ELIZABETH GERARDO NEVES

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *MUSSISMILIA HISPIDA* (VERRILL, 1902) (CNIDARIA, ANTHOZOA, SCLERACTINIA)

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

EDIÇÃO DEFINITIVA

RIO DE JANEIRO

-1998-

ZOOLOGIA/FCC
207

ELIZABETH GERARDO NEVES

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *MUSSISMILIA HISPIDA* (VERRILL, 1902) (CNIDARIA, ANTHOZOA, SCLERACTINIA)

Banca Examinadora:

Prof. Clovis Barreira e Castro

(Presidente da Banca)

Prof. Carlos Renato Rezende Ventura

Prof. Mauro Maida

Rio de Janeiro, 24 de Julho de 1998.

Trabalho realizado no Setor de Celenterologia do Departamento de Invertebrados, Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora:

Profa. Dra. Débora de Oliveira Pires

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Museu Nacional

Ficha Catalográfica

Neves, Elizabeth Gerardo

Comportamento Reprodutivo de *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902) (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). Rio de Janeiro. Museu Nacional/UFRJ, 1998. 91 pp.

Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia)

1.coral 2.reprodução 3.gametogênese 4.histologia 5.Mussidae 6.Brasil

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Teses

Dedico este trabalho à memória de meu pai, Luiz Neves, e ao meu marido, Rodrigo Johnsson

⁂

A vida não passa de um instante,

mas basta este instante

para empreendermos coisas eternas

E. Bersot

AGRADECIMENTOS

À Professora Débora de Oliveira Pires pela orientação e apoio. Nossa jornada me forneceu valiosa aprendizagem.

Ao Professor Clovis Barreira e Castro pela orientação inicial e pela valiosa colaboração na montagem dos gráficos. Obrigada!

Ao Professor Fábio Lang da Silveira, minha sincera gratidão pelas esclarecedoras explicações.

Ao amigo Ricardo Varotto, por toda atenção e extremo cuidado na elaboração da versão final dos gráficos de frequência, mapa e capa do presente trabalho. Sou eternamente grata.

Ao amigo Marcos Barbeitos, pelas preciosas discussões estatísticas e inacreditável paciência. Obrigada!

Ao amigo Claudio Ratto, pela coleta do material e pela imensa colaboração na histologia.

Aos demais colegas de laboratório: Marcelinho, Emiliano, Bárbara, Érika e Mônica, agradeço toda amizade e apoio.

Às amigas Vera, Suzana, Ana Claudia e Geórgia pelo carinho e amizade de sempre. "Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito...".

À Adriana "Glob" pela amizade e compreensão. Das palavras colhi o bálsamo...Obrigada pela força!

Aos funcionários da biblioteca do Museu Nacional-UFRJ, Vera e Antônio Carlos, e aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Zoologia, Anete e Waldyr, pela atenção e auxílio prestimosos.

À FAPERJ e CAPES, pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq, FUJB e FAPERJ pelos auxílios ao Setor de Celenterologia.

À minha família, especialmente ao meu pai e eterno mentor, por todo carinho e apoio sempre demonstrados.

Ao meu companheiro e principal incentivador, Rodrigo Johnsson, a quem dedico meus mais profundos sentimentos e toda minha gratidão. Dentre todas aquelas sua ajuda será sempre inestimável.

RESUMO

Através de análises histológicas foi verificado o padrão reprodutivo de *Mussismilia hispida*, espécie zooxantelada de coral, endêmica na costa brasileira. Fragmentos provenientes de 2 colônias fixas, as quais foram marcadas no campo para que pudessem ser repetidamente amostradas, e de 10 colônias escolhidas ao acaso foram mensalmente obtidos no período de abril/89 a março/90, na Praia da Tartaruga, Búzios, Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que *M. hispida* é uma espécie hermafrodita sequencial, cujo modo de reprodução envolve a liberação de gametas para fertilização e desenvolvimento externos. Células femininas surgiram antes das masculinas e foram inicialmente observadas em abril/89. O tamanho dos ovócitos de Estágio I, parcialmente imersos na camada mesogleal, variou de 13,04μm a 19,56μm. Entre fevereiro/90 e março/90, ovócitos alcançaram o máximo de amadurecimento e estavam aptos para fertilização. O maior ovócito de Estágio III encontrado no período, possuia 521,76μm. Desencadeamento do ciclo espermático ocorreu em dezembro/89 e prosseguiu até março/90. Ovócitos e cistos maduros ocorreram concomitantemente sobre os mesmos mesentérios férteis, durante o verão, e desapareceram em algumas amostras entre fevereiro/90 e março/90. Amadurecimento das gônadas prosseguiu sob influência da elevação da temperatura da água, fornecendo evidências de sincronia sazonal no ciclo reprodutivo. Histologicamente, observou-se uma assincronia intercolonial no desenvolvimento dos gametas durante a estação reprodutiva. Sob este aspecto, foi possível deduzir que diferentes colônias da população reproduziram-se em momentos distintos ao longo do período de desova. Não foram encontradas zooxantelas no interior dos ovócitos de pré-desova, os quais caracteristicamente apresentavam grande acúmulo de material vitelínico e vesícula germinativa periférica.

ABSTRACT

Through histological analysis the reproductive pattern of *Mussismilia hispida*, a zooxanthellate coral species endemic to the Brazilian coast was verified. Fragments from 2 tagged colonies, which were marked in the field in order to be repeatedly sampled, and 10 others haphazardly chosen were collected monthly, from April/89 to March/90, at Praia da Tartaruga, Buzios, Rio de Janeiro. The results showed that *M. hispida* is a sequential hermaphroditic species with a broadcast-spawning mode of reproduction, and external fertilization and development. Female cells developed prior to male cells, and were first observed in April/89. Size of Stage I oocytes partially immersed into mesogleal layer ranged from 13,04μm to 19,56μm. Between February/90 and March/90, oocytes reached maximum ripeness and were ready for fertilization. The largest Stage III oocyte found in this period had 521,76μm. The spermatic cycle began in December/89 and continued through March/90. Mature oocytes and cysts occurred concomitantly on the same fertile mesenteries during summer, and disappeared from some samples between February/90 and March/90. Gonad maturation occurred with increasing sea-water temperature, evidencing seazonal synchrony in the reproductive cycle. Histologically, an intercolonial asynchrony in the development of the gametes during the breeding season was observed. From this, it was possible to infer that different colonies of the population reproduced at different times throughout the spawning period. No zooxanthellae were found in pre-spawning oocytes, which characteristically had a large amount of vitelline material and a peripheral germ vesicle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1

1A. Reprodução Assexuada em Corais.....1

1B. Reprodução Sexuada em Corais.....3

1C. Espécies que Liberam Gametas *versus* Espécies que Incubam Plânulas.....5

1D. Sistema Reprodutivo, Desenvolvimento Gonadal e Fertilização.....8

1E. Periodicidade e Influência de Fatores Ambientais na Reprodução Sexuada.....11

1F.Sincronia.....14

1G. Recifes de Corais e o Histórico dos Estudos de Mussidae no Brasil.....15

2. OBJETIVOS.....18

3. MATERIAL E MÉTODOS.....19

3A. Histologia e Análise Qualitativa.....22

3B. Análises Citométricas.....25

4. RESULTADOS.....29

4A. Sexualidade.....29

4B. Disposição das Gônadas.....29

4C. Gametogênese (Aspectos Gerais).....29

4D. Ovogênese.....33

4E. Espermatogênese.....46

4F. Análise Citométrica.....53

4G. Sincronia.....58

4H. Reprodução Assexuada.....61

5. DISCUSSÃO.....62

5A. Método Histológico.....62

5B. Características Reprodutivas.....63

5C. Estratégias Relacionadas ao Sucesso Reprodutivo: Variação do Tamanho do Ovo e Fecundidade....66

5D. Processos Associados à Vitelogênese para Obtenção de Energia e Nutrientes....69

5E. Sazonalidade , Sincronia e Liberação de Gametas....71

5F. Perspectivas....74

6. CONCLUSÃO....76

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....78

*

1. INTRODUÇÃO

Recifes de corais representam comunidades biologicamente diversas, compostas por numerosos organismos que exibem uma ampla faixa de adaptação e interação (Richmond, 1983).

O crescente interesse pela ecologia, principalmente devido às alterações ambientais que atualmente comprometem a estabilidade de uma grande variedade de sistemas ecológicos, implica no conhecimento mais profundo da biologia e dos mecanismos que regem as relações faunísticas em cada ambiente.

Desta forma, além de fornecer um dos mais significantes e interessantes caminhos para a compreensão da evolução e funcionamento da propagação sexual e assexual (Campbell, 1974), o conhecimento da biologia reprodutiva dos corais e os processos associados à dispersão e recrutamento, constituem requisitos essenciais ao estudo da ecologia das comunidades e populações coralíneas (Harrison & Wallace, 1990).

1A. REPRODUÇÃO ASSEXUADA EM CORAIS

Novas colônias ou corais solitários podem originar-se através da reprodução assexuada. Um aspecto importante relacionado a este mecanismo inclui a proliferação e manutenção de genótipos bem sucedidos dentro de uma população através da formação de clones (Harrison & Wallace, 1990).

Boschma (1923), Wells (1966) e Krupp *et al.* (1992) observaram brotamento em algumas espécies de *Fungia*. O pequeno antocaule sobre o qual comumente desenvolve-se o pólipo é capaz de produzir diversos brotos; por outro lado, sobre sua superfície oral ou aboral, cada pólipo destacado pode similarmente gerar novos indivíduos. Além disso, através de estudos experimentais, Boschma (1923) e Krupp *et al.* (1992) inferiram que qualquer pequena amostra do tecido poderia potencialmente desenvolver-se num organismo

completo, sugerindo que fragmentos remanescentes no antocaule seriam responsáveis pela origem de novos brotos.

Rosen & Taylor (1969) encontraram pequenas massas esféricas sobre colônias adultas de *Goniopora stokesi*, as quais eventualmente se destacavam. Estas estruturas referidas pelos autores como "polyp-balls" foram descritas como uma forma ou fase de reprodução assexuada provavelmente derivadas do método de brotamento extratentacular.

Fadlallah (1982) observou brotos em pólipos da borda da colônia de *Astrangia lajollaensis*, numa pequena área do tecido marginal, comumente em contato com o substrato. Segundo o autor, o espaço gastrovascular do broto era independente, originando pólipos sem vínculos, embora bem próximos uns dos outros.

Highsmith (1982) forneceu evidências de que a produção de novas colônias a partir da fragmentação de colônias pré-estabelecidas poderia ser o modo predominante de propagação de diversos corais construtores de recifes. O autor mencionou a baixa taxa de mortalidade e a alta taxa de crescimento, como uma das principais vantagens deste modo de reprodução assexuada. Por sua vez, DeVantier & Endean (1989), mencionaram a dispersão de fragmentos pela ação das ondas, como um fenômeno de extrema importância para a colonização de substratos arenosos, geralmente inóspitos para o recrutamento das plânulas.

Sammarco (1982) verificou que colônias de *Seriatopora hystrix* mantidas em laboratório sob condições não favoráveis liberavam pólipos, alguns dos quais com plânulas. Os pólipos destacavam-se de seus cálices, e após um curto período de deslocamento na água, fixavam-se e secretavam um novo esqueleto. Este processo foi denominado pelo autor "polyp bail-out". Mais recentemente, Kramarsky-Winter *et al.* (1997) observaram expulsão de pólipos em colônias de *Favia favus* e *Oculina patagonica*. Ao contrário do processo descrito por Sammarco (1982), as condições ambientais eram normais e todo o pólipo, incluindo o cálice, foi expelido pela colônia.

Estudos sobre o desenvolvimento de plânula realizados por Stoddart (1983) e Martin-Chavez (1986) provaram que larvas de *Pocillopora damicornis* poderiam ser produzidas assexuadamente por partenogênese. Por sua vez, Muir (1984, *apud* Harrison & Wallace, 1990) sugeriu que corpos lipídicos originados na faringe seriam responsáveis pela produção assexuada de larvas. Segundo o autor estas estruturas assemelhavam-se em forma e organização histológica aos primeiros estágios da plânula.

Harrison & Wallace (1990) salientaram que "a diversidade dos métodos reprodutivos empregados pelos corais e outros antozoários é testamento da extraordinária plasticidade dos tecidos em cnidários; e é provável que outros modos de propagação assexuada sejam ainda desconhecidos".

1B. REPRODUÇÃO SEXUADA EM CORAIS

Reprodução sexuada em corais escleractíneos pode envolver fertilização interna e o desenvolvimento de uma larva plânula dentro da cavidade gastrovascular (Stimson, 1978; Rinkevich & Loya, 1979a; Kojis & Quinn, 1981a, Fadlallah & Pearse, 1982a), ou a liberação de esperma e óvulos no mar, com fertilização externa e subsequente desenvolvimento planctônico da larva (Szmant-Froelich *et al.*, 1980; Kojis & Quinn, 1981a,b; Fadlallah & Pearse, 1982b). A diferença entre os dois modos de reprodução (incubação de plânula vs. liberação de gametas) tem influência em muitos aspectos da ecologia do coral, incluindo a transferência da alga simbiótica para a larva, habilidade e sobrevivência da larva durante o período de fixação e metamorfose, dispersão, padrões de distribuição biogeográficos, variabilidade genética, e até mesmo, taxas de especiação e evolução (Richmond, 1990).

Os estudos realizados por De Lacaze-Duthiers (1873, *apud* Duerden, 1902) trouxeram luz sobre o conhecimento do comportamento sexual dos membros da Ordem Scleractinia. Ocasionalmente, o autor verificou a liberação de plânulas através das pontas dos tentáculos dos pólipos de *Astroides calycularis*. Um processo similar foi observado por

Von Koch (1897, *apud* Duerden, 1904) em *Caryophyllia cyathus*. Posteriormente, Wilson (1888, *apud* Duerden, 1902) e Duerden (1902) registraram a liberação de gametas e larvas em colônias de *Manicina areolata* e *Favia fragum*, respectivamente. Não obstante, Duerden (1902) considerou ambos os eventos incomuns, pois tanto em *Manicina* quanto em *Favia*, larvas muito desenvolvidas encontravam-se nos espaços gastrovasculares. Segundo o autor, todos os corais eram indubitavelmente vivíparos.

Estudos subsequentes designados para detectar planulação, reforçaram o dogma da viviparidade, e até o final da década de 70 a incubação de plânulas era considerada o principal padrão no comportamento reprodutivo dos corais escleractíneos (Marshall & Stephenson, 1933; Atoda 1951a,b; Lewis, 1974; Stimson, 1976, 1978; Rinkevich & Loya, 1979a).

O crescente interesse na biologia reprodutiva destes organismos proporcionou a obtenção de informações mais precisas a respeito do ciclo gametogênico e reprodução dos corais. Consequentemente, como primariamente observado por Wilson (1888, *apud* Duerden, 1902), Duerden (1902) e Marshall & Stephenson (1933), verificou-se que ao invés de incubar a larva internamente, padrão até então considerado dominante, a maioria das espécies liberava gametas para fertilização externa e desenvolvimento planctônico (Szmant-Froelich *et al.*, 1980; Kojis & Quinn, 1981a,b, 1982; Fadlallah & Pearse, 1982b; Harrison *et al.*, 1984; Babcock *et al.*, 1986; Szmant, 1986; Oliver *et al.*, 1988).

Estudos recentes têm revelado que as espécies que liberam gametas na água apresentam um longo ciclo gametogênico, com um breve período reprodutivo a cada ano; ao contrário, aquelas que incubam as larvas possuem ciclos gametogênicos curtos, eventualmente sobrepostos, e múltiplas planulações anuais (Richmond & Hunter, 1990; Harrison & Wallace, 1990; Fan & Dai, 1995). Em relação ao primeiro caso, embora existam evidências de que a acentuada variação sazonal da temperatura do mar pode desencadear um segundo ciclo gametogênico (Szmant-Froelich *et al.*, 1980), até o momento, Stobart *et al.* (1992) foram os únicos a documentar um fenômeno de desova bianual.

Espécies gonocóricas e/ou hermafroditas cujos modos de desenvolvimento envolvem incubação de larvas e/ou liberação de gametas na água, constituem os padrões básicos da reprodução sexuada em corais escleractíneos (Harrison & Wallace, 1990). Entretanto, segundo Richmond & Hunter (1990), a maioria das espécies é hermafrodita e há registros de populações estéreis, principalmente próximas aos limites de sua distribuição geográfica.

1C. ESPÉCIES QUE LIBERAM GAMETAS *VERSUS* ESPÉCIES QUE INCUBAM PLÂNULAS

Diversos autores têm mostrado que a fertilização e o desenvolvimento externos claramente constituem o modo dominante de reprodução entre corais construtores de recifes (Harrison *et al.* 1984; Shlesinger & Loya, 1985; Willis *et al.*, 1985; Babcock *et al.*, 1986; Szmant, 1986; Soong, 1991; Stobart *et al.*, 1992; Harrison, 1993; Fadlallah, 1996).

Não obstante, comparado às outras características reprodutivas, como por exemplo, o sexo e a distribuição das gônadas nos mesentérios férteis, o modo de reprodução parece ser uma tendência relativamente plástica no ciclo de vida destes organismos (Harrison, 1985).

A distribuição de espécies que incubam, dentro de famílias e gêneros nos quais o comportamento de liberação de gametas é predominante, indica que o processo de incubação evoluiu independentemente em diversos taxa de corais (Harrison & Wallace, 1990).

Primariamente, Stimson (1978) propôs que o modo de reprodução poderia estar relacionado ao habitat. Sua hipótese assegurava que as espécies de águas rasas 'planulavam' para facilitar o recrutamento, enquanto que aquelas de áreas mais profundas liberavam gametas para desenvolvimento externo, contribuindo, assim, para a dispersão das plânulas. Posteriormente, Kojis & Quinn (1982) sugeriram que as espécies com ampla faixa de distribuição, ou seja, aquelas que concomitantemente ocupavam partes rasas e profundas do recife, caracteristicamente liberavam óvulos e esperma na água. A incubação

seria, desta forma, o principal modo de reprodução das espécies restritas a uma única faixa de distribuição.

Estudos subsequentes, contudo, revelaram que as espécies que caracteristicamente liberavam gametas pareciam constituir a grande maioria dos corais encontrados em águas rasas; além disso, a flutuosidade de grande parte dos embriões e larvas durante o período de desenvolvimento planctônico, consideravelmente contribui para sua capacidade de dispersão (Harrison *et al.*, 1984; Babcock, 1984, Williams *et al.*, 1984; Babcock & Heyward, 1986; Babcock *et al.* 1986; Oliver and Willis, 1987; Willis & Oliver, 1988).

Somando-se a estes fatos, alguns autores têm obtido evidências de que as espécies que incubam plânulas não encontram-se restritas às baixas profundidades (Gerrodette, 1981; Fadlallah & Pearse, 1982a; Van Moorsel, 1983; Kojis & Quinn, 1984).

Em 1983, Van Moorsel sugeriu que incubar as larvas seria um processo associado a previsibilidade do habitat. Baseando-se neste princípio, Szmant (1986) propôs que incubação havia evoluído nas espécies sujeitas a alta taxa de mortalidade, que ocupavam ambientes instáveis, a fim de potencializar o recrutamento.

Embora Szmant-Froelich *et al.* (1980) tenham inicialmente contestado a existência de uma relação universal entre o tamanho do pólipo, o tamanho do óvulo e o modo de reprodução, tem-se observado que espécies com colônias adultas e pólipos grandes, costumam liberar os gametas para fertilização e desenvolvimento da larva no mar; enquanto que, espécies com colônias adultas e pólipos pequenos, submetem-se a fertilização interna e incubam as larvas (Szmant 1986; Glynn *et al.*, 1994).

Rinkevich & Loya (1979a) sugeriram que as espécies que liberavam gametas eram altamente fecundas, ao passo que aquelas que incubavam produziam algumas poucas larvas bem desenvolvidas. Os autores também verificaram que corais coloniais maciços, com pólipos bem desenvolvidos, tais como *Favia doreyensis* e *F. favus*, produziam óvulos relativamente grandes, os quais posteriormente eram liberados na água. Ao contrário,

colônias ramificadas, com pólipos de reduzido tamanho, tal como *Stylophora pistillata*, comumente possuiam óvulos pequenos e incubavam as larvas.

Padrão similar não foi encontrado nas colônias de *P. lutea* e *P. australensis* estudadas por Harriott (1983a). Ambas as espécies, apesar de possuírem pólipos pequenos, foram observadas liberando gametas para fertilização externa. Kojis & Quinn (1981a) já haviam registrado significativa variação no modo de reprodução entre espécies de *Porites*. Em suas análises, os autores verificaram que colônias adultas com diâmetro superior a dois metros (*P. andrewsi*, *P. lobata* e *P. lutea*) liberavam pequenos óvulos, enquanto que colônias adultas de tamanho reduzido (*P. murrayensis*) incubavam plânulas na cavidade gastrovascular.

Em relação às espécies solitárias, generalizações são ainda mais improváveis. Fadlallah & Pearse (1982a,b) encontraram avantajados embriões, nas largas câmaras incubadoras da espécie solitária *Balanophyllia elegans*; e centenas de pequenos óvulos em *Paracyathus stearnsii*. Wells (1966), citou a incubação das larvas como o principal modo reprodutivo entre os solitários fungiídeos. Entretanto, Krupp (1983) observou a liberação de esperma e numerosos óvulos de tamanho diminuto em *Fungia scutaria*, espécie gonocórica de pólipo bem desenvolvido.

O estabelecimento de padrões no comportamento reprodutivo dos corais construtores de recifes tem sido frequentemente contestado. A despeito das evidências de variabilidade, existem tendências consistentes na reprodução que podem reforçar a taxonomia atual dos corais, primariamente estabelecida pelos caracteres esqueléticos (Harrison, 1985). Segundo Veron (1993), os corais são reprodutores criativos e é bem provável que muitos dos mecanismos empregados ainda sejam desconhecidos.

1D. SISTEMA REPRODUTIVO, DESENVOLVIMENTO GONADAL E FERTILIZAÇÃO

Colônias de corais frequentemente levam anos até alcançar maturidade sexual (Marshall & Stephenson, 1933; Rinkevich & Loya, 1979b; Kojis & Quinn, 1981b, 1985; Harriott, 1983a). Embora a idade e estresse sejam sugeridos como fatores relacionados à produção de gametas (Kojis & Quinn, 1985), diversos estudos têm demonstrado que o tamanho primariamente determina quando a colônia está apta a se reproduzir (Connell, 1973; Kojis & Quinn, 1985, Szmant-Froelich, 1985).

O sexo em corais escleractíneos não pode ser distinguido por características externas mas, às vezes, pode ser identificado quando as gônadas estão maduras no interior da cavidade gastrovascular (Fadlallah, 1983). As estruturas referidas como gônadas são na realidade áreas gametogênicas que se desenvolvem como espessamentos nos mesentérios reprodutivos (Fautin & Mariscal, 1991). Mais precisamente, estão localizadas entre os músculos retratores longitudinais e os filamentos mesentéricos (Szmant-Froelich *et al.*, 1980).

Segundo Harrison (1985), a disposição das gônadas nas espécies hermafroditas é geralmente consistente dentro de cada família. O autor verificou três padrões básicos: gônadas femininas e masculinas entremeadas sobre o mesmo mesentério, como por exemplo em Faviidae, Pectiniidae e Merulinidae; desenvolvidos separadamente, mas adjacentes sobre o mesmo mesentério, como observado em Mussidae; ou ainda, gônadas desenvolvendo-se separadamente sobre mesentérios distintos, como em Acroporidae e Pocilloporidae. Nas espécies gonocóricas as gônadas comumente desenvolvem-se no interior dos mesentérios, como o caso de Dendrophylliidae, Flabellidae, Poritidae e Siderastreidae, ou menos frequente, projetam-se para fora do plano dos mesentérios, como em Caryophylliidae e Fungiidae (Harrison, 1985).

Ovócitos e cistos testiculares originam-se de células germinativas, derivadas de células-tronco intersticiais, situadas primariamente na endoderme; posteriormente, estas

células aglomeram-se e movem-se em direção à mesogléia, onde amadurecem (Delvoye, 1988). A maior parte do crescimento e diferenciação dos gametas ocorre enquanto estão circundados pela camada mesogleal (Larkman, 1983).

Dados sobre a produção de vitelo em corais escleractíneos são escassos. Entretanto, alguns autores como Kessel (1968) Larkman (1983) e Eckelbarger (1994) mencionaram o processo para outros grupos de cnidários.

Durante o período caracterizado pela vitelogênese, a maioria dos ovócitos acumula considerável quantidade de glicogênio, proteína e lipídio no interior de vesículas, ou grânulos (Larkman, 1983). O retículo endoplasmático associado ao complexo de Golgi parece coordenar a produção dos corpos vitelínicos (Kessel, 1968; Eckelbarger, 1994). O material granular é frequentemente encontrado próximo à superfície externa dos ovócitos, formando uma membrana vitelínica (Kessel, 1968, Larkman, 1983). A incorporação de produtos provenientes de células endodérmicas, através da mesogléia para o interior do ovócito (produção de vitelo "extra-ovócito"), foi citada por Kessel (1968) em medusas de Hydrozoa, Larkman (1983) em *Actinia fragacea* (Anthozoa) e Eckelbarger (1994) em Scyphozoa.

A reabsorção de ovócitos maduros e imaturos tem sido observada e discutida por alguns autores (Rinkevich & Loya, 1979a; Szmant-Froelich *et al.*, 1980; Harriott, 1983a; Kojis, 1986a; Harrison & Wallace, 1990; Glynn *et al.*, 1994; Sier & Olive, 1994). Harrison & Wallace (1990) sugeriram que o fenômeno poderia ser induzido por estresse. Sier & Olive (1994) contestaram esta hipótese e verificaram que, após período de liberação de gametas, absorção de ovócitos remanescentes era um processo inerente e gradual em colônias de *Pocillopora verrucosa*. Em estudos anteriores, Rinkevich and Loya (1979a) verificaram que durante o desenvolvimento dos ovócitos, em gônadas de *Stylophora pistillata*, somente alguns alcançavam os estágios finais da maturação, enquanto que os outros desapareciam. Os autores citaram evidências de que aqueles que tinham sucesso, obtinham nutrientes não

só pelas células endodérmicas vizinhas, mas também através da fagocitose de outros ovócitos.

Harrison (1985) demonstrou haver uma correlação entre a morfologia do espermatozóide e o padrão sexual em cada espécie. Espécies das famílias Acroporidae, Pectiniidae, Mussidae e alguns faviídeos possuem espermatozóides em forma de pêra, ou ovóides, com um núcleo anterior arredondado. Já as espécies da família Agariciidae, Fungiidae, Poritidae, Caryophylliidae, Dendrophylliidae e também alguns faviídeos apresentam espermatozóides cônicos com uma zona nuclear anterior mais alongada. Espermatozóides em forma de pêra ou ovóides estariam associados às espécies hermafroditas, enquanto que aqueles de forma cônica seriam mais comuns entre as espécies gonocóricas.

A fertilização é um evento crítico e possivelmente limitante no ciclo de vida dos organismos que liberam seus gametas no ambiente. Em relação ao meio aquático, a diluição dos gametas pode resultar em taxas de fertilização relativamente baixas. Sendo assim, estratégias de agregação e sincronia na liberação dos gametas potencializam o sucesso reprodutivo, aumentando as chances de encontros entre óvulos e espermatozóides (Oliver & Babcock, 1992). Harrison *et al.* (1984) presumiram que a atração química viabilizaria o encontro e o reconhecimento dos gametas co-específicos. De fato, a quimiotaxia foi pela primeira vez demonstrada em esperma de *Montipora digitata* por Coll *et al.* (1994). Segundo os autores, propriedades atrativas equilibrariam os efeitos da diluição, aumentando a probabilidade de fertilização em invertebrados que liberam gametas na água.

Nas espécies incubadoras, embriões e larvas desenvolvem-se livremente no interior dos pólipos, sugerindo que a fertilização dos ovócitos maduros ocorra internamente, dentro da cavidade gastrovascular (Szmant-Froelich *et al.*, 1985; Chornesky & Peters, 1987). Contudo, Fadlallah & Pearse (1982a) observaram que tanto a fertilização quanto os estágios primários do desenvolvimento embriogênico poderiam ocorrer quando os ovócitos ainda se encontravam na camada mesogleal. Semelhante mecanismo foi posteriormente descrito por

Kojis (1986a) em colônias de *Acropora cuneata* e *A. palifera*. A autora verificou que os óvulos foram fertilizados antes de serem liberados para o espaço gastrovascular, e permaneceram ligados ao mesentério por uma estrutura em forma de pedúnculo, até o amadurecimento da larva.

1E. PERIODOCIDADE E INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA REPRODUÇÃO SEXUADA

Nas diferentes classes de cnidários, cada espécie parece apresentar uma temperatura ideal para o desencadeamento das atividades sexuais, incluindo alterações morfológicas e funcionais das estruturas reprodutivas até então ausentes ou inativas (Campbell, 1974). A variação sazonal da temperatura do mar tem sido amplamente aceita como o fator mais importante no controle dos ciclos gametogênicos e/ou nos períodos de reprodução em corais escleractíneos (Szmant-Froelich *et al.* 1980; Van Moorsel, 1983; Harrison *et al.* 1984; Babcock, 1984; Fadlallah, 1985; Willis *et al.* 1985; Babcock *et al.* 1986; Harrison & Wallace, 1990).

Babcock (1984) sugeriu que a temperatura poderia regular o período de liberação de gametas por meio do controle do desenvolvimento dos cistos testiculares. Por outro lado, Kojis (1986a) propôs que a mudança sazonal no comprimento do dia forneceria um padrão mais consistente para a ovogênese em recifes de águas rasas. Soong (1991), verificou que o valor adaptativo da reprodução sazonal poderia estar relacionada à disponibilidade de substrato para fixação, inapropriado por exemplo, nos períodos de domínio de algas. Segundo a autora, a iniciação da gametogênese nas espécies que liberam gametas na água poderia ocorrer devido ao aumento da temperatura na primavera, enquanto que a liberação dos gametas provavelmente seria controlada por outros fatores, como o fotoperíodo.

