de fotografia de natura, iniciats el curs passat en les classes de pràctiques de l'assignatura de biologia[21]. Pel que fa a l'àmbit biològic, en un petit rierol de muntanya aprenguérem a descobrir –entre les pedres- gran quantitat d'organismes que sovint passen desapercebuts (alguns peixos,

[21] Un dels nostres treballs ("Cromatografia policromàtica") va quedar finalista en el concurs de Fotografia Científica del CDECT del curs passat : http://www.xtec.cat/cdec/concurs/premis08cdec.htm i algunes de les fotografies aquí presentades han resultat seleccionades i guanyadores del concurs Bioimatges 2009: http://www.cbcat.net/pdf/BIOIMATGES2009%20Premis.pdf

capgrossos de tritons, sangoneres, larves de tricòpters, de plecòpters i altres insectes, dels quals realitzàrem un ampli reportatge fotogràfic. També d'altres organismes, com bolets, líquens, molses i falgueres. Així com les diferències entre un bosc caducifoli i un bosc perennifoli (al Montseny n'hi ha de tots dos tipus).

Als hivernacles d'Aquàtiques Vilassar descobrírem la varietat de plantes flotants, semisubmergides i submergides que tenen. Aquest any no volíem que el bassal del pati de les tortugues s'omplís de plantes flotants (malgrat el seu indubtable valor estètic) ja que havíem de provar el tractament antialgues ja comentat i només agafàrem alguna cua de cavall (*Equisetum* sp) i un parell d'elodees (plantes submergides oxigenants).

06/07/2009- Observem la tortuga gran (7495) posant ous entre les 15:30 i les 17:30h.

07/07/2009- Troballa dels nou ous de la tercera posta, marcats des del numero 9 fins el 17. Aquesta ha estat una veritable sorpresa, no esperàvem una posta tant tardana i menys encara tant nombrosa.

09/07/2009- Segona aplicació d'antialgues als dos aquaris del laboratori. L'observació al microscopi de les larves ja desenvolupades (prèviament adormides amb èter en la petita càmera narcòtica del laboratori, trobades al voltant de l'ou número 8, confirma que es tracta de *Drosophila melanogaster,* també anomenada mosca del vinagre, mosca de la fruita o mosqueta.

Al veure que l'aplicació d'antialgues als aquaris ha donat resultat i tant els peixos com les plantes aquàtiques continuen en bones condicions, l'hem aplicat també al bassal del pati de les tortugues amb les proporcions adequades: Tenint en compte que el volum del bassal és de 4198 dm^3 (Oscar Cusó, 2007), hauríem d'aplicar-ne 83,96 mL, però com que hi ha sediment i el bassal no està del tot ple, hem calculat que el volum d'aigua és tan sols d'uns 3000 dm^3. Així doncs, hi apliquem 60 ml d'antialgues.

10/07/2009- Hem pesat els ous de la primera i la segona posta (anant molt en compte de no modificar la seva posició), tenint en compte que estan aproximadament a la meitat del desenvolupament embrionari. Hem pogut observar que tots els ous han perdut pes.

16/07/2009- Hem fet el calibratge dels sensors H3, H4, utilitzant com a referència el TESTO 177 H1, així com dels sensors T3, T4 i T5, tenint com a referent el termòmetre de precisió BRAND[22]. D'altra banda, hem trobat l'ou número 6 fet malbé i l'hem hagut de llençar (després de practicar-li una dissecció).

20/07/2009- Facultat de Biologia. De fet havíem de fer el calibratge al servei de Camps Experimental de la Facultat de Biologia de la UB, però el tècnic del Departament, en Josep Matas, va opinar que ho podíem portar a terme a l'Escola (ell ens deixava el material) perquè es necessitava gairebé tot un dia per portar a terme el calibratge. D'aquesta manera, després li ensenyaríem els resultats i podríem dedicar més temps a fer una visita a les instal·lacions. En Josep Matas ens va ensenyar les càmeres d'ambient controlat (fitotrons) amb especial dedicació als tipus de llum fitoestimulants (perquè les plantes creixin bé) i també ens va fer una classe sobre calibratge d'instruments de mesura (enfocada al treball de la Jordina).

Aquest mateix dia havíem quedat amb la Dra. Emilia Gutiérrez del Departament d'Ecologia (per consultar-li els dubtes sobre com encaminar aquest treball), però abans el nostre tutor ens va ensenyar l'edifici (amb els *Potus* que pengen del pis de dalt) i una exposició de Zoologia amb alguna raresa, com un vedell de dos caps.

[22] El calibratge dels sensors s'explica amb deteniment al treball de recerca de la Jordina Colom.

