

Adriana Luiza Pimenta Sant' Iago de Carvalho

**Ciclo reprodutivo, gametogênese e desenvolvimento larval de *Asterina stellifera* (Möbius, 1859) (Echinodermata: Asteroidea)
na região de Cabo Frio, RJ.**



Dissertação apresentada à Coordenação de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Rio de Janeiro
2001

Adriana Luiza Pimenta Sant'ago de Carvalho

**Ciclo reprodutivo, gametogênese e desenvolvimento larval de *Asterina stellifera* (Möbius, 1859) (Echinodermata: Asteroidea)
na região de Cabo Frio, RJ.**

Banca examinadora:

Prof. Carlos Renato Rezende Ventura
(Presidente da banca)

Prof. Débora de Oliveira Pires

Prof. Kaízia Siqueira Campos-Creasey

Rio de Janeiro, 7 de abril de 2001

Trabalho realizado no Setor de Echinodermata
Departamento de Invertebrados, Museu Nacional
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Renato Rezende Ventura
Departamento de Invertebrados, Museu Nacional
Universidade Federal do Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Adriana Pimenta San`lago de

Ciclo reprodutivo, gametogênese e desenvolvimento larval de *Asterina stellifera* (Möbius, 1859) (Echinodermata: Asteroidea) na região de Cabo Frio, RJ.

Rio de Janeiro. UFRJ, Museu Nacional, 2001.

i-ix, 1-48

Tese: Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia)

1. Ciclo Reprodutivo 2. Gametogênese 3. Desenvolvimento larval 4. *Asterina stellifera* 5.

Asteroidea 6. Asterinidae 7. Echinodermata 8. Cabo Frio

I - Universidade Federal do Rio de Janeiro

II - Teses

Aos meus pais, José Roberto e Maria Célia

...Um pequenino grão de areia olhou para o céu, viu uma estrela e imaginou coisas de amor. Mesmo sem saber se houve ou não alguma coisa entre eles dois, constatou-se que tempos depois apareceu a estrela do mar....

AGRADECIMENTOS

Agradeço com todo carinho às pessoas que direta ou indiretamente tiveram participação na realização deste trabalho.

Em especial ao meu orientador Dr. Renato Ventura, com quem muito aprendi, pela oportunidade de trabalho e, em especial, por sua confiança e amizade, que me fez crescer como profissional e como pessoa.

À Andrea Junqueira, Alexandra Pinho, Ana Paula Falcão, Cristiane Fiori, Eloá Garcia, Mônica Souza e Renata Lima, pelos agradáveis momentos nas coletas da Ilha do Japonês.

Aos meus mais que queridos amigos e companheiros de laboratório, Andrea Duque, Fábio Mac Cord, Ricardo Varotto, Samantha Lee e, pela descontração e companherismo que tornaram os dias no laboratório os melhores possíveis, pelas valiosas discussões e pela grande "força" nas coletas de Arraial do Cabo. "Telefonema huhu!!!!!"

À querida Thäis Hokoç, por sua amizade e pela grande ajuda nas coletas das Prainhas do Pontal em Arraial do Cabo. Valeu, Tatá!!!!

À Helena, Cadu, Zé Bola, Adriana, Bruninha, Antônio Carlos e Vera, pelo "teto" em Arraial do Cabo.

A toda a equipe do setor de Celenterologia DI/MN, na figura do Dr. Clóvis Castro e Dra. Débora Pires, pelos bons momentos e por todo apoio dado nas mais diversas etapas deste estudo.

À querida Prof. Magda Regina Padilha, do Departamento de Botânica da UFRJ, a "tia Magda", pela utilização do micrótomo e, especilamente, por seu alto astral e carinho.

Ao Cláudio Ratto do setor de Celenterologia/MN por seu apoio e dicas na histologia.

Aos mais que queridos Dr. Sérgio Lourenço e Elisabete Barbarino, do departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, por abrirem as portas de seu

laboratório, recebendo-me como alguém da equipe e por todo o apoio dado em uma importante e árdua etapa deste estudo. Valeu mesmo!!!!

A todos os professores do departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, em especial ao Dr. Abílio Soares Gomes, pelo apoio e utilização do equipamento óptico e de fotografia, durante o experimento de desenvolvimento larval.

Ao grande e querido amigo Marcelo Semeraro, pela paciência e horas de trabalho extra na elaboração e edição dos gráficos e figuras desta dissertação. Valeu, Marcelinho!!!!

A Dra. Helena Lavrado, por sua boa vontade e ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus pais, irmãos e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando.

Aos amigos Ana Brasil e Hélio, pelo apoio e importantes conselhos. É muito bom ter pessoas como vocês por perto!

À coordenação do Programa de Pós graduação em Zoologia do Museu Nacional, pela utilização dos equipamentos e por todo o material fornecido para este estudo.

ÍNDICE

Agradecimentos	vi
Índice	viii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	ix
Resumo	1
Introdução	2
Artigo:.....	8
Abstract.....	9
Introduction	10
Material and Methods.....	11
Study areas	11
Reproductive cycle	12
Larval development	14
Results	15
Organ Indices	15
Histological analysis.....	19
Sex ratio.....	19
Gametogenic cycle	19
Spermatogenesis	20
Oogenesis	21
Larval development.....	27
Discussion.....	29
Acknowledgments	34
References	35
Considerações Finais	40
Referencias Bibliográficas.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mapa da área de estudo	12
Fig. 2. Índice dos órgãos – Ilha do Japonês.....	16
Fig.3. Índice gonadal de machos e fêmeas – Ilha do Japonês	17
Fig. 4. Índice dos órgãos – Prainhas do Pontal.....	18
Fig. 5. Índice gonadal de machos e fêmeas – Prainhas do Pontal	19
Fig. 6. Gametogênese – machos	22
Fig.7. Gametogênese – Fêmeas	23
Fig. 8. Frequência dos estágios de maturidade – Ilha do Japonês	24
Fig.9. Frequência dos estágios de maturidade – Prainhas do Pontal.....	25
Fig. 10. Frequência de tamanho dos ovócitos – Ilha do Japonês	26
Fig. 11. Frequência de tamanho dos ovócitos – Prainhas do Pontal	27
Fig. 12. Desenvolvimento embrionário	30
Fig. 13. Desenvolvimento larval	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos coletados	13
Tabela II. Tempos de desenvolvimento.....	28

RESUMO

A reprodução sexuada em Asteroidea envolve a produção de gametas, fertilização externa e o desenvolvimento de fases larvais. Uma grande variedade de estratégias reprodutivas pode ser observada nos asteróides da família Asterinidae, sendo observadas espécies que produzem ovos pequenos e larvas planctotróficas, de longa duração na coluna d'água, espécies que produzem ovos grandes e larvas lecitotróficas, de curta duração na coluna d'água e até mesmo espécies vivíparas. Muito pouco se sabe a respeito dos aspectos reprodutivos de Asteroidea no litoral brasileiro. No presente estudo, serão verificados e descritos os aspectos reprodutivos de *A. stellifera* em duas populações na região de Cabo Frio, incluindo o ciclo gonadal, a gametogênese e o desenvolvimento larval. A primeira população está na região entre-marés da Ilha do Japonês, junto às gramíneas marinhas. A outra população situa-se no infralitoral rochoso das Prainhas do Pontal, em Arraial do Cabo. O desenvolvimento larval foi descrito por intermédio de cultivo em laboratório. O ciclo reprodutivo foi estudado em intervalos mensais utilizando-se índice dos órgãos e exame histológico das gônadas. *A. stellifera* apresentou um desenvolvimento planctotrófico típico em asteróides, com dois estágios larvais sucessivos, uma larva bipinária e outra braquiolária. Foi verificado um padrão reprodutivo anual, com picos de desenvolvimento gonadal em agosto e setembro, nas duas populações. A periodicidade dos eventos reprodutivos foi idêntica nas duas populações, mas diferenças no índice gonadal (IG) e no índice dos cecos pilóricos (ICP) foram observadas. Na população do infralitoral rochoso os valores de IG foram maiores e foi observada uma menor variação nos valores de ICP. Foi observada uma relação inversa entre os valores de IG e ICP sendo que na população da região entre-marés esta relação foi mais evidente. As diferenças observadas podem estar associadas a fatores ambientais, como hidrodinamismo e disponibilidade alimentar.

INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de estratégias reprodutivas foi descrita para os equinodermas. O tipo de estratégia reprodutiva é uma característica marcante da biologia funcional de uma espécie. Assim, torna-se um importante parâmetro nos estudos das transformações evolutivas ocorridas na história de uma espécie ou de um grupo de espécies (WRAY, 1996).

A reprodução em Asteroidea pode ocorrer por meios assexuados ou sexuados. A reprodução assexuada, por autotomia ou fissão, ocorre em apenas 26 das aproximadamente 1600 espécies conhecidas de asteróides e está intimamente ligada ao poder de regeneração destes organismos (CHIA & WALKER, 1991; MLADENOV, 1996). A reprodução sexuada é predominante dentre os asteróides e permite a recombinação de genes, o que garante uma variabilidade genética entre os indivíduos de uma população (GIESE & PEARSE, 1974).

Os asteróides são, em sua maioria, gonocóricos, mas espécies hermafroditas também são observadas. A existência de dimorfismo sexual de caracteres morfológicos externos é obscura e requer maiores investigações (CHIA & WALKER, 1991). Machos e fêmeas são geralmente diferenciados através do aspecto gonadal e do corte histológico destes órgãos.

Tanto nos machos quanto nas fêmeas o sistema reprodutivo é formado por unidades interconectadas. Estas unidades são formadas pela gônada, gonoduto e dois ramos genitais (CHIA E WALKER, 1991). A parede das gônadas é composta por um saco interno e outro externo, separados por um celoma genital (CHIA E WALKER, 1991). O saco interno consiste de epitélio germinal, seio hemal e epitélio celômico; o saco externo consiste de

epitélio celômico, tecido conectivo e peritônio visceral (CHIA & WALKER, 1991; BYRNE, 1992; BYRNE, MORRICE & WOLF, 1997).

A reprodução sexuada em Asteroidea envolve a produção de gametas, fertilização externa e o desenvolvimento de fases larvais, sendo caracterizada por um padrão anual no desenvolvimento dos gametas, o que sugere uma sincronia entre os indivíduos da população no período de liberação das células reprodutivas (CHIA & WALKER). Esta sincronia favorece o sucesso de fertilização e o crescimento das larvas em condições favoráveis (OLIVE, 1992).

Os gametas masculinos e femininos são formados através de um processo de diferenciação celular, a gametogênese (GIESE & PEARSE, 1974). A gametogênese é regulada por fatores endógenos, por controle hormonal (KANATANI, 1969), porém, fatores exógenos podem iniciar e sincronizar os eventos reprodutivos através de mudanças ambientais (GIESE & PEARSE, 1974). Dentre os fatores exógenos pode-se destacar a temperatura (GIESE & PEARSE, 1974), o fotoperíodo (PEARSE & EERNISSE, 1982; PEARSE E WALKER, 1986) e a disponibilidade de alimento (TYLER, PAIN & BILLET, 1984). Porém, é muito difícil avaliar separadamente o efeito de tais fatores no processo gametogênico. As correlações positivas ou negativas são apenas sugestivas, não sendo comprovadas relações diretas entre estes parâmetros e a gametogênese (CHIA & WALKER, 1991).

O desenvolvimento das gônadas está intimamente relacionado à aquisição de nutrientes (LAWRENCE, 1987). Em muitas espécies os cecos pilóricos, além de suas funções digestivas, atuam como mediadores na estocagem e transferência destes nutrientes

para as gônadas, tornando possível o desenvolvimento dos gametas (LAWRENCE & LANE, 1982). Nestes casos, o desenvolvimento dos cecos pilóricos antecede o desenvolvimento gonadal e há uma diminuição no tamanho dos cecos à medida que as gônadas crescem (MAUZEY, 1966; BARKER & NICHOLS, 1993; BYRNE, 1992).

A fecundação em Asteroidea é externa (KOMATSU, KANO & OGURO, 1990). Porém, a fecundação interna foi sugerida para algumas espécies incubadoras da família Asterinidae, *Asterina pseudoexigua pacifica* (KOMATSU, KANO & OGURO, 1990), *Patiriella vivipara* e *P. parvivipara* (BYRNE & CERRA, 1996). Estas espécies são hermafroditas, sendo observados ovócitos maduros e espermatozóides simultaneamente em um mesmo indivíduo, sugerindo então, a possibilidade de auto-fertilização (KOMATSU, KANO & OGURO, 1990; BYRNE & CERRA, 1996).

Assim como a maioria dos invertebrados marinhos, os equinodermas apresentam um ciclo de vida complexo, envolvendo, em geral, uma fase larval planctônica e, após a metamorfose, uma fase adulta bentônica. A metamorfose é um período de grandes modificações morfológicas, no qual o juvenil se desenvolve e há a transformação da simetria bilateral da larva na simetria pentarradial do adulto (SMITH, 1997; CHIA, OGURO & KOMATSU, 1993).