Evidências indicam que os ciclos sazonais ambientais associados às variações de latitude podem influenciar nos padrões de desova, embora hajam algumas contradições (Richmond & Hunter, 1990; Babcock *et al.*, 1994). Em Papua-Nova Guiné (Oliver *et al.*, 1988) e Micronesia (Richmond & Hunter, 1990), onde a variação da temperatura e da maré é mínima, há uma queda evidente na sincronia reprodutiva nas populações de corais. Por outro lado, as análises realizadas por Szmant (1991) mostraram que duas espécies do Caribe (*Montastrea annularis e M. cavernosa*) exibiam forte sincronia reprodutiva a despeito da pequena variação na amplitude, tanto da temperatura quanto da maré. Mais recentemente, Fadlallah (1996) registrou uma desova sincronizada em colônias de *Acropora clathrata* no Golfo Árabe, e atribuiu o fenômeno às flutuações diárias da temperatura do mar e às estações bem definidas da região.

Os padrões reprodutivos sazonais, principalmente entre as espécies que liberam gametas para fertilização externa, prevalecem nas regiões tropicais onde as mudanças na temperatura, irradiação e qualidade da água, apresentam flutuações marcantes (Babcock *et al.*,1986). Embora a reprodução ocorra predominantemente entre a primavera e o verão, quando a temperatura do mar alcança valores máximos, existem registros de espécies que reproduzem-se nos perlodos mais frios do ano, durante o outono, inverno ou início da primavera (Fadlallah, 1982; Fadlallah & Pearse, 1982b; Harrison *et al.*, 1984). Ao contrário, segundo Harrison & Wallace (1990) não é possível distinguir uma tendência sazonal nos indivíduos que incubam as larvas, pois a estação e duração do período reprodutivo varia significativamente entre as espécies incubadoras.

Independente do modo de reprodução (incubação de plânulas vs. liberação de gametas), periodicidade no desenvolvimento das gônadas e no período de reprodução também tem sido estabelecida e associada ao ciclo lunar (Marshall & Stephenson, 1933; Stimson, 1978; Harriott, 1983b; Jokiel, 1985; Stoddart & Black, 1985; Szmant-Froelich, 1985; Babcock *et al.*, 1986; Kojis, 1986a; Martin-Chavez, 1986; Chornesky & Peters, 1987; Soong, 1991; Dai *et al.*, 1992; Babcock *et al.*, 1994; Glynn *et al.* 1994; Kinzie III, 1996).

Jokiel (1985) mencionou a irradiação noturna, causada pela iluminação da lua, como o principal fator ambiental controlador da sincronização e momento de liberação das larvas nos ciclos mensais de planulação em *Pocillopora damicornis*. Diversos estudos têm ressaltado a previsibilidade do processo de maturação e desova durante a lua cheia, ou num período logo após esta. Alguns exemplos podem ser citados para a Grande Barreira de Recife da Austrália (Kojis & Quinn, 1981a; Harrison *et al.*, 1984; Willis *et al.*, 1985; Babcock *et al.*, 1986), Havaí (Heyward, 1986), Caribe (Szmant, 1986) e Mar Vermelho (Shlesinger & Loya, 1985). Entretanto, tem-se observado que dentro de uma única espécie, sincronia lunar na reprodução pode variar em relação à distribuição geográfica, sazonalidade ou aos morfotipos. Somando-se a tais divergências, espécies distintas de um mesmo recife podem planular em diferentes fases da lua (Stimson, 1978; Rinkevich & Loya, 1979b; Richmond & Jokiel, 1984; Jokiel, 1985; Shlesinger & Loya, 1985; Soong, 1991).

Um segundo aspecto foi proposto por Babcock *et al.* (1986), segundo os quais, os corais poderiam utilizar a luz da lua como sinal ambiental para prever o regime de maré. Observações prévias realizadas por Simpson (1985), na Grande Barreira de Recife da Austrália, forneceram indícios de que a reprodução poderia ser sincronizada pela variação da maré seguida à lua cheia.

Estudos experimentais têm demonstrado a importância da variação luminosa, referente à extensão dos ciclos circadianos e lunar, durante a estação reprodutiva (Jokiel *et al.*, 1985; Hunter, 1988). Segal (1970) propôs a presença de células epidérmicas ou gastrodérmicas fotossensíveis, e a possibilidade da luz agir diretamente sobre as células reprodutivas. Posteriormente, Babcock *et al.* (1994) sugeriram que o fotoperíodo seria tão relevante quanto a temperatura na gametogênese e reprodução. Embora não possuam fotorreceptores especializados, os corais escleractíneos estariam aptos a perceber mudanças na irradiação solar, através das atividades fotossintéticas das zooxantelas (algas simbióticas que vivem nos tecidos dos corais hermatípicos) (Harrison & Wallace, 1990).

Apesar das evidências de que os mecanismos regulatórios dos ciclos reprodutivos em invertebrados marinhos envolvem a interação de fatores exógenos (ambientais externos) e endógenos (biológicos, ligados provavelmente à produção de hormônios), os estudos desenvolvidos até o momento com corais referem-se exclusivamente à discussão da influência dos fatores ambientais sobre a reprodução (Harrison & Wallace, 1990).

1F. SINCRONIA

Estudos recentes têm sugerido que a gametogênese é comumente sicronizada dentro de cada colônia, e pelo menos parcialmente sincronizada entre membros de uma mesma população (Richmond & Hunter, 1990).

Nas espécies que liberam gametas na água e possuem ciclos gametogênicos anuais, o desenvolvimento dos ovócitos e espermatozóides é frequentemente variável nos estágios iniciais, alcançando simultaneamente o amadurecimento pouco antes do período de reprodução (Kojis & Quinn, 1981b; Fadlallah & Pearse, 1982b; Harriott, 1983a; Szmant, 1986).

Fadlallah & Pearse (1982b) observaram uma alta sincronia na ovogênese e espermatogênese do coral gonocórico e solitário *Paracyathus stearnsii*. A partir da observação de um fenômeno de reprodução em massa, incluindo 25 espécies de corais, Willis *et al.* (1985) verificaram que a maturação final dos ovócitos e espermatozóides ocasionalmente poderia sofrer um atraso, resultando em pelo menos duas liberações de gametas durante a estação reprodutiva. Os autores também sugeriram que a fase da lua associada à temperatura do mar poderia determinar os intervalos entre um evento e outro. Longe de ser um acontecimento isolado, eventos consecutivos de liberação de gametas e plânulas durante o pico reprodutivo têm sido observados com relativa frequência (Kojis & Quinn, 1981a,b, 1982; Harrison *et al.*, 1984; Babcock *et al.*, 1986; Shimoike *et al.*, 1992).

Mais recentemente, Szmant (1991) e Acosta & Zea (1997) encontraram assincronia intra e intercolonial no desenvolvimento das gônadas em *Montastrea cavernosa*, espécie caracteristicamente gonocórica que libera gametas na água.

Em relação às espécies incubadoras, com ciclos múltiplos e sobrepostos, gametas e larvas em vários estágios de desenvolvimento têm sido encontrados nos pólipos férteis (Szmant-Froelich *et al.* 1985; Kojis, 1986a, Chornesky & Peters, 1987).

A sincronia intracolonial e a alta assincronia intercolonial, durante o período de planulação, foram observadas em colônias de *Stylophora pistillata*, por Rinkevich & Loya (1979a), e em *Acropora palifera*, por Kojis (1986a). A assincronia intra e intercolonial, foram por sua vez verificadas em colônias de *Porites astreoides* e *P. porites*, por Chornesky & Peters (1987) e Tomascik & Sander (1987), respectivamente. Ao contrário, análises realizadas por Szmant-Froelich *et al.* (1985) em colônias de *Favia fragum*, demonstraram haver sincronia intra e intercolonial na maturação das gônadas.

Coma *et al.* (1995) sugeriram que a sincronia é um relógio interno regulado por estímulos externos, principalmente associados à variação da temperatura do mar e dos ciclos lunar e de maré. Campbell (1974) enfatizou que a sincronia na reprodução é uma das estratégias mais importantes, através da qual espécies que liberam óvulos e espermatozóides na água asseguram o sucesso da fertilização e reduzem o desperdício de gametas.

1G. RECIFES DE CORAIS E O HISTÓRICO DOS ESTUDOS DE MUSSIDAE NO BRASIL

Segundo Veron (1995), os recifes de corais da Austrália representam os maiores e mais complexos sistemas de todo o mundo, estendendo-se por 2000 km ao longo da costa norte-oriental de Queensland. Praticamente todas as 800 ou mais espécies de corais construtores de recifes pertencem a ordem Scleractinia (Maragos, 1977). No Havaí

encontram-se 40 destas espécies, enquanto que as Ilhas Samoa e Marshall apresentam cerca de 200. Em alguns recifes na costa ocidental da Austrália foram registrados 283 espécies de corais zooxantelados e na Grande Barreira de Recife foi estimado um total de 330 espécies (Veron, 1995). Comparado a outras regiões do mundo, o Brasil possui uma pequena variedade de corais-pétreos formadores de recifes, apenas 15, sendo que 7 são endêmicos (Castro, 1994). Apesar de sua grande importância ecológica, a presença e localização de todos os recifes brasileiros ainda é pouco conhecida (o trabalho mais abrangente foi realizado em 1970 por Laborel).

Dois gêneros de Mussidae, *Mussismilia* Ortmann, 1890 e *Scolymia* Haime, 1852, ocorrem na costa brasileira. O gênero *Mussismilia* é endêmico para o Brasil e possui três espécies: *M. braziliensis* (Verrill, 1868), *M. hartti* (Verrill, 1868) e *M. hispida* (Verrill,1902). Segundo Laborel (1970), *M. hispida* divide-se em duas sub-espécies geográficas com distribuição parapátrica: *M. hispida hispida*, com distribuição do Rio São Francisco até São Sebastião (SP) e *M. hispida tenuisepta*, com distribuição de Fernando de Noronha e Atol das Rocas até o norte de Salvador (BA).

M. hispida ocorre em áreas bem iluminadas, frequentemente em locais rasos, no topo ou na orla dos recifes. As colônias são maciças e hemisféricas, geralmente baixas (normalmente as bases representam seu maior diâmetro). A espécie é comumente conhecida como coral-cérebro, pois além de apresentar forma arredondada, sua superfície encontra-se coberta por pólipos de contorno irregular. Foram registradas colônias de *M. hispida* com mais de um metro de diâmetro na Praia da Tartaruga, em Búzios, Rio de Janeiro (o diâmetro máximo dessas colônias costuma ser de cerca de 40 cm - Hetzel & Castro, 1994).

O estudo da reprodução envolvendo outros gêneros de Mussidae foi realizado por Duerden (1902) (*Isophyllia dipsacea*), Marshall & Stephenson (1933) (*Lobophyllia sp.*, *Symphyllia recta*), Harriott (1983a) (*Lobophyllia corymbosa*), Willis *et al.* (1985) (*Acanthastrea echinata*, *Lobophyllia corymbosa*, *L. hemprichii*, *Scolymia vitiensis*, *Symphyllia*

recta), Babcock & Heyward (1986) (*Lobophyllia corymbosa*, *L. hemprichii*), Babcock *et al.* (1986) (*Acanthastrea echinata*, *Lobophyllia corymbosa*, *L. hemprichii*, *Symphyllia radians*, *S. recta*), Szmant (1986) (*Mycetophyllia ferox*), e Heyward *et al.* (1987) (*Lobophyllia corymbosa*). Segundo Harrison (1985) os mussídeos são predominantemente hermafroditas com gônadas desenvolvendo-se separadamente, mas adjacentes sobre o mesmo mesentério. Richmond & Hunter (1990) sugeriram que, além do hermafroditismo, a liberação de gametas na água para fertilização e desenvolvimento externos, aparentemente constitui uma característica estável no modo de reprodução da família em questão.

Embora visasse, principalmente, o conhecimento da microanatomia dos mussídeos brasileiros, as observações realizadas por Pitombo (1992) proporcionaram algumas indicações sobre as estratégias adotadas pelos corais estudados na reprodução, constituindo desta forma, a única referência ao tema. Corroborando os resultados obtidos por Harrison (1985) e Richmond & Hunter (1990), Pitombo (1992) observou um padrão hermafrodita em pólipos de *M. hispida*. Segundo o autor, as gônadas continham tanto células femininas quanto masculinas, em diferentes estágios de maturação, ocupando espaços distintos em um mesmo mesentério. Os cistos testiculares se encontravam na porção mais interna, voltada para a cavidade gastrovascular, situavam-se acima dos ovócitos e próximos à faringe, enquanto que os ovócitos encontravam-se na porção mais periférica, voltada para a parede do corpo polipar, situavam-se abaixo dos cistos, na região basal do pólipo.

Estudos específicos sobre a biologia reprodutiva dos corais brasileiros são escassos, senão inexistentes. O presente trabalho vem portanto somar novos conhecimentos sobre os corais zooxantelados, principalmente à família Mussidae; além de representar o primeiro registro sobre o ciclo reprodutivo de uma importante espécie construtora de recifes da costa brasileira.

2. OBJETIVOS

Utilizando o exame histológico das estruturas citológicas e tissulares relacionadas à reprodução, este trabalho tem como principais objetivos:

(**1**) Determinar o sexo e o arranjo das gônadas em *M. hispida*.

Questões:

M. hispida é gonocórica ou hermafrodita?

O desenvolvimento das gônadas é simultâneo ou sequencial?

A distribuição das gônadas nos mesentérios férteis de *M. hispida* segue o padrão descrito por Harrison (1985) para os mussídeos?

(**2**) Descrever a gametogênese e averiguar o padrão temporal do ciclo reprodutivo de *M. hispida* em Búzios.

Questões:

Como se caracterizam os estágios da ovogênese e espermatogênese em *M. hispida*?

O ciclo reprodutivo de *M. hispida* é anual?

(**3**) Verificar a sincronia inter e intracolonial no desenvolvimento gonadal e o período reprodutivo de *M. hispida* em Búzios.

Questões:

Há sincronia no desenvolvimento das gônadas entre as diferentes colônias de *M. hispida*?

Há sincronia entre os pólipos de uma mesma colônia?

Qual é a estação reprodutiva?

(**4**) Caracterizar o modo de reprodução de *M. hispida*.

M. hispida incuba larvas ou libera gametas na água para fertilização externa?

⁂

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo do ciclo reprodutivo de *Mussismilia hispida* foi realizado em colônias coletadas na Praia da Tartaruga, Armação de Búzios, no norte do estado do Rio de Janeiro (Fig.1).

Utilizando-se um martelo e uma ponteira, fragmentos contendo um mínimo de cinco pólipos foram retirados mensalmente de 12 colônias, no período de abril de 1989 a março de 1990. Duas colônias, codificadas com as letras **B** e **C** e denominadas de colônias fixas, foram individualmente marcadas para que pudessem ser repetidamente amostradas. As colônias **B** e **C** encontravam-se a dois metros de profundidade e possuiam mais de um metro de diâmetro. As dez outras colônias, embora não tenha sido empregado nenhum critério metodológico na amostragem, foram designadas de colônias aleatórias. Estas situavam-se próximas às fixas e estavam relativamente à mesma profundidade. Todas as amostras permaneceram conservadas em formol 4%, por cerca de sete anos.

A média semanal da temperatura da superfície do mar ('SST') durante os anos de 1898 e 1990 foi obtida pelo National Metereological Center (NMC), National Oceanographic and Atmospheric Administration (NOAA), através do FTP anônimo para nic.fb4.noaa.gov e dos arquivos no directory/pub/ocean/clim1.

O material estudado no presente trabalho encontra-se depositado e tombado na Coleção de Cnidários do Museu Nacional/UFRJ (MNRJ).

Relação dos lotes de *M. hispida* - local de coleta: Praia da Tartaruga, Búzios, Rio de Janeiro (RJ), coletor: Claudio Continentino Ratto (em negrito número de registro da coleção, entre parênteses código do laminário):

- Colônia Fixa B -

MNRJ 3241- data de coleta: 22/ABR/89 (lam. 2011B1); **MNRJ 3242**- 15/MAI/89 (lam. 2012B8); **MNRJ 3243**- 15/JUN/89 (lam. 2013B8); **MNRJ 3244**-16/JUL/89 (lam. 2014B7); **MNRJ 3245**- 15/AGO/89 (lam. 2015B5); **MNRJ 3246**- 15/SET/89 (lam. 2016B1); **MNRJ 3247**- 16/OUT/89 (lam. 2017B1); **MNRJ 3248**- 27/NOV/89 (lam. 2018B1); **MNRJ 3249**- 16/DEZ/89 (lam. 2019B1, 2019B2); **MNRJ 3250**-

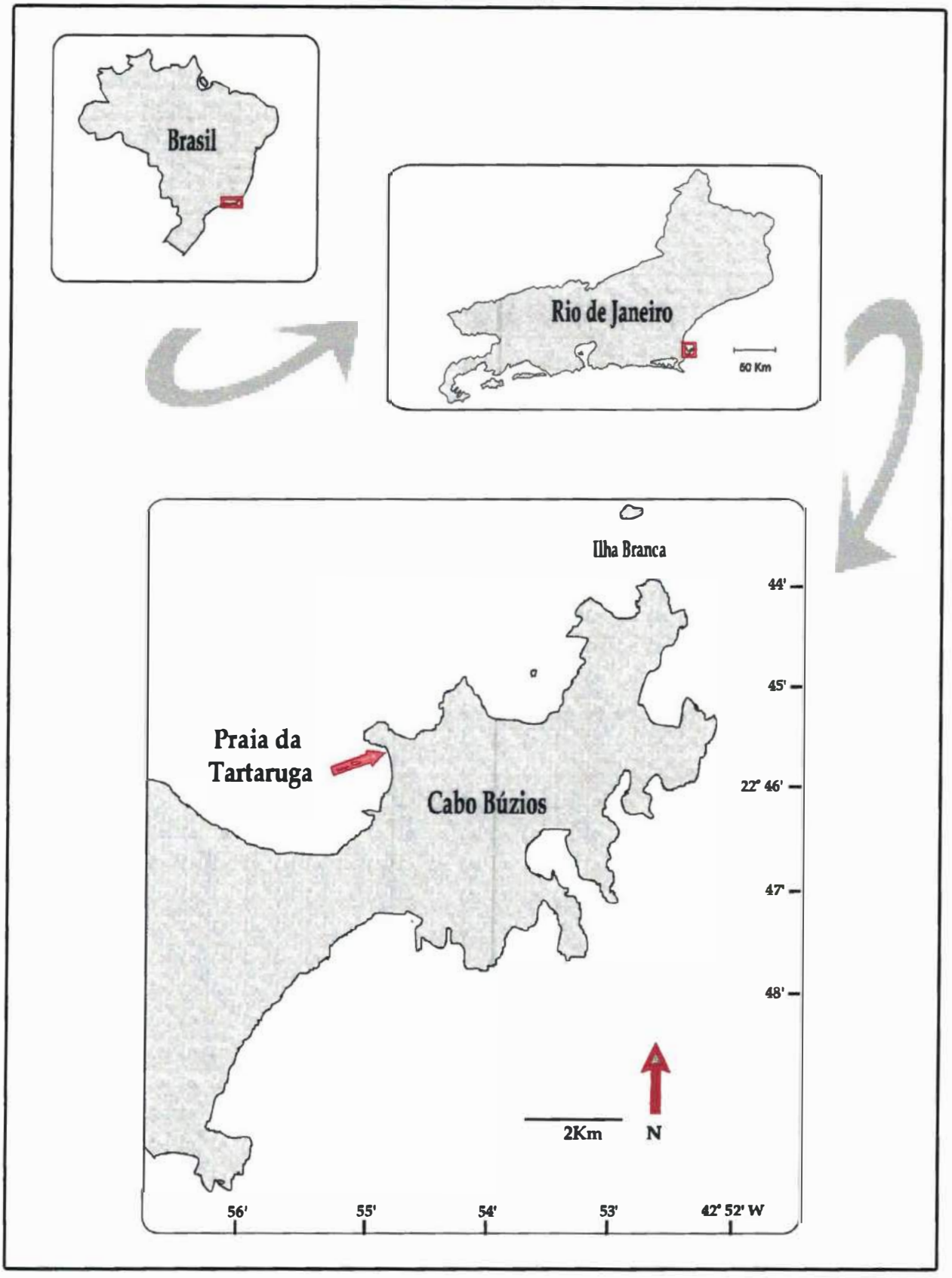


Figura 1. Mapa da região de Búzios (RJ) indicando a Praia da Tartaruga, local onde foram realizadas as coletas mensais das colônias de *M. hispida* no período de abril/89 a março/90.

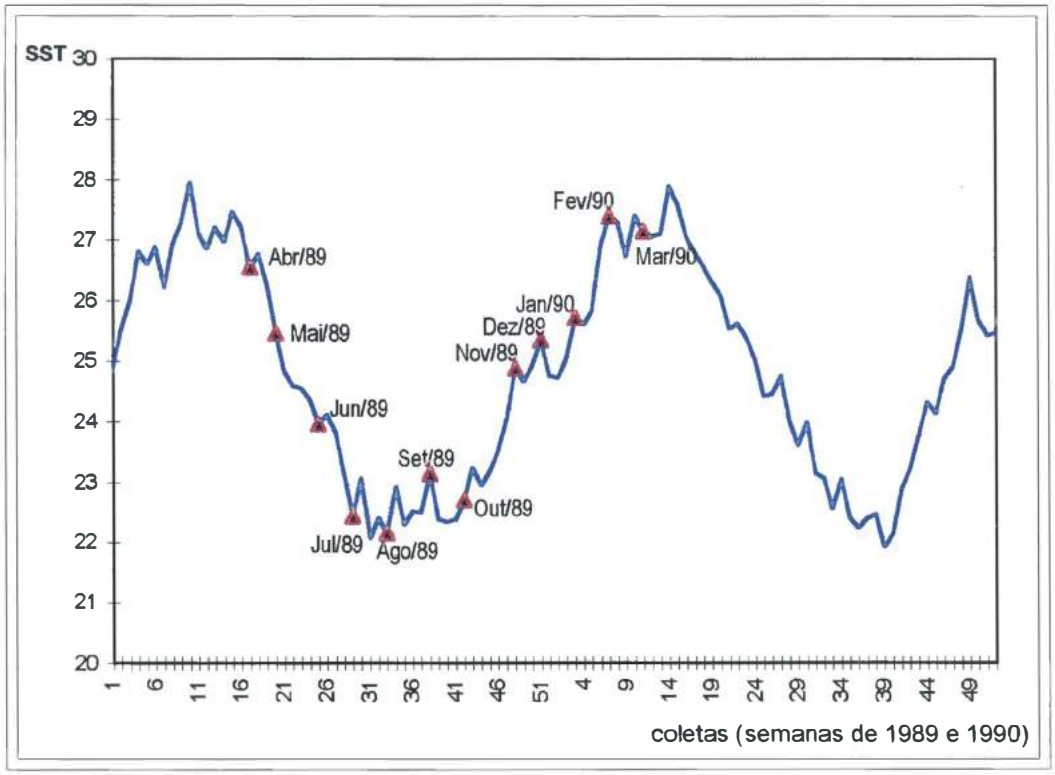


Figura 2. Média semanal da temperatura da superfície do mar (SST-°C), durante os anos de 1989 e 1990, na região de Búzios.

15/JAN/90 (lam. 2020B2, 2020B3); **MNRJ 3251**- 15/FEV/90 (lam. 2021B5, 2021B6); **MNRJ 3252**- 15/MAR/90 (lam. 2022B1, 2022B2).

- Colônia Fixa C -

MNRJ 3253- data de coleta: 22/ABR/89 (lam. 2011C6); **MNRJ 3254**- 15/MAI/89 (lam. 2012C6); **MNRJ 3255**-15/JUN/89 (lam. 2013C3); **MNRJ 3256**- 16/JUL/89 (lam. 2014C7); **MNRJ 3257**- 15/AGO/89 (lam. 2015C8); **MNRJ 3258**- 15/SET/89 (lam. 2016C7); **MNRJ 3259**- 16/OUT/89 (lam. 2017C1); **MNRJ 3260**-27/NOV/89 (lam. 2018C2); **MNRJ 3261**- 16/DEZ/89 (lam. 2019C1, 2019C2); **MNRJ 3262**- 15/JAN/90 (lam. 2020C1, 2020C2); **MNRJ 3263**- 15/FEV/90 (lam. 2021C4, 2021C5); **MNRJ 3264**- 15/MAR/90 (lam. 2022C1, 2022C2, 2022C3, 2022C4).

- Colônias Aleatórias -

MNRJ 3265- data de coleta: 22/ABR/89 (col. al. 1); **MNRJ 3266**- 15/MAI/89 (col. al. 2); **MNRJ 3267**- 15/JUN/89 (col. al. 3); **MNRJ 3268**- 16/JUL/89 (col. al. 4); **MNRJ 3269**- 15/AGO/89 (col. al. 5), **MNRJ 3270**- 15/SET/89 (col. al. 6), **MNRJ 3271**- 16/OUT/89 (col. al. 7); **MNRJ3272**- 27/NOV/89 (col. al. 8); **MNRJ 3273**- 16/DEZ/89 (col. al. 9, lam. 3500, 3501a, 3502b, 3503); **MNRJ 3274**- 15/JAN/90 (col. al. 10, lam. 3510a, 3512b, 3515a, 3516b, 2860); **MNRJ 3275**- 15/FEV/90 (col. al. 11, lam. 2871, 3520a, 3522b, 3523a, 3524b); **MNRJ 3276**- 15/MAR/90 (col. al. 12, lam. 3531a, 3532b, 3539, 2880).

3A. HISTOLOGIA E ANÁLISE QUALITATIVA

Os procedimentos utilizados para a preparação de cortes histológicos seguem a metodologia descrita em Winsor (1946) e Davenport (1960).

Nem todos os fragmentos foram descalcificados à época de sua coleta. Alguns foram mantidos com esqueleto calcário em formol 4%. No processo de descalcificação utilizou-se solução de ácido fórmico a 10% e formol a 5%. Dependendo do tamanho das amostras, levava-se cerca de três a cinco dias consecutivos para se eliminar o esqueleto calcário dos tecidos. Durante o período em que permaneceram imersos em solução ácida descalcificadora, diariamente os fragmentos eram retirados, lavados em água corrente por 1h, e recolocados nos recipientes plásticos utilizados exclusivamente para este fim. Neste processo, efetuava-se a troca diária da solução ácida. Após completa descalcificação, os tecidos foram deixados em água corrente por 24h. Este procedimento visa a remoção dos resíduos de ácido, evitando assim a contínua ação destes nos tecidos e a provável

contaminação dos reagentes utilizados nos tratamentos subsequentes. Ao término desta etapa, as amostras foram transferidas para frascos com formol a 4% e mantidas vedadas, por pelo menos 48h, antes de serem novamente processadas.

Os critérios utilizados para a escolha dos pólipos incluiram o tamanho e a localização destes nos tecidos descalcificados. Pólipos pequenos e/ou marginais não foram analisados, ao contrário, aqueles mais desenvolvidos provenientes da parte mais central das amostras foram cortados e separados para os procedimentos histológicos.

Uma vez que a seleção dos pólipos foi obtida através de cortes realizados no plano longitudinal, em algumas ocasiões, antes do emblocamento das amostras, verificou-se que a pressão da navalha no tecido relativamente mole do pólipo causava um deslocamento dos mesentérios ora para uma banda, ora para outra. Consequentemente, a parte emblocada poderia não apresentar a metade correspondente dos mesentérios, sendo portanto difícil encontrar os ovócitos, principalmente nos estágios mais iniciais quando eram pouco abundantes. Para evitar tais artifícios, optou-se por emblocar ambas as partes do pólipo.

A primeira etapa do processo histológico incluiu desidratação dos tecidos, realizada por meio de banhos em uma série sucessiva de álcoois: 70° (30min), 80° (30min), 90° (30min), 100° I (30min) e 100° II (30min). Após desidratação, procedeu-se a diafanização, obtida através de dois banhos em xilol (30min cada). Finalmente, as amostras foram embebidas em três banhos de parafina (1h cada) em estufa a 58°C. Os dois primeiros banhos são de extrema relevância, pois o xilol retido nos tecidos durante o processo de diafanização deve ser completamente eliminado. Os resíduos comprometem o resultado final, seja na montagem do bloco ou durante os cortes. No último banho o tecido foi depositado na forma de inclusão e após um período de 24h, tempo com boa margem de segurança para o completo esfriamento e enrijecimento da parafina, o bloco foi retirado para o corte.

Séries de cortes histológicos longitudinais, com espessura de 6-7μm, foram obtidos em micrótomo rotativo e montados sobre lâminas de vidro.

A desparafinização, a re-hidratação e a coloração dos cortes compreenderam as três últimas etapas metodológicas de preparo do material. Coloração das lâminas foi realizada com tricrômico de Mallory (Pantin, 1948), o qual possibilitou uma maior distinção entre os processos musculares e a mesogléia (Belém, 1976).

A contracoloração dos núcleos com Hematoxilina de Weigert (da Silveira & Migotto, 1984; Belém, 1987), foi testada. Entretanto, o contraste alcançado na maioria das lâminas não foi satisfatório, pois apesar dos núcleos se destacarem pela coloração mais intensa, todas as demais estruturas inclusive a mesogléia uniformizaram-se em tons de rosa. Somando-se a este fato, os testes realizados com amostras contendo gônadas em diversos estágios de desenvolvimento não contribuiram para a individualização das etapas da vitelogênese, uma vez que não houve variação significativa entre a coloração dos ovócitos maduros e imaturos. Desta forma, prosseguiu-se à utilização exclusiva do tricrômico de Mallory.

As lâminas obtidas foram minuciosamente analisadas com intuito de se estabelecer o sexo da espécie, a posição das gônadas nos mesentérios, o padrão temporal da ovogênese e espermatogênese, classificar os estágios de desenvolvimento das gônadas, verificar a sincronia intra e intercolonial no ciclo gametogênico e deduzir o momento de liberação dos gametas. Todas as medidas foram realizadas através de ocular micrométrica, e as fotomicrografias dos cortes selecionados foram obtidas em microscópio óptico Olympus BH2.

Os estágios de desenvolvimento das células reprodutivas foram comparados aqueles propostos por Szmant-Froelich *et al.* (1980, 1985) e Wourms (1987).

3B. ANÁLISES CITOMÉTRICAS

Métodos citométricos similares aqueles aplicados por da Silveira (1980, 1986) e Belém (1987) foram utilizados na análise quantitativa do comportamento reprodutivo de *M. hispida*.

Entre abril/89 e novembro/89, um pólipo foi mensalmente amostrado nas colônias fixas B e C. A partir de dezembro/89, data significativa por representar o início da estação reprodutiva, incluindo o desencadeamento do ciclo espermático, amadurecimento das gônadas e processo de liberação de gametas (histologicamente inferido pelo súbito desaparecimento das células reprodutivas maduras), dois pólipos passaram a ser mensalmente analisados.

