



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DA ASCÍDIA *Eudistoma vannamei*
MILLAR, 1977 (TUNICATA: ASCIDIACEA)**

TEREZA EMANUELLE DA SILVA COSTA

**TRABALHO SUPERVISIONADO (MONOGRAFIA)
APRESENTADO AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
DE PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE DAS
EXIGÊNCIAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
ENGENHEIRO DE PESCA.**

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
DEZEMBRO/2007**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Tito Monteiro da Cruz/Lotufo, D.Sc
Orientador/Presidente

Prof. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto, Ph.D
Membro

Prof. José Renato Oliveira César, Ph.D
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C876b Costa, Tereza Emanuelle da Silva.
Biologia reprodutiva da ascídia *Eudistoma vannamei millar*, 1977 (Tunicata: ascidiacea) /
Tereza Emanuelle da Silva Costa. – 2007.
33 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.
Orientação: Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

1. Ascídia - Reprodução. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

Dedico este trabalho à minha mãe, eterna amiga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me ter dado a oportunidade de estar em uma faculdade pública privilegiada.

À minha mãe por tantos anos de amor, dedicação e carinho.

Aos meus poucos familiares que de alguma forma estão presentes e me incentivam durante minha caminhada.

Ao professor Tito Lotufo, pela orientação, paciência, confiança, e pela possibilidade de iniciar uma jornada de pesquisas, aumentando minha admiração pelo ambiente marinho.

Aos demais professores do Departamento de Engenharia de Pesca, pelos momentos de aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca, em especial a Leni, que sempre me ajudou quando necessário.

À professora Letícia Lotufo, por colaborar na realização da continuidade desse trabalho, permitindo que eu utilizasse material e espaço cedidos nos laboratórios LOE e Ecotox.

À amiga Paula Gimenez, por me ajudar e incentivar em dar continuidade aos trabalhos com a espécie *Eudistoma vannamei*.

A todos os meus amigos e amigas queridas, que entraram juntamente comigo na faculdade fazendo com que esses cinco anos de curso passassem tão rápido em cada momento de descontração.

A todos do Laboratório de Ecologia Animal, em especial: Andréa, Carol, Eduardo, Fabiano, Fred, Ronaldo e Wander.

Ao Instituto Terramar, pela possibilidade de redescobrir Flecheiras e fazer desse local meu campo de trabalho.

Às minhas amigas Andréa e Rosane, que fazem parte da minha vida a mais de dez anos, e Alice durante esses cinco anos, irmãs de coração.

Ao amigo Raimundo Junior, por me abrigar na casa de seus familiares em Flecheiras durante minhas coletas, possibilitando que eu conhecesse pessoas tão maravilhosas.

A todos que estiveram em algum momento presentes na minha vida e que direta ou indiretamente contribuíram para o meu desempenho profissional e pessoal.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	viii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1- Área de estudo:	6
2.2- Coleta dos dados:	7
2.3- Análise biológica:	9
2.4- Análise dos dados:.....	10
3- RESULTADOS.....	11
3.1- Morfologia da espécie:	11
3.1.1- Aspecto externo:	11
3.1.2- Estrutura interna:	11
3.1.3- Larva:	12
3.2- Aspectos Ecológicos:.....	12
3.3- Aspectos Reprodutivos:	13
4- DISCUSSÃO.....	18
5- CONCLUSÕES.....	23
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