De acordo com características ecológicas como habitat (plâncton ou bentos) e fonte de nutrição (ambiente ou vitelo), o desenvolvimento em Asteroidea pode ser classificado em quatro padrões: (1) planctotrófico; (2) lecitotrófico pelágico; (3) lecitotrófico bentônico; (4) incubador (BOSH, 1989; CHIA, OGURO & KOMATSU, 1993; McEDWARD & JANIES, 1993). Associados a estes quatro padrões de desenvolvimento, três tipos larvais

são reconhecidos para os asteróides: (1) bipinária; (2) braquiolária; (3) larva tipo barril ("Barrel-shaped"), este último ocorrendo apenas na família Astropectinidae (CHIA, OGURO & KOMATSU, 1993; McEDWARD & JANIES, 1993).

Nas espécies que apresentam desenvolvimento planctotrófico, são produzidos ovos pequenos ($< 300 \mu\text{m}$), com pouca quantidade de material nutritivo, que desenvolvem, geralmente, duas fases larvais sequenciais, uma larva bipinária e outra braquiolária (CHIA, OGURO & KOMATSU, 1993; McEDWARD & JANIES, 1993). A larva bipinária é morfologicamente mais complexa, devido a presença de bandas ciliadas e um aparelho digestivo funcional; a larva braquiolária diferencia-se da bipinária devido a presença de estruturas especializadas para o assentamento (Mc EDWARD & JANIES, 1993).

No desenvolvimento lecitotrófico pelágico são produzidos ovos grandes ($\geq 300 \mu\text{m}$), ricos em material nutritivo e que desenvolvem apenas um estágio larval pelágico, uma larva braquiolária de curta duração na coluna d'água (CHIA, OGURO & KOMATSU, 1993; McEDWARD & JANIES, 1993; BYRNE & CERRA, 1996). Neste tipo de desenvolvimento, a larva braquiolária é morfologicamente mais simples, devido a ausência de estruturas especializadas para a alimentação (McEDWARD & JANIES, 1993).

O desenvolvimento lecitotrófico bentônico provém de ovócitos grandes, liberados no substrato e dispostos após a fertilização como uma massa de ovos. Após os estágios iniciais de clivagem, há o desenvolvimento de uma larva braquiolária que está intimamente ligada ao substrato (McEDWARD & JANIES, 1993; BYRNE & CERRA, 1996). Neste tipo de desenvolvimento larva braquiolária tem os braços reduzidos e um disco adesivo bem evidente (McEDWARD & JANIES, 1993).

Nas espécies incubadoras a prole fica retida até o estágio juvenil. Esta retenção pode ser interna (i.e., celoma) ou externa (i.e., entre os espinhos). Dentre as espécies incubadoras, são consideradas vivíparas aquelas nas quais o desenvolvimento ocorre na gônada ou no trato genital (KOMATSU, KANO & OGURO, 1990). Espécies incubadoras e vivíparas têm geralmente um tamanho reduzido e são hermafroditas (McEDWARD & JANIES, 1993; BYRNE & CERRA, 1996).

Dentre os asteróides, a família Asterinidae é o grupo que apresenta a maior variação de padrões de desenvolvimento, especialmente nos gêneros *Patiriella* e *Asterina*, sendo observadas desde espécies planctotróficas até espécies vivíparas (KOMATSU, KANO & OGURO, 1990; BYRNE & CERRA, 1996; HART, BYRNE & SMITH, 1997). Esta variação nos tipos de estratégias reprodutivas têm como principal consequência uma variação na dispersão das espécies. Espécies com desenvolvimento planctotrófico têm um maior potencial de dispersão, devido sua longa permanência na coluna d'água. Espécies com desenvolvimento lecitotrófico apresentam uma menor capacidade de dispersão, enquanto que espécies incubadoras estão restritas a determinadas regiões (BYRNE & CERRA, 1996).

Asterina stellifera é uma espécie litorânea, comum na zona entre marés, principalmente em substratos rochosos, podendo também ser encontradas em substratos arenosos, junto às gramíneas marinhas. Sua distribuição na costa Atlântica vai desde a região de Cabo Frio (23°S 42°W) até Mar del Plata (35°S 56°W) e do Senegal (15°N 15°W) à Namíbia (28°S 15°E) (SW África) (CLARK & DOWNEY, 1992). É uma espécie tipicamente temperada e sua ocorrência na região em baixas latitudes pode estar

associada ao fenômeno da ressurgência que ocorre na costa oeste da África (CAMPBELL & ROWE, 1997) e na região de Cabo Frio.

Esta dissertação tem como objetivo principal verificar e descrever os aspectos reprodutivos de *Asterina stellifera* na região de Cabo Frio, incluindo o ciclo gonadal, a gametogênese e o desenvolvimento larval.

Muito pouco se sabe a respeito dos aspectos reprodutivos de Asteroidea no litoral brasileiro (VENTURA *et al.*, 1997; VENTURA *et al.*, 1998). O estudo da reprodução sexuada de *Asterina stellifera* irá contribuir de forma relevante com informações da história de vida de mais uma espécie da família Asterinidae, que é composta por espécies que apresentam diferentes tipos larvais.

Esta dissertação está organizada em formato de artigo científico, de acordo com o novo modelo deliberado pelo Programa de Pós Graduação em Zoologia do Museu Nacional/UFRJ.

ARTIGO

REPRODUCTIVE CYCLE AND LARVAL DEVELOPMENT OF *Asterina stellifera* (MÖBIUS)
(ECHINODERMATA: ASTEROIDEA) FROM TWO DISTINCTS HABITATS IN CABO FRIO REGION,
BRAZIL.

Adriana Luiza Pimenta Sant'ago de Carvalho & Carlos Renato Resende Ventura

ABSTRACT

The development and reproductive cycle of *Asterina stellifera* were studied from samples taken from populations in two distinct habitats from Cabo Frio. One is an intertidal seagrass flat at Japonês Island (1994-1995); the second is a sublittoral rocky-shore at Pontal Beaches (1999-2000). Development pattern was described based on laboratory cultures. Reproductive cycle was studied at monthly intervals by organ indices and histological examinations of gonads. *A. stellifera* has a typical planktotrophic development with bipinnaria and brachiolaria stages. The periodicity of the annual reproductive cycle was similar for both populations, but the gonad index (GI) was higher and the pyloric caeca index (PCI) had less variation in the rocky-shore population. The GI and PCI had an inverse relationship in both populations, but it was greater in the seagrass-flat population. Environmental factors like hydrodynamics and food availability are the most probable mechanisms for these differences.

INTRODUCTION

Annual reproductive cycles have been described for many asteroid species (Farmanfarmaian *et al.*, 1958; Crump, 1971; Scheibling, 1981; Crump and Barker, 1985; Franz, 1986; Boivin *et al.*, 1986; Barker and Xu, 1991; Byrne, 1992; Chen and Chen, 1992; Byrne *et al.*, 1997). These studies involve mainly temperate species and little is known about South Atlantic asteroids species (Ventura *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 1998).

A great diversity of reproductive strategies has been reported to asteroids and both seasonal and continuous reproductive patterns have been described. These strategies may even vary between closely related species. (Emlet *et al.*, 1987; Chia *et al.*, 1993; McEdward and Janies, 1993). The reproductive strategy is a striking feature in functional biology of a species and is important in studies on evolutionary changes in life-history (Wray, 1996).

Development in the family Asterinidae has a great diversity (Byrne and Cerra, 1996; Hart *et al.*, 1997). Asterinids include species with planktotrophic development (Byrne and Barker, 1991); non-feeding pelagic development, (Lawson-Kerr and Anderson, 1978; Byrne, 1992; Byrne *et al.*, 1999; Chen and Chen, 1992); non-feeding benthic development, (Lawson-Kerr and Anderson, 1978; Byrne, 1995; Emson and Crump, 1976; Marthy, 1980); viviparous species which develop through an intragonadal reduced larvae, (Byrne and Cerra, 1996; Komatsu *et al.*, 1990). There are also fissiparous species, (Achituv and Sher, 1991).

Asterina stellifera (Möbius) is an Atlantic temperate specie, common in intertidal zone, occurring mainly in rocky shores. Its distribution ranges from Cabo Frio, Brazil (23°S 42°W), to Mar del Plata, Argentina (35°S 56°W), in the west Atlantic and from Senegal

(15°N 15°W) to Namibia (28°S 15°E) (SW Africa) in the east Atlantic (Clark and Downey, 1992).

This study describes the reproductive cycle of *Asterina stellifera* of two populations from different habitats in the Cabo Frio region and the chronology of development.

MATERIAL AND METHODS

Study areas

Asterina stellifera were collected in two distinct habitats, in the Cabo Frio region (Fig. 1). Japonês Island (site 1) is an intertidal sand flat with seagrass (*Halodule wrightii*) located in Itajuru Channel (22° 59'S; 42°W) which connects Araruama Lagoon to the ocean. Annual surface seawater temperature varied from 20° to 36°C during the sampling period (Junqueira *et al.*, 1997). The second (site 2) is a rocky intertidal site, located at Pontal Beaches, Arraial do Cabo (22° 53'S 42°W). The surface seawater temperature there varied from 19° to 27°C, during the studied period.

Reproductive cycle

Adults were randomly collected monthly from August 1994 to December 1995 in the seagrass flat population (site 1) and from March 1999 to October 2000 in the rocky shore population (site 2) (Table 1). Specimens preserved in 10% formaldehyde. In the laboratory, specimens were placed on a filter paper for approximately 30 minutes and then weighed. Gonads and pyloric caeca were removed and weighed.

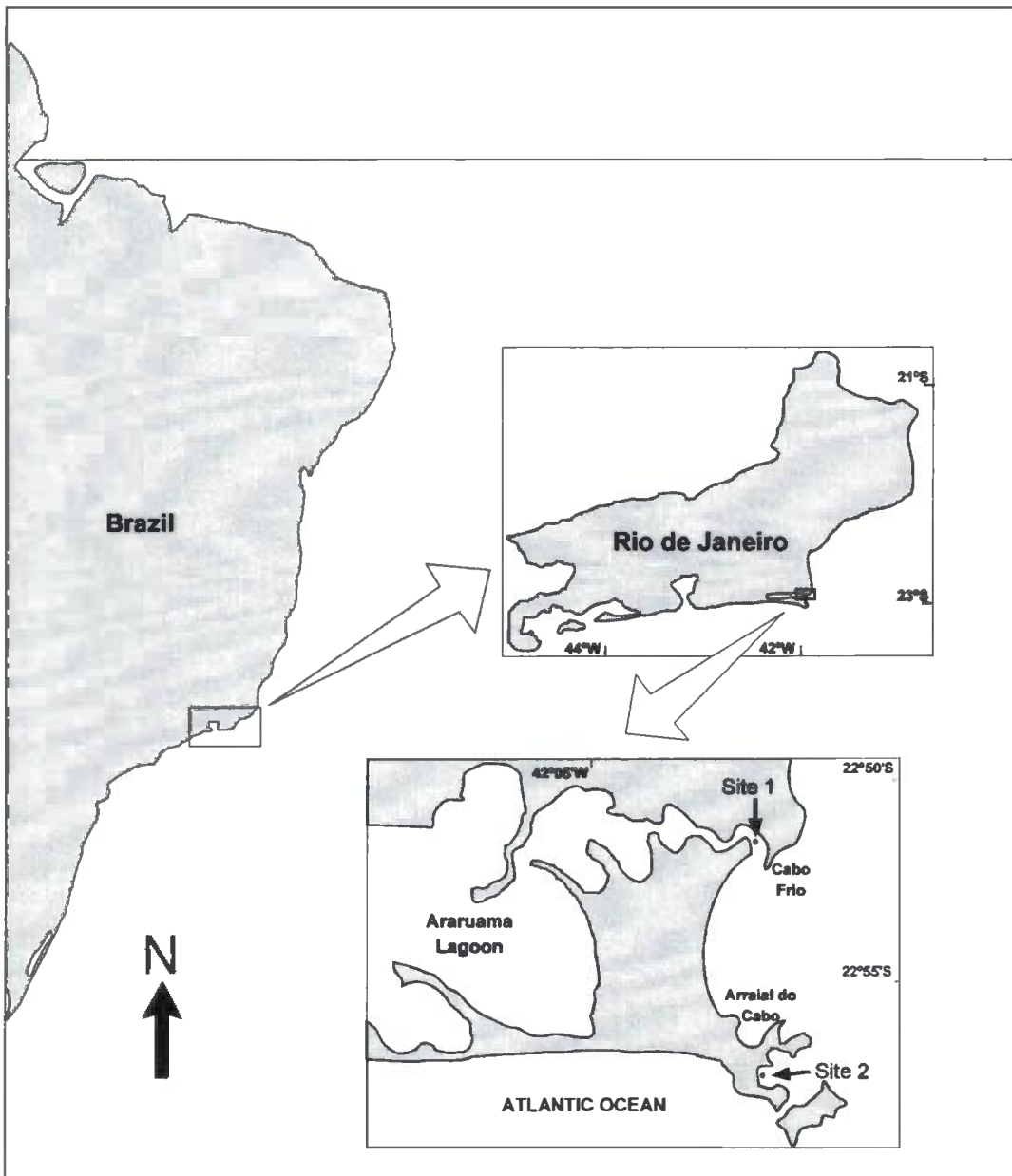


Fig. 1 – Location of study sites. Site 1 – seagrass-flat population; Site 2 – rocky-shore population

Table 1: Numbers of adult *Asterina stellifera* monthly collected for reproductive cycle analysis from seagrass-flat population (SGFP) and from rocky-shore population (RSP).