Devido à importância dos eventos ocorridos nas colônias fixas no período de dezembro/89 a março/90, e a fim de se averiguar o grau de sincronia intercolonial no desenvolvimento das gônadas durante a estação reprodutiva, um a dois pólipos provenientes de três colônias aleatórias diferentes foram processados e analisados. É importante ressaltar, que as colônias aleatórias foram exclusivamente estudadas no intervalo de dezembro/89 a março/90, ao passo que as fixas o foram ao longo de todo período amostral, precisamente a partir de abril/89 até março/90.

Para cada pólipo emblocado foram medidos 50 ovócitos, escolhidos ao acaso nos mesentérios férteis. Como procedimento padrão, a primeira lâmina de cada série histológica foi minuciosamente analisada. Entretanto, frequentemente o número de ovócitos presentes nos cortes era insuficiente para cobrir todas as análises em uma única lâmina. Desta forma, as contagens e mensurações prosseguiram pelas lâminas seguintes até que o número total estipulado de células fosse alcançado.

Os diâmetros foram obtidos pelas medidas dos maiores eixos dos ovócitos (Szmant 1986; Soong, 1991). As medições foram realizadas com aumento de 156,25x, que representava para cada divisão da micrométrica um valor equivalente a 6,522μm.

Para evitar que o mesmo ovócito fosse repetidamente medido, a presença de núcleo e nucléolo, ambos com os contornos bem definidos, foi utilizado como critério para as medições. Embora, ocasionalmente, tenha-se observado que estas estruturas poderiam permanecer por mais de um corte numa mesma série, a partir do segundo corte, núcleo e nucléolo progressivamente tornavam-se menores e menos nítidos, saindo da condição adequada de mensuração. A fim de afastar qualquer possibilidade de dúvida, nestas ocasiões foram montados esquemas com a distribuição dos ovócitos nos mesentérios, nos quais todas as células medidas eram marcadas.

Ao contrário dos ovócitos, cada cisto possui centenas de células reprodutivas, cujo reduzido tamanho dificulta sua contagem e medição. Além disso, cistos maduros ou imaturos frequentemente apresentam uma ampla variação no tamanho. Neste caso, a sobreposição dos diâmetros não se restringe exclusivamente aos limites entre um estágio e outro, como observado nos ovócitos, mas torna-se constante ao longo de todo desenvolvimento. Somando-se à carência de referências metodológicas e estatísticas empregadas a este tipo de análise em cnidários, tais fatos suportaram a decisão de se direcionar maior atenção à exposição qualitativa do ciclo espermático em *M. hispida*.

Dando prosseguimento ao tratamento quantitativo da ovogênese, calculou-se a média, a variância e o desvio padrão dos diâmetros dos ovócitos (n=50) obtidos em cada pólipo-amostra das colônias fixas e aleatórias. Para o cálculo da média aritmética simples ($\bar{X}$) empregou-se a fórmula

$$\bar{X} = \frac{\Sigma x}{n}$$

a variância (s^2) foi obtida por

$$s^2 = \frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma \bar{X})^2}{n}}{n}$$

e finalmente, para o cálculo do desvio padrão (s) utilizou-se:

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma \bar{X})^2}{n}}{n - 1}}$$

Durante os meses em que foram amostrados 2 pólipos por colônia (de dezembro/89 a março/90), aplicou-se o teste de distribuição *F*, ao nível de probabilidade 2,5% e com graus de liberdade (n-1)= 49, para verificar a existência de diferenças significativas entre as variâncias dos diâmetros dos ovócitos (n=50) das duas amostras. Para proceder ao teste *F* foi calculado:

$$F = \frac{s^2_1}{s^2_2}$$

onde, s^2_1 e s^2_2 correspondem respectivamente ao maior e menor valor da variância. Quando a razão da variância obtida era maior do que o valor calculado para $F_{0,025\,[49,49]} = 1,77$ (Rohlf & Sokal, 1969; da Silveira, 1980; Belém, 1987), a hipótese nula ($H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$) era rejeitada. Consequentemente, considerava-se inadequada a reunião das medidas das duas amostras em um único polígono de frequência. Caso a hipótese nula não fosse descartada ou seja, o valor obtido para *F* era menor que 1,77, passava-se a uma segunda etapa: comparar as médias das medidas de cada pólipo e verificar se estas diferenciavam significativamente uma da outra. A comparação foi obtida através do teste de distribuição de Student, ou teste *t*, cuja fórmula se expressa nos seguintes termos:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s^2}}$$

onde $\mu_1 - \mu_2 = 0$ e $n_1 = n_2$, ao nível de probabilidade de 5%, com graus de liberdade 2(N-1)= 98. A hipótese nula (H_0: $\mu_1 = \mu_2$) foi rejeitada quando o valor de *t* observado era maior do que o valor calculado de $t_{0,05\ (98)}$= 1,984 (Rohlf & Sokal, 1969; da Silveira, 1980; Belém, 1987), sendo portanto, definitivamente inapropriada a reunião das medidas de cada pólipo em um único polígono de frequência.

Para a montagem dos polígonos de frequência, os ovócitos foram primeiramente distribuídos em 6 classes de tamanhos com intervalos de 100 µm (valor escolhido arbitrariamente): 0-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 e 500-600 µm. A seguir foram calculados os pontos médios para cada classe de tamanho, respectivamente: 50, 150, 250, 350, 450 e 550 µm. Os pontos plotados nos intervalos do polígono de frequência correspondem ao ponto médio obtido para cada classe.

Finalizando os procedimentos metodológicos empregados na presente dissertação, dados de média, desvio padrão e os valores extremos dos diâmetros dos ovócitos (n=50) obtidos nas amostras das colônias fixas B e C foram plotados em gráficos. Tal procedimento foi empregado para a análise do grau de sincronia no desenvolvimento intracolonial das gônadas ao longo do período amostral (Grant & Tyler, 1983).

4. RESULTADOS

4A. SEXUALIDADE

Através das análises histológicas, *M. hispida* foi caracterizada como uma espécie hermafrodita sequencial, com as células femininas desenvolvendo-se primeiro que as masculinas, e o amadurecimento de ambas culminando num mesmo período de liberação de gametas (hermafroditas sequenciais co-sexuais, segundo terminologia de Policansky, 1982 *apud* Harrison & Wallace, 1990).

4B. DISPOSIÇÃO DAS GÔNADAS

As gônadas foram encontradas tanto nos mesentérios imperfeitos quanto nos perfeitos, no espaço restrito entre o músculo retrator e o filamento mesentérico. Com o desencadeamento do ciclo espermático, as gônadas masculinas ocuparam a região médio-superior dos mesentérios, mais próxima à faringe, situando-se acima das células femininas, as quais progressivamente se aglomeram na região basal do corpo polipar (Fig. 3). Como observado por Pitombo (1992), a proliferação e o aumento no diâmetro dos cistos e ovócitos geraram um deslocamento das células femininas para face mais externa do mesentério, em direção à parede do pólipo, e das células masculinas para face mais interna, junto à cavidade gastrovascular.

4C. GAMETOGÊNESE (ASPECTOS GERAIS)

Células-tronco intersticiais (*sensu* Delvoye, 1988), encontradas na endoderme dos mesentérios adjacente à mesogléia, diferenciaram-se

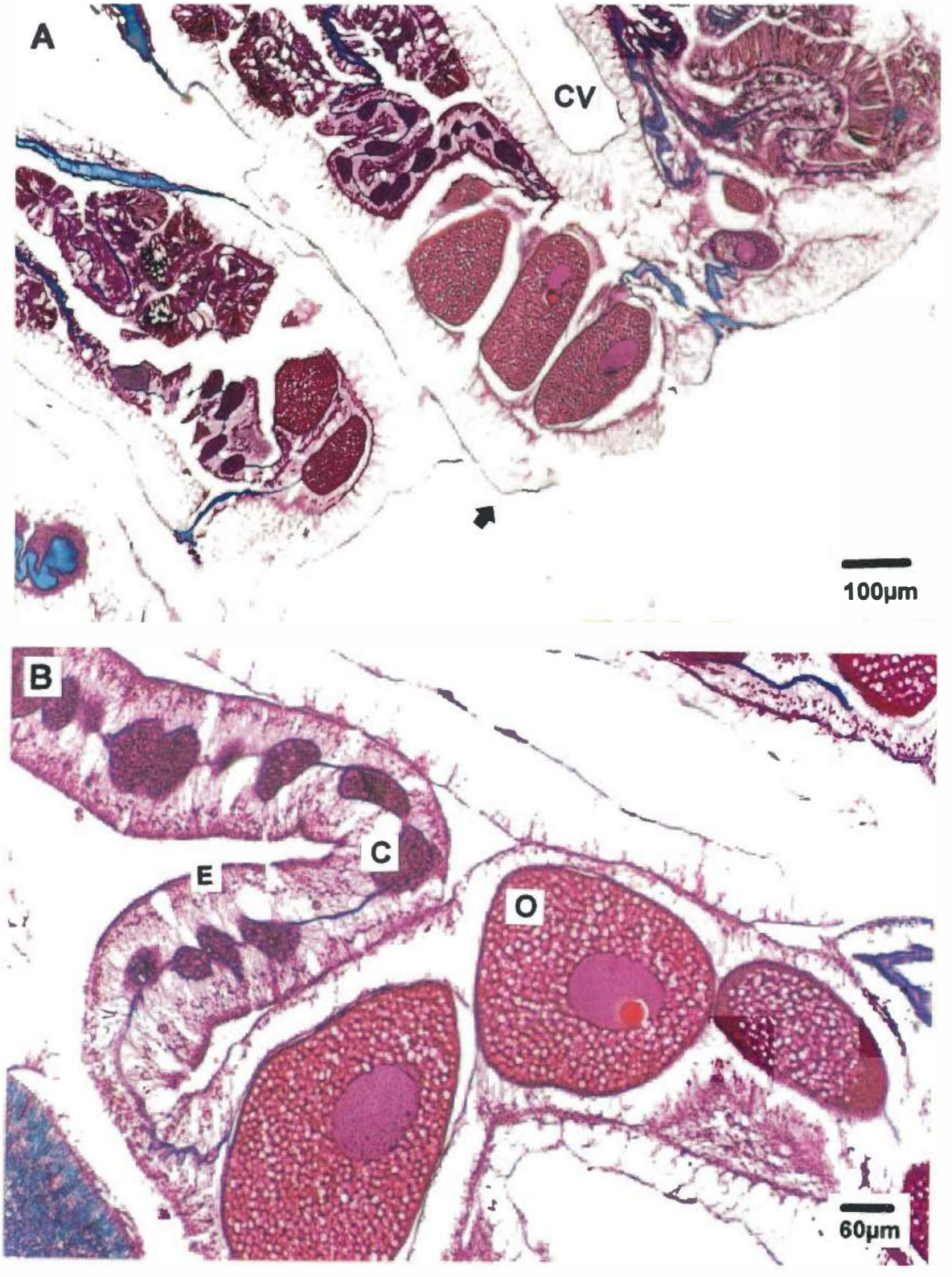


Figura 3. A, B. Disposição das gônadas masculinas e femininas nos mesentérios. A. Seta está indicando a base do pólipo. C= cisto testicular, CV= cavidade gastrovascular, E= endoderme, M= mesogléia, O= ovócito. A= MN2020B2, lam. 36 (janeiro/90)/B= MN2020B2, lam. 27 (janeiro/90).

em células sexuais. Posteriormente, migraram em direção à mesogléia onde ao longo da gametogêse alcançaram o amadurecimento final. Uma vez maduras, as células reprodutivas foram liberadas para o interior da cavidade gastrovascular e em seguida expelidas pela abertura oral, para fertilização e desenvolvimento externos.

Na ovogênese, as células intersticiais diferenciadas primariamente apresentavam um núcleo esférico ou elipsóide bem desenvolvido. Durante a fase de 'ancoragem', nem todas as células alcançaram a mesogléia e foram incorporadas ao citoplasma dos ovócitos primários mais desenvolvidos. Ocasionalmente verificou-se que a camada mesogleal próxima sofria algumas alterações locais, ora tornando-se mais espessa ou levemente ramificada.

Na espermatogênese, as células intersticiais diferenciadas inicialmente formavam aglomerados celulares difusos, delimitados por um invólucro fino e azulado de provável origem mesogleal. Uma vez imersos na mesogléia, formavam os cistos testiculares. Como observado na ovogênese, os cistos primários primariamente tornaram-se maiores através da incorporação de novas células. Não foram encontradas modificações locais na mesogléia relacionadas à proximidade dos aglomerados celulares.

Baseando-se nas alterações morfocitométricas descritas por Szmant-Froelich *et al.* (1980, 1985) e Wourms (1987) para os ovócitos ao longo de seu desenvolvimento, a ovogênese foi dividida em três etapas.

A diferenciação das células intersticiais aparentemente ocorreu na camada mesogleal, onde deram origem às ovogônias. As ovogônias distinguíam-se pelo tamanho reduzido e pela presença de um núcleo central bem desenvolvido, caracterizando a primeira etapa da ovogênese, ou Estágio I. Ao término do Estágio I, as ovogônias diferenciaram-se em ovócitos primários dando prosseguimento à segunda etapa, ou Estágio II. Durante o Estágio II foi registrado um progressivo crescimento do núcleo e do citoplasma, este último principalmente devido à proliferação das vesículas lipídicas. Uma concentração de grânulos ao redor do ovócito, sob a camada mesogleal, e no interior do citoplasma foi detectada

nesta etapa. No desenvolvimento dos ovócitos primários em ovócitos secundários, houve uma intensa produção de vitelo e o deslocamento da vesícula germinativa (=núcleo) para uma posição mais periférica, próxima à membrana celular. Tais transformações resultaram na diferenciação de um ovo maduro apto à fertilização, caracterizando desta forma, a terceira e última etapa do processo de desenvolvimento das células reprodutivas femininas.

A produção de vitelo constituiu um dos principais fenômenos relacionados ao amadurecimento dos ovócitos de *M. hispida*. Aparentemente, tanto as vesículas lipídicas quanto o material granular, foram possivelmente utilizados como fonte de nutrientes para manutenção da célula, e posteriormente da larva.

Representando um dos processos de síntese de vitelo intra-ovócito, a diferenciação das vesículas lipídicas foi à princípio observada quando as células imaturas já se encontravam imersas na camada mesogleal, e prosseguiu ao longo de toda ovogênese. Além da síntese intra-ovócito, foram detectadas evidências de síntese de nutrientes extra-ovócito. Grânulos provenientes de células endodérmicas vizinhas pareciam difundir-se através da mesogléia, e em seguida pela membrana celular, para o interior dos ovócitos. A concentração de material granular sob a camada mesogleal formou um invólucro conspícuo, o qual sofreu alterações de cor e espessura à medida em que as etapas da ovogênese prosseguiam. No estágio final de amadurecimento, houve um intenso deslocamento dos grânulos para a região citoplasmática, através do qual difundiram-se até alcançarem o interior da vesícula germinativa. As diferenças observadas na forma e na cor dos grânulos provavelmente estariam associadas à natureza do conteúdo transportado por estas estruturas.

Apesar do período de coleta não ter se sobreposto, ou seja, não houve uma réplica na amostragem do primeiro mês no qual se detectou células primárias (no caso, abril), a ovogênese em *M. hispida* caracterizou-se por um ciclo anual. Células reprodutivas femininas desenvolveram-se primeiro que as masculinas e levaram muito mais tempo até alcançarem pleno amadurecimento. Corroborando os resultados obtidos com as colônias

fixas, as análises das colônias aleatórias ressaltaram a presença de uma reduzida sincronia intra e intercolonial. Além disso, forneceram evidências relevantes da existência de pelo menos dois picos de desova durante a estação reprodutiva.

A despeito da variação temporal no desenvolvimento final das gônadas, verificou-se que o amadurecimento dos cistos e ovócitos prosseguiu, ao longo da gametogênese, concomitantemente ao aumento da temperatura da água do mar (a liberação dos gametas ocorreu durante o pico de temperatura).

O fenômeno de reabsorção foi verificado em alguns estágios da ovogênese. Os ovócitos aparentavam um estado geral de desintegração, com perda do conteúdo citoplasmático. Comumente a liberação de grânulos e vesículas ocorria marginalmente junto à membrana celular, ou menos frequente, num ponto central do citoplasma, próximo ao núcleo. A camada mesogleal encontrava-se bastante comprometida, não sendo mais possível distinguí-la integralmente ao redor da célula. A presença de estruturas arroxeadas junto às células em degeneração foi detectada, principalmente nos estágios finais. Tais elementos foram identificados como fagócitos, e sua função foi relacionada ao processo de reabsorção.

Finalizando, o evento de desova foi inferido por um conjunto de características peculiares que incluíram, dentre as mais relevantes, o desaparecimento das células reprodutivas maduras nos mesentérios férteis e a aparência relativamente fragilizada e vacuolada da endoderme.

4D. OVOGÊNESE

As análises histológicas possibilitaram avaliar as mudanças nas gônadas femininas ao longo da ovogênese. Tais alterações foram utilizadas como parâmetros básicos na caracterização e classificação dos estágios de desenvolvimento gonadal.

-Estágio I (ou primário)-

As células em desenvolvimento primário, ou de Estágio I, marcaram o início do ciclo reprodutivo nas amostras do mês de abril/89, quando então foram observadas pequenas ovogônias, com núcleo e nucléolo distintos, parcialmente imersas na mesogléia (Fig. 4).

Primariamente na endoderme, as células reprodutivas femininas possuíam entre 13,04 e 19,57µm e coravam em tons de rosa, púrpura ou azul-acinzentado claro. Uma vez imersos na mesogléia, os ovócitos primários mais desenvolvidos aparentemente incorporavam em seu citoplasma algumas células menores que ainda se encontravam na endoderme.

Embora tenham alcançado tamanhos relativamente superiores, os ovócitos de Estágio I não ultrapassaram 100µm de diâmetro.

Conferindo com a descrição de Wourms (1987) para as células pré-meióticas e com Szmant-Froelich *et al.* (1985) para a classificação dos ovócitos de Estágio I, uma das principais características das células analisadas ao longo do primeiro estágio de desenvolvimento envolvia a reduzida diferenciação das vesículas lipídicas no citoplasma. Ovócitos imaturos possuiam uma aparência mais densa, contrastando com o aspecto esponjoso daqueles mais maduros.

Outras características envolviam a presença de um núcleo elipsóide central, púrpura claro, bem desenvolvido e eventualmente circundado por um halo branco. Em seu interior, distinguía-se um nucléolo esférico alaranjado, situado marginalmente próximo à membrana nuclear. A mesogléia azul-transparente pouco espessa e sem ramificações (exceto pelas suaves projeções junto às células recém-ancoradas) formava uma capa fina e conspícua ao redor dos ovócitos em desenvolvimento primário.

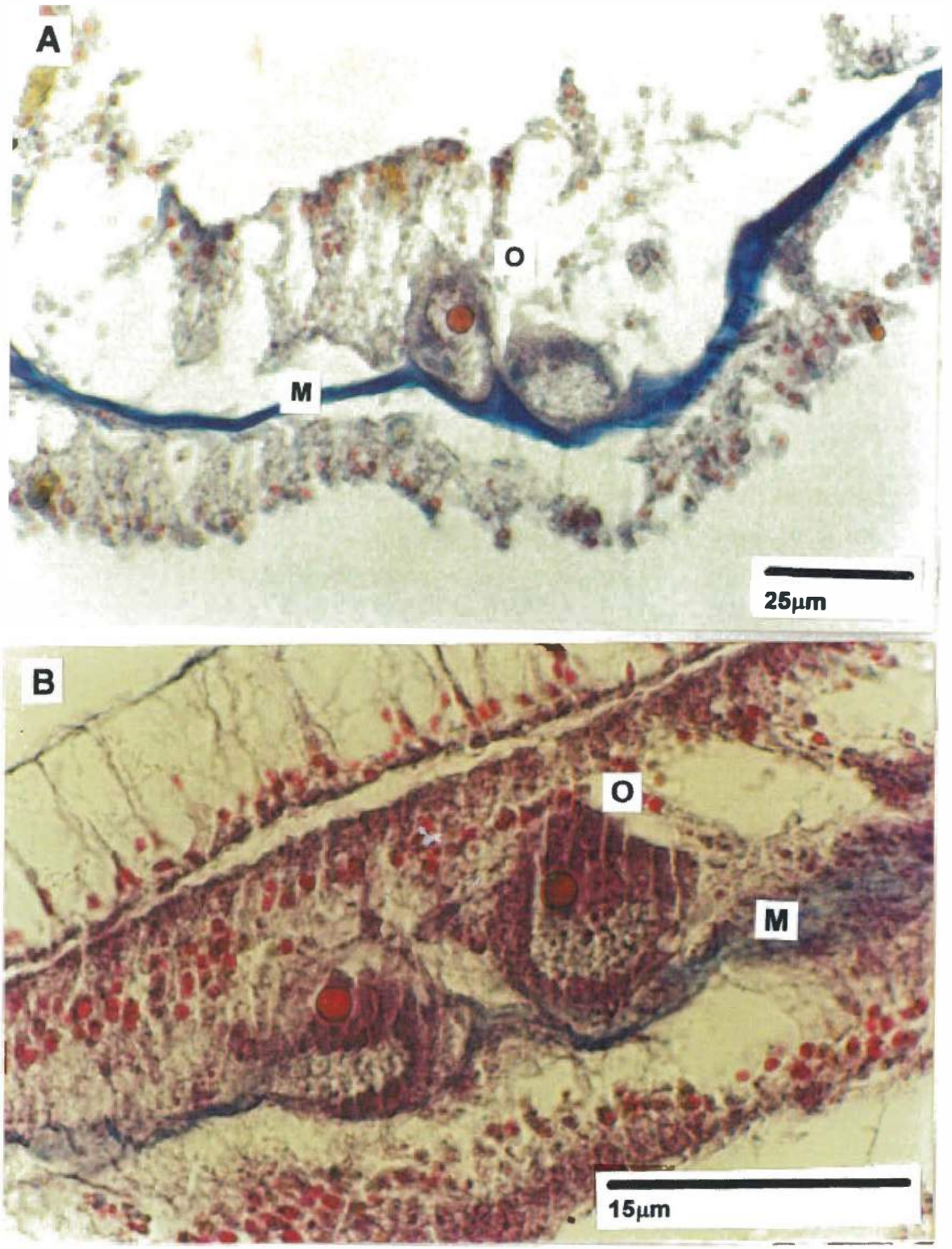


Figura 4. A, B. Ovócitos de Estágio I. M= mesogléia, O= ovócito. A= MN2012C6, lam. 36 (maio/89)/B= MN2012B8, lam. 41 (maio/89).

Durante a primeira fase da ovogênese, não foi verificado processo de reabsorção celular. As células de Estágio I, imersas na mesogléia, apresentavam contornos bem definidos, sem sinal de desintegração ou perda de conteúdo citoplasmático.

Nas amostras de abril/89 e maio/90, os ovócitos eram pouco abundantes (não mais que oito células em cada mesentério fértil), e assemelhavam-se morfologicamente, aparentando desta forma, estarem todos no mesmo estágio de desenvolvimento.

Junto ao aparecimento dos ovócitos de Estágio I, os supostos indícios de um período de desova recente foram inferidos histologicamente. Os mesentérios, apesar de apresentarem espessamentos na região gonadogênica, encontravam-se ligeiramente retraídos com a camada mesogleal pouco ramificada e a endoderme adjacente visivelmente comprometida. Na Figura 4A observa-se que o tecido ao redor das células recém-ancoradas na mesogléia, encontra-se bastante fragilizado, com aspecto vacuolado. A foto foi obtida de uma amostra de abril/89, e fornece evidências de que o pólipo passou por um curto período de recuperação antes do reinício do ciclo reprodutivo. Somando-se a tais fatos, ovócitos aparentemente imaturos, com tamanhos variando entre 45,65μm e 52,18μm (n=4) e de cor arroxeada, foram encontrados no mesmo período soltos na cavidade gastrovascular, próximos ao disco oral e, ocasionalmente, na região basal do corpo polipar (Fig. 5A).

-Estágio II (ou intermediário)-

As células em desenvolvimento intermediário, ou de Estágio II, foram primariamente observadas nas amostras de junho/89. Duas das transformações mais notáveis, em relação ao estágio anterior, consistiram na nítida diferenciação e proliferação das vesículas lipídicas citoplasmáticas, bem como, na síntese de grânulos associados à vitelogênese.

Ovogônias diferenciaram-se em ovócitos primários dando origem às células de Estágio II, presentes praticamente até o final do ciclo reprodutivo. Inicialmente, os ovócitos

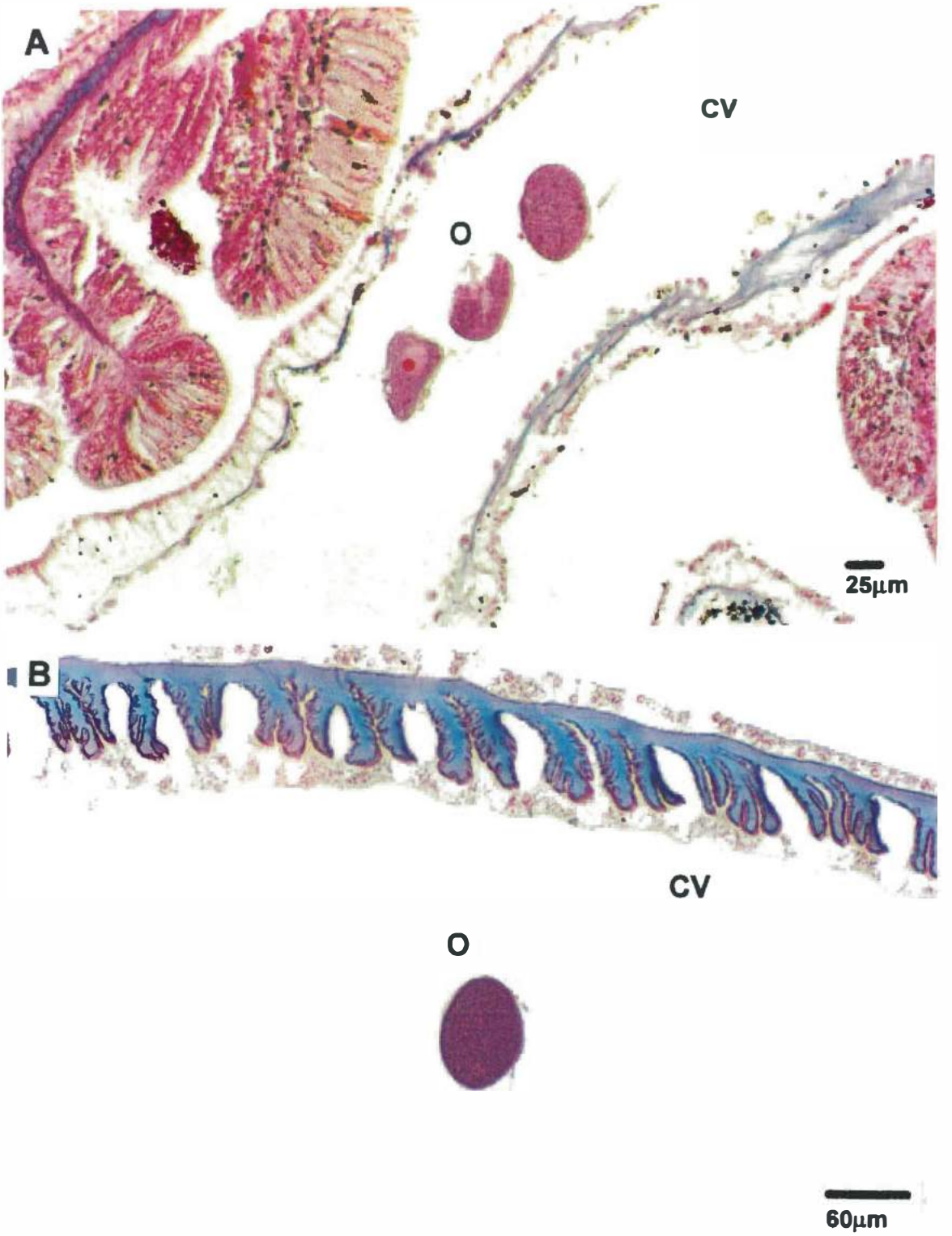


Figura 5. A, B. Ovócitos soltos na cavidade gastrovascular. CV= cavidade gastrovascular, O= ovócito. A= MN2012B8, lam. 42 (maio/89)/B= MN2019C2, lam. 17 (dezembro/89).

encontravam-se dispostos como um cordão de pérolas, separados uns dos outros por um espaço na camada mesogleal. À medida que tornavam-se maiores, gradativamente ocupavam toda a mesogléia, eliminando os espaços e causando uma considerável dilatação da camada endodérmica adjacente (Fig. 6).

Uma relativa sobreposição dos Estágios I e II foi observado em células cujos diâmetros situavam-se entre 60-100μm.

Corroborando os parâmetros básicos definidos por Szmant-Froelich *et al.* (1980, 1985) a deposição de citoplasma ao redor do núcleo ocorreu progressivamente acarretando um grande aumento do volume e uma alteração na cor das células, que de púrpura claro passaram a púrpura escuro, podendo apresentar variações em vermelho ou rosa. Embora Wourms (1987) tenha sugerido que o processo vitelogênico possa ser sutilmente observado neste estágio, diversos grânulos de vitelo, formavam um invólucro conspícuo sob a camada mesogleal em tons variando de púrpura a vermelho claro. A presença destas estruturas no interior do citoplasma tornou-se mais evidente nos ovócitos de Estágio II, encontrados nas amostras de outubro/89 e novembro/89. Eventualmente verificou-se uma pequena quantidade de material granular corado de rosa ao redor da vesícula germinativa (Fig. 7).

À princípio elipsóide e mais claro, o núcleo arroxeado assumiu uma forma mais esférica com margens eventualmente denteadas. Inicialmente observada ao redor do núcleo das células de Estágio I, uma sombra branca em forma de meia-lua (ou 'halo') tornou-se relativamente comum junto à uma das margens do nucléolo, o qual apresentava-se perfeitamente esférico em tons variando do laranja ao vermelho. A mesogléia pouco mais espessa e ramificada na parte superior, próxima ao músculo retrator, não apresentou nenhuma alteração significativa na região de proliferação das células reprodutivas.