A região entremarés do litoral cearense é caracterizada pela ocorrência de recifes de praia, ou “beach rocks”, abrigando uma grande biodiversidade de organismos marinhos. Estudos realizados sobre a composição, interações e as diversas variações que possam ocorrer nessas comunidades, são uma fonte de informações valiosas para elaborar planos de monitoramento que assegurem o bom gerenciamento dos ecossistemas. A fauna de Ascidiacea é bem representativa no litoral cearense com várias espécies catalogadas, e dentre as quais se destaca *Eudistoma vannahae*, endêmica da região nordeste. As ascídias assim como os demais invertebrados possuem diversos mecanismos que garantem a integridade dos eventos relacionados à sua sobrevivência. Neste trabalho, foi analisado o período reprodutivo da espécie *Eudistoma vannahae* presente nos recifes costeiros de Flecheiras, Trairi, Ceará. As coletas foram realizadas em intervalos bimensais entre outubro de 2006 e agosto de 2007, durante as baixamares de sizígia e compreendiam 10 colônias por coleta. A análise das coletas foi feita em laboratório através de observações das amostras de colônia da espécie, correspondendo a 10 zoóides por colônia. Os dados obtidos foram utilizados em tabelas e gráficos para analisar sua época reprodutiva com base no estágio de maturação dos organismos. Foi verificado que há variação em relação ao estágio de maturação entre os meses, caracterizando uma estação reprodutiva contínua com maior esforço na estação chuvosa no primeiro semestre.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Recifes costeiros de Flecheiras durante as baixas marés de sizígia... 6	6
Figura 2: Disposição da colônia de <i>Eudistoma vannahae</i> sob pedra evidenciando sua coloração laranja/ amarelo e a presença de outros organismos..... 8	8
Figura 3: amostras dentro de sacos plásticos, à esq., e dentro de uma tampa plástica, à dir., durante a triagem do material. 9	9
Figura 4: Larva de <i>Eudistoma vannahae</i> fotografada em microscópio estereoscópico..... 12	12
Figura 5: Porcentagem de zoóides em cada estágio de maturação e de larvas de acordo com cada mês de coleta. Ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas 15	15
Figura 6: Frequência de colônias com presença ou ausência de maturação em zoóides nos meses do estudo. Ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas..... 16	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Periodicidade das coletas com base no intervalo bimensal entre os meses de outubro de 2006 e agosto de 2007 registrando dia e hora de acordo com a maré. 7	7
Tabela 2 Número de zoóides relacionados com o estágio de maturação gonadal: ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas..... 13	13
Tabela 3: Presença ou ausência de maturação por amostra de colônia. Ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas 16	16

BIOLOGIA REPRODUTIVA DA ASCÍDIA *Eudistoma vannamei* MILLAR, 1977
(TUNICATA: ASCIDIACEA)

Tereza Emanuelle da Silva Costa

1- INTRODUÇÃO

O litoral cearense é caracterizado por apresentar uma extensa faixa de praias arenosas que são ocasionalmente interrompidas pela ocorrência de recifes de praia, ou “beach rocks”, ocorrendo predominantemente na região entre a preamar e a baixamar (SMITH e MORAIS, 1984). Esses afloramentos rochosos geralmente abrigam uma flora e fauna mais ricas do que os ambientes arenosos e muitos desses organismos precisam de adaptações para tolerar as variações das marés e a exposição a condições impróprias ao seu desenvolvimento.

Poucos estudos foram realizados nesses ambientes, destacando-se levantamentos faunísticos apresentados no volume organizado por MATTHEWS-CASCON e LOTUFO (2006). No contexto desta fauna, um dos grupos mais abundantes é o das ascídias, que habitam preferencialmente porções sombreadas e abrigadas nos recifes. Sobre a fauna de Ascidiacea do litoral cearense, destacam-se os trabalhos de LOTUFO (2002) e, LOTUFO e SILVA (2006) através de um levantamento preliminar, acompanhado de revisão taxonômica, evidenciando uma grande riqueza e diversidade para os espécimes encontrados.

As ascídias são animais exclusivamente marinhos, membros da classe Ascidiacea, sendo predominantemente sésseis, fixas a rochas ou a outros substratos duros e considerados os mais comuns, diversificados e mais conhecidos dentre os organismos pertencentes ao subfilo Tunicata (RODRIGUES et al., 1998; RUPPERT et al., 2004).

Dentre os membros da classe, a família Polycitoridae destaca-se por ser composta de ascídias coloniais, com zoóides divididos em tórax e abdômen, revestidos por uma túnica comum e com dois sifões abrindo-se diretamente na superfície da colônia. Família bastante diversificada e com vários representantes registrados, fato também evidenciado no trabalho de Millar (1977) para o litoral norte-nordeste brasileiro, no qual grande parte dos espécimes pertencia à família Polycitoridae, principalmente ao gênero *Eudistoma*. Este gênero é representado por espécies compostas de zoóides geralmente alongados, com tórax curto contendo três fileiras de fendas e pedúnculo esofágico-retal comprido e estreito. O gênero possui uma grande variedade de espécies, de distribuição especialmente em regiões quentes. Existem poucas espécies em águas temperadas e não há registro de nenhuma espécie no litoral de São Paulo (LOTUFO, 2002). Alguns pesquisadores relataram a dificuldade em realizar a taxonomia para esse gênero devido à grande homogeneidade de características entre seus representantes, tendo a estrutura da colônia ganho acentuada importância para relatar as diferenças entre as espécies pertencentes ao grupo (VAN NAME, 1945; LOTUFO, 2002).