SGFP	Aug 94	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan 95	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec			
Females*	3	5		6	6	2	-	6	6	2	7	-	5	5	-	3	2			
Males*	5	6		8	3	9	-	6	5	1	4	-	6	6	-	10	7			
Total**	9	11		15	10	12	-	13	12	3	11	-	12	11	-	13	10			
RSP	Mar 99	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan 00	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct
Females*	9	4	8	7	9	5	6	8	5	5	7	9								
Males*	6	8	3	6	5	6	5	6	10	9	6	7								
Total**	15	15	11	15	15	10	11	15	15	15	15	16	15	15	15	15	15	15	15	11

(*):number of individuals analyzed histologically; (**):number of dissected individuals.

Gonad index (GI) and pyloric caeca index (PCI) were calculated as (organ wet weight/ total eviscerated body weight) X 100 (Grant and Tyler, 1983).

Monthly samples of gonads were embedded in paraffin and sectioned at 7 μ m. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Gametogenesis was divided into five stages (Byrne, 1992; Byrne *et al.*, 1997). Oocyte size frequency distribution was documented by measuring the diameter of oocytes sectioned through nucleus.

Monthly variation of GI and PCI were tested for significance using the Kruskal-Wallis nonparametric test (Zar, 1984; Siegel, 1975). Gonad indices from each population were compared by Student's t-test (Zar, 1984) after checking all requirements of homocedasticity. A chi-squared goodness-of-fit test (Zar, 1984) was used to determine if the male to female ratio differs from 1:1, as well as to verify differences between GIs of females and GIs of males (Crump and Barker, 1985).

Larval development

Adults were collected from rocky-shore population (site 2) during the breeding season, from August to September. In the laboratory, ovaries and testes were removed. Ovaries were treated with a 10^{-5} solution of 1-methyladenine (Kanatani, 1969; Meijer *et al.*

1984), for approximately 2h to obtain mature oocytes. Testes were kept dry in a refrigerator for the same period.

For fertilization, oocytes were washed in seawater and placed in a 500ml beaker. Pieces of testis were transferred to a petri dish with approximately 50ml of seawater to obtain a dilute sperm solution. A few drops of the sperm solution were added to the beaker containing the oocytes. Five to ten minutes later, the fertilized eggs were filtered in a 25 μ m net and carefully washed several times in seawater to remove sperm.

Fertilized eggs were transferred to 5 liter flasks with 3 liter of seawater, at a concentration of approximately 20 cells.ml⁻¹ of seawater (Barker, 1978). These flasks were kept in at a 12:12h photoperiod in a temperature controlled room at 20°C \pm 1°C. For the first two days, seawater was changed every 12h and samples of developing embryos were taken every hour. After the second day, seawater was changed every two days and samples of the larvae were taken everyday. These samples were anaesthetized in 7% MgCl₂ solution before fixation in Bouin's solution and 10% formaldehyde.

Two days after fertilization, when the early bipinnaria was observed, the feeding of larvae was initiated. A mixture of two flagellated species, *Dunaliella tertiolecta*, and *Isochrysis galbana* and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* was added to the cultures at concentrations of 5000-12000 cells.ml⁻¹. The algae were grown in F/2 medium (Guillard & Ryther, 1962). Algae were added to the cultures when the seawater was changed, every two days. Seawater used in the cultures was sterilized in autoclave for 40 minutes.

RESULTS

Organ Indices

Asterina stellifera exhibited an annual reproductive cycle pattern at both studied populations (Fig.2-4). Peaks in gonad indices in the seagrass-flat population occurred in late winter (August 1994 \cong 21%, and in September 1995 \cong 19%) (Fig. 2). These peaks were followed by a marked drop in gonad index (GI), indicating a spawning period from August to November 1994 and from September to November 1995 (spring). The GI increased gradually from November 1994 to August 1995.

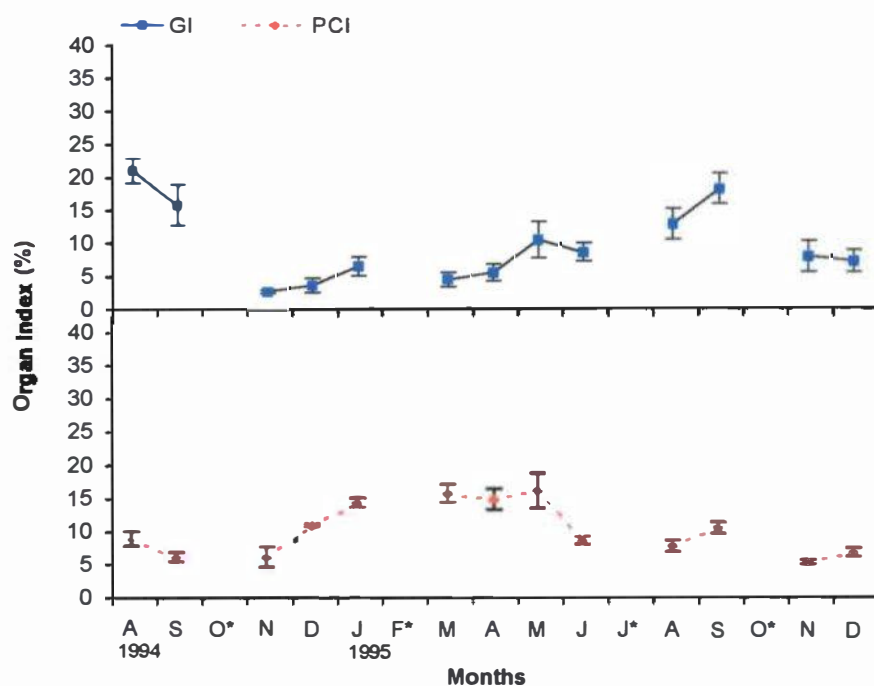


Fig. 2 – *Asterina stellifera*. Monthly variation in mean gonad and pyloric caecum indices from seagrass-flat population. Vertical bars indicate \pm SE. *No sampled months.

The Kruskal-Wallis test showed significant differences between maximum and minimum GI values. The peak recorded in August 1994 was significantly higher than that recorded in September. Although the gonad cycle of males and females were similar (Fig. 3), GI of females were significantly higher than GI of males ($\chi^2= 7,465$; D.F.=2; $0,01 > p > 0,001$).

The pyloric caeca index (PCI) started to increase in November 1994 ($\cong 7\%$) and peaked in May 1995 ($\cong 16\%$) (Fig. 2). From May to June 1995, PCI values dropped to a low of $\cong 5\%$ in November 1995. The PCI increased in December 1995 suggesting the beginning of another cycle.

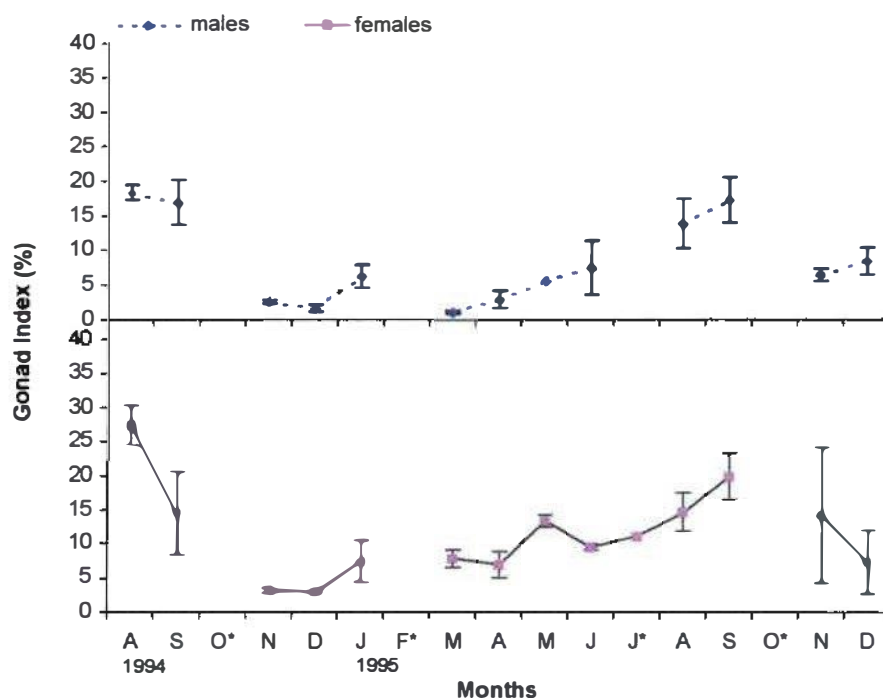


Fig. 3 – *Asterina stellifera*. Monthly variation in gonad index of males and females from seagrass-flat population. Vertical bars indicate \pm SE. *No sampled months.

Gonad and pyloric caeca indices exhibited a reciprocal relationship (Fig. 2). In August 1994 (maximum GI), PCI values were low. The PCI increased from November 1994 (minimum GI) to June 1995 (Fig. 2).

In the rocky-shore population, the maximum gonad indices (GI) also occurred in late winter (August 1999 \cong 26% and in September 2000 \cong 35%), and minimum values in March 1999 (\cong 2%) and February 2000 (\cong 3%) (Fig. 4). Gonad index increased gradually from March to August 1999. A marked drop in GI from August to September 1999 indicated the beginning of spawning period, which extended to February 2000. An increase in GI in February indicated, the beginning of a new cycle.

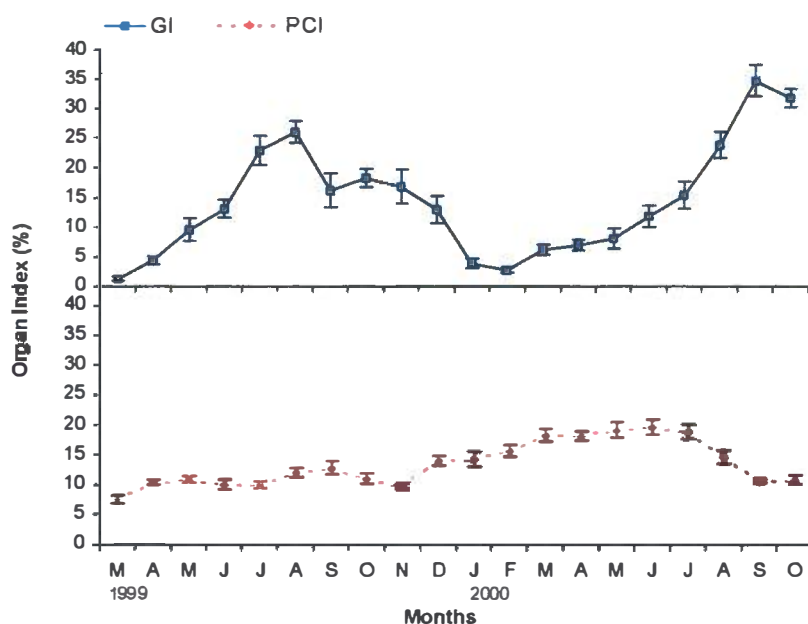


Fig. 4 – *Asterina stellifera*. Monthly variation in mean gonad and pyloric caecum indices rocky-shore population. Vertical bars indicate \pm SE.

The maximum and minimum GI were significantly different ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis test). Gonad index in females were significantly higher than in males (Fig. 5) ($X^2 = 14,485$; d.f.=2; $p < 0,001$).

Pyloric caeca indices were low from March to November 1999 (Fig.4). An increase in December 1999 was significant ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis test). The Student's t-test showed that the GI of the seagrass-flat population were significantly less than those of the rocky-shore population ($t = 4,44$; d.f.=429; $p < 0,05$).