22/07/2009- Visita al CRARC de Masquefa amb totes les nostres tortugues. Ens hi hem passat tot un matí. D'una banda, s'ha tractat el tema de la publicació d'un article sobre hibernació que està portant a terme l'Eudald Pascual i que ha de fer uns últims retocs. S'han revisat totes les tortugues, aprofitant el curs que imparteix l'Albert Martínez, director científic del CRARC, a joves veterinaris.

Recentment, han donat un premi al CRARC que han invertit en comprar microxips, i l'Albert i en Joaquim han decidit posar-ne a les nostres tortugues. Mentre ho estava realitzant, l'Albert anava fent l'explicació completa de tot el procés.

El microxip facilita que les tortugues puguin ser identificades amb més facilitat en cas d'un possible robatori (ja que en el nostre cas no es poden perdre perquè estan en el pati de les tortugues, que és un indret tancat lateralment).

Aquestes tortugues tenen la importància afegida de que se'ls hi ha fet molts estudis (com l'explicat més amunt de l'Eudald). Fins i tot han entrat a formar part d'un estudi de filogènia evolutiva a partir de l'anàlisi del seu ADN mitocondrial portat a terme per

Salvador Carranza del Centre Superior d'Investigacions Científiques (CSIC)[23].

D'altra banda, l'Albert ens ha donat antiparasitari perquè el donem tant a les tortugues grans com a les petites, amb la dosis adequada per a cadascuna.

24/07/2009- Una de les tasques vinculades amb el manteniment del pati de les tortugues que s'havia de realitzar era repintar un fragment de la paret. La pintura que anteriorment recobria aquest fragment havia caigut i havia estat revisada el curs anterior per l'Èlia, la Laura i el David. Així doncs, vam anar-li a preguntar al Joan Serrat, arquitecte i professor de Dibuix de Batxillerat, que ens aconsellés sobre quin tipus de pintura calia aplicar per tal que no tornés a caure. Ell va dir-nos que enlloc d'utilitzar un material que repel·leixi la humitat, el més adequat és un material que la deixi transpirar, com és el cas de les pintures al silicat. Així doncs, vam anar a comprar una Imprimació al Silicat *Macy*, que conformaria la primera capa, a sobre de la qual vam aplicar-hi un revestiment *Macy.*

Al pintar, ens hem trobat amb un problema: el color del revestiment no coincideix amb el color original de la paret, de manera que ens veurem obligades a tornar-ho a pintar amb el color adient, que tampoc acaba de resultar del tot exacte, però ja ho donem per acabat.

Aquest mateix dia es va fer una important podada dels arbres més alts que cauen al terrat de l'escola, ja que s'ha fet una remodelació dels mateixos i podrien obstruir els desaigües.

26/07/2009- Hem trobat l'ou número 4 esquerdat, de manera que deduïm que li deu quedar poc per nàixer.

28/07/2009- Ha eclosionat l'ou número 4 de la posta del 28/05/2009, que hem anomenat J1 i que pesa 13,1 g. El dia abans l'havíem traslladat a un recipient amb paper mullat.

04/08/2009- Ha eclosionat l'ou número 3 de la posta del 28/05/2009, al qual hem anomenat J2 i que pesa 10,09 g. Curiosament, és la tortuga que pesa menys de totes les nascudes fins al moment a l'escola.

[23] El Dr. Carranza ens va explicar aquests i altres estudis en una visita de biologia al CSIC el curs passat.

13/08/2009- El bassal del pati estava aproximadament uns 10 cm més baix; l'hem omplert. A més, el pati estava sec i amb poc aliment per les tortugues grans, de manera que hem replantat diferents espècies vegetals (dent de lleó, etc).

24/08/2009- Observem que el mascle està en plena activitat sexual, malgrat ja és massa tard perquè es produeixi cap altra posta.

28/08/2009- S'ha trucat al CRARC per explicar-los la troballa d'alguns ous malmesos i, d'altra banda, per comentar la inflamació de les parpelles de la tortuga M1, la qual sembla que gairebé no hi veu i menja ben poc. A més, hem observat que s'ha aprimat 5 grams. Els experts del CRARC ens diuen que la conjuntivitis és causada pel dèficit de vitamina A, de manera que ens han recomanat que li subministrem una dieta rica en aquest tipus de vitamina (tomàquets, meló, pastanagues, dent de lleó i julivert) i que li apliquem tres o quatre gotes de col·liri a cada ull, tres o quatre cops al dia.

També hem posat el sensor H3 al terrari del laboratori.

01/09/2009- Ha nascut la tortuga de l'ou número 17 de la posta del 06/07/2009 a les 13:00h. L'hem anomenat J3 i pesa 12,1 g.