A espécie *Eudistoma vannamei*, objeto de estudo deste trabalho, é caracterizada por colônias formadas por várias cabeças pedunculadas, unidas por uma base fina aderida ao substrato (MILLAR, 1977). A espécie é registrada como endêmica do litoral nordestino brasileiro, sendo particularmente abundante nos afloramentos rochosos do entremarés no litoral do Ceará (LOTUFO e SILVA, 2006).

Ainda são poucos os estudos acerca da reprodução desses organismos, no qual grande parte dos trabalhos já realizados está voltada para o levantamento de espécies através da caracterização taxonômica do grupo. O ciclo reprodutivo de ascídias foi estudado por autores como Millar (1952, 1954, 1958a, 1971, 1974), Goodbody (1961), Yamaguchi (1975) e, no Brasil, por Rocha (1991). A reprodução das ascídias coloniais pode se dar de forma assexuada ou sexuada. A reprodução assexuada pode ocorrer por brotamento ou fissão de colônias, e a reprodução sexual ocorre com a liberação dos espermatozóides e fecundação interna, com a incubação do embrião até a formação completa da larva (MILLAR, 1971).

Segundo Millar (1971), o ciclo de vida de ascídias solitárias é relativamente simples, e pode ser analisado como o estabelecimento de um novo indivíduo, o qual, cresce, reproduz e morre, tendo o organismo uma dimensão adequada para cada estágio. Já para as ascídias coloniais, é um pouco mais complicado, e a colônia resultante é considerada como uma unidade biológica, com mudanças envolvendo vários graus de deterioração, renovação e ocasionalmente, divisão.

As gônadas são hermafroditas, e estão incluídas junto à alça intestinal. O oviduto é um tubo de paredes muito finas capaz de grande distensão, enquanto o espermiduto é um tubo de parede espessa que apresenta várias voltas, como uma serpentina. Esses dutos acompanham o reto por toda extensão do pedúnculo até se abrir na cavidade atrial (VAN NAME, 1945).

Examinar a variação da fecundidade entre populações animais mantém as evidências já expressadas por alguns autores de que fatores possam limitar ou realçar a reprodução sexual, e que as relações alométricas podem ser uma medida comparativa valiosa entre populações que diferem grandemente em tamanho, morfologia, ou localização (DURANTE e SEBENS, 1994).

A temperatura parece ser o principal fator que influencia o período reprodutivo das espécies (MILLAR, 1958a; YAMAGUCHI, 1975; TURON, 1988; ROCHA, 1991). Em águas temperadas, a maioria das espécies tem seu período reprodutivo restrito aos meses mais quentes do verão, apesar de espécies em regiões boreo-árticas reproduzirem-se no inverno (MILLAR, 1954, MILLAR, 1958a). Já em águas mais quentes, as espécies se reproduzem ao longo de todo o ano, e a intensidade do esforço reprodutivo poderá apresentar uma sazonalidade marcada, resultante das variações térmicas (MILLAR, 1971; ROCHA, 1991).

O sucesso reprodutivo desses organismos somente será possível se suas larvas forem capazes de localizar e conseguir espaço disponível sobre um substrato adequado, e a densidade das larvas disponibilizadas pela colônia ao ambiente estará diretamente relacionado ao sucesso da colonização (HURLBUT, 1992). Além das formas coloniais, as ascídias podem também estar presentes na forma solitária e, ambas são caracterizadas por possuírem uma larva livre-natante, que apresenta as quatro características fundamentais

dos cordados: notocorda, tubo nervoso dorsal, cauda pós-anal e fendas faríngeas (RUPPERT et al., 2004).