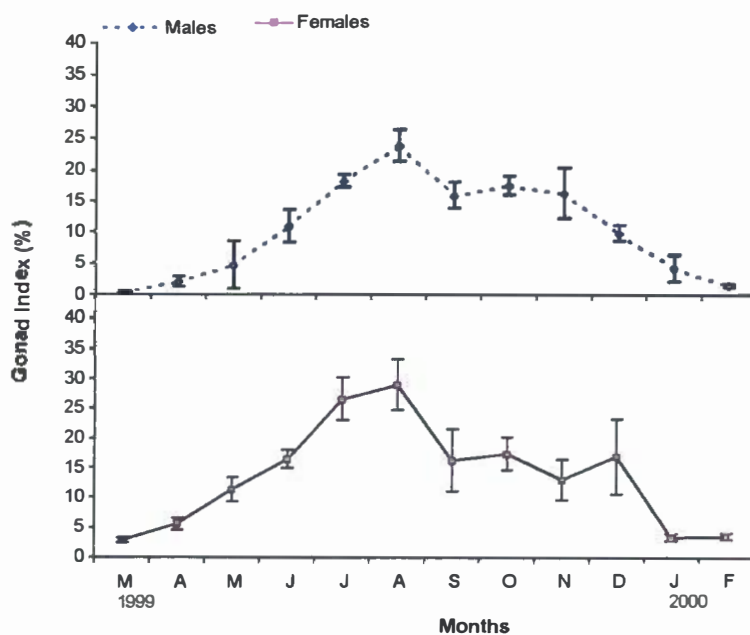


Fig 5 – *Asterina stellifera*. Monthly variation in mean gonad index of males and females from rocky-shore population. Vertical bars indicate \pm SE.

Histological analysis

Sex ratio

The male:female ratio of both populations was not significantly different from 1:1 (seagrass-flat population: $\chi^2=2,63$, d.f.=1, $p \geq 0,01$; rocky-shore population: $\chi^2=1,076$, d.f.=1, $p \geq 0,01$).

Gametogenic cycle

Annual gametogenic cycles were very similar in both populations. Maturity stages of *Asterina stellifera* are illustrated in Figure 6 (males) and Figure 7 (females). Frequencies of maturity stages are shown in Figures 8 and 9.

Spermatogenesis

At recovery stage (Fig 6A), spermatic columns are evident along the thick testis wall and the geminal layer becomes folded. Relict sperm are observed in some testes. The beginning of spermatogenic cycle occurred in March (late summer/early fall) in both populations (Fig. 8A-9A). At this time, gonads were very small, and testes were recovering a new cycle. In the rocky-shore population, a new spermatogenic cycle started by January 2000, when males in recovery stage were recorded (Fig. 9A).

Growing testes are characterized by intense sperm production. Spermatic columns became larger and some sperm are found in the lumen (Fig. 6B). The growing phase of testis was shorter in the seagrass-flat population than in the rocky-shore population and occurred mainly from January to April 1995 (Fig. 8A). In the rocky-shore population, testes growth was mainly documented from April to July 1999 (Fig 9A).

In mature testes, the spermatogenic columns become narrow and the lumen is completely filled by spermatozoa (Fig. 6C). In the seagrass-flat population mature stage was observed mainly in August and September 1994 and from May to September 1995 (Fig. 8A). The rocky-shore population had mature testes from June to September 1999 (Fig. 9A).

In partly spawned testes, the lumen is not densely filled by sperm. Some empty spaces are present because of sperm release (Fig. 6D). This is an intermediate stage between mature and spent individuals. Spawning for males from the seagrass-flat population was from August to September 1994 and in December 1995 (Fig. 8A). Males from the rocky-shore population spawned in August 1999, but high frequencies of partly spawned individuals were recorded from October to December 1999 (Fig 9A).

In spent testes, the lumen is almost empty. Gonad wall becomes shrunken and two-sac structure is evident (Fig. 6E). Empty testes were found in November and December 1994 in the seagrass-flat population (Fig. 8A) and in March/April 1999 and January/February 2000 in the rocky-shore population (Fig. 8A).

Oogenesis

In the recovery stage, ovaries are small and small oocytes are found in the ovary wall (Fig. 7A). In the seagrass-flat population, ovaries were in the recovery stage in March 1995 (Fig. 8B), characterizing the beginning of the oogenic cycle. Frequency of ovaries in recovery stage was very low in the rocky-shore population although females were in this stage March to May 1999 (Fig. 9B).

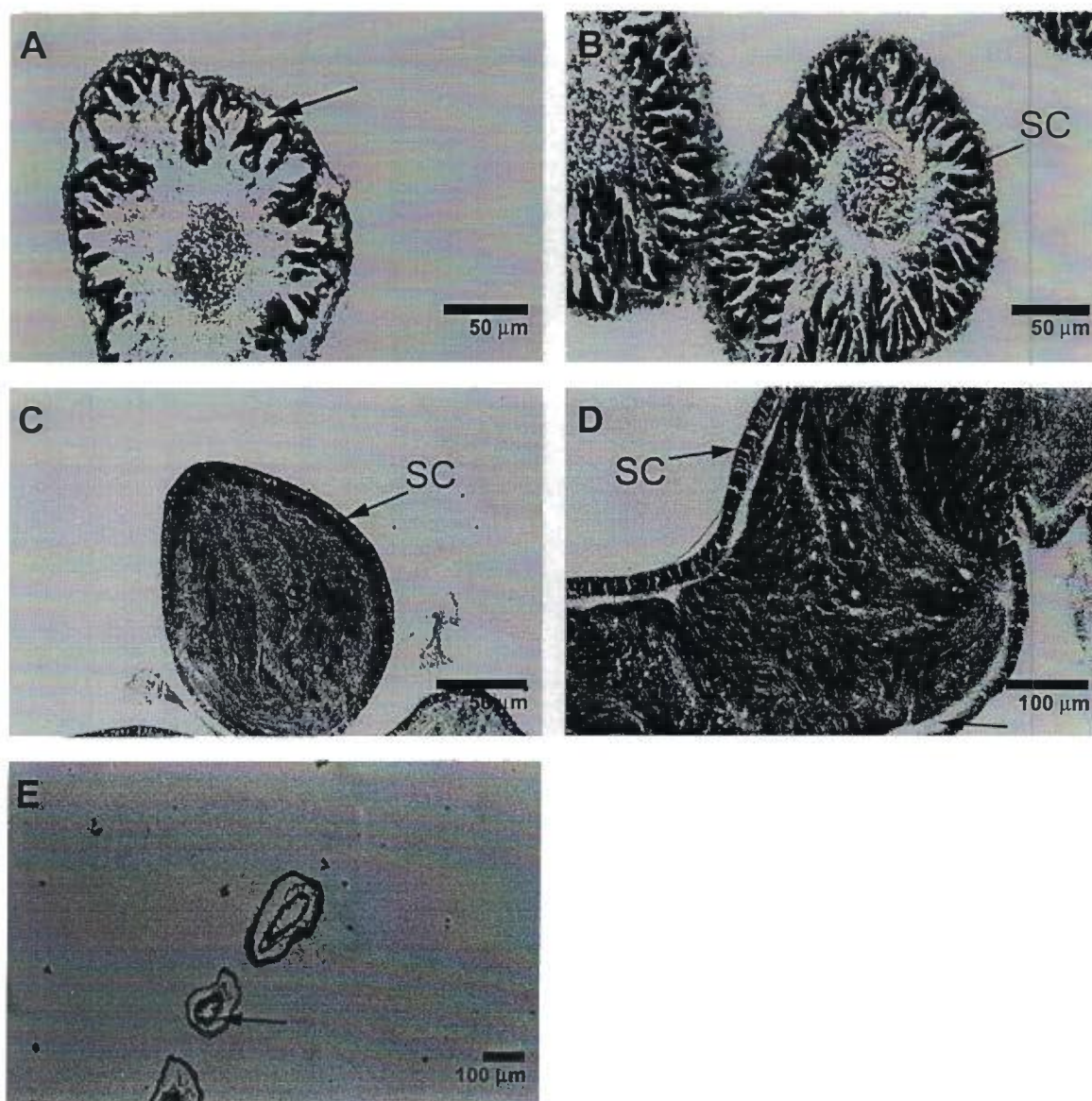


Fig. 6 – *Asterina stellifera*. Histological sections of testes. (A) Recovery stage showing tortuous profile of germinal epithelium (arrow). (B) Growing stage. S - sperms; SC - spermatic columns. (C) Mature stage with lumen filled by sperms. SC - spermatic columns; S - sperms. (D) Partly spawned stage containing spaces because of sperm release (arrow). S - sperms; SC - spermatic columns. (E) Spent stage with the two-sac structure evident (arrow).

Ovaries in the growing stage (Fig. 8B) are characterized by an dramatic increase of oocytes diameter. The pear shape of oocytes becomes round. As oocytes increase in diameter, there is a dislocation of larger oocytes to the lumen. Ovaries were in the growing stage from April to May in the seagrass-flat population (Fig. 8B) and from April to July in the rocky-shore population (Fig 9B).

In mature ovaries, the lumen is filled with large oocytes (Fig. 7C). Previtellogenic oocytes are often present in ovary wall. The rocky-shore population had mature oocytes from June to July (Fig. 9B).

Partly spawned ovaries (Fig. 7D) are very similar to mature ovaries. However the lumen of ovary is not completely filled with oocytes because of oocyte release. The seagrass-flat population spawned from August to September 1994 and from January to December 1995 (Fig. 8B). The rocky-shore population, had spawned ovaries from May to December 1999, but spawning mainly occurred from August to December (Fig. 9B). Spawning was characterized by an increase in frequency of ovaries in partly spawned stage.

In spent ovaries, there are few or no vitellogenic oocytes in the lumen (Fig.7E). A few relict oocytes in degeneration are present and gonads become shrunken. The majority of spent ovaries was recorded from September to December 1994 in the seagrass-flat population (Fig. 8B), characterizing an agametogenic phase. Spent ovaries were mainly found from January to February 2000 in the rocky-shore population (Fig. 9B).

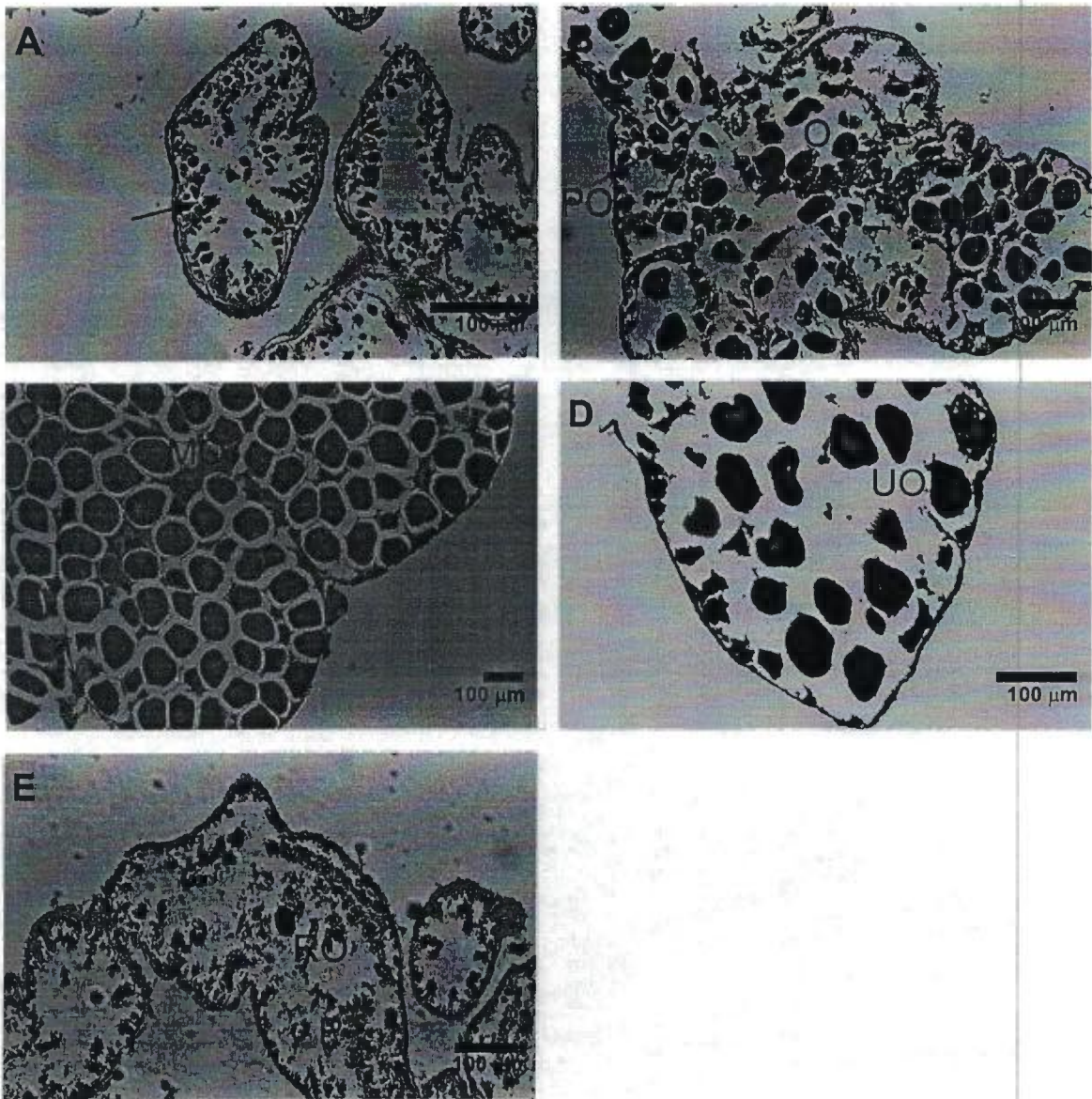


Fig. 7 – *Asterina stellifera*. Histological sections of ovaries. (A) Recovery stage showing invaginations (arrow). (B) Growing stage. PO – previtelogenic oocytes; O – oocytes. (C) Mature stage showing the lumen filled by oocytes. MO – mature oocytes. (D) Partly spawned stage showing spaces among cells. UO – unspawned oocytes. (E) Spent stage RO – relict oocytes; P – phagocytes.