Células de Estágio II, em provável processo degenerativo, o qual incluia a expulsão de grânulos e vesículas, e uma profunda palidez tanto do citoplasma, quanto do núcleo, foram observadas com relativa frequência e associadas ao processo de reabsorção.

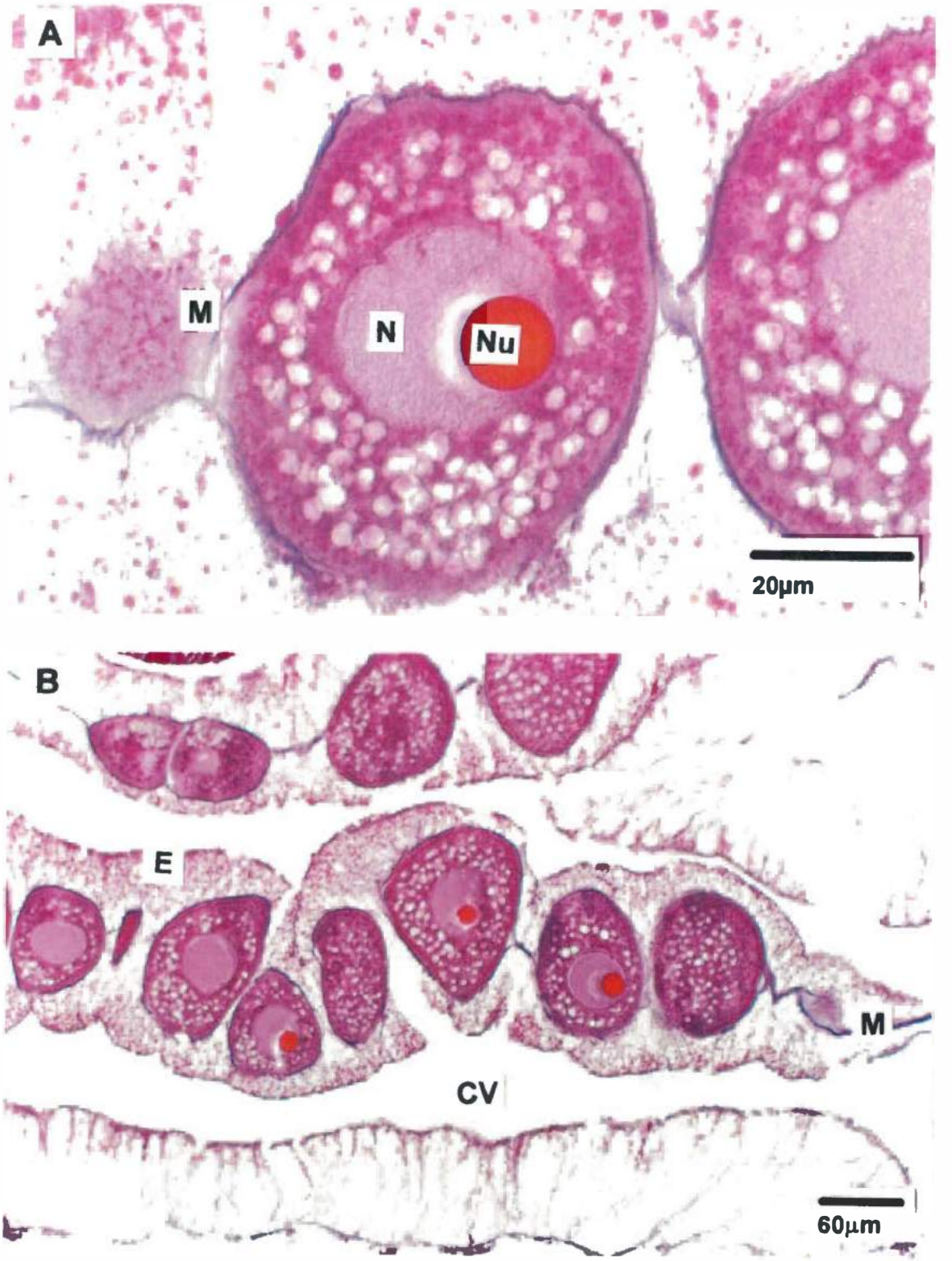


Figura 6. A, B. Ovócitos de Estágio II. CV= cavidade gastrovascular, E= endoderme, M= mesogléia, N= núcleo, Nu= nucléolo. A= MN2017B1, lam. 48 (outubro/89)/B= MN 2017B1, lam. 48 (outubro/89).

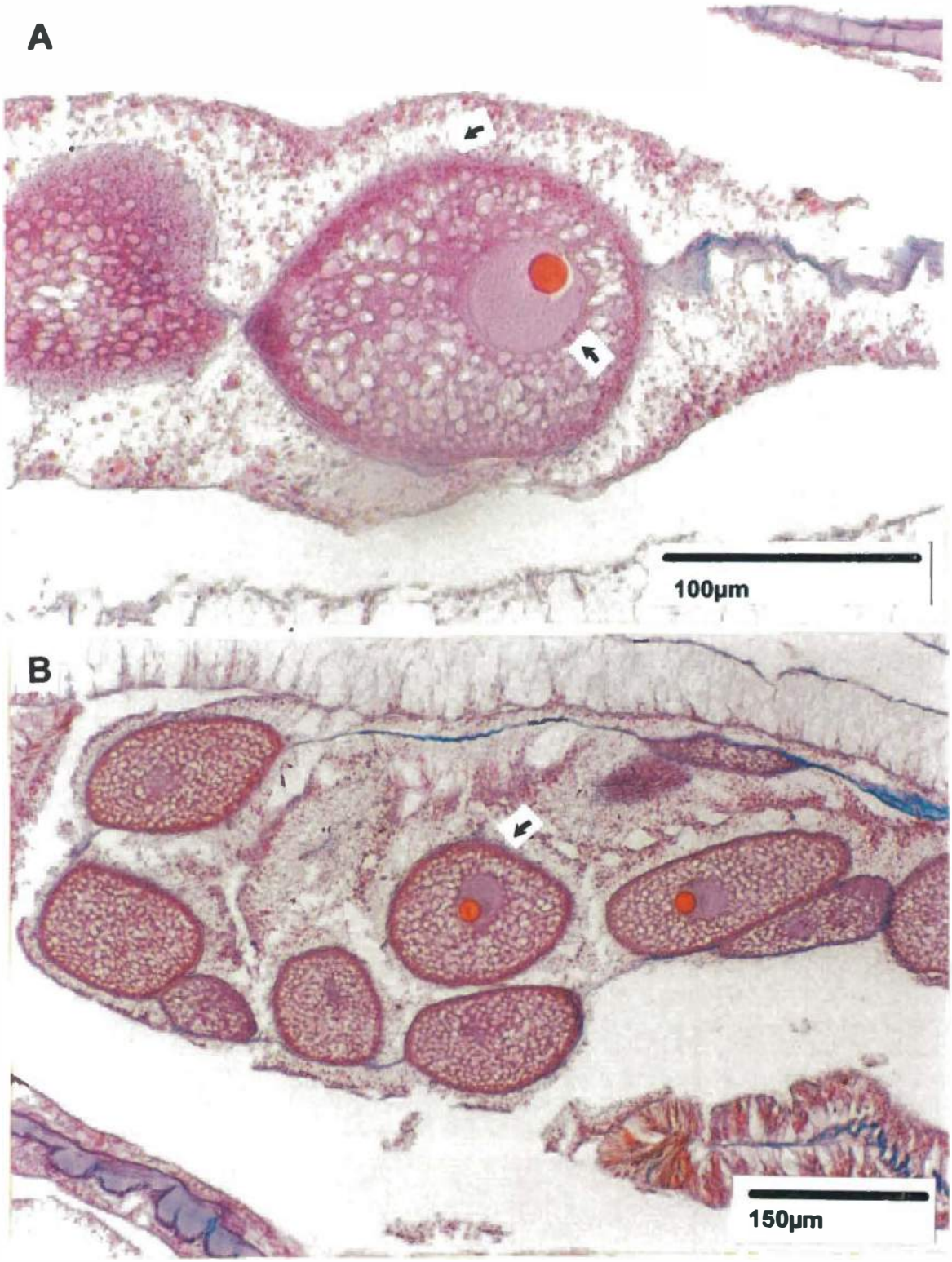


Figura 7. A, B. Ovócitos de Estágio II. As setas estão indicando áreas de concentração dos grânulos vitelínicos. Observa-se na figura A os grânulos próximos ao núcleo. A= MN2018C2, lam. 15 (novembro/89)/B= MN2018B1, lam. 7 (novembro/89).

A provável participação de elementos fagocitários foi detectada através da presença de estruturas esféricas e arroxeadas, ao redor e no interior das células em degeneração. Aparentemente, os ovócitos que fracassaram em alcançar os estágios posteriores de desenvolvimento foram reaproveitados como fonte de energia e nutrientes pelo tecido parental (Fig. 8).

A endoderme do filamento mesentérico visivelmente mais compacta, contrastava com o aspecto um tanto fragilizado observado nas amostras de abril/89. O sutil aumento no número de zooxantelas foi detectado na camada endodérmica próxima ao disco oral.

-Estágio III (ou final)-

As células em desenvolvimento final, ou de Estágio III, foram primariamente observadas nas amostras do mês de dezembro/89 e caracterizaram o início da estação reprodutiva, que culminou com o evento de liberação de gametas.

Células maduras, em estado de pré-desova, tornaram-se abundantes nas amostras de fevereiro/90. A sobreposição dos Estágios II e III em ovócitos com valores entre 200μm e 300μm foi relativamente comum. A predominância do Estágio III foi verificada principalmente nas células cujos diâmetros ultrapassavam 300μm. Por outro lado, não foram observados ovócitos plenamente maduros com tamanho inferior a 100μm.

As transformações observadas nos ovócitos das amostras deste período são consistentes com aquelas descritas por Wourms (1987), para os ovócitos vitelogênicos, e por Szmant-Froelich *et al.* (1980, 1985), para os ovócitos de Estágio IV (a autora classificou as etapas da ovogênese em cinco estágios, embora os dois últimos sejam similares, o Estágio V difere do Estágio IV devido principalmente à condensação da cromatina).

Os numerosos e volumosos ovócitos de Estágio III por pouco não acarretaram uma completa obliteração do espaço gastrovascular. Na região proliferativa, a camada mesogleal

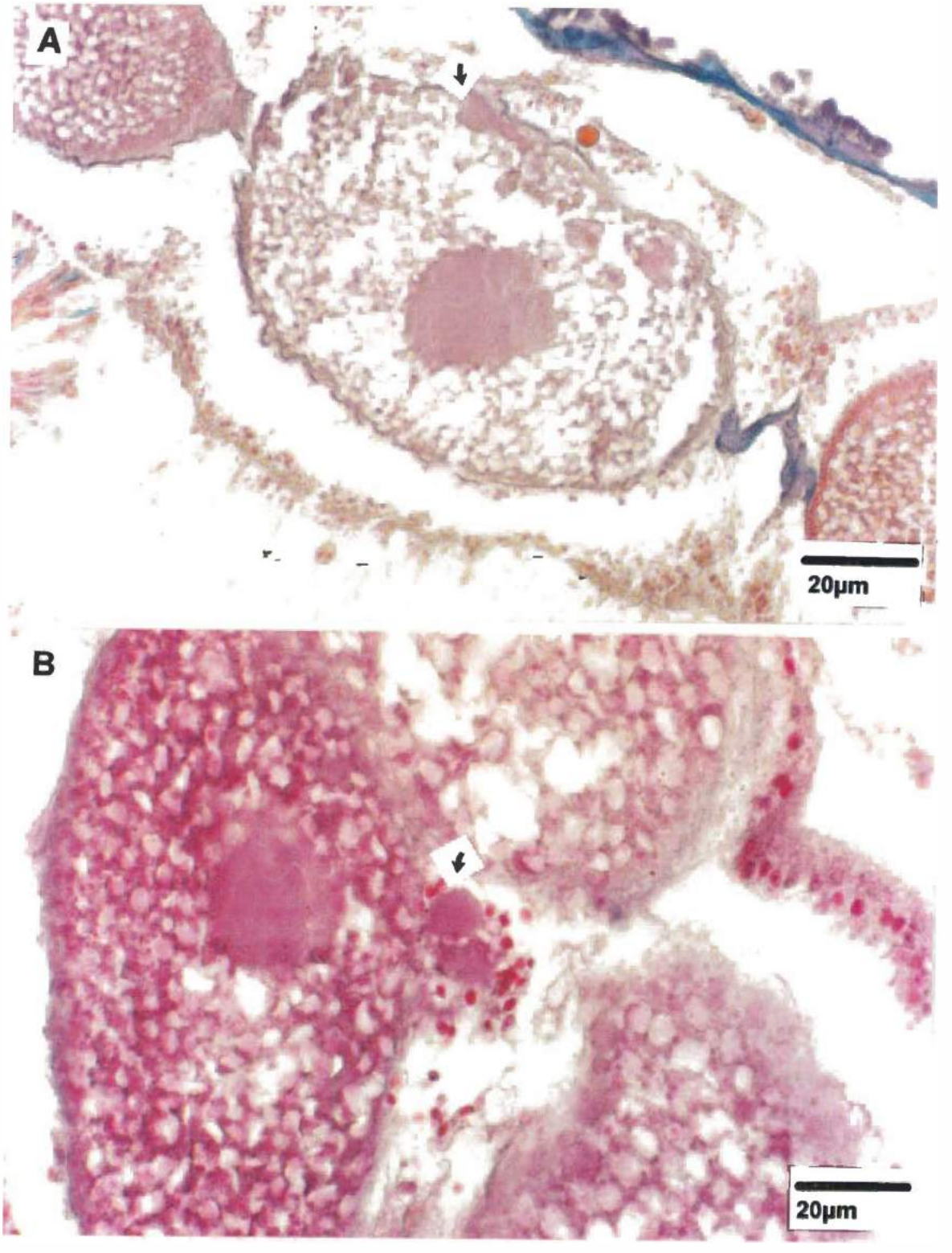


Figura 8. A, B. Ovócitos de Estágio II em degeneração. As setas estão indicando as estruturas identificadas como supostos elementos fagocitários. A= MN2019C2, lam. 23 (dezembro/89)/B= MN2020B3, lam. 18 (janeiro/90).

progressivamente tornou-se menos espessa até praticamente desaparecer, excetuando-se por um invólucro extremamente delgado presente ao redor das células maduras. Ao contrário dos estágios anteriores, nos quais situava-se na região mais central do citoplasma, o núcleo adquiriu uma posição marginal, próximo à membrana celular. O nucléolo periférico sofreu uma pequena deformação, apresentando-se com frequência em forma de 'feijão' ou 'meia-taça'. Eventualmente uma sombra em 'meia-lua' distinguiu-se em seu interior. Somando-se às demais alterações, cores mais intensas distinguiram as estruturas celulares: o citoplasma em rosa ou vermelho escuro, o núcleo em roxo médio ou roxo escuro, e por fim, o nucléolo em laranja escuro (Fig. 9A).

Grânulos avermelhados e róseos, concentravam-se em volta dos ovócitos sob a camada mesogleal. Dando prosseguimento à síntese de nutrientes, primariamente desencadeada no Estágio II, houve uma profusa produção de vitelo e o deslocamento dos grânulos vitelínicos em direção à parte central do citoplasma. Difundindo-se por entre as vesículas lipídicas, estas pequenas estruturas alcançaram o interior da vesícula germinativa, onde ocasionalmente se fusionavam originando grânulos maiores. À princípio, não foi registrado nenhum sistema ou estrutura responsável pela entrada e dispersão de nutrientes. Entretanto, em algumas células maduras, uma área extremamente densa com grande concentração de material granular, foi identificada num pequeno espaço situado entre o núcleo periférico e a membrana celular. Esta região assemelhava-se a um 'corredor', através do qual os grânulos infestavam o citoplasma (Fig. 9B).

A presença de grânulos no interior do núcleo, pode também estar relacionado à espiralação da cromatina (visível ao microscópio óptico na forma de grânulos grosseiros fortemente corados).

Nas amostras de fevereiro/90 e março/90, a camada mesogleal tornou-se extremamente fina, formando uma bolsa no interior da qual os ovócitos encontravam-se parcialmente aderidos. Dentre os últimos eventos que precederam a liberação dos ovócitos

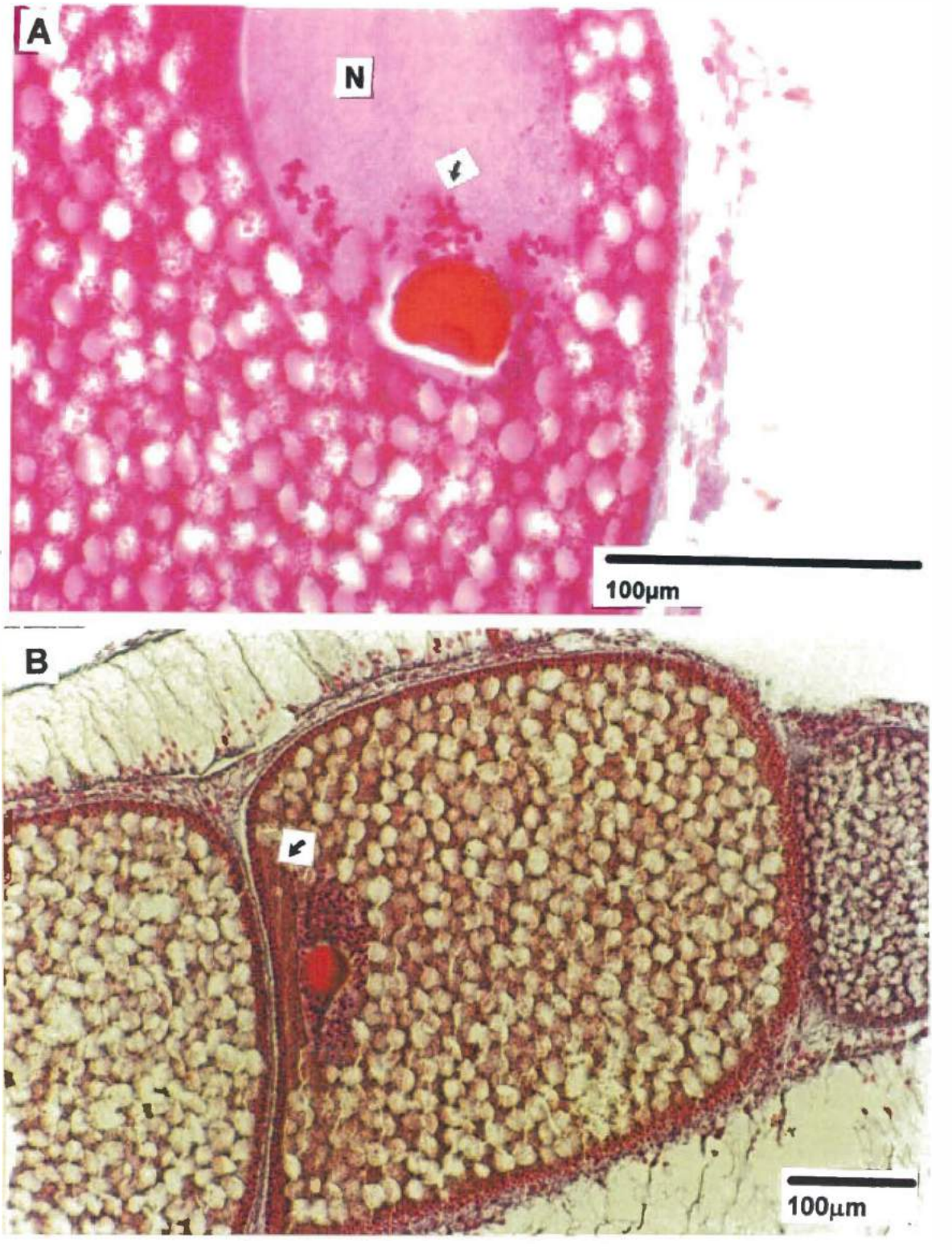


Figura 9. A, B. Ovócitos de Estágio III. A. Núcleo marginal com nucléolo em forma de 'feijão'. A seta está indicando a presença de material granular no interior do núcleo. B. Seta está indicando a área denominada de 'corredor' devido à concentração de grânulos no espaço entre o núcleo e a membrana celular. N= núcleo. A= MN2020B2, lam. 34 (janeiro/90)/B= MN2860, lam. 8 (janeiro/90).

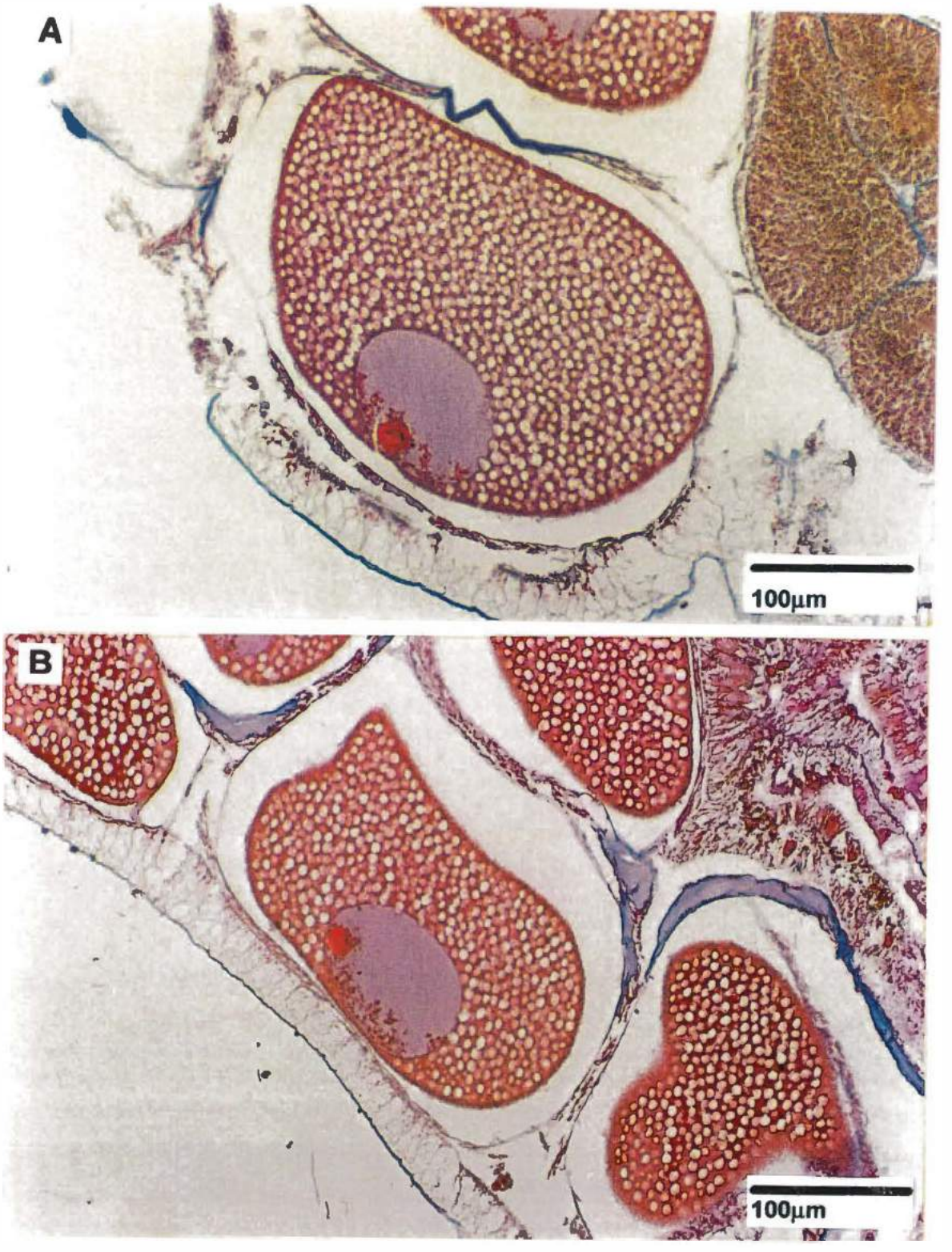


Figura 10. A, B. Ovócitos de Estágio III soltos no interior do invólucro mesogleal. A= MN2022B1, lam. 3 (março/90)/B= MN2022B1, lam. 1 (março/90).

para o espaço gastrovascular, o descolamento das células e a ruptura do invólucro mesogleal consistiram nos mais relevantes (Fig. 10).

Como verificado no período anterior, o processo de reabsorção prosseguiu durante a estação reprodutiva, afetando tanto os ovócitos de Estágio II quanto aqueles mais maduros de Estágio III. Mais uma vez foram verificados elementos fagocitários próximos ou no interior das células em degeneração (Fig. 11).

Inicialmente encontradas junto aos ovócitos de Estágio I, nas amostras de abril/89 e maio/89, células imaturas e de coloração intensa, com tamanhos variando entre 52,18μm e 78,26μm (n=8), foram novamente observadas soltas na cavidade gastrovascular, próximas ao disco oral.

A aquisição de algas simbióticas não foi verificada durante a ovogênese. Ovócitos maduros caracteristicamente não possuiam zooxantelas.

4E. ESPERMATOGÊNESE

As gônadas masculinas são compostas por numerosos cistos testiculares, os quais possuem diversas células reprodutivas. À medida em que vão amadurecendo assumem a forma de um 'bouquet', devido à peculiar disposição dos espermatozóides. Similarmente à ovogênese, alterações morfológicas ocorridas ao longo do ciclo espermático resultaram na classificação de três estágios de desenvolvimento.

-Estágio I (ou primário)-

Os cistos testiculares desenvolveram-se acima das células femininas na parte superior do mesentério fértil, caracteristicamente mais convoluto devido ao espessamento da região gonadogênica.

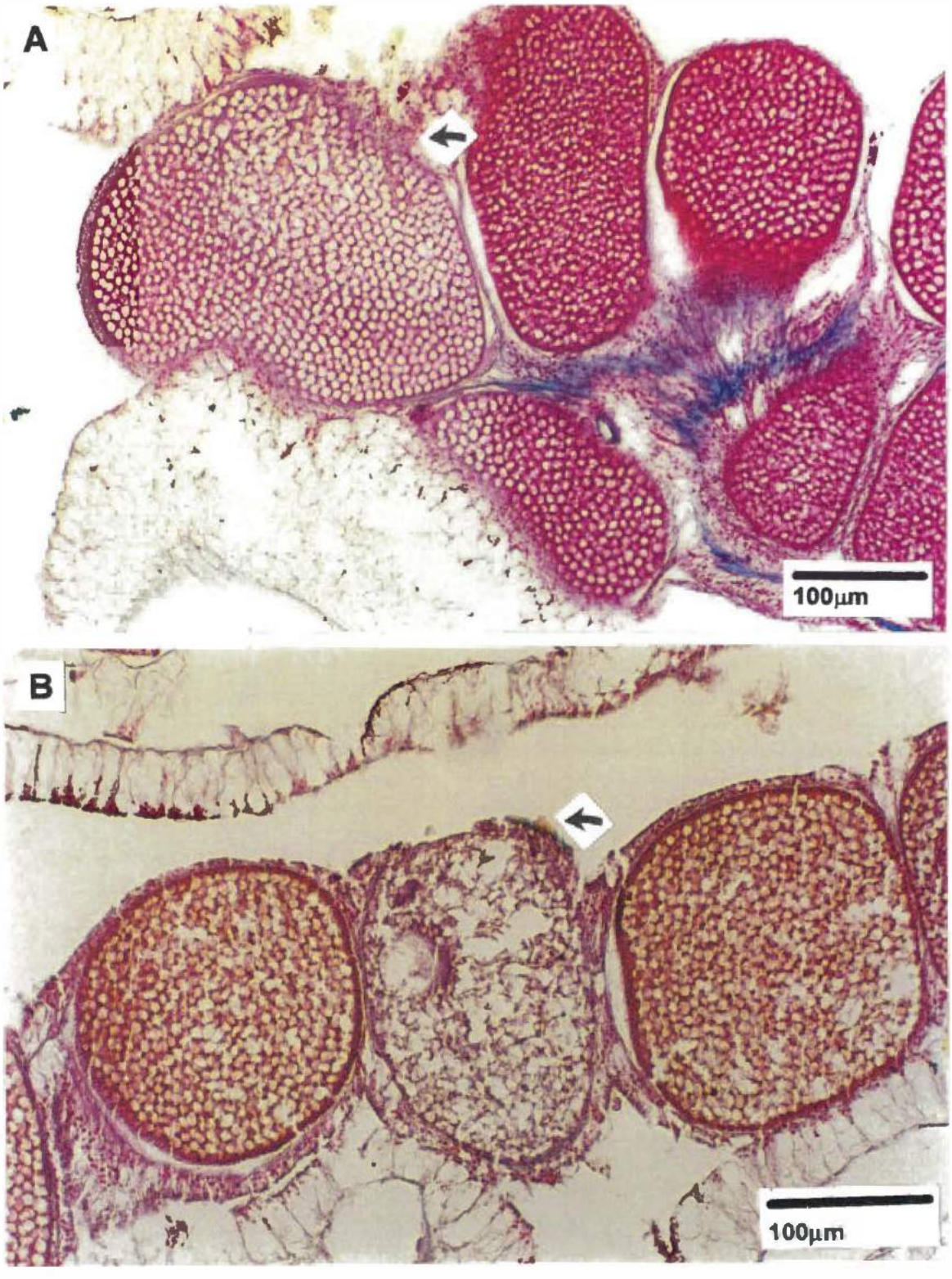


Figura 11. A, B. As setas estão indicando ovócitos de Estágio III em degeneração. A= MN2021B6, lam. 3 (fevereiro/90)/B= MN2860, lam. 4 (janeiro/90).

O primeiro estágio detectável na espermatogênese foi caracterizado por conjuntos de células-tronco intersticiais diferenciadas localizados na endoderme, próximos à mesogléia. Inicialmente observados nas amostras de dezembro/89, nos pólipos da colônia fixa **C** e em algumas colônias aleatórias, cistos de Estágio I foram encontrados ao longo de toda espermatogênese ora ainda na endoderme, ora já na camada mesogleal.