Estudos sobre o desenvolvimento e liberação das larvas em espécies coloniais mostram que as larvas são capazes de sair da colônia de diversas maneiras, de acordo com o tipo de incubação. Em muitas espécies, o desenvolvimento dos embriões está retido na região do tórax e a larva sai diretamente através do sifão atrial, o qual se abre na superfície da colônia, ou através da cavidade cloacal comum. Vários métodos podem ser utilizados para determinar a época e a duração das estações reprodutivas, ressaltando as experiências já realizadas sobre a atividade de maturação das gônadas, identificação das larvas, incrustação ou "fouling" e distribuição espacial (MILLAR, 1971).

As ascídias, assim como os demais invertebrados marinhos bentônicos, estão sob intensa pressão competitiva por espaço, luz e nutrientes. Por isso muitos desses organismos desenvolveram uma variedade de mecanismos de defesa, incluindo estratégias comportamentais, físicas (espículas, túnica resistente) e químicas (bioatividade de metabólitos secundários, pH ácido) para assegurar sua sobrevivência (VERVOORT et al., 1998).

Elevados níveis de vanádio e a acidez na superfície da túnica têm sido propostos como mecanismos inibidores da colonização de epibiontes, e os membros da família Polycitoridae estão entre os únicos que possuem ambos os mecanismos de inibição (STOECKER, 1980; DAVIS e WRIGHT, 1989).

Segundo Harvell e Fenical, (1989), restrições físicas presentes ou desenvolvidas durante o ciclo de vida que possam impedir uma particular defesa de ser usada em todas as partes de um organismo, necessitam de defesas adicionais para assegurar a proteção de todo o organismo.

Os invertebrados marinhos são uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos com atividades citotóxicas, antimicrobiais, antifúngicas, antivirais e anti-incrustantes que assumem diversas funções ecológicas. A variação qualitativa desses metabólitos é importante para realizar estudos de ecologia química e de suas aplicações biotecnológicas, especialmente quando espécies intermediárias não são definidas com precisão devido à falta de caracteres morfológicos confiáveis. Grupos tais como esponjas e ascídias se destacam neste aspecto (LÓPEZ-LEGENTIL et al., 2005a).

Devido a essa importante característica obtida com a ajuda da farmacologia/toxicologia, alguns trabalhos já mostraram que *Eudistoma vannamei* apresenta metabólitos com atividades biológicas interessantes (JIMENEZ et al., 2003; JIMENEZ et al., 2007) e, apesar de muito comum no Ceará, pouco se sabe a respeito de sua biologia, como reprodução, hábitos alimentares e taxas de crescimento.

Conhecer e determinar as características implicantas para o desenvolvimento de um organismo vivo torna-se uma importante ferramenta para desvendar todo um complexo sistema biológico. Fato este que pode ser evidenciado em espécies coloniais que passam por uma série de mudanças complexas envolvendo vários graus de deterioração, renovação e, conseqüentemente, divisão (MILLAR, 1971).

Com base nos aspectos apresentados, este trabalho teve por objetivo geral, compreender aspectos básicos da biologia reprodutiva da espécie de ascídia *Eudistoma vannamei*, coletada em Flecheiras (Município de Trairi, CE). Os objetivos específicos foram: indicar o período reprodutivo da espécie; e comparar o padrão reprodutivo com outras espécies estudadas. Este estudo é inédito para o grupo, com informações relevantes sobre a biologia do animal em questão.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Área de estudo:

A praia de Flecheiras situa-se a 144 km de Fortaleza, no município de Trairi, CE. Essa região é formada por um complexo arenítico que representa uma das maiores plataformas de recife de praia do litoral cearense. Muitos organismos, como algas, e uma fauna bentônica expressiva se beneficiam da consistência dura do substrato consolidado para se fixarem e então se desenvolverem. Porém são os que necessitam de melhores adaptações para tolerar constantemente as variações diárias na região entremarés, principalmente durante as baixamares de sizígia, no qual ficam expostos às condições de ventos, mudanças de temperatura, salinidade, além do extrativismo algícola que modifica a paisagem local e altera a distribuição dos organismos que possam ter alguma relação com as algas.



Figura 1: Recifes costeiros de Flecheiras durante as baixas marés de sizígia.