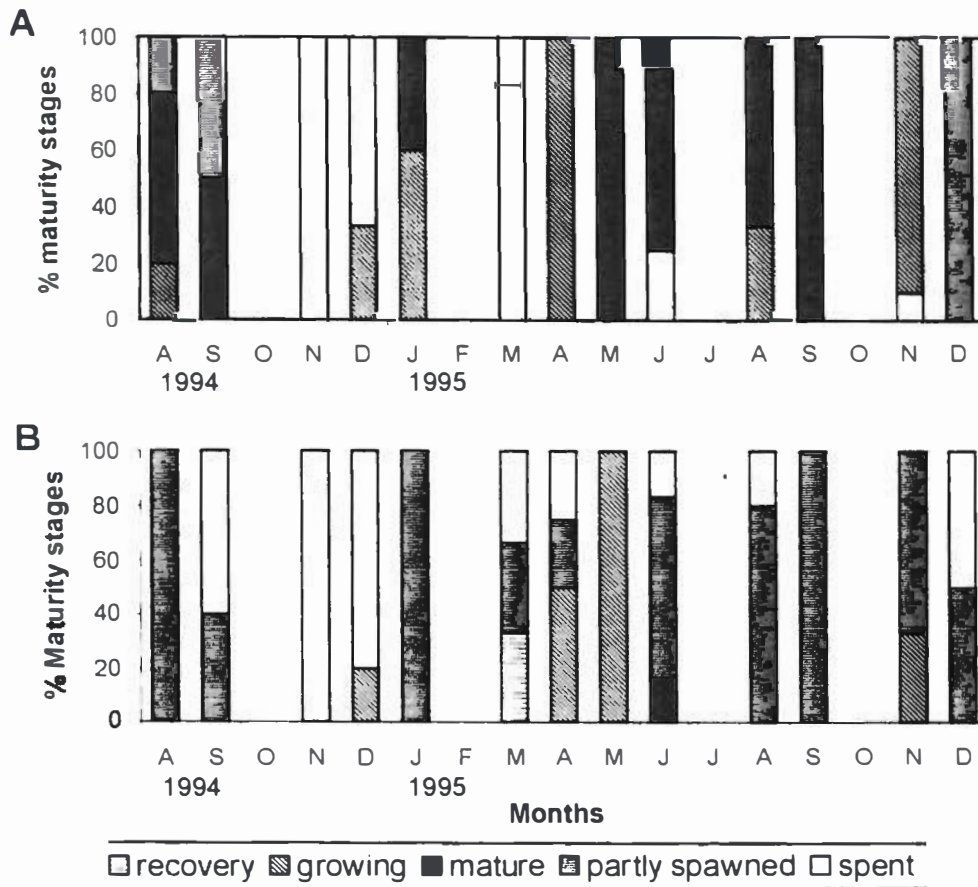


Fig. 8 – *Asterina stellifera*. Gametogenic cycle. Frequency of maturity stages in males (A) and females (B) from the seagrass-flat population

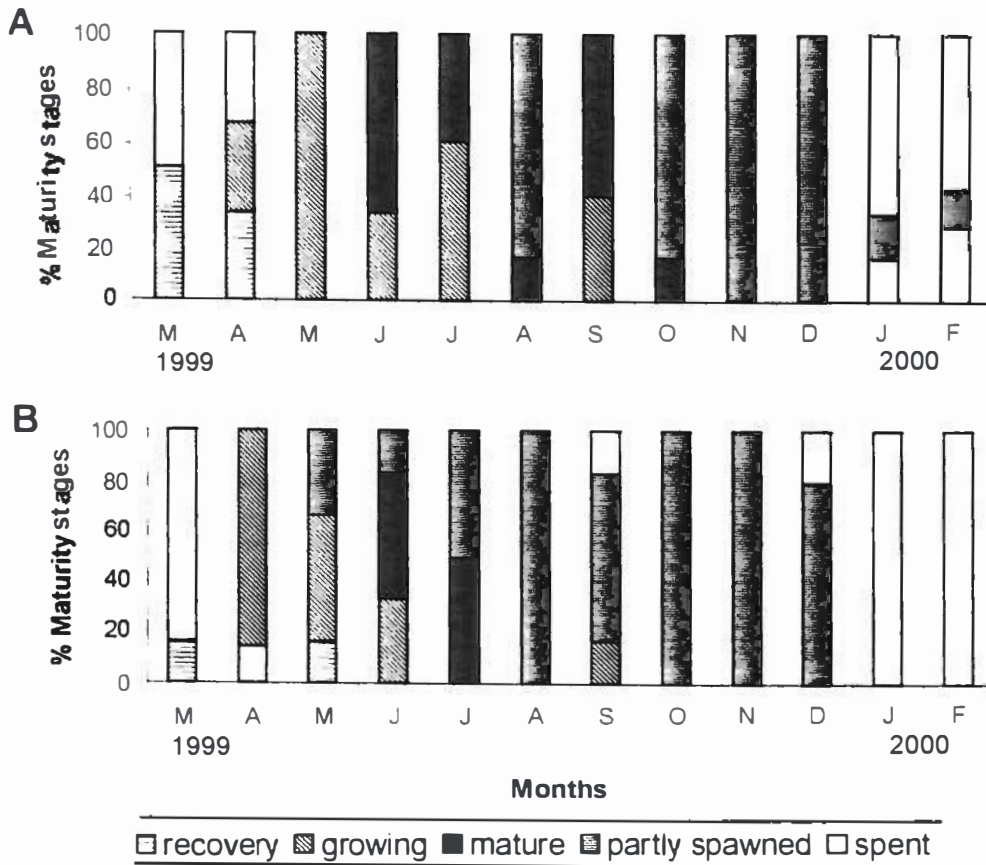


Fig. 9 – *Asterina stellifera*. Gametogenic cycle. Frequency of maturity stages in males (A) and females (B) from the rocky-shore population

Analysis of oocyte diameters (Fig.10-11) confirms the reproductive pattern, indicated by gonad indices and gametogenic cycles for both populations. In the seagrass-flat population (Fig. 10), the maximum oocyte size dropped from August to December 1994, indicating spawning. Oocytes increased in size from March to August 1995. An increase in oocyte diameter occurred in the rocky-shore population from April to June 1999 (Fig. 11). From August to December 1999, oocytes were larger and the modal value was c.a. 90 μm , but larger oocytes (>100 μm) were also founded. From November to December, small classes were found, indicating the beginning of a new cycle. A drop in oocyte diameter was recorded from December 1999 to February 2000, characterizing the end of spawning period (Fig. 11).

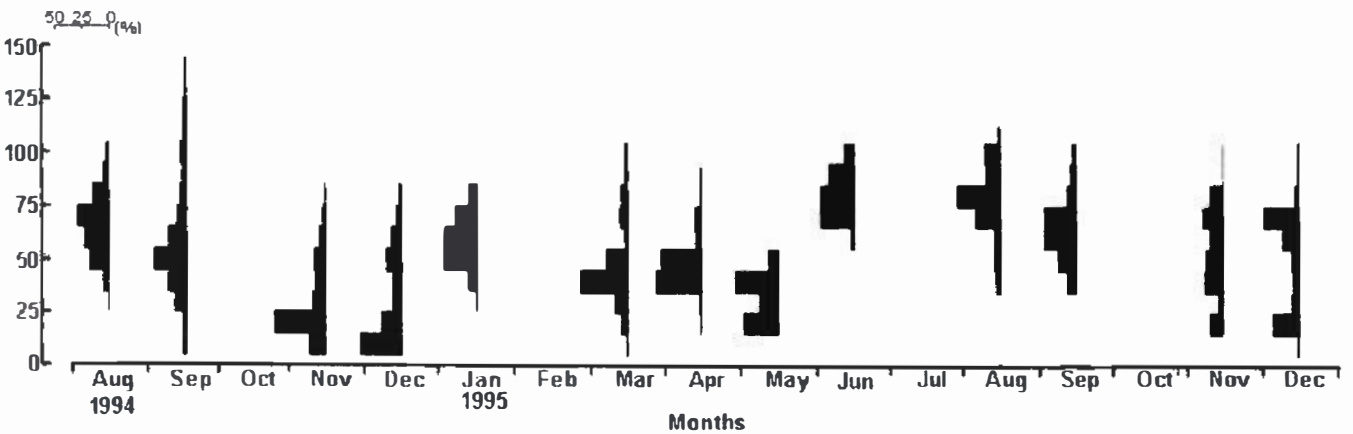


Fig. 10 – *Asterina stellifera*. Oocyte size-frequency distribution in seagrass-flat population.

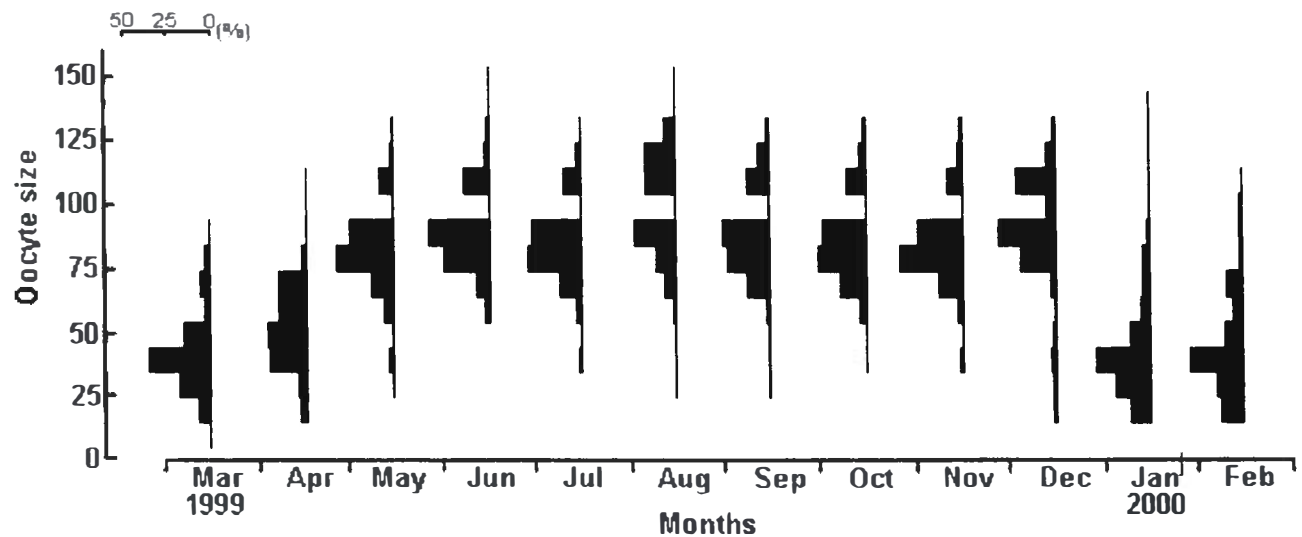


Fig. 11 – *Asterina stellifera*. Oocyte size-frequency distribution in the rocky-shore population.

Larval development

From 90-120 minutes after the beginning of the treatment with 1-metyladenine, ruptures in the ovary wall were observed and mature oocytes were obtained. The spawned eggs were spherical, reddish and 100-150 μ m in diameter.

The chronology of development is presented in Table II. The fertilization membrane, with 1 polar body, was observed 60-120 seconds after fertilization and two polar bodies were observed in 15 minutes after fertilization took place.

The first cleavage (Fig 12A) occurred in 60-75 minutes and the second cleavage (Fig. 12B) 2h after fertilization. From 3 to 4 hours the third (Fig. 12C) and fourth cleavages were completed. Early blastula developed by ca. 5 hours and the wrinkled blastula by 6 to 8 hours (Fig. 12D). The blastula rotated within the fertilization membrane, propelled by the ciliate covering.