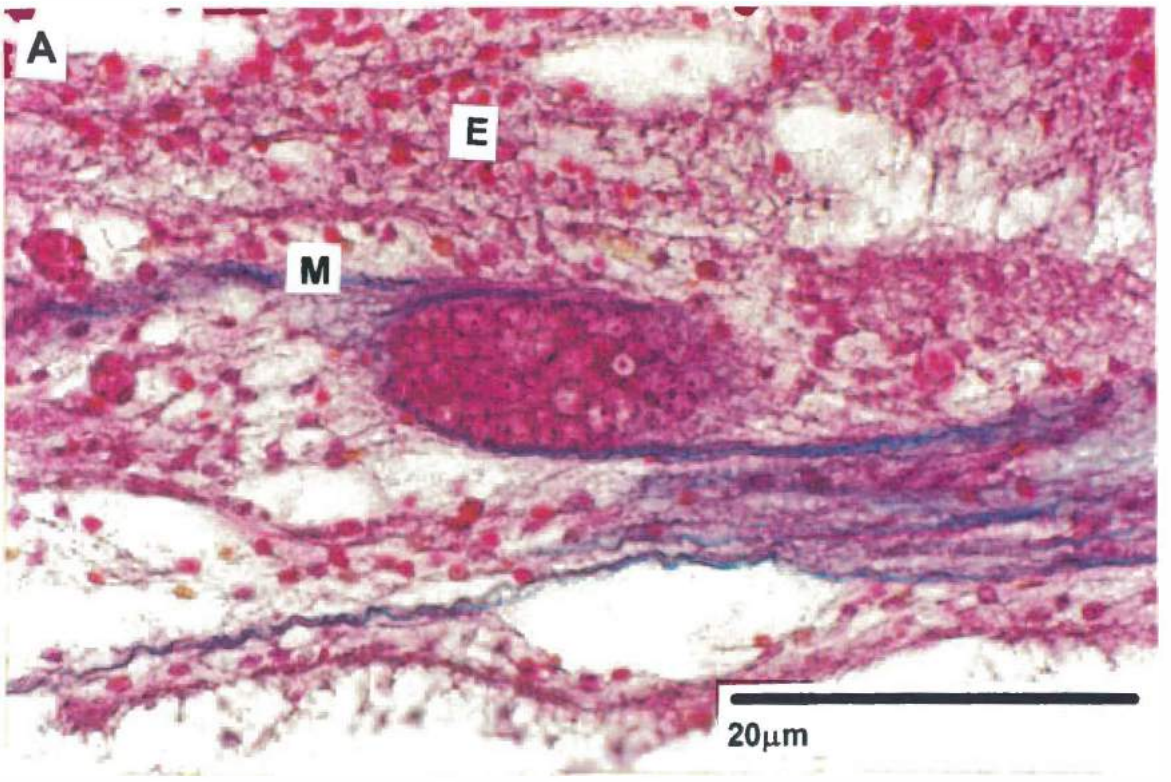
Medindo cerca de 7 a 30 µm, cistos de Estágio I coravam em tons de rosa e púrpura, e pareciam aumentar em diâmetro pela incorporação de novas células ao conjunto de espermatogônias. Envolvidos por uma camada extremamente delgada de mesogléia, os cistos em desenvolvimento primário possuiam um número razoável de espermatogônias. Cada célula era individualizada por sua forma perfeitamente esférica, núcleo e nucléolo distintos (Fig. 12). Ao contrário dos ovócitos de Estágio I, pouco abundantes no primeiro mês em que foi detectada atividade gametogênica, numerosos cistos de Estágio I encontravam-se presentes no início do ciclo espermático.

-Estágio II (ou intermediário)-

Todas as amostras analisadas em janeiro/90, tanto das colônias fixas **B** e **C** quanto das colônias aleatórias, apresentavam cistos em diversos estágios de desenvolvimento e tamanhos. Com cerca de 30 a 100µm e caracteristicamente mais numerosos, os cistos de Estágio II possuiam lúmens centrais, em forma de fendas e coloração em tons de púrpura ou avermelhado (Fig. 13).

-Estágio III (ou final)-

Na última etapa do desenvolvimento das gônadas masculinas, as espermátides diferenciaram-se em espermatozóides através de um longo processo que envolveu a condensação do citoplasma e da cromatina nuclear, bem como o surgimento de um longo flagelo.



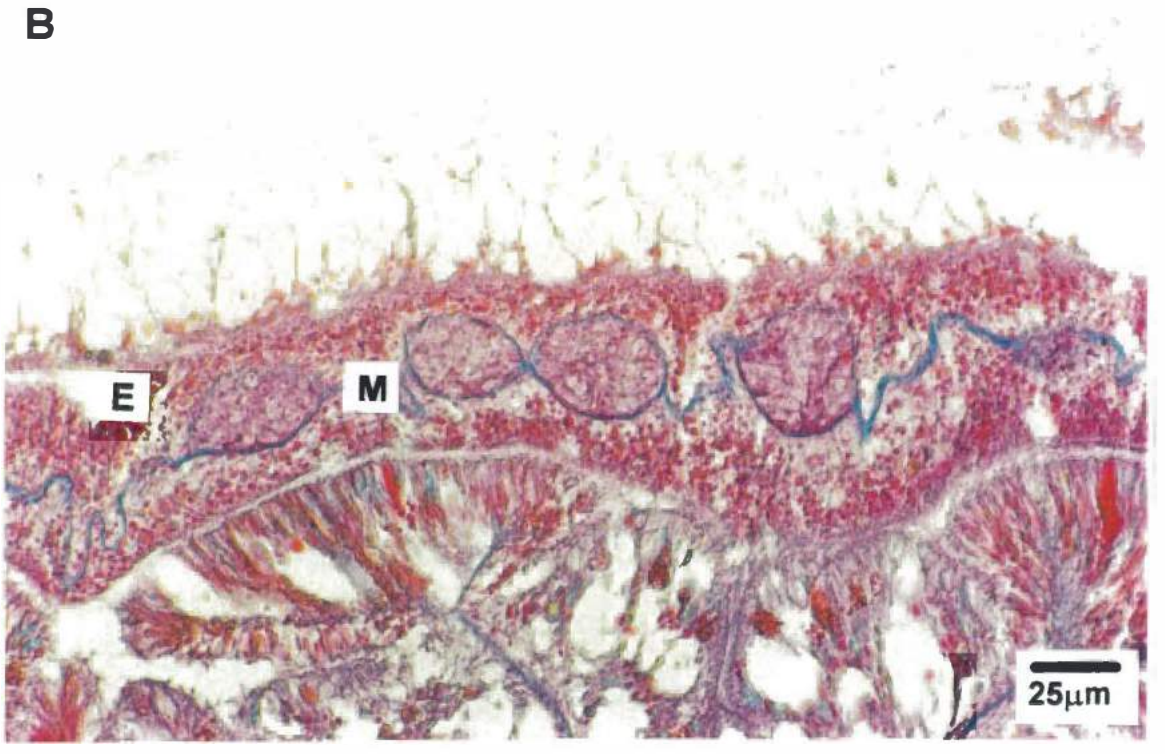


Figura 12. A, B. Cistos testiculares de Estágio I. E= endoderme, M= mesogléia. A= MN2021B5, lam. 3 (fevereiro/90)/B= MN2020C1, lam. 57 (janeiro/90).

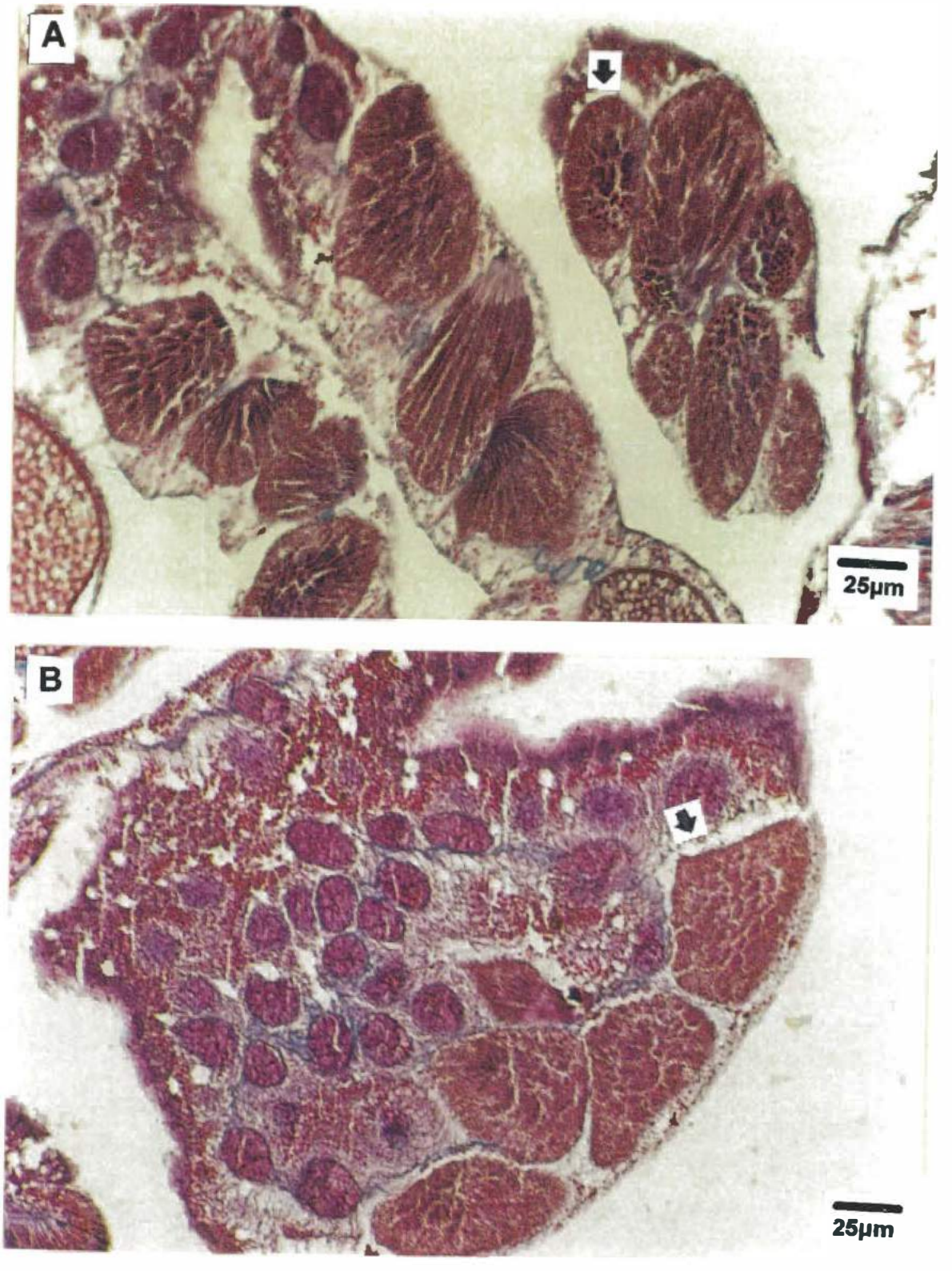


Figura 13. A, B. As setas estão indicando os cistos testiculares de Estágio II. A= MN 2871, lam. 13 (fevereiro/90)/B= MN 2871, lam. 12 (fevereiro/90).

Agregados de espermatozóides conferiram aos cistos de Estágio III o aspecto de um 'bouquet', com as longas caudas rosa-transparentes agrupadas de um lado e as cabeças ovóides densamente coradas do outro (Fig. 14).

Cistos maduros com cerca de 100 a 320µm foram primeiramente observados nas amostras de janeiro/90. Nas amostras de fevereiro/90 tornaram-se mais abundantes, situando-se bem próximos aos ovócitos de Estágio III. A despeito da eventual variação na coloração, não muito incomum as cores dos cistos de Estágio II e III uniformizaram-se em tons de púrpura e vermelho intenso, este último mais frequente entre aqueles de Estágio III.

Contrastando com os ovócitos maduros, ao redor dos quais formava um invólucro relativamente conspícuo, a mesogléia gradativamente tornou-se imperceptível até quase desaparecer em volta dos cistos de Estágio III.

Cistos vazios ou parcialmente desovados não foram encontrados, aparentemente todos os espermatozóides foram liberados para o espaço gastrovascular após ruptura dos tecidos, permanecendo apenas uma cicatriz na endoderme em forma de vacúolo.

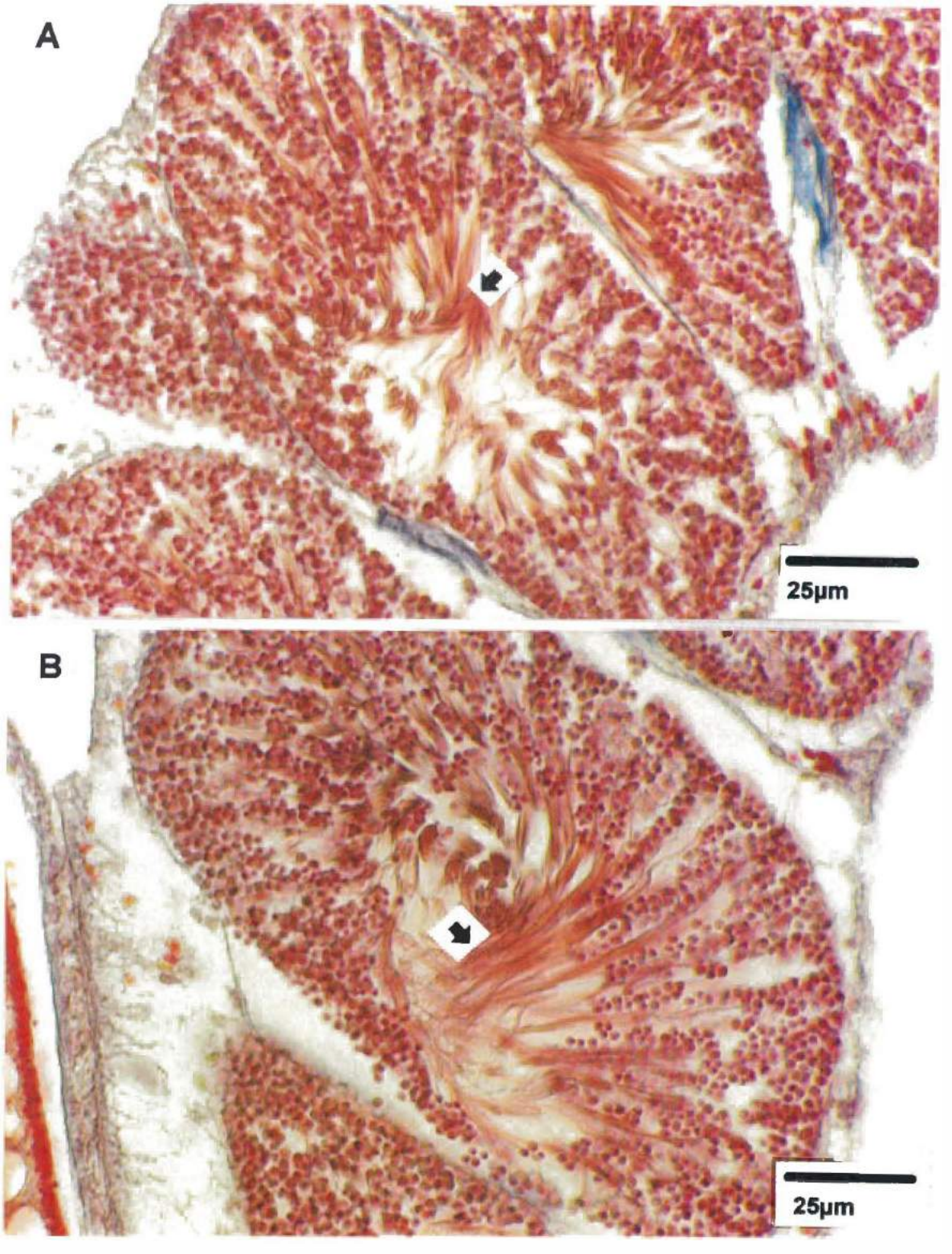


Figura 14. A, B. Cistos testiculares de Estágio III. As setas estão indicando as caudas dos espermatozóides. A= MN2021, lam.11 (fevereiro/90)/B= MN2021, lam. 11 (fevereiro/90).

4F. ANÁLISE CITOMÉTRICA

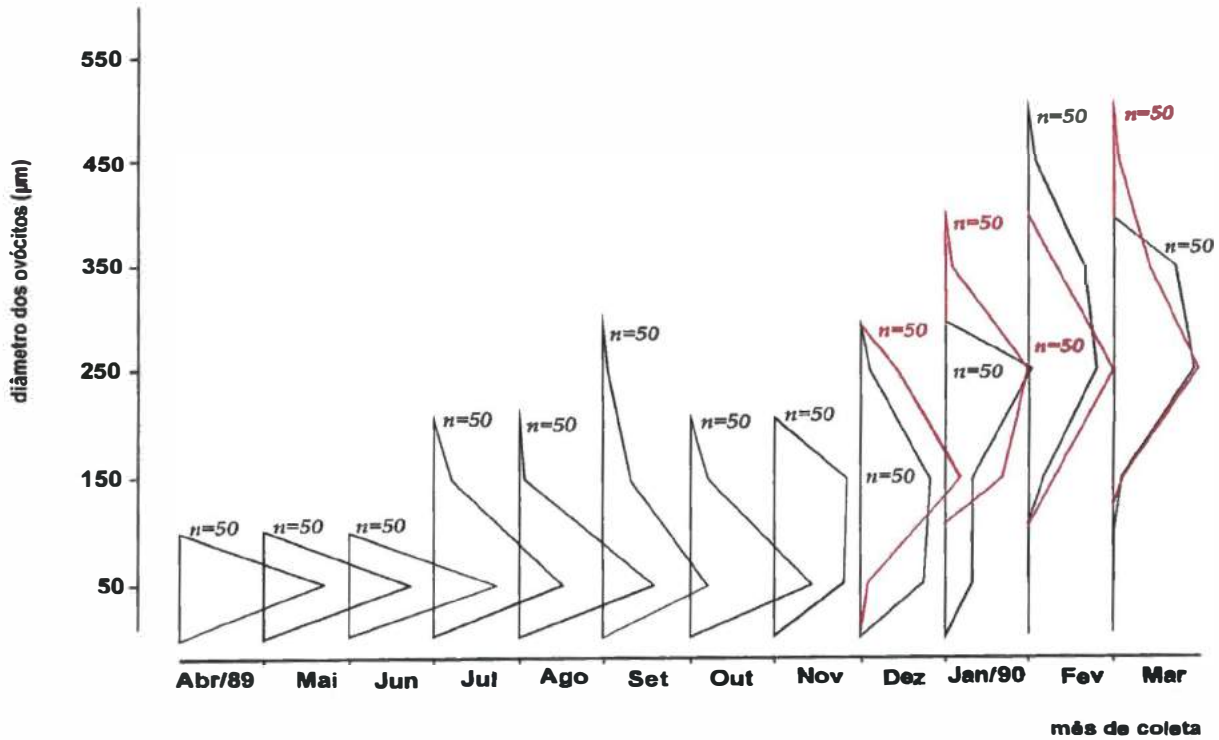
As medidas dos diâmetros dos ovócitos foram reunidos em três gráficos de polígonos de frequência. As Figuras 15, 16 e 17 expressam, respectivamente, a frequência das diferentes classes de tamanho dos ovócitos nas colônias fixas **B** e **C** e nas colônias aleatórias.

Inicialmente foi verificada a variabilidade das medidas dos ovócitos entre os dois pólipos amostrados, no período de dezembro/89 a março/90, utilizando-se um teste de razão de variância (teste de distribuição *F*). Quando o resultado indicava que as variâncias eram significativamente diferentes (heterocedásticas), imediatamente descartava-se a possibilidade de reunir os diâmetros dos ovócitos sob um único polígono. Ao contrário, quando as variâncias eram iguais (homocedásticas), aplicava-se o teste *t* .

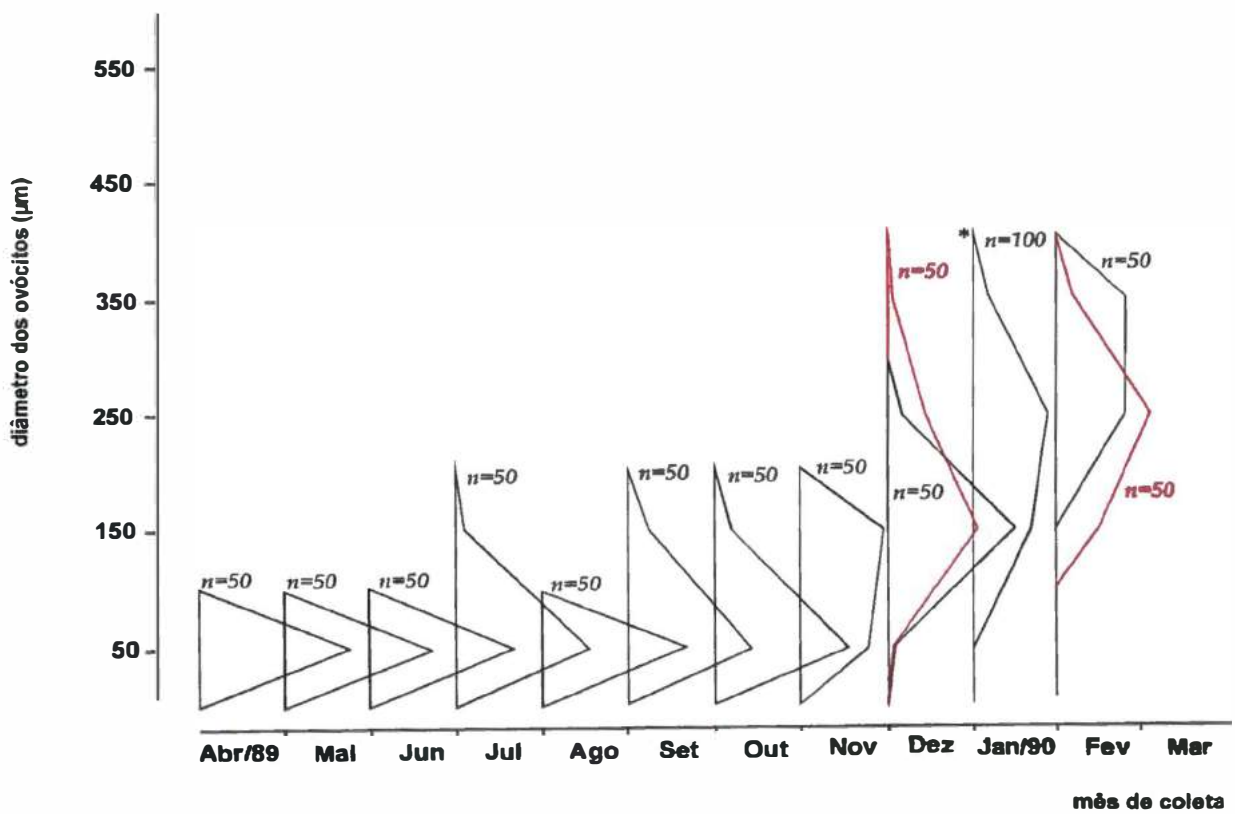
Na colônia fixa **B** a hipótese nula (H_0) foi rejeitada para os pólipos de janeiro/90 e março/90, pois para $F_{0,025(49,49)}$= 1,77, os valores obtidos F=3,81 (janeiro/90) e F=2,01 (março/90) mostraram haver diferenças significativas entre as variâncias. Por outro lado, H_0 foi aceita para os pólipos de dezembro/89 (F=1,63, p=0,025) e fevereiro/90 (F=1,05, p=0,025), as variâncias eram homocedásticas. Entretanto, de acordo com o teste *t* o tamanho médio dos ovócitos variaram significativamente entre um pólipo e outro nos meses de dezembro (t=4,46, p=0,05) e fevereiro (t=3,11, p=0,05). Logo, a reunião dos diâmetros sob uma único polígono não seria aconselhável, uma vez que os pólipos poderiam encontrar-se em estágios de desenvolvimento diferentes (Fig.15).

Em relação à colônia fixa **C** verificou-se que os pólipos de dezembro/89 possuiam variâncias heterocedásticas (F=2,13, p=0,025), enquanto que os pólipos de janeiro/90 e fevereiro/90 apresentavam variâncias homocedásticas (F=1,23 e F=1,39, respectivamente). Aplicando-se o teste *t* para comparação das médias, H_0 foi aceita para os pólipos de janeiro/90 (t=0,40, p=0,05) e rejeitada para os de fevereiro/90 (t=7,63, p=0,05). Portanto, o

Colônia Fixa B



Colônia Fixa C



de dezembro/89 (lam. 3500 e 3503) referem-se à colônias distintas, nas quais apenas um pólipo foi analisado, sendo portanto desnecessária a utilização de qualquer teste estatístico. Os pólipos analisados de uma das colônias de janeiro/90 (lam. 3515 e 3516) igualmente possuiam variâncias homocedásticas, mas ao contrário do caso anterior, as médias não eram significativamente diferentes (t=0,78, p=0,05) e as medidas foram reunidas num mesmo polígono. Em relação às duas outras categorias de janeiro/90, uma refere-se aos pólipos 3510 e 3512 cujas variâncias eram heterocedásticas (F=1,95;p=0,025) e a outra representa as medidas de uma terceira colônia da qual foi amostrado apenas um pólipo (lam. 2860). As amostras provenientes de duas colônias de fevereiro/90 apresentaram variâncias homocedásticas (lam. 3520 e 3522, 3523 e 3524). Entretanto, de acordo com o teste *t*, apenas em uma colônia (lam. 3523 e 3524), as médias não diferiam significativamente (t=0,62, p=0,05). A outra amostra (lam. 2871) refere-se às medidas obtidas de um único pólipo proveniente de uma terceira colônia. Finalmente, os pólipos amostrados em uma das colônias analisadas de março/90 (lam. 3531 e 3532) também possuiam variâncias homocedásticas. Utilizando-se o teste *t*, verificou-se que as médias eram iguais (t=1,10, p=0,05). Os outros dois polígonos de março/90, representam os diâmetros obtidos de pólipos (lam. 3539 e 2880) provenientes de colônias distintas (Fig.17).

Uma vez realizados os testes estatísticos, prosseguiu-se à construção dos gráficos de frequência utilizando-se todas as amostras obtidas durante os meses de coleta. Picos no tamanho e desenvolvimento ocorreram em momentos distintos durante o verão. Dados citométricos mostraram que os valores de diâmetros mais baixos situaram-se no período abril/89 a novembro/89 enquanto que os mais altos entre dezembro/89 e março/90, caracterizando um ciclo reprodutivo anual para *M. hispida* (Figs. 15 e 16).

Analisando-se os polígonos de frequência das colônias fixas B e C, observou-se que de abril/89 a junho/89 (outono/inverno) as medidas dos ovócitos concentraram-se no intervalo de classe de 0 - 100μm. Histologicamente, verificou-se que houve uma grande ocorrência de ovócitos imaturos de Estágio I, principalmente em abril/89 e maio/89, cujas

medidas não ultrapassaram 100μm de diâmetro. No período de julho/89 a novembro/89 (inverno/primavera) surgiram duas novas classes compostas pelos ovócitos cujos diâmetros situavam-se no intervalo de 100 - 200μm e 200 - 300μm - esta última representada apenas na amostra de setembro/89 da colônia **B**. Análises histológicas ressaltaram a presença de inúmeras células de Estágio **II**, particularmente dentre aquelas com medidas superiores a 100μm. A única exceção foi observada na amostra de agosto/89 da colônia **C** - nesta os ovócitos não ultrapassaram 100μm, maioria dos quais aparentava pouco desenvolvimento, sendo portanto caracterizada como célula de Estágio **I**. Nos últimos meses de amostragem, no período de dezembro/89 a março/90 (verão/outono), os ovócitos entraram na fase final de amadurecimento e atingiram seu maior diâmetro. Embora, células menores que 100μm tenham ocorrido em praticamente todo o ciclo, excetuando-se nos dois últimos meses antes da desova, ou seja, até janeiro/90 na colônia **B** e até dezembro/89 na colônia **C**, os intervalos de classe de 200 - 300μm e 300 - 400μm passaram a ser os mais representativos (alguns ovócitos significativamente maiores, situados no intervalo de 400 - 500μm, foram encontrados na colônia **B**).

Em relação às colônias aleatórias, similarmente verificou-se a presença de células menores que 100μm, em quase todas as amostras, com exceção de uma colônia em janeiro/90 (lam. 3516), duas em fevereiro/90 (pólipos lam. 3520 e 3522 de uma colônia e lam. 3523 e 3524 de outra) e uma em março/90 (lam. 3531 e 3532, ambos os pólipos de uma mesma colônia). Como nas colônias fixas, houve uma concentração dos diâmetros nos intervalos de 200 - 300μm e 300 - 400μm e a ocorrência de alguns ovócitos com mais de 400μm (estes últimos observados, principalmente , numa colônia de março - lam. 3539). Em uma única amostra (lam. 2880 - março) foram encontrados exclusivamente ovócitos menores que 100μm.

4G. SINCRONIA

A sincronia no desenvolvimento das gônadas entre as colônias fixas e aleatórias foi avaliada no período de dezembro/89 a março/90.

Apesar de ter sido verificada uma tendência no padrão temporal de desenvolvimento dos ovócitos, durante a estação reprodutiva observou-se uma assincronia intercolonial no período de liberação de gametas. A maturação final ocorreu em março/90 para a colônia fixa **B**, e em fevereiro/90 para a colônia fixa **C** (em março/90, os pólipos não apresentavam mais células maduras e os tecidos encontravam-se fragilizados, sugerindo um aparente estado de pós-desova). Quando observamos os polígonos referentes às colônias aleatórias (Fig. 17), principalmente aqueles do mês de março/90, a variação nos estágios de desenvolvimento entre diferentes colônias torna-se mais evidente. Analisando detalhadamente cada polígono (da esquerda para direita), encontramos três situações distintas. A primeira delas, seria aquela mais ou menos esperada, se compararmos com as colônias fixas **B** e **C**, para o desfecho do ciclo reprodutivo: ausência de células imaturas menores que 100μm, e concentração dos ovócitos em valores superiores a 200μm. A segunda aparentemente caracteriza uma situação de sobreposição de ciclos. Ou seja, observa-se a presença de células maduras que alcançaram diâmetros superiores a 400μm e um número significativo de ovócitos pequenos, menores que 100μm. Por sua vez, o terceiro polígono claramente representa o início de um novo ciclo reprodutivo (como verificado nos polígonos de abril/89 a junho/89 das colônias fixas **B** e **C**) com todas as células apresentando valores inferiores a 100μm.