A irregularidade da plataforma proporciona o aparecimento de poças de marés, fendas e grutas (Figura 1), locais propícios ao desenvolvimento das ascídias e a disposição desse grupo sob as pedras é fator primordial para sua

sobrevivência. Por isso, os locais onde havia grande disponibilidade de colônias da espécie *Eudistoma vannamei* foram tomados como ponto de coleta para as amostras.

2.2- Coleta dos dados:

O material foi coletado com um intervalo bimensal entre os meses de outubro de 2006 e agosto de 2007, de acordo com as marés de sizígia, no período de baixamar, possibilitando a visualização dos locais onde as colônias se apresentavam mais expressivas. O dia e hora das coletas em função das marés foram definidos com base na Tábua de Marés oferecida pela Diretoria de Hidrografia e Navegação (DHN). A periodicidade das coletas está definida na Tabela 1.

Tabela 1: Periodicidade das coletas com base no intervalo bimensal entre os meses de outubro de 2006 e agosto de 2007 registrando dia e hora de acordo com a maré.

	OUT- 06	DEZ- 06	FEV- 07	ABR- 07	JUN- 07	AGO- 07
Coleta	01	02	03	04	05	06
Dia	08	02 03	18 19	18	15	31
Maré	0.0	0.4 0.3	0.2 0.1	0.0	0.2	0.2
Horário	11:13	08:19 09:06	11:11 11:56	11:11	10:51	12:36

Foi possível encontrar condição favorável para realizar as coletas 1 hora antes do previsto devido ao rápido recuo da maré. Tal semelhança ocorria também durante a subida da maré, sendo necessária então rapidez em visualizar os locais de presença da espécie e agilidade em retirar cada amostra da colônia.

Para cada coleta foram tomadas 10 amostras de colônias da espécie *Eudistoma vannamei*, totalizando 60 amostras. As colônias estavam dispostas

de várias maneiras e em quantidades variadas (Figura 2), sendo utilizada uma régua para medir o tamanho de cada colônia a partir do maior comprimento observado. Também foram observados coloração, inclinação, posição e presença de outros organismos acompanhantes. As anotações foram feitas com auxílio de uma prancheta de PVC e lapiseira.

Por se tratar de uma espécie incrustante que fica aderida às rochas torna-se complicada a sua retirada, sendo necessário então o uso de luva de algodão especial para evitar possíveis cortes ou irritações ao tocar em algumas espécies de esponjas, e de um raspador de coco, de metal comum, para diminuir os riscos de danos físicos ao retirar partes da colônia.



Figura 2: Disposição da colônia de *Eudistoma vannamei* sob pedra evidenciando sua coloração laranja/ amarelo e a presença de outros organismos.

Cada exemplar foi colocado dentro de saco plástico com água do mar, etiqueta de identificação, e devidamente fechado com liga de borracha deixando ar suficiente no interior do saco para manter a respiração dos organismos. Para evitar que os zoóides contraíssem muito o corpo durante a manipulação, foi adicionado uma pequena quantidade do anestésico Metanosulfonato de Tricaína, um dos únicos anestésicos liberados para o uso em peixes e, com efeito, quase imediato.

Durante a triagem do material os sacos foram abertos possibilitando a respiração dos animais, enquanto cada amostra era limpa com ajuda de pinça

e luva cirúrgicas para retirada de espécies incrustantes (Figura 3). Depois de limpo, cada exemplar era colocado nos sacos plásticos, devidamente fechados, e congelados em freezer antes de ser levada para laboratório.



Figura 3: amostras dentro de sacos plásticos, à esq., e dentro de uma tampa plástica, à dir., durante a triagem do material.

2.3- Análise biológica:

O material foi levado para o Laboratório de Ecologia Animal no Instituto de Ciências do Mar Labomar. As amostras foram descongeladas, e fixadas em formol salino a 4% por um período de 48 horas e posteriormente preservados em etanol 70%. Nesse último processo, os sacos plásticos foram selados para não haver perda do etanol por evaporação e possível perda do material por deterioração ou contaminação por fungos. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, foi feita a análise biológica da espécie com ênfase na maturação gonadal dos zoóides. Os zoóides eram retirados da colônia com ajuda de uma pinça biológica de ponta fina no qual eram feitos cortes na túnica da colônia, abrindo-a e conseguindo então puxar os zoóides para fora. Outros materiais também foram utilizados, como placa de petri e vidro de relógio para separar os zoóides, corante hemalun de Masson para visualizar o contorno e volume das estruturas, glicerina P.A. para visualizar melhor a parte interna e por último, tubos do tipo Eppendorf para guardar os zoóides.