Table II: Development chronology of dc *Asterina stellifera*:

Time	stage
0	Fertilization
60-120 s	Fertilization membrane forming
60-90 min	Frist cleavage – 2 blastomere stage
2 hours	Second cleavage – 4 blastomere stage
3-3,5 hours	Third cleavage – 8 blastomere stage
4-4,5 hours	Fourth cleavage - 16 blastomere stage
± 5 hours	Wrinkled blastula
± 22-23 hours	Swimming gastrula; gastrula with elongating archenteron
± 48 hours (2 days)	early bipinnaria
4-8 days	Bipinnaria stage; gut regions differentiate; ciliary bands well-defined; hydropore.
35 days (5 weeks)	Late Bipinnaria/early brachiolaria
5-5,5 weeks	Early brachiolaria
8-10 weeks	Advanced brachiolaria (rudimentary adhesive disc)

After 20 hours, the early gastrula was observed, and two hours later, the swimming gastrula was developed. From 22-23 hours, gastrula with elongating archenteron was documented (Fig. 12E). From 25-48 hours, the embryo developed into the first larval stage, the bipinnaria larvae. The round body shape became elongated; the end of the archenteron became expanded and the rudiment of gut was observed.

After two days the early bipinnaria (Fig 13A) was observed and the larvae was ca. 900µm in length. The gut and ciliary bands were evident. At this time, the larvae began to feed. From 5-10 days, the bipinnaria larvae were well-developed (Fig. 13B) and the characteristic bipinnarian shape and ciliary bands were well-defined. Gut regions, mouth, stomach and oesophagus were well-differentiated and the hydropore was visible in dorsal surface (Fig. 13B-C).

About 5 weeks after fertilization, the late bipinnaria/early brachiolaria stage was reached (Fig. 13D). At this stage, the tips became elongated and the bipinnaria larvae started to get brachiolarian shape.

The early brachiolaria stage was documented after about 5 to 7 weeks. From 8 to 10 weeks, brachiolaria larvae were well developed and the rudimentary adhesive disc was evident. Brachiolaria larvae were larger than bipinnaria and swimming movements characteristic in plancktonic development were not observed.

DISCUSSION

The greatest advantage of an seasonal reproductive cycle is the synchronuous release of gametes within a population, increasing chances of successful fertilization (Olive, 1992). Both populations of *Asterina stellifera* studied here exhibited an annual reproductive cycle, shown by seasonal change in gonad indices, gametogenic stages and oocyte diameters. Two other asteroid species at Cabo Frio, *Astropecten brasiliensis* (Ventura *et al.*, 1997) and *A. cingulatus* (Ventura *et al.*, 1998) show an annual reproductive cycle.

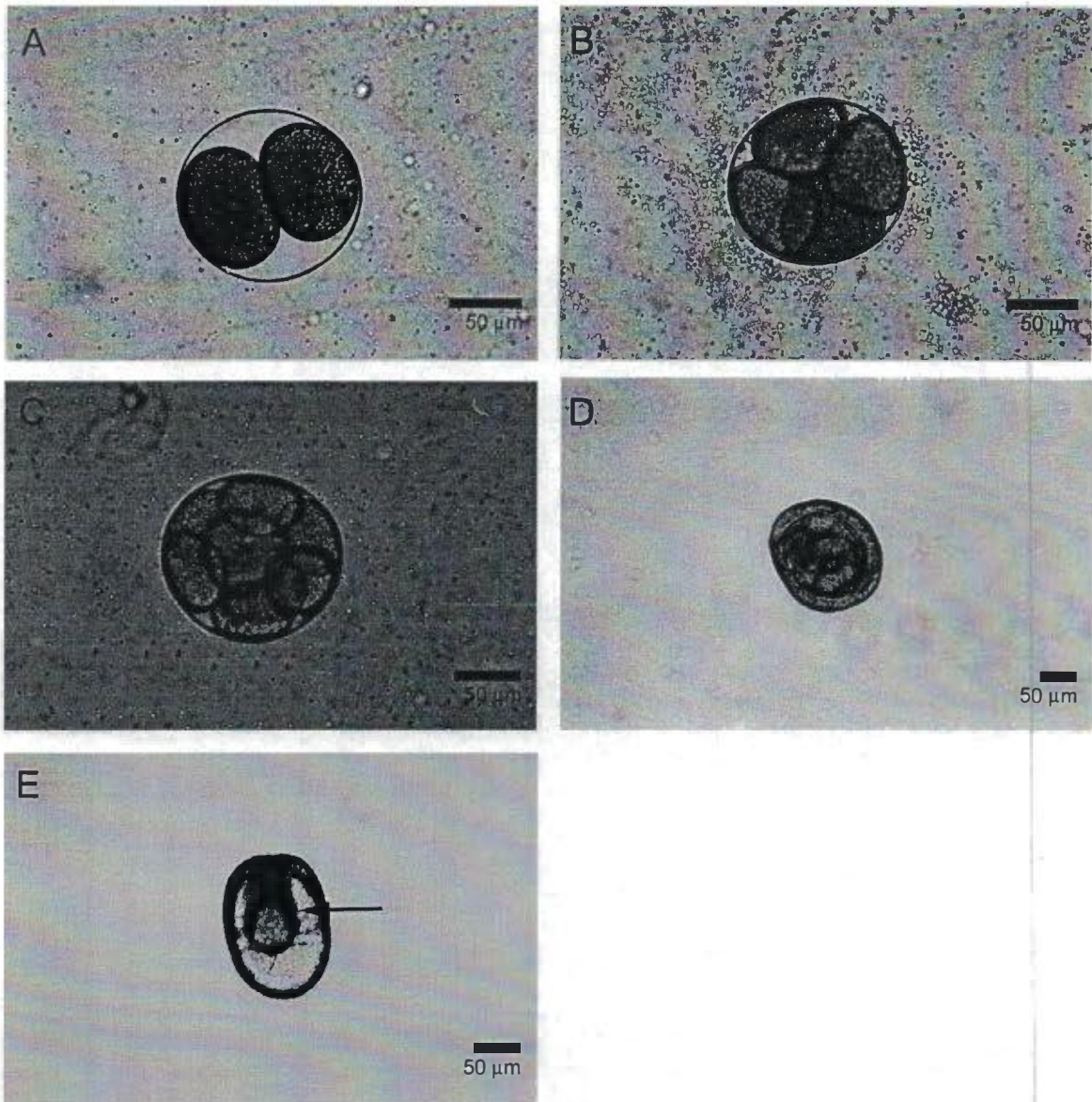


Fig. 12 – *Asterina stellifera*. Early development. (A) One hour, first cleavage. (B) Two hours, second cleavage. (C) Three hours, third cleavage. (D) Six to eight hours, wrinkled blastula. (E) Twenty-two to twenty-three hours, gastrula with elongating archenterom (arrow).

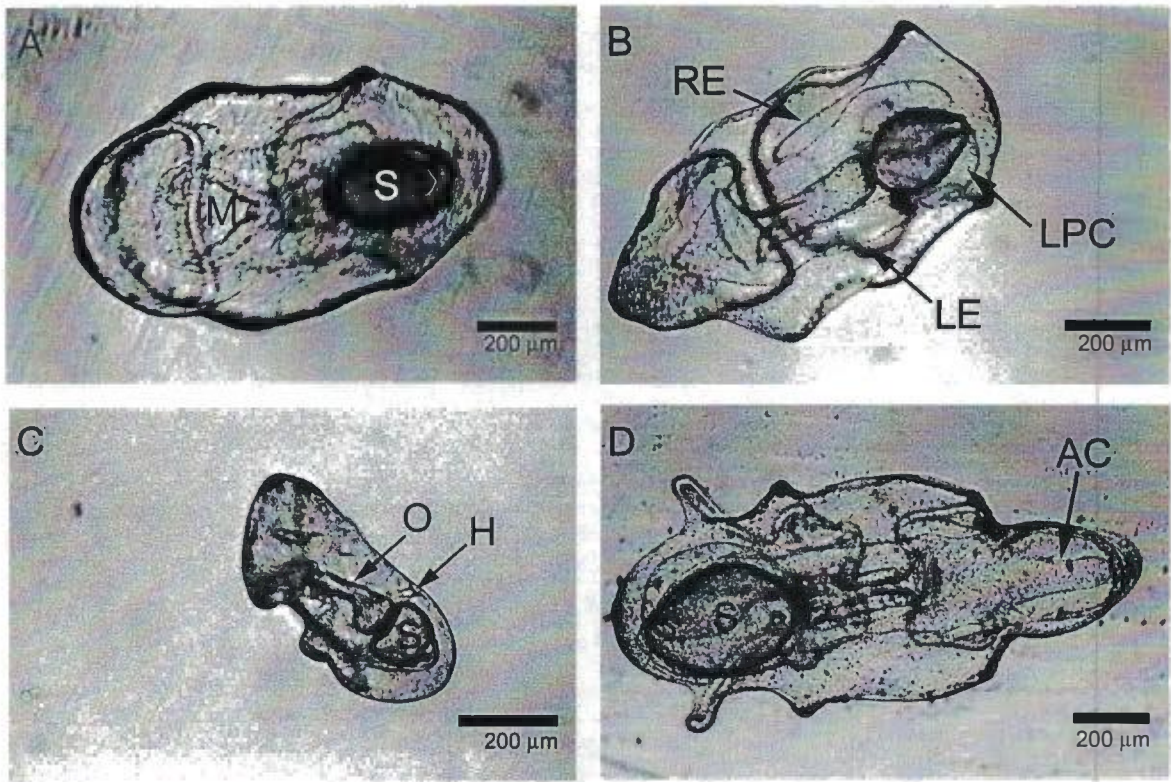


Fig. 13 – *Asterina stellifera*. Larval development. (A) Bipinnaria stage, two days, ventral view. M – mouth; S – stomach. (B) Five to ten days. LE – left enterocel; RC – right enterocel; LPC – left posterior celom. (C) Five to ten days, side view. Gut regions are evident. S – stomach; O – oesophagus; H – hydropore. (D) Late Bipinnaria/early Brachiolaria. AC – anterior celom; S – stomach.

Some studies have been reported interpopulation differences in reproductive pattern in asteroid species, e.g. *Patiriella regularis* (Crump, 1971); *Oreaster reticulatus* (Scheibling, 1981); *Asterias rubens* (Barker and Nichols, 1983); *Coscinasterias calamaria* (Crump and Barker, 1985); *Sclerasterias mollis* (Barker and Xu, 1991). These studies pointed out that these differences can be related to environmental factors such as temperature, hydrodynamics and food availability. Despite the fact that the two populations of *A. stellifera* showed a similar gonadal cycle, differences in reproductive output and

length of spawning period were found. Gonad indices from the seagrass-flat population, were significantly lower than they those of the rocky-shore population, and the spawning period was shorter. The seagrass-flat population probably was influenced by stressful environmental conditions of higher temperatures and exposure. A short breeding season may be favorable for the seagrass-flat population because of environmental stress. However, it is relevant to emphasize that these populations were not studied at the same time.

Gonad index differences between males and females have been reported for some asteroid species (Farmanfarmaian *et al*, 1958; Mauzey, 1966; Crump, 1971; Scheibling, 1981; Franz, 1986). Females *A. stellifera* have higher reproductive output than males since their GI values were always significantly higher. Scheibling (1981) reported similar data for *Oreaster reticulatus*.

Compared to the gonad cycle, the pyloric caeca cycle showed less seasonal variation in either population. This smaller variation in PCI may be caused by a constant food supply (Byrne, 1992), mainly in rocky shore from Pontal Beaches, where this variation was lower.

An inverse relationship between GI and PCI has been reported for many asteroids species (Mauzey, 1966; Barker and Nichols, 1983; Chia and Walker, 1991; Byrne, 1992). Pyloric caeca are storage organs of asteroids (Jangoux and Impe, 1977; Lawrence, 1987) and this inverse relationship suggests the transport of nutrients accumulated in pyloric caeca to gonads, during gametogenesis. In the seagrass-flat population this relationship was more evident than in the rocky-shore population. When food is abundant this relationship may not occur (Lawrence, 1987). Gonadal growth is related to acquisition of nutrients and there is a minimum amount of energy necessary for maintenance. Gonad growth does not

occur below this threshold but does above it: somatic growth would happen as well if an upper threshold of energy acquisition is achieved (Lawrence, 1987).

Gonad index (GI) has been widely used in reproductive studies. It is a good indicator of the development stage of gonads and may document reproductive events. However, histological analysis of gonads is important to describe gametogenesis (Schoenmakers, 1984). In this study, histological analysis showed that spawning started earlier than suggested by the GI. In fact, this highlights the importance of histological analysis being done in addition to gonad indices in reproductive studies.

The oocyte size-frequency distributions were unimodal for both populations. This means that only one oocyte cohort is produced during one reproductive cycle. The same pattern has been reported for *Patiriella regularis* (Crump, 1971). In contrast, bimodal distributions have been reported for *P. gummii*, *P. calcar* (Byrne, 1992) and *P. exigua* (Chen and Chen, 1992). The longer period of oogenesis, in these species, is probably associated with their lecithotrophic development pattern (Chen and Chen, 1992).

Asterina stellifera has a typical planktotrophic development, as found in *Stichaster australis*, *Coscinasterias calamaria* (Barker, 1978), *Patiriella regularis* (Byrne and Barker, 1991), *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis* (Barker and Nichols, 1983 and Chia *et al.*, 1993).