Em dezembro/89, os mesentérios férteis da colônia fixa **B** não apresentavam indícios de espermatogênese, embora ovócitos de Estágio III fossem abundantes. Ao contrário, os dois pólipos amostrados da colônia fixa **C** possuiam numerosos cistos imaturos de Estágios I e II. Similar assincronia foi encontrada entre as colônias aleatórias, sendo que em

dezembro/89 duas das três colônias analisadas não tinham ainda cistos testiculares (lam. 3500 e 3503) e em março/90 uma das colônias só apresentava ovócitos imaturos de Estágio I (lam. 2880).

Através de análises histológicas foi possível inferir sobre o provável período de desova, o qual pode ter ocorrido entre o mês de fevereiro/90 e março/90 na colônia fixa **C**, ou logo após a última coleta de março/90 na colônia fixa **B**. Os maiores diâmetros obtidos nas colônias aleatórias foram encontrados nas amostras de janeiro/90, fevereiro/90, e março/90. A ausência de células menores que 100μm e a presença de células maiores que 300μm em um polígono de janeiro/90, dois de fevereiro/90 e um de março/90 sugere que para algumas colônias aleatórias a liberação de gametas foi efetuada entre fevereiro/90 e março/90 (seguindo o padrão da colônia fixa **C**) ou logo após a coleta de março/90 (conforme observado na colônia fixa **B**).

Os valores da média dos diâmetros dos ovócitos, nas colônias fixas **B** e **C**, aumentaram à medida que o amadurecimento progrediu e o evento de desova se aproximou (Figs. 18 e 19).

Nas figuras 18 e 19 observa-se que as medidas obtidas nos últimos meses de amostragem (de dezembro/89 a março/90 para colônia **B** e de dezembro/89 a fevereiro/90 para a colônia **C**) se distanciaram das médias. Os valores de desvio padrão neste período foram maiores que nos meses anteriores sugerindo que, embora houvessem células significativamente maiores e provavelmente mais desenvolvidas, um grupo com tamanho relativamente inferior não havia alcançado o mesmo estágio de maturação.

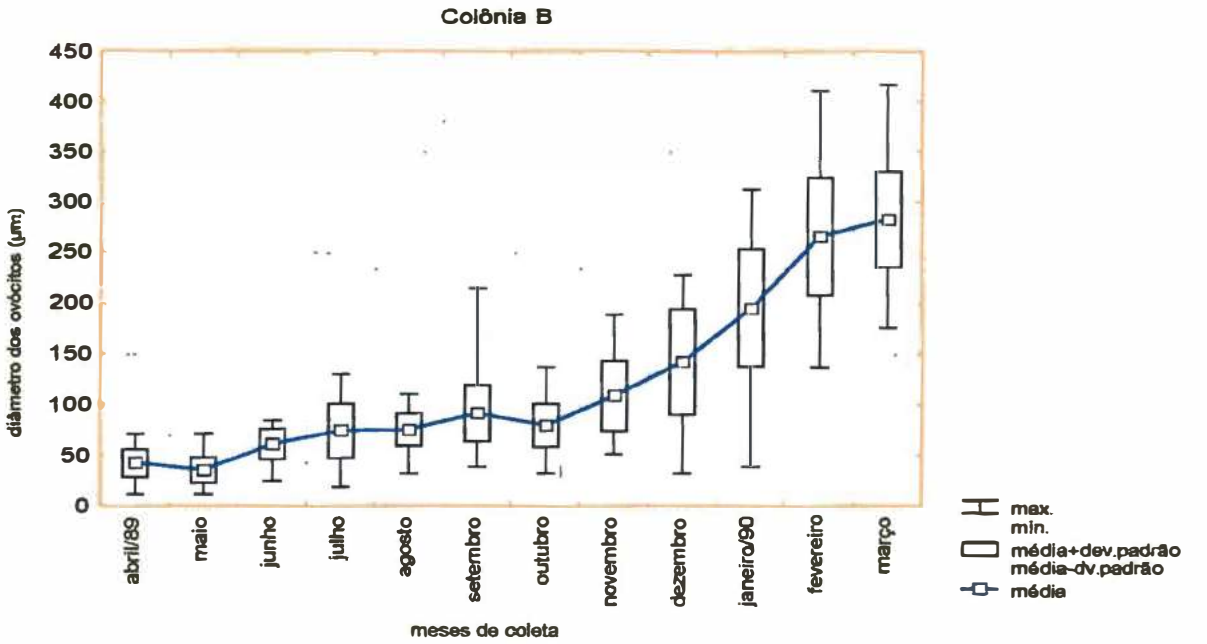


Figura 18. Gráfico com os valores da média, desvio padrão e os diâmetros máximo e mínimo para a população de ovócitos analisados (n=50) na colônia fixa B, entre abril/89 e março/90.

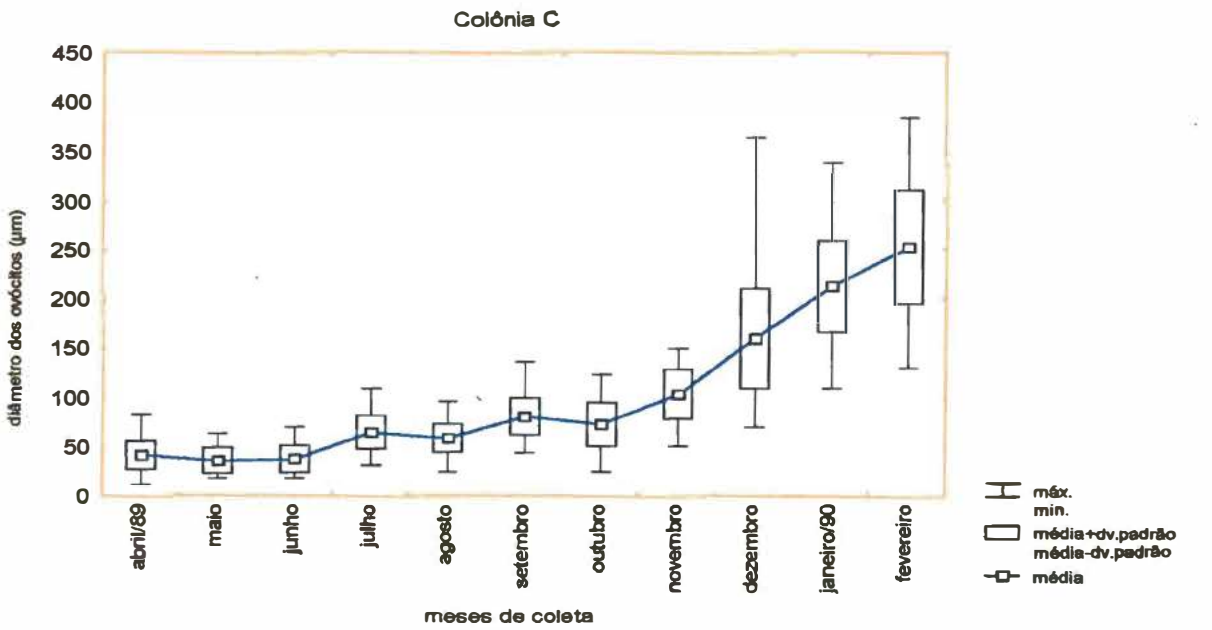


Figura 19. Gráfico com os valores da média, desvio padrão e os diâmetros máximo e mínimo para a população de ovócitos analisados (n=50) na colônia fixa **C**, entre abril/89 e fevereiro/90.

4H. REPRODUÇÃO ASSEXUADA

Durante a seleção dos pólipos nos tecidos descalcificados encontrou-se evidências de reprodução assexuada. Os pólipos em processo de divisão caracteristicamente apresentavam mais de uma faringe no interior do disco oral convergindo para uma cavidade gastrovascular comum. Tanto as aberturas orais quanto a base dos pólipos encontravam-se interconectados por partes do tecido. Pólipos recém-formados, sexualmente imaturos, com abertura oral, faringe e cavidade gastrovascular distintas também foram observados com relativa frequência junto aqueles mais desenvolvidos. Aparentemente, a reprodução assexuada em *M. hispida* é primariamente empregada para o crescimento da colônia, enquanto que a reprodução sexuada é utilizada para a formação de novas colônias.

5. DISCUSSÃO

5A. MÉTODO HISTOLÓGICO

O aprimoramento das técnicas histológicas tem permitido detalhar e acompanhar o desenvolvimento gonadal e embrionário de diversas espécies de corais (Szmant-Froelich *et al.*, 1980; Kojis & Quinn, 1981a,b; Fadlallah & Pearse, 1982a,b; Harriott, 1983a,b; Krupp, 1983; Szmant-Froelich *et al.*, 1985; Kojis, 1986; Chornesky & Peters, 1987; Harrison, 1988; Delvoye, 1988; Kenyon, 1992; Glynn *et al.*, 1991,1994,1996; Sier & Olive, 1994). Embora a histologia tenha desvantagens que incluem alterações no tamanho das gônadas, enrrugamento dos tecidos e falhas técnicas durante o corte dos pólipos (Harriott, 1983a; Harrison & Wallace, 1990), indubitavelmente foi uma importante ferramenta para a análise e compreensão do comportamento reprodutivo de *M. hispida*.

A ausência de características sexuais externas (Fadlallah, 1983) contribui para a necessidade e importância do uso da histologia no estudo da biologia reprodutiva dos corais. Em alguns casos, durante a maturação final, as gônadas tornam-se visíveis e frequentemente apresentam cores intensas, sendo portanto possível observá-las a olho nu no interior da cavidade gastrovascular (Heyward *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 1984). Contudo, para análise da sexualidade e desenvolvimento das gônadas, a prática da dissecção restringe-se aos estágios finais (momento em que os ovos e cistos alcançam tamanhos razoáveis), e fornece melhores resultados com material fresco ou recém-fixado, quando então as cores estão pouco alteradas e a consistência do tecido permite certa manipulação.

Já para as amostras de *M. hispida*, o longo período de conservação tornou o material pouco resistente, com grande mucosidade e comprometimento da cor. Sob estas circunstâncias foi extremamente difícil distinguir, por dissecção, os mesentérios férteis e no interior destes as gônadas maduras. Não obstante, a histologia permitiu definir os estágios

de desenvolvimento, fornecendo minuciosa informação sobre as alterações citológicas e tissulares, e prever o período de desova - caracterizando, desta forma, um padrão temporal para o ciclo reprodutivo de *M. hispida.*

É importante ressaltar que o método de coloração multi-estágio, ou tricrômico, possui grande eficácia na diferenciação das diversas estruturas celulares (Winsor, 1946) e portanto, foi particularmente adequado ao estudo da gametogênese.

5B. CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS

O hermafroditismo, a liberação de gametas para fertilização e desenvolvimento externos, distribuição das gônadas nos mesentérios férteis, e a forma ovóide da cabeça dos espermatozóides seguem as descrições de Harrison (1985,1990), Willis *et al.* (1985), Babcock *et al.* (1986), Richmond & Hunter (1990) e Pitombo (1992) para a maioria dos mussídeos. Dentre estas características a fertilização externa e a produção de espermatozóides ovóides correspondem à condição 'primitiva' citada por Jagersten (1962) para os metazoários.

Tendo os fragmentos sido coletados a uma profundidade relativamente baixa, o comportamento reprodutivo adotado, envolvendo a liberação de gametas na água, confirma a tendência mencionada por Harrison *et al.* (1984), Babcock (1984), Williams *et al.* (1984), Babcock & Heyward (1986), Babcock *et al.* (1986), Oliver & Willis (1987) e Willis & Oliver (1988) para as espécies encontradas em águas rasas. Além disso, observando-se o volume citoplasmático dos ovos maduros e as inúmeras vesículas lipídicas nele contidas, deduz-se que possuam significativa flutuabilidade, e consequentemente, considerável capacidade de dispersão.

As espécies que liberam os gametas na água representam cerca de 70% dos invertebrados marinhos cujos ciclos de vida foram descritos (Giangrande *et al.*, 1994), e segundo Richmond (1996) esta constitui a estratégia de 85% (mais de 250 espécies) dos

corais estudados. A ausência de plânulas no interior da cavidade gastrovascular ao longo da gametogênese, forneceu forte evidência do modo de reprodução adotado por *M. hispida*. Algumas exceções no padrão reprodutivo foram citadas por Duerden (1902) Szmant (1986) e Pitombo (1992) para outros gêneros da família. Analisando a reprodução sexuada em algumas espécies de corais escleractíneos, Duerden (1902) mencionou a presença de ovócitos e plânulas em *Isophyllia dipsacea*. Incubação também foi observada por Szmant (1986) em *Mycetophyllia ferox*. Por sua vez, embora visasse a microanatomia dos mussídeos brasileiros, Pitombo (1992) obteve indícios de gonocorismo e incubação de larvas em *Scolymia wellsi*. De qualquer forma estas não parecem constituir características muito comuns entre os Mussidae (Willis *et al.*, 1985; Babcock *et al.* 1986; Richmond & Hunter, 1990)

Nos pólipos férteis de *M. hispida*, cistos testiculares imaturos surgiram em dezembro/89, quando então diversos ovócitos encontravam-se praticamente maduros. Tal situação foi observada por *Glynn et al.* (1996) em colônias de *Pavona gigantea*. Similarmente, os autores verificaram a presença de gametas imaturos de um sexo com gametas maduros de outro durante a estação reprodutiva, denominando as colônias de hermafroditas sequenciais co-sexuais.

Fadlallah (1983), expôs a problemática da terminologia no padrão sexual dos corais. A designação 'sequencial co-sexual' sugerida por Policansky (1982, *apud* Fadlallah, 1983) descreve a maturação sucessiva das gônadas femininas e masculinas durante o período de reprodução, enquanto que no hermafrodita simultâneo, os gametas masculinos e femininos surgem ao mesmo tempo e amadurecem simultâneamente pouco antes da desova.

Segundo Harrison & Wallace (1990) o hermafroditismo sequencial não havia sido ainda demonstrado entre os corais escleractíneos, embora o houvesse sido para outros grupos de Cnidaria. Por outro lado, Fadlallah (1983) propôs que a maturação sequencial, protogenia ou protândria referiam-se ao mesmo processo sazonal.

Primariamente, Duerden (1902) enfatizou que os cistos testiculares dificilmente seriam encontrados sozinhos, mas sempre associados à uma significativa quantidade de ovócitos. Mais recentemente, Richmond & Hunter (1990) mencionaram que a maioria dos corais hermafroditas exibiam protogenia anual, com as gônadas femininas desenvolvendo-se antes das masculinas.

Exemplo de protogenia foi inicialmente citado por Marshall & Stephenson (1933) para colônias de *Lobophyllia sp.* e *Symphyllia recta* (ambas representantes da família Mussidae). Rinkevich & Loya (1979a) afirmaram que em *Stylophora pistillata* as gônadas femininas surgiram primeiro que as masculinas, caracterizando um padrão protogênico. Similarmente, Kojis & Quinn (1981b) verificaram que as gônadas femininas em *Goniastrea favulus* desenvolveram-se antes das masculinas. A despeito dos primeiros ovócitos terem aparecido em março e os cistos apenas no final de setembro e início de outubro, os autores definiram as colônias como hermafroditas simultâneas. Questionando, particularmente, a sexualidade de *Symphyllia recta* nos estudos de Marshall & Stephenson (1933), Fadlallah (1983) ressaltou o cuidado necessário à interpretação dos dados provenientes de amostras cronológica ou demograficamente incompletas, as quais poderiam originar definições equivocadas.

Os aspectos relacionados à classificação do padrão sexual de *M. hispida* pareceram adequar-se à terminologia de Policansky (1982, *apud* Fadlallah, 1983) para o hermafrodita sequencial co-sexual, embora não tenha ficado muito claro o limite que o separa dos indivíduos ditos hermafroditas protogênicos, cujo desenvolvimento não envolveu verdadeira troca de sexo (Rinkevich & Loya, 1979a; Szmant 1986). Os primeiros cistos testiculares surgiram quando diversos ovócitos já se encontravam maduros (com as características das células de Estágio III). Em todas as amostras o desencadeamente do ciclo espermático esteve fortemente associado à presença de numerosos ovócitos seguindo processo similar aquele descrito por Duerden (1902).

A morfologia dos espermatozóides em cnidários é de particular interesse para os estudos comparativos devido à sua natureza primitiva, baseada principalmente na ausência de um acrossoma verdadeiro (Miller, 1983; Franzén, 1996). Harrison (1985,1990) mostrou haver dois tipos básicos de espermatozóides entre os corais: aqueles em forma de pêra ou ovóides característicos das espécies hermafroditas, e os cônicos associados às espécies gonocóricas. Por sua vez, Steiner (1991) comparou a morfologia do esperma entre os corais e concluiu que nas espécies gonocóricas este seria morfologicamente mais especializado do que nos indivíduos hermafroditas. Segundo Harrison (1985,1990), a estrutura do espermatozóide tende a ser conservativa para a maioria das famílias e subordens, sugerindo que diferenças morfológicas entre os dois tipos poderiam refletir afinidades filogenéticas. Desta forma, o aspecto ovóide observado nos gametas masculinos de *M. hispida*, além de ser o padrão comum entre os indivíduos hermafroditas, confere com a descrição de Harrison (1985, 1990) para os Mussidae, Acroporidae, Pectinidae e alguns Faviidae.

Além das tendências na morfologia dos gametas masculinos, a forma pela qual as gônadas distribuem-se pelo mesentérios férteis foi igualmente citada por Harrison (1985) como uma característica estável entre as famílias de corais. O arranjo encontrado nos pólipos hermafroditas de *M. hispida* (cistos testiculares desenvolvendo-se acima dos ovócitos sobre os mesmos mesentérios), confere com o padrão descrito por Harrison (1985) para os Mussidae.

5C. ESTRATÉGIAS RELACIONADAS AO SUCESSO REPRODUTIVO: VARIAÇÃO NO TAMANHO DO OVO E FECUNDIDADE

Nos invertebrados marinhos o modo de desenvolvimento encontra-se intimamente associado às estratégias de sobrevivência e à manutenção do organismo no ambiente (Giangrande *et al.*, 1994). Embora dados sobre a fertilização e embriogênese não tenham

sido explorados na presente análise, alguns aspectos sobre o desenvolvimento de *M. hispida* puderam ser avaliados através da formação e maturação das gônadas.

Para os organismos marinhos que desovam na água, fatores que envolvem diluição, longevidade dos gametas e tempo de contato entre esperma e ovo, são determinantes para o sucesso reprodutivo (Oliver & Babcock, 1992). Corais que submetem-se à fertilização externa alcançam significativa variabilidade genética (Veron, 1993) - mas considerando-se os fatores supracitados, correm o risco de perderem substancial parte do esforço empregado na reprodução. Presumivelmente, vasta quantidade de esperma é requerida para sobrepor os efeitos da diluição dos gametas e aumentar as chances de cruzamentos genéticos (Szmant, 1986; Oliver & Babcock, 1992).

Como em diversas espécies de corais, os ovócitos de *M. hispida* alcançaram dimensões avantajadas no período de pré-desova, devido principalmente ao acúmulo de material vitelínico durante os estágios finais de maturação. O maior ovócito encontrado ao longo da gametogênese foi uma célula de Estágio III com 521,76µm. Segundo Harrison & Wallace (1990) Acroporidae e Mussidae tipicamente produzem ovos grandes (400-800µm) enquanto que Agariciidae, Fungiidae e Pocilloporidae normalmente produzem ovos pequenos (100-250µm). O diâmetro médio dos ovócitos obtido por Szmant (1986) em *Mycetophyllia ferox*, um mussídeo hermafrodita incubador, alcançou 300µm. Por outro lado, a média das medidas dos ovócitos obtida por Heyward *et al.* (1987) em colônias de *Lobophyllia corymbosa*, um mussídeo hermafrodita que libera gametas na água, foi de 538µm - analisando a mesma espécie, Harriott (1983a) encontrou um diâmetro médio de 600µm.

Estudos sobre a importância do tamanho do ovo e o sucesso reprodutivo são escassos em cnidários, embora sejam amplamente abordados para alguns grupos de equinodermas e ascídias (Atkinson & Yund, 1996; Levitan, 1993,1996; Podolsky & Strathmann, 1996; Strathmann, 1985; Sewell & Young, 1997).

De acordo com Levitan (1993), ovos pequenos não são vantajosos para os organismos que liberam gametas na água. Ao contrário, ovos grandes representam bons alvos para os espermatozóides, aumentando a probabilidade de fertilização.

Como mencionado por Sewell & Young (1997), entre os invertebrados marinhos parece haver uma relação entre a fecundidade e a quantidade de energia investida na produção dos ovos, de forma que, uma espécie pode gerar centenas de pequenos ovos, com desenvolvimento planctotrófico, ou um número significativamente menor de ovos maiores, com desenvolvimento lecitotrófico - este último aparentemente adequado ao comportamento observado em *M. hispida.*

Segundo Strathmann (1985), o desenvolvimento lecitotrófico parece reduzir a taxa de mortalidade larval - as larvas seriam independentes dos recursos tróficos externos e consequentemente gastariam menos tempo nos estágios pré-metamórficos. Entretanto, como observado pelo próprio autor a produção de uma grande quantidade de pequenos ovos poderia requerer o mesmo investimento energético empregado para a produção de um número reduzido de ovos grandes. Não obstante, Giangrande *et al.* (1994) fizeram alguns comentários sobre a plasticidade observada no comportamento de algumas larvas lecitotróficas, as quais eventualmente utilizariam os alimentos disponíveis no ambiente.

Levitan (1996) sugeriu que nos invertebrados cuja reprodução ocorre através da liberação de gametas, a eficácia da quimiotaxia poderia estar associada com tamanhos efetivamente maiores de ovos. Podolsky & Strathmann (1996) verificaram que apesar dos ovos mais desenvolvidos apresentarem taxas de fertilização significativamente elevadas, a produção total de embriões declinava sob determinadas condições de concentração e longevidade dos gametas masculinos, causadas pela perda da fecundidade. Somando-se a este fato, Atkinson & Yund (1996) e Hall & Hughes (1996) afirmaram que uma grande quantidade de esperma seria um fator determinante para as taxas de fertilização.

Sob estes aspectos, embora o desenvolvimento das gônadas masculinas em *M. hispida* não tenha sido analisado quantitativamente, uma estimativa preliminar mostrou que,

a despeito das restrições físicas geradas inicialmente pela proliferação e crescimento das células femininas, os mesentérios apresentavam uma grande quantidade de cistos testiculares maduros (às vezes superior a 50 cistos por mesentério). Desta forma, o esforço empregado para o sucesso reprodutivo em *M. hispida* poderia primariamente agir contra os efeitos da diluição, potencializando a fertlização através da intensa produção de espermatozóides (em um único cisto maduro contam-se centenas de espermatozóides) e no desenvolvimento de ovócitos grandes.

Em relação aos eventos de pós-desova, a presente análise forneceu indícios sobre o suposto padrão lecitotrófico. Estudos específicos são entretanto necessários para elucidar os processos relacionados à fecundação e embriogênese, e gerar informações precisas e detalhadas a respeito do desenvolvimento da larva.

5D. PROCESSOS ASSOCIADOS À VITELOGÊNESE PARA OBTENÇÃO DE ENERGIA E NUTRIENTES

A combinação de atividades na síntese de vitelo extra e intra-ovócito integrou um dos processos mais importantes observado na ovogênese de *M. hispida*. O termo 'vitelo' provém de uma única classe de proteínas chamadas vitelogeninas, a qual normalmente compreende cerca de 60% a 90% das proteínas solúveis do ovo (Eckelbarger, 1986).

Devido às limitações da metodologia empregada, não foi possível discernir sobre os mecanismos relacionados com a produção de vitelo. Entretanto, Kessell (1968), Larkman (1983), Eckelbarger (1986, 1994) e Eckelbarger & Davis (1996) utilizando técnicas associadas à microscopia eletrônica revelaram a participação do complexo de golgi e do retículo endoplasmático rugoso na produção autosintética de material vitelínico, sob a forma de grânulos e vesículas.

Em diversos invertebrados, proteínas vitelogênicas são produzidas pelos ovócitos através de processos autossintéticos ('intra-ovócito') ou por mecanismos heterosintéticos ('extra-ovócito') envolvendo células somáticas (Wourms, 1987).

A presença de grânulos junto às vesículas lipídicas na região citoplasmática e no interior do núcleo dos ovócitos de *Favia doreyensis* e *Symphillia recta* foi inicialmente citada por Marshall & Stephenson (1933).

A concentração de numerosos grânulos foi também detectada por Glynn *et al.* (1996) no tecido endodérmico dos mesentérios férteis de *Pavona gigantea* e *Gardineroseris planulata*. Os autores associaram a presença destas estruturas à nutrição dos ovócitos imaturos em desenvolvimento. Além disso, observaram a formação de uma densa camada granulosa ao redor das células maduras sob o invólucro mesogleal, a qual identificaram como a camada cortical descrita por Harrison & Wallace (1990).

Em *M. hispida*, associada à síntese intra-ovócito de vesículas lipídicas, a incorporação de material granular foi observada em profusão principalmente durante os estágios finais da ovogênese. Aparentemente oriundos das células endodérmicas vizinhas, grânulos deslocavam-se através da estreita camada mesogleal, em direção ao citoplasma. Grande parte destas estruturas concentraram-se ao redor dos ovócitos formando uma camada densa e conspícua, tal como a camada cortical observada por Glynn *et al.* (1996). Nos estágios finais houve uma migração de material granular em direção ao núcleo, onde aparentemente se fundiram originando grânulos de tamanhos maiores. A variação primária da cor e do tamanho dos grânulos pode à princípio refletir a presença de diferentes tipos de nutrientes, os quais segundo Kessell (1968), Larkman (1983) e Eckelbarger (1994) são constituídos basicamente por glicogênio, proteína e lipídio.

Corroborando a hipótese de Rinchevich & Loya (1979a), na qual os ovócitos seriam reabsorvidos como fonte de nutrientes e energia para aqueles que obtiveram sucesso em seu desenvolvimento, nem todos os ovócitos de *M. hispida* alcançaram pleno amadurecimento. Isto ficou evidenciado pelos sinais de desintegração e perda do conteúdo

citoplasmático de alguns ovócitos de Estágio II e III. A despeito das observações de Sier & Olive (1994), a absorção não ocorreu exclusivamente após período de desova, ao contrário, consistiu num processo gradual, mais intenso durante a estação reprodutiva. Histologicamente foi possível inferir que os ovócitos em reabsorção eram primariamente fagocitados. Supostos elementos fagocitários, sob a forma de estruturas esféricas e arroxeadas, foram observados próximos ou no interior das células reprodutivas em degeneração.

A presença de ovócitos pequenos soltos na cavidade gastrovascular levantou algumas questões. Primariamente, não foi descartada a possibilidade da preparação do material para análise histológica ter acarretado o rompimento do tecido endodérmico e o deslocamento de alguns ovócitos. Entretanto, a ocorrência destas células, aparentemente imaturas, junto àquelas plenamente desenvolvidas, poderia indicar que a eliminação dos ovócitos que fracassaram em alcançar a maturidade não envolveu exclusivamente reabsorção; mas também sua expulsão para a cavidade gastrovascular, onde podem ter sido digeridos (digestão extracelular) ou eliminados pela abertura oral.

O estágio final da gametogênese, durante a estação reprodutiva, provavelmente caracterizou um período de grandes gastos energéticos para as colônias, especialmente para os pólipos individualmente. Seguindo à finalização do processo de vitelogênese, com os ovócitos aptos à fertilização, e o desencadeamento do ciclo espermático, prosseguiu-se a desova e provável regeneração dos tecidos, fragilizados pela liberação dos gametas.

5E. SAZONALIDADE, SINCRONIA E LIBERAÇÃO DE GAMETAS

Entre os corais escleractíneos, a influência sazonal no desenvolvimento das gônadas e desova, e a duração do período reprodutivo parecem variar em relação à latitude (Harrison & Wallace, 1990). Nas regiões mais próximas do Equador, como os recifes situados em

Salamaua e Busama (7°S), em Papua Nova Guiné, o ciclo reprodutivo estende-se por longos períodos (Kojis, 1986b). Por outro lado, nas altas e médias latitudes dos trópicos (Lat. 23°-14°S) as condições de temperatura sofrem mudanças anuais e muitos organismos marinhos apresentam curtos períodos de reprodução (Pearse, 1974; Kojis & Quinn 1981a,b,1982; Harriott, 1983a; Harrison *et al.* 1984).

Richmond & Hunter (1990) sugeriram que nas altas latitudes os corais encontram-se em seu limite de distribuição, e portanto poderiam ser estéreis. Entretanto, estudos têm revelado que a reprodução sexuada nas espécies subtropicais é extremamente relevante. Assim, Tanner (1996) citou a latitude e a temperatura da água como os fatores determinantes da sazonalidade na planulação das colônias de *Pocillopora damicornis*, *Seriatopora hystrix* e *Stylophora pistillata* situadas em Heron Island (23°S), Austrália (a liberação das larvas foi observada predominantemente durante o verão). Wilson & Harrison (1997) demonstraram que diversos corais (dentre eles duas espécies de Mussidae: *Acanthastrea echinata* e *A. lordhowensis*), provenientes das Solitary Islands (30°S), Austrália, desovaram durante o final do verão/início do outono, quando então a temperatura do mar encontrava-se em seu pico máximo (26°C).

Além disso, associadas ao regime de temperatura em cada região, variações intra-específicas durante o período reprodutivo são relativamente comuns (Richmond & Hunter, 1990). Um exemplo pode ser citado para as colônias de *Pocillopora damicornis* que ocorrem em pontos distintos na Grande Barreira de Recife da Austrália - aquelas localizadas nas latitudes mais altas (32°S-Stoddart & Black, 1985 / 23°S-Tanner, 1996) característicamente reproduzem-se durante a primavera e o verão, enquanto que as colônias situadas em latitudes mais baixas (14°S - Harriott, 1983b) liberam plânulas ao longo de praticamente todo o ano.

As colônias de *M. hispida* analisadas no presente trabalho situavam-se na faixa das médias-altas latitudes (22°S). Na Figura 2, observa-se que existiu uma variação entre as

temperaturas de inverno e verão na superfície da água durante o período de coleta. O longo ciclo reprodutivo de *M. hispida* teve início em abril/89, durante o outono, quando a temperatura da água encontrava-se entre 26°C e 27°C. Nos meses seguintes, até o final do inverno, a temperatura continou a cair alcançando valor próximo a 22°C. O aparecimento e crescimento parcial das gônadas femininas, prosseguiu durante a queda da temperatura. A partir de dezembro/89, quando a temperatura já se encontrava em plena elevação, os ovócitos tornaram-se visivelmente maiores e entraram no último estágio de desenvolvimento. Concomitante ao aumento da temperatura e amadurecimento das gônadas femininas, desencadeou-se a produção e maturação dos cistos testiculares. O ciclo reprodutivo culminou em, pelo menos, dois eventos de desova entre o final do verão e o início do outono, durante a temperatura máxima da água (27,3-27°C). Eventos múltiplos de desova, durante o período de reprodução, têm sido sugerido por diversos autores como um comportamento relativamente frequente entre os corais escleractíneos (Kojis & Quinn, 1981a,b, 1982; Harrison *et al.*, 1984; Babcock *et al.*, 1986; Shimoike *et al.*, 1992; Willis *et al.*, 1985). Devido à ausência de gônadas maduras antes do verão, a hipótese de uma desova bianual foi à princípio descartada.