02/09/2009- A les 9:20 h observem que els ous número 9 i 10 de la posta del 06/07/2009 estan parcialment esquerdats. Al cap d'unes hores, concretament a les 13:40 h, neix l'ou número 9, al qual anomenem J4 i que pesa 12,2 g. Pràcticament a la mateixa hora, veiem la tortuga de l'ou número 10, la qual està a punt de sortir, amb un gran vitel, fet pel qual tornem a posar l'ou a la incubadora per tal que la tortuga el reabsorbeixi completament.

A més, hem pintat la paret del pati amb el revestiment al silicat del color salmó de la paret.

03/09/2009- La tortuga de l'ou número 10 ja ha reabsorbit tot el vitel, cosa que li ha permès sortir finalment de l'ou. L'hem anomenat J5 i pesa 12,9 g.

04/09/09- Hem portat la tortuga M1 a la Clínica Veterinària Núria Plana de Sant Feliu de Llobregat, donat que la tortuga no mostrava cap millora. La Dra. Clàudia ens ha recomanat que banyem a la tortuga amb aigua tèbia dos o tres cops al dia, ja que d'aquesta manera la tortuga recuperarà la temperatura corporal i s'activarà més, i conseqüentment estarà més disposada a menjar. A més, ens ha donat una llista amb els aliments més indicats per al dèficit de vitamina A, donant major importància als espinacs i a les bledes, donat el seu alt contingut en la vitamina esmentada. D'altra banda, ens ha dit que seguim amb el tractament amb el col·liri que ja li aplicàvem fins al moment.

També hem donat un suplement vitamínic i proteic a les tortugues nascudes recentment (J1, J2, J3 i J4).

15/09/2009- Hem tornat a portar la tortuga M1 a la Clínica Veterinària Núria Plana per controlar l'evolució de la malaltia. La doctora ens ha receptat Biominol A hidrosoluble, el qual hem de mesclar amb el menjar. Ens ha recomanat no seguir amb el col·liri ja que porta cortisona, la qual si se'n consumeix amb excés pot causar efectes adversos i ja fa dues setmanes que li donem.

La dosi que li donem de Biominol A hidrosoluble és una gota diluïda en 5 ml, que és el mateix que 0,4 ml al dia, barrejat amb el menjar.

A més, ens va dir que observant la forma en que respirava podia tenir una principi de pulmonia, fet per el qual és recomanable realitzar-li unes radiografies. Tot i així ens va dir que sinó millorava en una setmana li injectaria una dosis de vitamina A.

28/09/2009- Els Senyor Bretones, veterinari de la clínica St. Vicenç, ens ha vingut a buscar les tortugues per la radiografia corresponent a la sessió de tardor i li hem demanat que ens miri a fons els pulmons de la M1.

29/09/2009- Visita Unitat Anatomia i Embriologia Humana per ensenyar a la Dra. Manzanares la feina feta d'Osteocronologia (corresponent a aquest treball), entregar-li una còpia en paper del treball anterior (del David Bretones) i plantejar-li uns dubtes i la conveniència de repetir algunes proves.

5/10/2009- Ens tornen les tortugues M1 i M2 amb les radiografies fetes i amb un diagnòstic d'hipovitaminosis A i conjuntivitis. Els subministrarem unes pomades als ulls diàriament fins que el seu aspecte millori.

06/10/2009- Segona visita a la Unitat Anatomia i Embriologia Humana, per a realitzar el poliment manual del tall d'os, el qual serà utilitzat posteriorment per l'observació al microscopi de Nomarski.

08/10/2009- L'Ariadna ensenya a utilitzar una càmera rèflex digital als alumnes de segon d'ESO que realitzen el seu treball de *Petites investigacions* sobre les tortugues (Júlia) i sobre els aquaris (Víctor) perquè realitzin les seves pròpies fotografies.

15/10/2009- Portem la tortuga M1 al CRARC perquè la veiem molt malament i, tot i els nombrosos tractaments que li hem subministrat al llarg de l'estiu, es mor allà mateix. L'Albert farà la necròpsia per conèixer les causes de la seva mort i ens enviarà els resultats i les fotografies. També guardarà en formol la tortuga per si pot ser útil per a un treball de recerca posterior.

16/10/2009- Les temperatures han baixat, de manera que preparem el pati per a la hibernació, amb l'ajuda de la Júlia i el David.