A great diversity of development patterns has been reported to asterinid sea star (Byrne and Cerra, 1996; Hart *et al.*, 1997). This diversity is not usual among asteroids and some studies have speculated if these different life-history diversity follows phylogenetic lineages (Byrne and Cerra, 1996; Smith, 1997; Hart *et al.*, 1997; Byrne *et al.*, 1999; Hart, 2000). The greatest difficulty in answering a question like this, is the limited information on asteroids' life cycle. The variety of developmental patterns, reported for asterinids

species, mainly in *Patiriella* and *Asterma* species, make the Asterinidae family an important tool in phylogenetic studies of larval evolution. A phylogeny based on molecular data was carried out for the Asterinidae (Hart *et al.*, 1997). This study emphasized the necessity of more information about the life-history of other asterinids to reconstruct the transformations among modes of development in the family (Hart, 2000). The developmental pattern of *A. stellifera*, reported in this study may contribute to clarify the evolution of life-history traits in Asterinidae family.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. John M. Lawrence, and Dr. Hélio Ricardo da Silva for the helpful suggestions during the preparation of the manuscript. For the help during the field and laboratory, we thank to Dra Andrea de O.R. Junqueira, Andrea D. Pereira, Fábio.S. Mac Cord, Ricardo S. Varotto, Samantha Lee S. Alves and Thais H.M. Melo. We are also very grateful to Dr. Clóvis Castro, Dra. Débora Pires, from Museu Nacional/UFRJ, and to Dr. Sérgio Lourenço and Dr. Abilio Soeres members of Marine Biology Department of Universidade Federal Fluminense for providing facilities. To Marcelo S. Medeiros, for his help in computing.

REFERENCES

- Achituv Y., Sher E. (1991) Sexual Reproduction and fission in the sea star *Asterina burtoni* from the Mediterranean coast of Israel. Bull. mar. Sci. 48(3): 670-678.
- Alves S. L. S., Pereira A. D. Ventura C. R. R. (1999) Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) from Rio de Janeiro, Brazil. In: Echinoderm Research 1998. M.D.C Carnevali & F. Bonasoro (Eds.):165. A. A. Balkema Publ., Rotterdam.
- Barker M.F. (1978) Descriptions of the larvae of *Stichaster australis* (Verrill) and *Coscinasterias calamaria* (Gray) (Echinodermata: Asteroidea) from New Zealand, obtained from laboratory culture. Biol. Bull. 154:32-46.
- Barker M.F. Nichols D (1983) Reproduction, recruitment and juvenile ecology of the starfish, *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. J. mar. biol. Ass. U.K.63: 745-765.
- Barker M.F., Xu R.A. (1991) Seasonal changes in biochemical composition of body walls, gonad and pyloric caeca in two populations of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea) during the annual reproductive cycle. Mar. Biol. 109: 27-34.
- Boivin, Y., Larrivée D, Himmelman J.D.(1986) Reproductive cycle of the subarctic brooding asteroid *Leptasterias polaris*. Mar. Biol. 92: 329-337.
- Byrne M., Barker M.F. (1991) Embryogenesis and larval development of the asteroid *Patiriella regularis* viewed by light and scanning electron microscopy. Biol. Bull. 180:332-345.
- Byrne M. (1992) Reproduction of sympatric populations of *Patiriella gummii*, *P. calcar* and *P. exigua* in New South Wales, asterinid seastars with direct development. Mar. Biol. 114: 297-316.

- Byrne M. (1995) Changes in larval morphology in evolution of benthic development by *Patiriella exigua* (Asteroidea: Asterinidae), a comparison with the larvae of *Patiriella* species with planctonic development. Biol. Bull. 188: 293-305.
- Byrne M., Cerra A. (1996) Evolution of intragonadal development in the diminutive asterinid sea stars *Patiriella vivipara* and *P. parvivipara* with an overview of development of Asterinidae. Biol Bull 191: 17-26
- Byrne M, Morrice M.G., Wolf B (1997) Introduction of the northern Pacific asteroid *Asterias amurensis* to Tasmania: reproduction and current distribution. Mar. Biol. 127: 673-685.
- Byrne M., Cerra A., Hart M.W, Smith M.J. (1999). Life history diversity and molecular phylogeny in the Australian sea star genus *Patiriella*. In: W. Ponder and D. Lunney eds The Other 99%. The Conservation and Biodiversity of Invertebrates. Transactions of the Royal Zoological Society of New Wales, Mosman
- Chen B.Y, Chen C.P. (1992) Reproductive cycle, larval development, juvenile growth and population dynamics of *Patiriella pseudoexigua* (Echinodermata: Asteroidea) in Taiwan. Mar. Biol. 113: 271-280.
- Chia F.S., Walker C.W. (1991) Echinodermata: Asteroidea In: Giese A.C., Pearse J.S. and Pearse V.B. (eds) Reproduction of Marine Invertebrates, Vol VI Echinoderms and Lophophorates. Boxwood Press, Pacific Grove, California, pp 301-331.
- Chia, F.S. Oguro C., Komatsu M (1993) Sea-star (asteroid) development. In: Barnes, M.; A.D. Ansell and R.N. Gibson (eds) Oceanography and Marine Biological Annual Review UCL Press, London. 71: 223-257.
- Clark A.M., Downey M.E (1992) Starfishes of the Atlantic. Chapman & Hall. pp 794.

- Crump R.G. (1971) Annual reproductive cycles in three geographically separated populations of *Patiriella regularis* (Verrill), a common New Zealand asteroid. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 7: 137-162
- Crump R.G., Barker M.F. (1985) Sexual and asexual reproduction in geographically separated populations of the fissiparous asteroid *Coscinasterias calamaria* (Gray). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 88: 109-127.
- Emllet R.B., McEdward L.R., Strathmann R.R. (1987) Echinoderm larval ecology viewed from egg. In: M. Jangoux and J.M. Lawrence (eds) *Echinoderm Studies* A.A. Balkema, Rotterdam 2: 55-136.
- Emson R.H., Crump R.G. (1976) Booding in *Asterina gibbosa* (Pennant). *Thalassia jugosl.* 12(1): 99-105.
- Farmanfarmaian A., Giese A.C., Boolootian R.A., Bennett J. (1958) Annual reproductive cycles in four species of west coast starfishes. *J. Exp. Zool.* 138: 355-367.
- Franz D.R. (1986) Seasonal changes in pyloric caecum and gonad indices during the annual reproductive cycle in seastar *Asterias forbesi*. *Mar. Biol.* 91: 553-560.
- Grant. A., Tyler P.A (1983) The analysis of data in studies of invertebrate reproduction I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *Int. J. Invert. Reprod* 6: 271-283.
- Guillard, R.R.L., Ryther J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Hart M.W., Byrne M., Smith M.J (1997) Molecular phylogenetic analysis of life-history evolution in asterinid starfish. *Evolution* 51 (6): 1848-1861.

- Hart, M.W. (2000) Phylogenetic analyses of mode of larval development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11: 411-418.
- Jangoux, M., Impe E.V. (1977) The annual pyloric cycle of *Asterias rubens* L. (Echinodermata: Asteroidea). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 30: 165-184.
- Junqueira A.O.R., Ventura C.R.R, Carvalho A.L.P.S., Schmidt A.J. (1997) Population recovery of the sea urchin *Lytechinus variegatus* in a seagrass flat (Araruama Lagoon, Brazil): the role of recruitment in a disturbed environment. *Invert. Reprod. Develop.* 31(1-3): 143-150.
- Kanatani, H. (1969) Induction of spawning and oocyte maturation by 1-methyladenine in starfishes. *Expl. Cell Res.* 57: 333-337.
- Komatsu M., Kano Y.T., Oguro C. (1990) Development of a true ovoviviparous sea star, *Asterina pseudoexigua pacifica* Hayashi. *Biol. Bull.* 179: 254-263.
- Lawrence, J.M. (1987) A functional biology of echinoderms. Croom Helm London & Sidney 340pp.
- Lawson-Kerr C., Anderson D.T. (1978) Reproduction and development of starfish *Patriella exigua* (Lamarck) (Asteroidea: Asterinidae) and some comparisons with *P. calcar* (Lamarck). *Aust. J. mar. Fresh.* 29: 45-53.
- Marthy H.J. (1980) Etude descriptive du développement de l'oeuf d'*Asterina* (Échinoderme, Astéride) son intérêt en embryologie expérimentale. *Vie Milieu* 30 (1): 75-80.
- Mauzey K.P. (1966) Feeding behavior and reproductive cycles in *Pisaster ochraceus*. *Bio. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods hole* 131:127.
- McEdward L.R., Janies D.A. (1993) Life cycle evolution in Asteroids: What is Larva? *Biol. Bull.* 184: 255-268.

- Meijer I., Pondaven P., Guerrier P., Moreau M (1984) A starfish oocyte user's guide. Cah. Biol. mar. 25:457-480
- Olive P.J.W. (1992) The adaptive significance of seasonal reproduction in marine invertebrates: the importance of distinguish between models. Invert. Reprod. Develop. 22: 165-174.
- Scheibling R.E. (1981) The annual reproductive cycle of *Oreaster reticulatus* (L.) (Echinodermata: Asteroidea) and interpopulation differences in reproductive capacity. J. exp. mar. Biol. Ecol. 54: 39-54.
- Schoenmakers H.J.N., Goedhart M.J., Voogt P.A. (1984) Biometrical and histological aspects of reproductive cycle of ovaries of *Asterias rubens* (Echinodermata). Biol. Bull. 166: 328-348.
- Siegel S. (1975) Estatística não-paramétrica. McGraw-Hill, São Paulo, 350pp.
- Smith A.B. (1997) Echinoderm larvae and phylogeny. A. Rev. Ecol. Syst. 28: 219-241.
- Ventura C.R.R., Falcão A.P.C., Santos J.S., Fiori C.S. (1997) Reproductive cycle and feeding periodicity in the starfish *Astropecten brasiliensis* in the Cabo Frio upwelling ecosystem (Brazil). Invert. Reprod. Develop. 31(1-3): 135-141.
- Ventura C. R. R., Santos J. S., Falcão A. P. C., Fiori C. S. (1998) Reproduction and food intake in *Astropecten cingulatus* (Asteroidea: Paxillosida) in the upwelling environment of Cabo Frio (Brazil) :313-318, in Mooi, R. & Telford, M.[Eds]. *Echinoderms (San Francisco)*. Balkema, Rotterdam.
- Wray G.A. (1996). Parallel evolution of nonfeeding larvae in echinoderms. Syst. Biol. 45(3): 308-322.
- Zar J.H. (1984) Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New York, 718 pp.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas duas populações estudadas foram observados picos no crescimento gonadal nos meses de agosto e setembro. Dados relativos à coleta realizada em agosto de 1996 (fora do período de estudo) na população da Ilha do Japonês (seagrass-flat population) mostram que o valor do índice gonadal foi semelhante ao que foi observado em agosto 1994 e setembro 1995 ($\cong 19\%$). Isto sugere que o período de liberação das células reprodutivas ocorra principalmente no final do inverno e durante a primavera, caracterizando um ciclo anual de desenvolvimento gonadal. Os baixos e constantes valores do erro padrão durante a época de liberação dos gametas sugerem uma sincronia entre os indivíduos nas duas populações estudadas.

Esta época de liberação dos gametas pode estar associada ao fenômeno da ressurgência que ocorre na região de Cabo Frio, principalmente na primavera e verão, de setembro a março (VENTURA & FERNANDES, 1995; VENTURA *et al.*, 1997). O desenvolvimento da larva planctotrófica neste período seria mais favorável devido ao aumento de nutrientes na coluna d'água.

A espécie *Asterina stellifera* apresentou, na região de Cabo Frio, um longo período de crescimento gonadal e um período mais curto de liberação das células reprodutivas. O mesmo padrão foi descrito para outras espécies da família Asterinidae, como por exemplo *Patiriella pseudoexigua* (CHEN & CHEN, 1992); *P. gunnii* e *P. calcar* (BYRNE, 1992). VENTURA *et al.* (1997 e 1998), documentaram o padrão reprodutivo de *Astropecten brasiliensis* e *A. cingulatus* na região de Cabo Frio. Estas duas espécies, apesar de filogeneticamente próximas, apresentaram ciclos reprodutivos distintos. *A. brasiliensis*

apresentou um padrão reprodutivo semelhante a *Asterina stellifera*, com crescimento gonadal gradual, um menor período de liberação das células reprodutivas e uma sincronia entre os indivíduos da população na época de liberação dos gametas. Ao contrário, *A. cingulatus* apresentou um crescimento gonadal mais rápido, seguido de uma suave diminuição nos valores do índice gonadal, caracterizando uma assincronia entre os indivíduos da população durante a época de liberação das células reprodutivas. Estas diferenças observadas podem estar associadas à distribuição geográfica destas espécies. *A. cingulatus* é uma espécie tipicamente tropical. *Astropecten brasiliensis* e *Asterina stellifera* são consideradas espécies tipicamente temperadas e sua ocorrência na região de Cabo Frio pode estar associada ao fenômeno da Ressurgência.