Observando-se a curva de crescimento dos ovócitos nas colônias fixas (Figs. 18 e 19) verifica-se que o amadurecimento das células femininas ocorreu lentamente. A diferença temporal na liberação dos gametas em *M. hispida* (em março/90 para a colônia **B** e em fevereiro/90 para a colônia **C**) pareceu estar primariamente associada ao desencadeamento do ciclo espermático durante o verão - os primeiros cistos foram inicialmente encontrados nas amostras de dezembro/89 da colônia fixa **C**. Babcock (1984) inicialmente propôs que a temperatura poderia regular o período de desova através do controle do desenvolvimento das gônadas masculinas.

Segundo Richmond & Hunter (1990), a gametogênese comumente prossegue de forma sincronizada dentro de cada colônia, e pelo menos parcialmente sincronizada entre os membros de uma mesma população. Em *M. hispida*, uma suposta assincronia intercolonial

poderia ser considerada para a etapa final do ciclo reprodutivo, principalmente nas amostras do mês de março/90. Observando-se os polígonos de frequência temos situações extremamente distintas, como o desaparecimento das gônadas maduras na colônia fixa **C** (Fig. 19) e o reinício da gametogênese em uma das amostras aleatórias (Fig. 17).

Grant & Tyler (1983) sugeriram que uma amostragem mensal seria adequada para os indivíduos com ciclo gonadogênico anual e tendências sazonais. Além disso, demonstraram que a sincronia intracolonial no desenvolvimento das gônadas poderia ser avaliada pelo cálculo do desvio padrão dos diâmetros dos ovócitos. Analisando-se os gráficos 18 e 19, verifica-se que os valores da média e desvio padrão variaram entre as amostras, principalmente no período de dezembro/89 a março/90. A presença de células imaturas menores que 100µm, junto à células maduras de quase 300µm (como por exemplo, na amostra 2020B2 de janeiro/90) denota que o processo de amadurecimento prosseguiu gradativamente, causando uma relativa assincronia entre os pólipos.

Assumindo que o número de pólipos analisados possam representar o ciclo reprodutivo de toda a colônia, uma amostragem insuficiente poderia levar a erros de interpretação, envolvendo por exemplo a existência de uma assincronia intercolonial. Desta forma, considerando o reduzido número de pólipos amostrados no presente estudo e a variação no desenvolvimento gonadal obtida durante o período de liberação dos gametas, a hipótese mais aceitável seria que todas as colônias apresentavam pólipos em dois estágios distintos, o que poderia gerar picos de desova dentro de uma população durante a estação reprodutiva.

5F. PERSPECTIVAS

Segundo Fadlallah (1985), estudos básicos relacionados aos mecanismos reprodutivos das diferentes espécies que compõem nossos recifes constituem importantes ferramentas para que se possa garantir a estabilidade destes sistemas. A reprodução, desta

forma, pode ser um fator de grande relevância para os programas de monitoramento e conservação dos recifes coralíneos.

Os resultados obtidos na presente dissertação representam o primeiro passo para elaboração de uma série de estudos. A determinação do período de reprodução para a população de *M. hispida* na região de Cabo de Búzios (RJ), dentre outras possibilidades, permite que novas análises sejam direcionadas exclusivamente para o final do ciclo gametogênico, minimizando os esforços amostrais. Aspectos relacionados aos eventos que sucedem a liberação dos gametas tais como fertilização, embriogênese e recrutamento são completamente desconhecidos, e portanto merecem atenção.

6. CONCLUSÃO

- *M. hispida* é caracteristicamente uma espécie hermafrodita sequencial co-sexual, que libera gametas na água para fertilização externa e provável desenvolvimento lecitotrófico da larva.

- Gametogênese seguiu um padrão anual com a produção de ovócitos grandes, sem zooxantelas e com considerável acúmulo de vitelo. Células reprodutivas femininas surgiram primeiro que as masculinas, e o amadurecimento de ambas culminou num mesmo período de desova.

- Síntese de vitelo , sob forma de grânulos e vesículas lipídicas, envolveu atividades intra e extra-ovócito, com a migração de material granular para o citoplasma e posteriormente para o interior do núcleo.

- Ovócitos levaram cerca de 11 meses para alcançarem pleno amadurecimento. Primariamente observados no outono, possuiam menos de 100μm, entre a primavera e o verão atingiram valores superiores a 500μm - o maior ovócito encontrado possuia 521,76μm.

- Células de pré-desova possuíam núcleo marginal e encontravam-se soltas no interior do invólucro mesogleal.

- Nem todos os ovócitos obtiveram sucesso em seu desenvolvimento, sendo reabsorvidos. Processo de reabsorção parece ter ocorrido principalmente no final do ciclo, e contou com a provável participação de elementos fagocitários.

- Gônadas masculinas desenvolveram-se acima das gônadas femininas, na região gonadogênica dos mesentérios férteis, precisamente entre o músculo retrator e o filamento mesentérico.

- Cistos testiculares foram inicialmente observados em dezembro/89, junto aos ovócitos de Estágio II e III. Em janeiro/90 muitos cistos já apresentavam espermatozóides e em fevereiro/90 praticamente todos estavam maduros.

- Desencadeamento do ciclo espermático e amadurecimento das gônadas masculinas e femininas foram possivelmente regulados pela elevação da temperatura da água do mar.

- Suposta assincronia intracolonial no desenvolvimento das gônadas, principalmente nos últimos meses de amostragem entre o final do verão e o início do outono, forneceu indicíos de pelo menos dois eventos de desova durante a estação reprodutiva para a população de *M. hispida* da região de Cabo de Búzios (RJ).

*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. & ZEA, S. 1997. Sexual reproduction of the reef coral *Montastrea cavernosa* (Scleractinia, Faviidae) in the Santa Marta area, Caribbean coast of Colombia. *Mar. Biol.*, Berlin, **128**: 141-148.

ATKINSON, O.S. & YUND, P.O. 1996. The effect of variation in population density on male fertilization success in a colonial ascidian. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, **195**: 111-123.

ATODA, K. 1951a. The larva and postlarval development of some reef-building corals. III *Acropora brueggemanni* (Brook). *J. Morphol.*, Philadelphia, **80**: 1-13.

ATODA, K. 1951b. The larva and postlarval development of some reef-building corals. IV *Galaxea aspera* Quelch. *J. Morphol.*, Philadelphia, **80**: 17-30.

BABCOCK, R.C. 1984. Reproduction and distribution of two species of *Goniastrea* (Scleractinia) from the Great Barrier Reef Province. *Coral Reefs*, Berlin, **2**: 187-195.

BABCOCK, R.C., BULL, G.D., HARRISON, P.L., HEYWARD, A.J., OLIVER, J.K., WALLACE, C.C. & WILLIS, B.L. 1986. Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Mar. Biol.*, Berlin, **90**: 379-394.

BABCOCK, R.C. & HEYWARD, A.J. 1986. Larval development of certain gamete-spawning scleractinian corals. *Coral Reefs*, Berlin, **5**: 111-116.

BABCOCK, R.C., WILLIS, B.L. & SIMPSON, C.J. 1994. Mass spawning of corals on a high latitude coral reef. *Coral Reefs*, Berlin, **13**: 161-169.

BELÉM, M.J.C. 1976. **Estudo sistemático e histológico de quatro espécies de Endomyaria (Actiniaria) encontradas no município de Aracruz, Espírito Santo, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Zoologia, Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, 80 pp.

BELÉM, M.J.C. 1987. **Aspectos da biologia de *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae) do litoral do Estado do Rio de Janeiro, com ênfase na estimativa de seu comportamento reprodutivo**. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências/USP, São Paulo, 322 pp.

BOSCHMA, H. 1923. Experimental budding in *Fungia fungites. Proc. Royal Acad. Amsterdam,* Amsterdam, **26**: 88-96.

CAMPBELL, R.D. 1974. Reproduction of marine invertebrates. *In*: Giese, A.C, Pearse, J.S. (eds.). Vol. I. **Acoelomate and Pseudocoelomate**. III. Cnidaria. Academic Press, New York, USA. p. 133-199.

CHORNESKY, E.A. & PETERS, E.C. 1987. Sexual reproduction and colony growth in the scleractinian coral *Porites astreoides. Biol. Bull.*, Lancaster, **172**: 161-177.

CLARKE, A. 1992. Reproduction in the cold: Thorson revisited. *Invert. Repr. Develop.*, Philadelphia, **22**:175-184.

COLL, J.C., BOWEN, B.F., MECHAN, G.V., KONIG, G.M., CARROL, A.R., TAPIOLAS, D.M., ALIÑO, P.M., HEATON, A., De NYS, R., LEONE, P.A., MAIDA, M., ACERET, T.L., WILLIS, R.H., BABCOCK, R.C., WILLIS, B.L., FLORIAN, Z., CLAYTON, M.N. & MILLER, R.L. 1994. Chemical aspects of mass spawning in corals. I. Sperm-attractant molecules in the eggs of the scleractinian coral *Montipora digitata. Mar. Biol.*, Berlin, **118**: 177-182.

COMA, R., ZABALA, M. & GILI, J.M. 1995. Sexual reproductive effort in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata. Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **117**: 185-192.

CONNELL, J.H. 1973. Population ecology of reef-building corals. p. 205-245. *In*: Jones, O.A., Endean, R. (eds.). **Biology and Geology of Coral Reefs**, 2 Biol., 1. Academic Press, New York, 480 pp.

DAI, C.F., SOONG, K. & FAN, T.Y. 1992. Sexual reproduction of corals in northern and southern Taiwan. *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp.*, Guam, **1**: 448-455.

DAVENPORT, H.A. 1960. **Histological and Histochemical Technics**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 401 pp.

DELVOYE, L. 1988. Gametogenesis and gametogenic cycles in *Agaricia agaricites* (L) and *Agaricia humilis* Verrill and notes on gametogenesis in *Madracis mirabilis* (Duchassaing & Michelotti) (Scleractinia). Studies in Honour of Dr. Pieter Wagenaar Hummelinck. Van der Steen (ed.). Uitgaven, *"Natuurwetenschappelijke Studiekring voor Suriname en de Nederlandse Antillen"*, Amsterdam, **123**: 121-134.

DeVANTIER, L. M. & ENDEAN, R. 1989. Observations of colony fission following ledge formation in massive reef corals of the genus *Porites*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **58**: 191-195.

DUERDEN, J.E. 1902. West Indian madreporarian polyps. *Natl. Acad. Sci Mem,* Washington, **8** (7): 403-648.

DUERDEN, J.E 1904. **The coral *Siderastrea radians* and its postlarval development**. Carnegie Institution of Washington, USA. 126 pp.

ECKELBARGER, K.J. 1986. Vitellogenic mechanisms and the allocation of energy to offspring in polychaetes. *Bull. mar. Sci*, Miami, **39**(2): 426-443.

ECKELBARGER, K.J. 1994. Oocytic nutrition in the lower Metazoa: the Scyphozoa. *In*: Wilson Jr., W.H, Stricker, S.A., Shinn, G.L. (eds.). **Reproduction and Development of Marine Invertebrates**. The Johns Hopkins Press Ltd, London. p. 15-28.

ECKELBARGER, K.J. & DAVIS, C.V. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Mar. Biol.*, Berlin, **127**: 79-87.

FADLALLAH, Y.H. 1982. Reproductive ecology of the coral *Astrangia lajollaensis*: sexual and asexual patterns in a kelp forest habitat. *Oecologia*, Berlin, **55**: 379-388.

FADLALLAH, Y.H. 1983. Sexual reproduction, development and larval biology in scleractinian corals. *Coral Reefs*, Berlin, **2**: 129-150.

FADLALLAH, Y.H. 1985. Reproduction in the coral ***Pocillopora verrucosa*** on the reefs adjacent to the industrial city of Yanbu (Red Sea, Saudi, Arabia). *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.*, Tahiti, **4**: 313-317.

FADLALLAH, Y.H. 1996. Synchronous spawning of *Acropora clathrata* coral colonies from the western Arabian Gulf. *Bull. mar. Sci.*, Miami, **59**(1): 209-216.

FADLALLAH, Y.H. & PEARSE, J.S. 1982a. Sexual reproduction in solitary corals: overlapping oogenic and brooding cycles, and benthic planulas in *Balanophyllia elegans*. *Mar. Biol.*, Berlin, **71**: 223-231.

FADLALLAH, Y.H. & PEARSE, J.S. 1982b. Sexual reproduction in solitary corals: synchronous gametogenesis and broadcast spawning in *Paracyathus steamsii*. *Mar. Biol.*, Berlin, **71**: 233-239.

FAN, T.Y & DAI, C,F. 1995. Reproductive ecology of the scleractinian coral *Echinopora lamellosa* in northern and southern Taiwan. *Mar. Biol.*, Berlin, **123**: 565-572.

FAUTIN, D.G. & MARISCAL, R.N. 1991. Chapter 6. Cnidaria: Anthozoa. p. 267-358. *In*: Harrison, F.W., Westfall, J.A. (eds.). **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora. Wiley-Liss, Inc. 436 pp.

FRANZÉN, A. 1996. Ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis in the hydrozoan *Cordylophora caspia* with comments on structure and evolution of the sperm in the Cnidaria and the Porifera. *Inv. Repr. Develop.*, Philadelphia, **29**(1):19-26.

GERRODETTE, T. 1981. Dispersal of the solitary coral *Balonophyllia elegans* by demersal planular larvae. *Ecology*, New York, **62**: 611-619.

GIANGRANDE, A., GERACI, S. & BELMONTE, G. 1994. Life-cycle and life-history diversity in marine invertebrates and the implications in community dynamics. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, Aberdeen, **32**: 305-333.

GITTINGS, S.R., BOLAND, G.S., DESLARZES, K.J.P., COMBS, C.L., HOLLAND, B.S. & BRIGHT, T.J. 1992. Mass spawning and reproductive viability of reef corals at the East Flower Garden Bank, Northwest Gulf of Mexico. *Bull. mar. Sci.*, Miami, **51**(3): 420-428.

GLYNN, P.W., COLLEY, S.B., EAKIN, C.M., SMITH, D.B., CORTÉS, J., GASSMAN, N.J., GÚZMAN, H.M., del ROSARIO, J.B. & FEINGOLD, J.S. 1994. Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panamá and Galapagos Islands (Ecuador). II *Porites*. *Mar. Biol.*, Berlin, **118**(2): 191-208.

GLYNN, P.W., COLLEY, S.B., GASSMAN, N.J., BLACK, K., CORTÉS, J. & MATÉ, J.L. 1996. Coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama and Galapagos Islands (Ecuador). III. Agariciidae (*Pavona gigantea* and *Gardineroseris planulata*). *Mar. Biol.*, Berlin, **125**: 579-601.

GLYNN, P.W., GASSMAN, N.J., EAKIN, C.M., CORTÉS, J., SMITH, D.B. & GÚZMAN, H.M. 1991. Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador). I. Pocilloporidae. *Mar. Biol.*, Berlin, **109**: 355-368.

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**: 259-269.

HALL, V. R. & HUGHES, T.P. 1996. Reproductive strategies of modular organisms: comparative studies of reef-building corals. *Ecology*, New York, **77**(3): 950-963.

HARRIOTT, V.J. 1983a. Reproductive ecology of four scleractinian species at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, Berlin, **2**: 9-18.

HARRIOTT, V.J. 1983b. Reproductive seasonality, settlement, and post-settlement mortality of *Pocillopora damicornis* (Linaeus), at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, Berlin, **2**: 151-157.

HARRISON, P.L. 1985. Sexual characteristics of scleractinian corals: systematic and evolutionary implications. *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.*, Tahiti, **4**: 337-342.

HARRISON, P.L. 1988. Pseudo-gynodioecy: an unusual breeding system in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Proc. 6th Int. Coral Reef Symp.*, Townsville, **2**: 699-705.

HARRISON, P.L. 1990. Sperm morphology and fertilization strategies in scleractinian corals. *Adv. Invert. Reprod.*, Amsterdam, **5**: 299-304.

HARRISON, P.L. 1993. Coral spawning on the Great Barrier Reef. *Search*, Brisbane, **24**(2): 45-47.

HARRISON, P.L., BABCOCK, R.C., BULL, G.D., OLIVER, J.K., WALLACE, C.C. & WILLIS, B.L. 1984. Mass spawning in tropical reef corals. *Science*, New York, **223**: 1186-1189.

HARRISON, P.L. & WALLACE, C.C., 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. *In*: Dubinsky, Z. (ed.). **Coral Reefs, Ecosystems of the World 25**. Elsevier, Amsterdam. p. 133-207.

HETZEL, B. & CASTRO, C.B. 1994. **Corais do Sul da Bahia**. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 189 pp.

HEYWARD, A. 1986. Sexual reproduction in five species of the coral *Montipora*. In: Jokiel, P.L., Richmond, R.H., Rogers, R.A. (eds.). **Coral Reef Population Biology**. *Hawaii Inst. Mar. Biol. Tech. Rep.*, Honolulu, **37**: 170-178.

HEYWARD, A.J. & BABCOCK, R.C. 1986. Self- and cross-fertilization in scleractinian corals. *Mar. Biol.*, Berlin, **90**:191-195.

HEYWARD, A., YAMAZATO, R., YEEMIN, T. & MINEI, M. 1987. Sexual reproduction of corals in Okinawa. *Galaxea*, Okinawa, **6**: 331-343.

HIGHSMITH, R.C. 1982. Reproduction by fragmentation in corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **7**: 207-226.

HUNTER, C.L. 1988. Genotypic diversity and population structure of the Hawaiian reef coral *Porites compressa*. Thesis, University of Hawaii, 136 pp.

JAGERSTEN, G. 1962. Further remarks on the early phylogeny of the Metazoa. *Zool. Bidrag.*, Uppsala, **33**: 79-108.

JOKIEL, P.L. 1985. Lunar periodicity of planula release in the reef coral *Pocillopora damicornis* in relation to various environmental factors. *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.*, Tahiti,**4**: 307-312.

JOKIEL, P.L., ITO, R.Y. & LIU, P.M. 1985. Night irradiance and synchronization of lunar release of planula larvae in the reef coral *Pocillopora damicornis. Mar. Biol.*, Berlin, **88**: 167-174.

KENYON, J.C. 1992. Sexual reproduction in Hawaiian *Acropora. Coral Reefs*, Berlin, **11**: 37-43.

KESSEL, R.G. 1968. Electron microscope studies on developing oocytes of a Coelenterate medusa with special reference to vitellogenesis. *J. Morph.*, New York, **126**(2): 211-247.

KINZIE III, R.A. 1996. Modes of speciation and reproduction in archaeocoeniid corals. *Galaxea*, Okinawa, **13**: 47-64.

KOJIS, B.L. 1986. Sexual reproduction in *Acropora* (*Isopora*) species (Coelenterata: Scleractinia) I. *A. cuneata* and *A. palifera* on Heron Island reef, Great Barrier Reef. *Mar. Biol.*, Berlin, **91**: 291-309.

KOJIS, B.L. 1986b. Sexual reproduction in *Acropora* (*Isopora*) (Coelenterata: Scleractinia). II. Latitudinal variation in *A. palifera* from the Great Barrier Reef and Papua New Guinea. *Mar. Biol.*, Berlin, **91**: 311-318.

KOJIS, B.L. & QUINN, N.J. 1981a. Reproductive strategies in four species of *Porites* (Scleractinia). *Proc. 4th Int. Coral Reef Symp.*, Manila, **2**: 145-151.

KOJIS, B.L. & QUINN, N.J. 1981b. Aspects of sexual reproduction and larval development in the shallow water hermatypic coral, *Goniastrea australiensis* (Edwards and Haime, 1857). *Bull. mar. Sci.*, Miami, **31**(3): 558-573.

KOJIS, B.L. & QUINN, N.J. 1982. Reproductive ecology of two faviid corals (Coelenterata: Scleractinia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **8**: 251-255.

KOJIS, B.L. & QUINN, N.J. 1984. Seasonal and depth variation in fecundity of *Acropora palifera* at two reefs in Papua New Guinea. *Coral Reefs*, Berlin, **3**: 165-172.

KOJIS, B.L. & QUINN, N.J. 1985. Puberty in *Goniastrea favulus*. Age or size limited? *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.*, Tahiti, **4**: 289-293.

KRAMARSKY-WINTER, E., FINE, M. & LOYA, Y. 1997. Coral polyp expulsion. *Nature*, London, **387**: 137.

KRUPP, D.A. 1983. Sexual reproduction and early development of the solitary coral *Fungia scutaria* (Anthozoa, Scleractinia). *Coral Reefs*, Berlin, **2**: 159-164.

KRUPP, D.A., JOKIEL, P.L & CHARTRAND, T.S. 1992. Asexual reproduction by the solitary scleractinian coral *Fungia scutaria* on dead parent coralla in Kaneohe Bay, Oahu, Hawaiian Islands. *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp.*, Guam, **1**: 527-534.

LABOREL, J. 1970. Campagne de la Calypso au large des cotes atlantiques de l'Amerique du Sud (1961-1962). Madreporaires et hydrocolliaires recifaux des cotes brésiliennes. Systématique, ecologie, répartition verticale et géographique. *Rés. Sci. Camp. Calypso*, Paris, **9** (25): 171-229.

LARKMAN, A.U. 1983. An ultrastructural study of oocyte growth within the endoderm and entry into the mesoglea in *Actinia fragacea* (Cnidaria, Anthozoa). *J. Morph.*, New York, **178**: 155-177.

LEVITAN, D.R. 1993. The importance of sperm limitation to the evolution of egg size in marine invertebrates. *Am. Nat.*, Lancaster, **141**: 517-536.

LEVITAN, D.R. 1996. Predicting optimal and unique egg sizes in free-spawning marine invertebrates. *Am. Nat.*, Lancaster, **148**(1): 174-188.

LEWIS, J.B. 1974. The settlement behaviour of planulae larvae of the hermatypic coral *Favia fragum* (Esper). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, **15**: 165-172.

MARAGOS, J.E. 1977. Order Scleractinia. Stony corals. p. 158-241. *In*: Devaney, D.M., Eldredge, L.G. (eds.). **Reef and Shore Fauna of Hawaii**. Section 1: Protozoa through Ctenophora. Bernice P. Bishop Museum Special Publication 64(1), Hawaii, 278 pp.

MARSHALL, S.M. & STEPHENSON, T.A. 1933. The breeding of reef animals. Part. I. The corals. *Sci. Rep. Great Barrier Reef Exped.*, London, **3**: 219-245.

MARTIN-CHAVEZ, E. 1986. Gametogenesis and origin of planulae in the hermatypic coral *Pocillopora damicornis*. *In*: Jokiel, P.L., Richmond, R.H., Rogers, R.A. (eds.). **Coral Reef Population Biology**. *Hawaii Inst. Mar. Biol. Tech. Rep.*, Honolulu, **37**: 193-205.

MILLER, R.L. (1983). Spermatogenesis and Sperm Function. *In*: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (eds.). **Reproductive Biology of Invertebrates**. Vol II. John Wiley and Sons, Chichester. p. 23-73.

OLIVER, J.K. & BABCOCK, R.C. 1992. Aspects of fertilization ecology of broadcast spawning corals: sperm dilution effects and *in situ* measurements of fertilization. *Biol. Bull. mar. biol. Lab.*, Woods Hole, **183**: 409-417.

OLIVER, J.K. & WILLIS, B.L. 1987. Coral-spawn slicks in the Great Barrier Reef: preliminary observations. *Mar. Biol.*, Berlin, **94**: 521-529.

OLIVER, J.K., BABCOCK, R.C., HARRISON, P.L. & WILLIS, B.L. 1988. Geographic extent of mass coral spawning: clues to ultimate factors. *Proc. 6th Int. Coral Reef Symp.*, Townsville, **2**: 803-810.

PANTIN, C.F.A. 1948. **Notes on Microscopical Technique for Zoologists**. Cambridge University Press, Cambridge, 77 pp.

PEARSE, J.S. 1974. Reproductive patterns of tropical reef animals, three species of sea urchins. *Proc. 2nd Int. Coral Reef Symp.*, Brisbane, **1**: 235-240.

PITOMBO, F.B. 1992. **Aspectos morfológicos e microanatômicos das espécies brasileiras de Mussidae Ortmann, 1890 (Cnidaria, Scleractinia)**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Zoologia, Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, 104 pp.

PODOLSKY, R.D. & STRATHMANN, R.R. 1996. Evolution of egg size in free-spawners: consequences of the fertilization-fecundity trade-off. *Am. Nat.*, Lancaster, **148**(1): 160-173.

RICHMOND, R.H. ,1983. **Reproduction, larval physiology, and dispersal potencial of the coral *Pocillopora damicornis*.** Thesis, Stony Brook, New York, 136 pp.

RICHMOND, R.H. 1990. Relationships among reproductive mode, biogeographic distribution patterns and evolution in Scleractinian corals. *Adv. Invert. Repr.*, Amsterdam, **5**: 317-322.

RICHMOND, R.H. 1996. Reproduction and recruitment in corals: critical links in the persistence of reefs. *In*: Sterling, V.A. (ed.). **Life & Death of Coral Reef**. Chapman-Hall Science, Birkeland. p. 175-197.

RICHMOND, R.H. & HUNTER, C.L. 1990. Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the tropical Pacific, and the Red Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **60**: 185-203.

RICHMOND, R.H. & JOKIEL, P.L. 1984. Lunar periodicity in larva release in the reef coral *Pocillopora damicornis* at Enewetak and Hawaii. *Bull. mar. Sci.*, Miami, **34**: 280-287.

RINKEVICH, B. & LOYA, Y. 1979a. The reproduction of the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. I. gonads and planulae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **1**(2): 133-144.

RINKEVICH, B. & LOYA, Y. 1979b. The reproduction of the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. II. Synchronization in breeding and seasonality of planulae shedding. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **1**(2): 145-152.

ROHLF, F.J. & SOKAL, R.R. 1969. **Statistical Tables**. W.H Freeman, San Francisco, 253 pp.

ROSEN, B.R. & TAYLOR, J.D. 1969. Reef coral from Aldabra: new mode of reproduction. *Science*, New York, **166**: 119-121.

SAMMARCO, P.W. 1982. Polyp bail-out: an escape response to environmental stress and a new means of reproduction in corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **10**: 57-65.

SEWELL, M. A. & YOUNG, C.M. 1997. Are echinoderm egg size distributions bimodal? *Biol. Bull.*, Lancaster, **193**: 297-305.

SEGAL, E. 1970. Light. Animals. Invertebrates. *In*: Kinne, O. (ed.). **Marine Ecology**, 1 Pt 1. Wiley (Interscience), New York. p. 159-211.

SIER, C.J.S. & OLIVE, J.W. 1994. Reproduction and reproductive variability in the coral *Pocillopora verrucosa* from the Republic of Maldives. *Mar. Biol.*, Berlin, **118**: 713-722.

da SILVEIRA, F.L. 1980. **Organização e estimativa do comportamento reprodutor de *Cirripathes* (*Stichopathes*) *gracilis* (Gray, 1857) (Anthozoa, Antipatharia)**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências/USP, São Paulo, 120 pp.

da SILVEIRA, F.L. 1986. **Aspectos da biologia de *Lophogorgia punicea* (Milne Edwards & Haime, 1857) (Gorgonacea, Gorgoniidae) do canal de São Sebastião, Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências/USP, São Paulo, 211 pp.

da SILVEIRA, F.L. & MIGOTTO, A.E. 1984. *Serehyba sanctisebastiani* n. gen. n. sp. (Hydrozoa, Tubulariidae), symbiont of a gorgonian octocoral from the southeast coast of Brazil. *Bijdr. Dierk.*, Amsterdam, **54**(2): 231-242.

SHIMOIKE, K., HAYASHIBARA, T., KIMURA, T. & OMORI, M. 1992. Observations of split spawning in *Acropora spp.* at Akajima Island, Okinawa. *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp.*, Guam, **1**: 484-488.

SHLESINGER, Y. & LOYA, Y. 1985. Coral community reproductive patterns: Red Sea *versus* the Great Barrier Reef. *Science*, New York, **228**: 1333-1335.

SIMPSON, C.J. 1985. Mass spawning of scleractinian corals in Dampier archipelago and the implications for management of coral reefs in Western Australia. *West. Aust. Dep. Conserv. Environ. Bull.*, **244**: 35 pp.

SOONG, K. 1991. Sexual reproductive patterns of shallow-water reef corals in Panama. *Bull. mar. Sci.*, Miami, **49**(3): 832-846.

STEINER, S.C.C. 1991. Sperm morphology of scleractinians from the Caribbean. *Hydrobiologia*, Ghent, **216/217**: 131-135.

STIMSON, J.S. 1976. Reproduction of some common Hawaiian reef corals. p. 271-279. *In*: Mackie, G.O. (ed.). **Coelenterate Ecology and Behaviour**. Plenum Press, New York, 744 pp.

STIMSON, J.S. 1978. Mode and timing of reproduction in some common hermatypic corals of Hawaii and Enewetak. *Mar. Biol.*, Berlin, **48**: 173-184.

STOBART, B., BABCOCK, R.C. & WILLIS, B.L. 1992. Biannual spawning of three species of Scleractinian coral from the Great Barrier Reef. *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp.*, Guam, **1**: 494-499.

STODDART, J.A. 1983. Asexual production of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol.*, Berlin, **76**: 279-284.

STODDART, J.A. & BLACK, R. 1985. Cycles of gametogenesis and planulation in the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **23**: 153-164.

STRATHMANN, R.R. 1985. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **16**: 339-361.

SZMANT, A.M. 1986. Reproductive ecology of Caribbean reef corals. *Coral Reefs*, Berlin, **5**: 43-53.

SZMANT, A.M. 1991.Sexual reproduction by the Caribbean reef corals *Montastrea annularis* and *M. cavernosa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **74**: 13-25.

SZMANT-FROELICH, A.M. 1985. The effect of colony size on the reproductive ability of the Caribbean coral *Montastrea annularis* (Ellis and Solander). *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.*, Tahiti, **4**: 295-300.