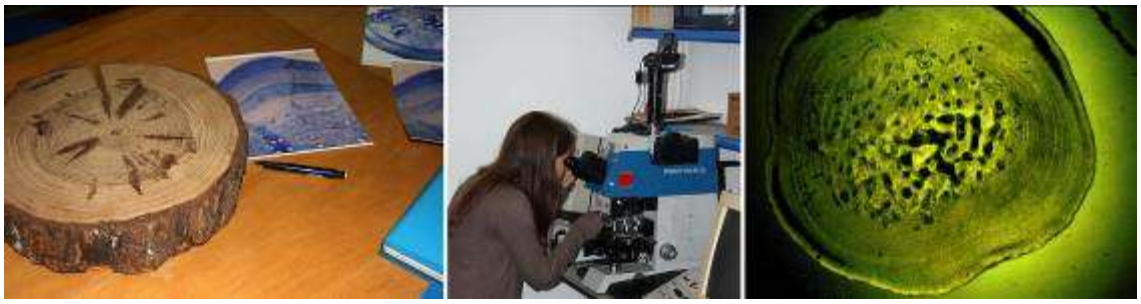
21/10/2009- Sessió de prova a P5. L'Ariadna prova la càmera amb braç flexible a la classe de P5 (explicat al treball de l'Ariadna Simón). Ha estat un èxit, tant la observació de petits animals com la de parts del cos dels mateixos nens.

23/10/2009- Rebem els resultats de la necròpsia de la M1. Segons l'informe la tortuga tenia una retenció de pedres a l'estómac, fet que no li permetia excretar. A més, tenia els ronyons i el fetge molt pàl·lids i els pulmons presentaven líquid al seu interior. És per aquest motiu que els experts del CRARC creuen que a part de la ingestió de pedres, podria haver-hi una altra causa de la seva mort i han agafat mostres per fer més anàlisis; quan tinguin els resultats ens els faran arribar.

26/10/2009- Entrega del treball (1a versió definitiva al tutor)

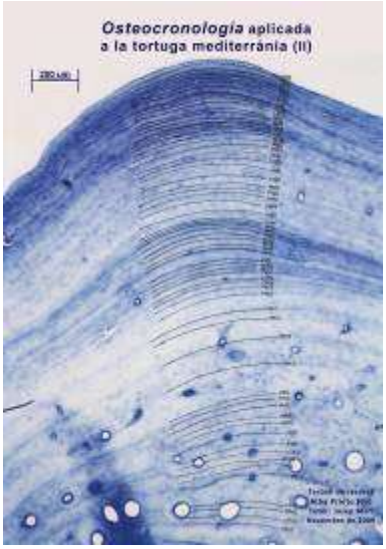
27/10/2009- Visita a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (explicada a l'apartat 3). Primer vàrem anar al Departament de Biologia Cel·lular per a realitzar l'observació amb el microscopi de Nomarski, amb l'ajuda de la doctora Durfort. Més tard,

anàrem al Departament d'Ecologia per ensenyar a la doctora Gutiérrez l'aplicació dels mètodes dendrològics a l'osteocronologia i verificar que l'ús que n'havíem fet fos correcte.



05/11/2009- L'efecte de la tardor al bassal es fa notar, ja que una part important de les fulles de les enfiladisses caducifòlies hi cauen. En traiem una bona part amb els salabres, i en posem algunes a les caixes d'incubació (de moment encara obertes) que tenim al pati, i també a dintre del terrari gran.

06/11/2009- Hi afegim una còpia de les portades de les memòries definitives dels nostres treballs de recerca (que hem d'entregar el proper dimarts).



09/11/2009- Entrega definitiva de les memòries del TR.

Agraïments

La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies a:

- En primer lloc al meu tutor Josep Marí, per a la seva especial dedicació al treball, per fer-me comprendre la importància del rigor en els treballs científics, per haver-me ajudat a resoldre els dubtes que s'han anat plantejant i d'altra banda, per haver-me permès aprendre alguns aspectes de l'àmbit biològic i de fotografia científica que no entren a formar part directa del treball.

- A la Dra. Emília Gutiérrez pels nombrosos consells i idees que ens ha donat i per proporcionar-nos bibliografia específica, la qual ha estat el punt de partida del treball.

- A la Dra. Mercè Durfort del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per permetre'ns l'ús del seu laboratori i, especialment, del microscopi de Nomarski.

- A la Dra. Mª Cristina Manzanares de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona (Campus de Bellvitge), per la seva inestimable col·laboració en aquest projecte per a l'obtenció i el poliment del tall de la mostra inclosa en plàstic, prèviament utilitzada per a l'observació en microscòpia electrònica.

- A Joaquim Soler i a l'Albert Martínez responsables, respectivament, de la direcció tècnica i científica del CRARC, per proporcionar-nos informació dels aspectes que desconeixíem.

- A la Jordina Colom i l'Ariadna Simón per la seva col·laboració en les tasques realitzades i, sobretot, pel suport moral que m'han donat en tot moment.

- I, finalment, als meus pares per ajudar-me en la traducció d'alguns articles, per les nombroses correccions i, sense cap mena de dubte, per donar-me ànims i consell sempre que ho he necessitat.