Foi observada uma grande diferença entre o tamanho médio dos indivíduos coletados nas duas populações. Na população da Ilha do Japonês (seagrass-flat population), o tamanho médio dos indivíduos foi bem menor, variando de 22,66 a 28,15 mm. Na população de Arraial do Cabo (rocky-shore population) o tamanho médio dos indivíduos variou de 40,06 a 48,85 mm. As diferenças observadas nos valores do índice gonadal poderiam estar associadas a esta diferença de tamanho, uma vez que os indivíduos coletados no banco de gramíneas poderiam ser sexualmente imaturos. Porém, isto não ocorreu uma vez que o índice gonadal é uma medida relativa, eliminando o efeito de qualquer diferença no tamanho dos indivíduos (GRANT & TYLER, 1983; CRUMP, 1971). Além disto, não se pode dizer que os indivíduos coletados no banco de gramíneas eram imaturos já que foi verificada uma variação sazonal nos valores do índice gonadal e as análises histológicas mostraram indivíduos em liberação e vazios (CHAO, CHEN & ALEXANDER, 1994). Estas diferenças provavelmente estão associadas a fatores ambientais (CRUMP, 1971; CRUMP & BARKER, 1985; BARKER & XU, 1991). Porém,

o esclarecimento da influência de fatores exógenos na reprodução de *A. stellifera* requer maiores investigações

Asterina stellifera apresentou, neste estudo, ovos pequenos (100-150 μm) e um desenvolvimento planctotrófico com mais de dez semanas de duração. *Patriella regularis* e *Asterina miniata*, assim como *A. stellifera*, produzem ovos pequenos (150 e 170 μm respectivamente) e apresentam um desenvolvimento planctotrófico com dois estágios larvais de longa duração na coluna d' água (\cong 10 e 15 semanas respectivamente) (CRUMP, 1971; EMLET, McEDWARD & STRATHMANN, 1987; BYRNE & BARKER, 1991). *Asterina burtoni*, *P. cacar* e *P. pseudoexigua* produzem ovos grandes (500, 400 e 378 μm respectivamente) e desenvolvem-se por intermédio de uma larva braquiolaria de curta duração na coluna d' água (\cong 5, 10 e 6 dias respectivamente) (EMLET, McEDWARD & STRATHMANN, 1987; BYRNE, 1992; CHEN & CHEN, 1992).

Asterina stellifera possui um desenvolvimento planctotrófico com duas fases larvais. O desenvolvimento planctotrófico é considerado o tipo ancestral em Asteroidea, enquanto que o desenvolvimento vivíparo é considerado o mais derivado (BYRNE & CERRA; HART, BYRNE & SMITH, 1997; HART 2000). HART, BYRNE & SMITH (1997), verificaram as relações filogenéticas de 12 asteróides da família Asterinidae, incluindo os gêneros *Patriella* e *Asterina*, baseando-se em dados moleculares. Com tais dados, testaram algumas hipóteses a respeito da evolução dos modos de desenvolvimento em Asteroidea. Nesse estudo, foi verificado que a elucidação da evolução dos tipos de desenvolvimento dentro da família Asterinidae ainda depende do conhecimento da história de vida do maior número possível de espécies desta família (HART, BYRNE & SMITH, 1997; HART 2000). A determinação do desenvolvimento de *A. stellifera* em laboratório,

contribui neste sentido, considerando-se que a inclusão desta espécie na filogenia gerada por HART, BYRNE e SMITH (1997), vem sendo realizada em colaboração com o Dr Harilaos Lessios (Smithsonian Tropical Research Institution, Balboa, Panamá). Em uma primeira análise, *A. stellifera* formou um grupo distinto com *A. gibbosa*, reunindo assim as duas espécies Atlânticas analisadas. Estas duas espécies apresentam padrões de desenvolvimento bem diferentes, pois *Asterina gibbosa* tem um desenvolvimento lecitotrófico bentônico (BYRNE & CERRA, 1996; HART *et al.*, 1997).

Assim, a inclusão preliminar de *A. stellifera* na análise filogenética realizada por HART, BYRNE e SMITH (1997), corrobora a idéia levantada por esses autores de que o modo de desenvolvimento dentro da família Asterinidae evoluiu independentemente, sem nenhuma limitação óbvia. Conclusões mais robustas, entretanto, dependem do sequenciamento total do trecho do DNA mitocondrial (subunidade I da citocromo oxidase) de *Asterina stellifera* e da subsequente análise filogenética. Estes são os próximos passos para a compreensão da história de vida de *Asterina stellifera* e suas consequências evolutivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKER, M.F. & NICHOLS, D., 1983. Reproduction, recruitment and juvenile ecology of the starfish, *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. **J. Mar. Biol. Assoc. U. K.** **63**: 745-765.
- BARKER, M.F. & XU, R.A., 1991. Seasonal changes in biochemical composition of body walls, gonad and pyloric caeca in two populations of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea) during the annual reproductive cycle. **Mar. Biol.**, Berlin, **109**: 27-34.
- BYRNE, M. & BARKER, M.F., 1991. Embryogenesis and larval development of the asteroid *Patiriella regularis* viewed by light and scanning electron microscopy. **Biol. Bull. Lancaster.** **180**:332-345.
- BOSH, I., 1989. Contrasting modes of reproduction in two antarctic asteroids of genus *Porania*, with a description of unusual feeding and non-feeding larval types. **Biol. Bull. Lancaster.** **177**:77-82.
- BYRNE, M., 1992. Reproduction of sympatric populations of *Patiriella gunnii*, *P. calcar* and *P. exigua* in New South Wales, asterinid seastars with direct development. **Mar. Biol.**, Berlin, **114**: 297-316.
- BYRNE, M. & CERRA, A., 1996. Evolution of intragonadal Development in the Diminutive Asterinid Sea Stars *Patiriella vivipara* and *P. parvivipara* with an overview of development of Asterinidae. **Biol. Bull.**, Lancaster, **191**: 17-26

- BYRNE, M., MORRICE, M.G & WOLF, B., 1997. Introduction of the northern Pacific asteroid *Asterias amurensis* to Tasmania: reproduction and current distribution. **Mar. Biol.**, Berlin, **127**: 673-685.
- CAMPBELL, A.C. & ROWE, F.W.E., 1997. A new species in the asterinid genus *Patriella* (Echinodermata, Asteroidea) from Dhofar, southern Oman: a temperate taxon in a tropical locality. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Zool.)** London, **63**(2): 129-136.
- CHAO, S.M., CHEN, C.P. & ALEXANDER, P.S., 1994. Reproduction and growth of *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) at two contrasting sites in southern Taiwan. **Mar. Biol.**, Berlin, **119**: 565-570.
- CHEN, B.Y. & CHEN, C.P., 1992. Reproductive cycle, larval development, juvenile growth and population dynamics of *Patriella pseudoexigua* (Echinodermata: Asteroidea) in Taiwan. **Mar. Biol.**, Berlin, **113**: 271-280.
- CHIA, F.S. & WALKER, C.W., 1991. Echinodermata: Asteroidea *In*: A.C. Giese, J.S. Pearse and V.B. Pearse (eds) **Reproduction of Marine Invertebrates, Vol VI Echinoderms and Lophophorates**. Boxwood Press, Pacific Grove, California, p. 301-331.
- CHIA, F.S.; OGURO, C. & KOMATSU, M., 1993. Sea-star (asteroid) development. *In*: Barnes, M.; A.D. Ansell and R.N. Gibson (eds) **Oceanography and Marine Biological Annual Review** UCL Press, London. **71**: 223-257.
- CLARK, A.M & DOWNEY, M.E., 1992. **Starfishes of the Atlantic**. Chapman & Hall London pp 794.
- CRUMP, R.G., 1971. Annual reproductive cycles in three geographically separated populations of *Patriella regularis* (Verril), a common New Zealand asteroid. **J. exp mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, **7**: 137-162.

- CRUMP, R.G. & BARKER, M.F., 1985. Sexual and asexual reproduction in geographically separated populations of the fissiparous asteroid *Coscinasterias calamaria* (Gray). **J. exp. mar. Biol. Ecol.** Amsterdam **88**: 109-127.
- EMLET, R.B., McEDWARD, L.R., & STRATHMANN, R.R., 1987. Echinoderm larval ecology viewed from egg. 2: 55-136 *in*: M. Jangoux and J.M. Lawrence (eds) **Echinoderm Studies** A.A. Balkema, Rotterdam,.
- GIESE, A.C. & PEARSE, J.S., 1974. Introduction: general principles. p. 1-49 *in*: Giese, & pearse (eds.). **Reproduction of marine invertebrates**. Vol. I, Academic Press, New York.
- GRANT, A. & TYLER, P.A., 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. **Int. J. Invert. Reprod.**, Philadelphia, **6**: 271-283.
- HART, M.W., BYRNE, M. & SMITH, M.J., 1997. Molecular phylogenetic analysis of life-history evolution in asterinid starfish. **Evolution** New York **51** (6): 1848-1861.
- HART, M.W., 2000. Phylogenetic analyses of mode of larval development. **Seminars in Cell & Developmental Biology** **11**: 411-418.
- KANATANI, H. 1969. Induction of spawning and oocyte maturation by 1-metiladenine in starfishes. **Expl. Cell Res.** New York **57**: 333-337.
- KOMATSU, M., KANO, Y.T. & OGURO, C., 1990. Development of a true ovoviviparous sea star, *Asterina pseudoexigua pacifica* Hayashi. **Biol. Bull.** Lancaster, **179**: 254-263.
- LAWRENCE, J.M., 1987. **A functional biology of echinoderms**. Croom Helm London & Sidney 340pp.

- LAWRENCE, J.M. & LANE, J.M., 1982. The utilization of nutrients by pos-metamorphic echinoderms. *In*: Jangoux, M. J.M. Lawrence (eds). **Echinoderm Nutrition**. A.A. Balkena, Rotterdam, p 331-371.
- MAUZEY, K.P., 1966. Feeding behavior and reproductive cycles in *Pisaster ochraceus*. **Bio. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods hole** 131:127.
- McEDWARD, L.R. & JANIES, D.A., 1993. Life cycle evolution in Asteroids: What is Larva? **Biol. Bull.**, Lancaster, 184: 255-268.
- MLADENOV, P.V., 1996. Environmental factories influencing asexual reproduction process in echinoderms. **Ocean. ACTA**. 19:3-4, 27-235.
- OLIVE, P.J.W., 1992. The adaptative significance of sazonal reproduction in marine invertebrates: the importance of distinguish beteen models. **Invert. Reprod. Develop.** Philadelphia 22: 165-174.
- PEARSE, J.S. & EERNISSE, D.J., 1982. Photoperiodic regulation of gametogenesis and gonadal growth in the sea star *Pisaster ochraceus*. **Mar. Biol.** Berlin, 67: 121-125
- PEARSE, J.S. & WALKER, C.W., 1986. Photoperiodic regulation of gametogenesis in a North Atantic sea star, *Asterias vulgaris*. **Int. J. Invert. Reprod. Develop.** Philadelphia 9: 71-77
- SMITH, A.B., 1997. Echinoderm larvae and phylogeny. **A. Rev. Ecol. Syst.**, 28: 219-241.
- TYLER P.A., PAIN, S.L.. & BILLET, D.S.M., 1984. the reproductive biology of deep sea forcipulate sea star (Asteroidea: Echinodermata) from the NE Atlantic Ocean. **J. Mar. Assoc. U.K. Devon** 64: 587-601.

VENTURA, C.R.R., FALCÃO, A.P.C., SANTOS, J.S. & FIORI, C.S., 1997. Reproductive cycle and feeding periodicity in the starfish *Astropecten brasiliensis* in the Cabo Frio upwelling ecosystem (Brazil). **Invert. Reprod. Develop.** Philadelphia/ Rehovot, **31**(1-3): 135-141.

VENTURA, C. R. R.; SANTOS, J. S. ; FALCÃO A. P. C & FIORI, C. S. 1998. Reproduction and food intake in *Astropecten cingulatus* (Asteroidea: Paxillosida) in the upwelling environment of Cabo Frio (Brazil) :313-318, *In* Mooi, R. & Telford, M.[Eds]. *Echinoderms (San Francisco)*. Balkema, Rotterdam.

VENTURA C.R.R., & FERNANDES, F.C., 1995. Bathymetric distributon and population size structure of paxillosid seastars (Echinodermata) in the Cabo Frio upwelling ecosystem of Brazil. **Bull. Mar. Sci.**, Miami, **56**(1): 268-282.

WRAY, G.A., 1996. Parallel evolution of nonfeeding larvae in echinoderms. **Syst. Biol.** **45**(3): 308-322.