SZMANT-FROELICH, A., RUETTER, M. & RIGGS, L. 1985. Sexual reproduction of *Favia fragum* (Esper): lunar patterns of gametogenesis, embryogenesis, and planulation in Puerto Rico. *Bull. mar. Sci.*, Miami, **37**: 880-892.

SZMANT-FROELICH, A.M., YEVICH, P. & PILSON, M.E.Q. 1980. Gametogenesis and early development of the temperate coral *Astrangia danae* (Anthozoa, Scleractinia). *Biol. Bull.*, Lancaster, **158**: 257-269.

TANNER, J.E 1996. Seasonality and lunar periodicity in the reproduction of Pocilloporid corals. *Coral Reefs*, Berlin, **15**:59-66.

TOMASCIK, T. & SANDER, F. 1987. Effects of eutrophication on reef-building corals. III. Reproduction of the reef-building coral *Porites porites*. *Mar. Biol.*, Berlin, **94**: 77-94.

VAN MOORSEL, G.W.N.M. 1983. Reproductive strategies in two closely related stony corals (*Agaricia*, Scleractinia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Oldendorf/Luhe, **13**: 273-283.

VERON, J.E.N. 1993. **Corals of Australia and the Indo-Pacific**. University of Hawaii Press, Honolulu, 644 pp.

VERON, J.E.N. 1995. **Corals in Space & Time. The Biogeography e Evolution of the Scleractinia**. University of New South Wales Press, Sydney, Australia, 321 pp.

VERRILL, A.E. 1868. Notes on radiata in the Museum of Yale College, with descriptions of new genera and species. 4. Notice of the corals and echinoderms collected by prof. C. F. Hartt at the Abrolhos Reef, Province of Bahia, Brazil, 1867. *Trans. Conn. Acad. Arts Sci.*, New Haven, **1**(2)4: 351-371.

VERRILL, A.E. 1902. Variation and nomenclature of Bermudian, West Indian and Brazilian reef corals, with notes on various Indo Pacific corals. *Trans. Conn. Acad. Arts Sci.,* New Haven, **11**(1)3: 63-168.

WELLS, J.W. 1966. Evolutionary development in the Scleractinian family Fungiidae. p. 223-246. *In*: Rees, W.J. (ed.). **The Cnidaria and their Evolution**. Academic Press, London, 449 pp.

WILLIAMS, D.McB., WOLANSKI, E. & ANDREWS, J.C. 1984. Transport mechanisms and the potential movement of planktonic larvae in the central region of the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, Berlin, **3**: 229-236.

WILLIS, B.L. & OLIVER, J.K. 1988. Inter-reef dispersal of coral larvae following the annual mass spawning on the Great Barrier Reef. *Proc. 6th Int. Coral Reef Symp.*, Townsville, **2**: 853-859.

WILLIS, B.L., BABCOCK, R.C., HARRISON, P.L., OLIVER, J.K. & WALLACE, C.C. 1985. Patterns in the mass spawning of corals on the Great Barrier Reef from 1981 to 1984. *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.*, Tahiti, **4**: 343-348.

WILSON, J.R. & HARRISON, P.L. 1997. Sexual reproduction in high latitude coral communities at the Solitary Islands, Eastern Australia. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.*, Panamá, **1**:533-538.

WINSOR, L. 1946. **Manual of Basic Zoological Microthecniques for Light Microscopy**. School of Biological Sciences, James Cook University of North Queensland, 199 pp.

WOURMS, J. 1987. Oogenesis. p. 50-124. *In*: Giese, A.C., Pearse, J.S., Pearse, V.B. (eds.). **Reproduction of Marine Invertebrates**. Vol. IX General Aspects: Seeking Unity in Diversity. Blackwell/Boxwood, California, 712 pp.

APÊNDICES

Apêndice 1

Ovócitos - Colônia Fixa B

(n=50)

2011B1(Abr)	2012B8(Mai)	2013B8(Jun)	2014B7(Jul)	2015B5(Ago)	2016B1(Set)	2017B1(Out)	2018B1(Nov)
13,044	13,044	26,088	19,566	32,610	39,132	32,610	52,176
19,566	13,044	26,088	26,088	45,654	45,654	45,654	52,176
19,566	13,044	32,610	32,610	45,654	52,176	52,176	52,176
19,566	19,566	32,610	32,610	52,176	58,698	52,176	58,698
26,088	19,566	39,132	39,132	52,176	58,698	58,698	65,220
26,088	19,566	39,132	39,132	58,698	71,742	58,698	65,220
32,610	19,566	39,132	39,132	58,698	71,742	58,698	65,220
32,610	19,566	39,132	39,132	65,220	71,742	65,220	71,742
32,610	26,088	45,654	45,654	65,220	71,742	65,220	71,742
32,610	26,088	45,654	45,654	65,220	71,742	65,220	71,742
32,610	26,088	52,176	52,176	65,220	71,742	65,220	78,264
32,610	26,088	52,176	58,698	65,220	71,742	65,220	78,264
32,610	26,088	52,176	58,698	65,220	71,742	65,220	78,264
32,610	26,088	52,176	58,698	65,220	78,264	65,220	84,786
32,610	26,088	58,698	58,698	65,220	78,264	65,220	84,786
32,610	26,088	58,698	58,698	65,220	78,264	71,742	91,308
32,610	32,610	58,698	65,220	65,220	78,264	71,742	91,308
32,610	32,610	58,698	65,220	71,742	78,264	71,742	91,308
39,132	32,610	58,698	65,220	71,742	78,264	71,742	97,830
39,132	32,610	58,698	65,220	71,742	78,264	71,742	97,830
39,132	32,610	58,698	71,742	71,742	84,786	71,742	97,830
39,132	32,610	65,220	71,742	71,742	84,786	71,742	97,830
39,132	32,610	65,220	71,742	78,264	84,786	71,742	97,830
39,132	32,610	65,220	71,742	78,264	91,308	71,742	104,352
39,132	39,132	65,220	71,742	78,264	91,308	71,742	104,352
39,132	39,132	65,220	71,742	78,264	91,308	78,264	110,874
45,654	39,132	65,220	78,264	78,264	91,308	78,264	110,874
45,654	39,132	65,220	78,264	78,264	91,308	78,264	117,396
45,654	39,132	65,220	84,786	78,264	91,308	78,264	117,396
45,654	39,132	65,220	84,786	78,264	97,830	78,264	117,396
52,176	39,132	65,220	84,786	78,264	97,830	84,786	117,396
52,176	39,132	65,220	84,786	78,264	97,830	84,786	123,918
52,176	39,132	65,220	84,786	78,264	97,830	84,786	123,918
52,176	39,132	65,220	84,786	78,264	97,830	84,786	123,918
52,176	39,132	71,742	91,308	78,264	97,830	84,786	123,918
52,176	39,132	71,742	91,308	78,264	97,830	84,786	130,440
52,176	39,132	71,742	91,308	84,786	97,830	84,786	130,440
52,176	39,132	71,742	91,308	84,786	104,352	91,308	130,440
52,176	45,654	71,742	97,830	84,786	110,874	91,308	130,440
52,176	45,654	71,742	97,830	84,786	110,874	97,830	136,962
58,698	45,654	71,742	97,830	91,308	110,874	97,830	136,962
58,698	45,654	78,264	97,830	91,308	110,874	97,830	143,484
58,698	52,176	78,264	97,830	91,308	117,396	97,830	143,484
58,698	52,176	78,264	97,830	97,830	117,396	104,352	150,006
58,698	52,176	78,264	104,352	97,830	123,918	110,874	156,528
58,698	52,176	84,786	104,352	97,830	123,918	110,874	156,528
65,220	58,698	84,786	117,396	97,830	123,918	117,396	156,528
65,220	58,698	84,786	123,918	104,352	130,440	123,918	182,616
71,742	58,698	84,786	130,440	104,352	136,962	130,440	182,616
71,742	71,742	84,786	130,440	110,874	215,226	136,962	189,138

X	43,176	35,871	61,437	74,481	75,525	91,960	79,829	108,917
s^2	194,262	167,108	241,486	715,464	255,375	783,453	450,644	1233,124
s	13,938	12,927	15,540	26,748	15,980	27,990	21,228	35,116

onde, X= média, s^2= variância, s= desvio padrão

continuação (Colônia Fixa B)

2019B1(Dez)	2019B2(Dez)	2020B2(Jan)	2020B3(Jan)	2021B5(Fev)	2021B6(Fev)	2022B1(Mar)	2022B2(Mar)
32,610	52,176	39,132	130,440	163,050	136,962	189,138	176,094
39,132	58,698	45,654	143,484	163,050	169,572	228,270	182,616
39,132	97,830	45,654	150,006	176,094	169,572	228,270	202,182
39,132	104,352	52,176	150,006	182,616	176,094	234,792	208,704
58,698	117,396	65,220	156,528	202,182	189,138	234,792	215,226
58,698	117,396	65,220	163,050	202,182	189,138	241,314	221,748
65,220	117,396	65,220	169,572	221,748	195,660	241,314	221,748
65,220	123,918	71,742	169,572	228,270	195,660	241,314	221,748
71,742	123,918	78,264	169,572	234,792	195,660	247,836	228,270
71,742	130,440	84,786	169,572	234,792	195,660	247,836	228,270
71,742	130,440	110,874	176,094	241,314	195,660	247,836	234,792
71,742	130,440	136,962	182,616	247,836	202,182	254,358	234,792
71,745	130,440	143,484	182,616	247,836	202,182	260,880	234,792
78,264	136,962	150,006	182,616	254,358	202,182	260,880	241,314
78,264	136,962	156,528	189,138	260,880	202,182	260,880	241,314
84,786	143,484	169,572	189,138	260,880	215,226	267,402	254,358
84,786	143,484	176,094	189,138	260,880	215,226	267,402	260,880
84,786	143,484	182,616	195,660	267,402	221,748	273,924	260,880
91,308	150,006	195,660	195,660	273,924	228,270	273,924	260,880
91,308	156,528	195,660	195,660	273,924	228,270	280,446	260,880
91,308	156,528	195,660	202,182	273,924	234,792	280,446	267,402
97,830	156,528	202,182	202,182	273,924	241,314	280,446	267,402
104,352	163,050	202,182	202,182	273,924	241,314	280,446	273,924
110,874	163,050	202,182	202,182	273,924	241,314	286,968	273,924
117,396	163,050	208,704	202,182	280,446	241,314	286,968	273,924
117,396	169,572	208,704	202,182	280,446	247,836	286,968	273,924
123,918	169,572	208,704	208,704	280,446	247,836	293,490	273,924
130,440	169,572	208,704	208,704	293,490	254,358	293,490	280,446
136,962	169,572	208,704	208,704	293,490	254,358	293,490	280,446
136,962	169,572	215,226	208,704	300,012	254,358	300,012	280,446
136,962	176,094	221,748	208,704	300,012	254,358	300,012	286,968
136,962	182,616	228,270	208,704	306,534	260,880	300,012	293,490
143,484	189,138	228,270	215,226	306,534	260,880	300,012	293,490
143,484	189,138	228,270	215,226	313,056	260,880	300,012	293,490
143,484	189,138	228,270	215,226	313,056	267,402	300,012	300,012
156,528	189,138	228,270	215,226	313,056	273,924	306,534	300,012
156,528	189,138	234,792	215,226	319,578	280,446	306,534	306,534
163,050	202,182	234,792	221,748	319,578	286,968	313,056	326,100
163,050	202,182	241,314	228,270	326,100	286,968	313,056	326,100
163,050	202,182	241,314	234,792	339,144	293,490	313,056	326,100
169,572	202,182	241,314	241,314	339,144	300,012	319,578	326,100
176,094	202,182	241,314	241,314	339,144	300,012	319,578	332,622
182,616	215,226	247,836	241,314	339,144	313,056	326,100	339,144
195,660	215,226	247,836	247,836	352,188	319,578	326,100	339,144
195,660	221,748	260,880	247,836	352,188	326,100	332,622	358,710
195,660	221,748	260,880	260,880	365,232	326,100	339,144	358,710
202,182	221,748	267,402	267,402	365,232	326,100	358,710	365,232
221,748	221,748	280,446	273,924	365,232	358,710	358,710	384,798
228,270	228,270	293,490	286,968	371,754	365,232	358,710	404,364
228,270	228,270	293,490	313,056	410,886	391,320	371,754	417,408

X	120,396	163,702	184,833	205,965	283,577	248,749	286,577	280,316
s^2	2884,165	1771,341	5287,736	1387,366	3221,036	3066,117	1504,246	3025,282
s	53,704	42,087	72,717	37,247	56,754	55,373	38,785	55,003

onde, X= média, s^2= variância, s= desvio padrão

Apêndice 2

Ovócitos - Colônia Fixa C

(n=50)

2011C6(Abr)	2012C6(Mai)	2013C3(Jun)	2014C7(Jul)	2015C8(Ago)	2016C7(Set)	2017C1(Out)	2018C2(Nov)
13,044	19,566	19,566	32,610	26,088	45,654	26,088	52,176
19,566	19,566	19,566	32,610	32,610	58,698	32,610	65,220
26,088	19,566	19,566	39,132	32,610	58,698	32,610	65,220
26,088	19,566	19,566	39,132	39,132	65,220	39,132	65,220
26,088	19,566	26,088	39,132	45,654	65,220	39,132	71,742
26,088	19,566	26,088	39,132	45,654	65,220	45,654	71,742
26,088	19,566	26,088	45,654	45,654	65,220	52,176	71,742
26,088	26,088	26,088	45,654	45,654	65,220	52,176	78,264
26,088	26,088	26,088	45,654	45,654	65,220	58,698	78,264
26,088	26,088	26,088	52,176	45,654	65,220	58,698	78,264
32,610	26,088	26,088	58,698	45,654	65,220	58,698	78,264
32,610	26,088	26,088	58,698	52,176	65,220	58,698	84,786
32,610	26,088	26,088	58,698	52,176	65,220	65,220	84,786
32,610	26,088	26,088	58,698	52,176	65,220	65,220	84,786
32,610	26,088	26,088	58,698	52,176	71,742	65,220	91,308
32,610	26,088	26,088	58,698	52,176	71,742	65,220	91,308
39,132	26,088	32,610	58,698	52,176	71,742	65,220	91,308
39,132	26,088	32,610	58,698	52,176	71,742	65,220	97,830
39,132	32,610	32,610	58,698	52,176	71,742	65,220	97,830
39,132	32,610	32,610	58,698	58,698	71,742	65,220	97,830
39,132	32,610	32,610	65,220	58,698	71,742	65,220	97,830
39,132	32,610	32,610	65,220	58,698	71,742	65,220	97,830
39,132	32,610	32,610	65,220	58,698	71,742	71,742	104,352
39,132	32,610	32,610	65,220	58,698	78,264	71,742	104,352
39,132	32,610	32,610	65,220	58,698	78,264	71,742	104,352
39,132	32,610	32,610	65,220	58,698	78,264	71,742	104,352
39,132	39,132	32,610	65,220	58,698	78,264	71,742	104,352
39,132	39,132	32,610	65,220	58,698	78,264	71,742	104,352
39,132	39,132	39,132	65,220	58,698	78,264	71,742	104,352
45,654	39,132	39,132	71,742	65,220	84,786	78,264	110,874
45,654	39,132	39,132	71,742	65,220	84,786	78,264	110,874
45,654	39,132	39,132	71,742	65,220	84,786	78,264	110,874
45,654	39,132	39,132	71,742	65,220	84,786	78,264	110,874
45,654	39,132	45,654	71,742	65,220	91,308	78,264	117,396
45,654	39,132	45,654	71,742	65,220	91,308	78,264	117,396
52,176	45,654	45,654	71,742	65,220	91,308	84,786	117,396
52,176	45,654	45,654	71,742	71,742	91,308	84,786	123,918
52,176	45,654	45,654	78,264	71,742	91,308	84,786	123,918
52,176	45,654	45,654	78,264	71,742	91,308	91,308	123,918
52,176	45,654	52,176	78,264	71,742	97,830	91,308	123,918
58,698	52,176	52,176	78,264	71,742	97,830	97,830	130,440
58,698	52,176	52,176	78,264	71,742	97,830	97,830	130,440
58,698	52,176	58,698	78,264	71,742	97,830	97,830	136,962
58,698	58,698	58,698	84,786	78,264	104,352	97,830	136,962
65,220	58,698	58,698	84,786	78,264	104,352	104,352	136,962
65,220	58,698	58,698	84,786	78,264	104,352	110,874	136,962
65,220	58,698	65,220	84,786	78,264	117,396	110,874	143,484
65,220	58,698	65,220	97,830	84,786	117,396	117,396	150,006
71,742	65,220	71,742	104,352	84,786	130,440	117,396	150,006
84,786	65,220	71,742	110,874	97,830	136,962	123,918	150,006

X	42,654	36,915	38,349	65,611	59,872	81,786	73,829	104,352
s^2	215,651	176,414	200,772	288,918	207,804	356,282	507,729	626,762
s	14,685	13,282	14,169	16,998	14,415	18,875	22,533	25,035

onde, X= média, s^2= variância, s= desvio padrão

continuação (Colônia Fixa C)

2019C1(Dez)	2019C2(Dez)	2020C1(Jan)	2020C2(Jan)	2021C4(Fev)	2021C5(Fev)
71,742	84,786	117,396	110,874	169,572	130,440
71,742	91,308	123,918	123,918	182,616	136,962
78,264	97,830	130,440	136,962	221,748	136,962
84,786	104,352	136,962	143,484	221,748	143,484
104,352	104,352	143,484	143,484	241,314	156,528
110,874	110,874	169,572	150,006	241,314	163,050
110,874	110,874	169,572	150,006	247,836	163,050
117,396	117,396	176,094	163,050	247,836	163,050
117,396	123,918	176,094	169,572	247,836	169,572
123,918	123,918	182,616	169,572	247,836	169,572
123,918	123,918	182,616	176,094	247,836	169,572
123,918	130,440	189,138	176,094	260,880	169,572
123,918	130,440	189,138	182,616	267,402	176,094
123,918	130,440	189,138	182,616	267,402	182,616
123,918	130,440	195,660	189,138	267,402	189,138
123,918	136,962	195,660	189,138	273,924	195,660
130,440	136,962	202,182	189,138	273,924	195,660
130,440	136,962	202,182	189,138	273,924	195,660
130,440	143,484	202,182	189,138	273,924	195,660
130,440	143,484	208,704	195,660	273,924	202,182
130,440	143,484	215,226	195,660	286,968	202,182
136,962	150,006	215,226	195,660	286,968	202,182
136,962	156,528	215,226	195,660	293,490	202,182
143,484	156,528	215,226	195,660	293,490	208,704
143,484	163,050	215,226	202,182	293,490	208,704
143,484	163,050	215,226	202,182	293,490	215,226
143,484	176,094	215,226	208,704	300,012	215,226
143,484	176,094	221,748	215,226	300,012	215,226
150,006	176,094	221,748	215,226	300,012	228,270
156,528	176,094	228,270	221,748	300,012	228,270
156,528	189,138	228,270	228,270	300,012	228,270
156,528	189,138	228,270	228,270	306,534	234,792
163,050	189,138	228,270	228,270	306,534	234,792
163,050	195,660	228,270	228,270	306,534	234,792
163,050	195,660	234,792	228,270	313,056	241,314
169,572	202,182	241,314	234,792	313,056	247,836
176,094	208,704	241,314	234,792	313,056	254,358
176,094	208,704	241,314	241,314	313,056	260,880
176,094	208,704	241,314	254,358	319,578	260,880
182,616	208,704	247,836	254,358	319,578	267,402
182,616	215,226	247,836	254,358	326,100	267,402
182,616	215,226	247,836	260,880	326,100	273,924
189,138	228,270	254,358	260,880	326,100	273,924
195,660	247,836	254,358	260,880	326,100	273,924
195,660	247,836	260,880	280,446	332,622	280,446
195,660	247,836	260,880	286,968	345,666	286,968
202,182	247,836	267,402	286,968	345,666	286,968
215,226	254,358	280,446	300,012	345,666	300,012
241,314	313,056	326,100	313,056	358,710	300,012
254,358	365,232	339,144	339,144	384,798	352,188

X	148,441	172,572	215,226	211,443	288,533	217,835
s^2	1556,592	3318,210	2003,555	2470,745	1792,713	2496,631
s	39,454	57,604	44,761	49,707	42,340	49,966

onde, X= média, s^2= variância, s= desvio padrão

Apêndice 3

Ovócitos - Colônias Aleatórias

(n=50)

3500(Dez)	3501(Dez)*a	3502(Dez)*b	3503(Dez)	3510(Jan)*a	3512(Jan)*b	3515(Jan)*a	3516(Jan)*b
39,132	65,220	32,610	39,132	32,610	110,874	78,264	110,874
91,308	71,742	39,132	39,132	45,654	110,874	136,962	150,006
91,308	71,742	45,654	45,654	45,654	130,440	156,528	169,572
97,830	97,830	58,698	45,654	52,176	130,440	163,050	182,616
117,396	104,352	78,264	45,654	52,176	136,962	163,050	202,182
117,396	104,352	78,264	45,654	117,396	143,484	195,660	202,182
130,440	110,874	91,308	45,654	123,918	143,484	202,182	202,182
130,440	110,874	91,308	52,176	123,918	143,484	202,182	208,704
130,440	110,874	97,830	52,176	123,918	143,484	228,270	228,270
130,440	117,396	97,830	52,176	130,440	143,484	228,270	228,270
136,962	117,396	97,830	58,698	130,440	150,006	228,270	234,792
136,962	123,918	97,830	58,698	130,440	150,006	228,270	234,792
143,484	123,918	97,830	71,742	130,440	150,006	228,270	241,314
143,484	130,440	104,352	78,264	130,440	150,006	234,792	241,314
143,484	130,440	110,874	91,308	136,962	150,006	234,792	241,314
150,006	130,440	110,874	97,830	136,962	156,528	234,792	247,836
150,006	130,440	117,396	104,352	143,484	156,528	234,792	254,358
150,006	130,440	117,396	117,396	143,484	163,050	234,792	260,880
150,006	136,962	117,396	117,396	150,006	163,050	241,314	260,880
156,528	143,484	117,396	117,396	156,528	163,050	260,880	260,880
163,050	143,484	123,918	123,918	156,528	163,050	260,880	267,402
163,050	150,006	123,918	123,918	156,528	169,572	260,880	267,402
163,050	150,006	123,918	123,918	156,528	169,572	260,880	273,924
163,050	163,050	130,440	130,440	156,528	169,572	267,402	273,924
163,050	163,050	130,440	130,440	163,050	169,572	273,924	280,446
163,050	169,572	130,440	136,962	163,050	169,572	286,968	280,446
163,050	169,572	130,440	136,962	163,050	176,094	286,968	286,968
169,572	169,572	130,440	136,962	163,050	176,094	293,490	286,968
169,572	169,572	130,440	136,962	163,050	176,094	293,490	293,490
169,572	176,094	136,962	136,962	163,050	182,616	300,012	293,490
176,094	176,094	143,484	136,962	169,572	182,616	300,012	293,490
176,094	182,616	143,484	136,962	169,572	182,616	306,534	300,012
176,094	182,616	150,006	143,484	169,572	182,616	306,534	313,056
176,094	202,182	150,006	143,484	169,572	182,616	306,534	319,578
182,616	202,182	150,006	143,484	176,094	189,138	313,056	326,100
182,616	202,182	156,528	143,484	176,094	189,138	313,056	326,100
182,616	208,704	156,528	150,006	176,094	195,660	313,056	332,622
189,138	215,226	163,050	150,006	176,094	195,660	319,578	339,144
195,660	221,748	169,572	150,006	182,616	195,660	319,578	339,144
195,660	221,748	176,094	150,006	182,616	195,660	319,578	345,666
202,182	228,270	182,616	150,006	182,616	202,182	319,578	345,666
208,704	228,270	182,616	150,006	189,138	202,182	326,100	352,188
208,704	228,270	189,138	150,006	189,138	208,704	352,188	352,188
215,226	241,314	195,660	156,528	195,660	208,704	352,188	352,188
215,226	241,314	208,704	169,572	202,182	215,226	352,188	352,188
241,314	260,880	208,704	169,572	208,704	215,226	352,188	358,710
241,314	267,402	215,226	176,094	215,226	221,748	358,710	358,710
241,314	273,924	241,314	182,616	215,226	247,836	371,754	378,276
260,880	300,012	247,836	182,616	221,748	247,836	378,276	397,842
260,88-	358,710	260,880	189,138	234,792	254,358	378,276	423,930

X	166,311	170,616	135,658	116,352	152,876	175,529	271,185	281,490
s^2	1927,597	3865,368	2616,428	2037,168	2052,446	1053,099	4401,380	4311,567
s	43,904	62,172	51,151	45,135	45,304	32,451	66,343	65,663

onde, X= média, s^2= variância, s= desvio padrão

continuação (Colônias Aleatórias)

2860(Jan)	2871(Fev)	3520(Fev)*a	3522(Fev)*b	3523(Fev)*a	3524(Fev)*b	3531(Mar)*a	3532(Mar)*b
45,654	84,786	123,918	123,918	221,748	234,792	150,006	163,050
58,698	84,786	130,440	130,440	228,270	234,792	163,050	189,138
58,698	97,830	130,440	143,484	228,270	241,314	182,616	195,660
65,220	136,962	156,528	156,528	234,792	241,314	195,660	208,704
71,742	150,006	156,528	163,050	241,314	247,836	195,660	221,748
78,264	156,528	169,572	176,094	247,836	254,358	208,704	221,748
156,528	163,050	169,572	189,138	254,358	254,358	208,704	221,748
143,484	169,572	176,094	208,704	260,880	260,880	215,226	228,270
169,572	169,572	176,094	215,226	260,880	260,880	221,748	228,270
182,616	176,094	176,094	221,748	267,402	260,880	221,748	228,270
182,616	176,094	176,094	221,748	273,924	260,880	228,270	228,270
182,616	189,138	182,616	228,270	280,446	260,880	228,270	228,270
182,616	189,138	189,138	228,270	280,446	267,402	228,270	228,270
189,138	189,138	189,138	234,792	280,446	267,402	228,270	247,836
195,660	189,138	189,138	241,314	280,446	267,402	234,792	247,836
202,182	195,660	189,138	247,836	286,968	273,924	234,792	254,358
208,704	195,660	189,138	247,836	286,968	280,446	234,792	254,358
228,270	195,660	202,182	247,836	286,968	280,446	234,792	260,880
228,270	195,660	202,182	247,836	293,490	286,968	241,314	260,880
228,270	208,704	202,182	247,836	293,490	286,968	241,314	260,880
228,270	221,748	208,704	247,836	300,012	286,968	247,836	260,880
228,270	228,270	208,704	254,358	300,012	286,968	247,836	260,880
228,270	228,270	215,226	254,358	300,012	293,490	254,358	267,402
234,792	228,270	215,226	254,358	300,012	293,490	254,358	267,402
234,792	234,792	215,226	260,880	300,012	293,490	260,880	267,402
234,792	234,792	221,748	260,880	300,012	300,012	260,880	267,402
241,314	234,792	221,748	267,402	306,534	313,056	260,880	273,924
241,314	234,792	228,270	273,924	306,534	313,056	260,880	273,924
247,836	241,314	228,270	273,924	306,534	313,056	267,402	273,924
247,836	247,836	234,792	280,446	313,056	319,578	273,924	273,924
254,358	247,836	234,792	286,968	313,056	326,100	280,446	280,446
260,880	247,836	241,314	286,968	319,578	326,100	293,490	280,446
260,880	247,836	247,836	293,490	319,578	326,100	293,490	286,968
267,402	247,836	247,836	293,490	326,100	326,100	293,490	286,968
267,402	254,358	254,358	293,490	326,100	332,622	293,490	293,490
273,924	260,880	267,402	300,012	326,100	332,622	300,012	293,490
273,924	260,880	267,402	300,012	326,100	332,622	300,012	306,534
273,924	267,402	267,402	306,534	332,622	339,144	300,012	319,578
273,924	267,402	273,924	306,534	332,622	339,144	306,534	319,578
286,968	273,924	286,968	306,534	332,622	345,666	306,534	319,578
293,490	280,446	286,968	313,056	332,622	345,666	313,056	326,100
293,490	286,968	293,490	326,100	339,144	352,188	319,578	326,100
300,012	286,968	293,490	332,622	339,144	358,710	319,578	326,100
300,012	293,490	293,490	339,144	339,144	371,754	319,578	332,622
300,012	293,490	293,490	339,144	339,144	378,276	326,100	332,622
300,012	313,056	306,534	352,188	345,666	378,276	326,100	332,622
306,534	319,578	306,534	352,188	352,188	397,842	326,100	352,188
306,534	319,578	326,100	391,320	358,710	397,842	332,622	358,710
313,056	326,100	358,710	397,842	371,754	397,842	352,188	371,754
371,754	352,188	371,754	417,408	391,320	410,886	371,754	391,320

X	223,574	225,922	227,879	265,706	301,708	307,056	263,228	274,054
s^2	5786,767	3715,015	3325,502	4272,417	1465,009	2275,858	2452,810	2395,047
s	76,071	60,951	57,667	65,364	38,275	47,706	49,526	48,939

onde, X=média, s^2= variância, s= desvio padrão

continuação (Colônias Aleatórias)

3589(Mar)	2880(Mar)
45,654	26,088
58,698	26,088
58,698	32,610
65,220	32,610
65,220	32,610
65,220	32,610
65,220	32,610
71,742	32,610
78,264	32,610
78,264	32,610
97,830	32,610
97,830	32,610
104,352	32,610
104,352	32,610
110,874	32,610
195,660	39,132
195,660	39,132
202,182	39,132
208,704	39,132
215,226	39,132
215,226	39,132
228,270	39,132
228,270	39,132
234,792	39,132
241,314	45,654
241,314	45,654
247,836	45,654
254,358	45,654
254,358	45,654
254,358	45,654
260,880	45,654
260,880	52,176
267,402	52,176
280,446	52,176
280,446	52,176
286,968	52,176
300,012	52,176
313,056	52,176
326,100	52,176
326,100	52,176
326,100	58,698
332,622	58,698
339,144	58,698
345,666	58,698
352,188	58,698
417,408	58,698
423,930	58,698
430,452	65,220
450,018	65,220
521,760	91,308

X	228,531	45,002
s^2	14443,237	158,426
s	120,180	12,586

onde, X=média, s^2= variância, s= desvio padrão