Ao todo foram retirados 10 zoóides por amostra de colônia, observados e descritos quanto ao estágio de maturação das gônadas. Outra característica importante para o evento reprodutivo das ascídias é a visualização da existência de larvas. As mesmas foram identificadas, contadas e descritas quanto à disposição no interior do zoóide e ou na colônia.

Para melhor compreensão sobre a fisiologia do gênero, foi necessária a visualização de alguns caracteres e descrições através de literatura disponível (VAN NAME, 1945; MILLAR, 1971; MILLAR, 1974; MILLAR, 1977; LOTUFO, 2002).

2.4- Análise dos dados:

Os dados obtidos durante as coletas foram passados para planilhas do software Microsoft Office Excel 2003, e analisados por meio de tabelas e gráficos. A classificação dos zoóides quanto ao estágio reprodutivo foi feita com base nas descrições propostas por VAN NAME (1945), no qual os zoóides apresentam gônadas masculinas e femininas representados por ovos e testículos e estão associadas ao trato digestório. Tanto o oviduto quanto o espermiduto acompanham o canal retal através de seus dutos até a cavidade atrial, local de incubação de ovos ou larvas.

A estação reprodutiva pôde ser comparada com trabalhos semelhantes realizados para espécies e localidades diferentes que apresentam variações no ciclo reprodutivo durante o ano com distribuição de ovos e larvas bastante variáveis (MILLAR, 1952; MILLAR, 1954; MILLAR, 1974; YAMAGUCHI, 1975; TURON, 1988; DURANTE, 1994).

As descrições sobre a biologia da espécie foram tomadas a partir dos trabalhos de MILLAR (1971); MILLAR (1977) o qual tiveram grande importância na caracterização de espécies até então não descritas para a época.

3- RESULTADOS

3.1- Morfologia da espécie:

3.1.1- Aspecto externo:

A espécie *Eudistoma vannamei* coletada em Flecheiras é formada por colônias contendo várias cabeças pedunculadas, unidas por uma massa basal fina aderida ao substrato. Cada cabeça media entre 1,0 a 1,6cm de altura, com túnica firme e transparente, livre de espículas, podendo-se visualizar os zoóides de coloração laranja e ou amarela, dependendo da colônia. O pedúnculo opaco possui túnica mais rígida e muitas vezes, é coberta por grande quantidade de sedimento, característica também presente para *Eudistoma carolinense* Van Name, (1945), porém os zoóides não são visíveis.

3.1.2- Estrutura interna:

Os zoóides estão contidos dentro dessas cabeças, medindo entre 3,0 a 15,0mm, podem estar distendidos ou bastante contraídos, e são separados por uma fina membrana tecidual. Cada zoóide é revestido por um manto, que muitas vezes é opaco não permitindo a visualização de alguns órgãos internos. O corpo é dividido em duas regiões, tórax, com cesta branquial contendo três fileiras de fendas, cada uma com cerca de 20 fendas de cada lado, e abdômen, com o trato digestório e órgãos reprodutivos. Em outras espécies do gênero, o número de fileiras permanece o mesmo, mas o de fendas difere com a espécie, como é o caso de *Eudistoma saldanhai* Millar, (1977) com 10 fendas de cada lado. No tórax, encontram-se os sífões, branquial e atrial, responsáveis respectivamente pela absorção de água e partículas em suspensão e pela liberação de dejetos e partículas não assimiladas. As gônadas são hermafroditas, apresentam oviduto e espermiduto, e estão associadas ao trato digestório. Os dutos genitais acompanham o reto, liberando o ovo ou larva para dentro da cavidade atrial, permanecendo incubada até que a cavidade se abra na superfície da túnica liberando a larva para fora da colônia.

3.1.3- Larva:

A larva é ovóide, livre-natante, de coloração amarelo gema com diâmetro bastante considerável em relação ao tamanho do zoóide. Como já citado no início do trabalho, as larvas de ascídias apresentam as quatro características fundamentais dos cordados: notocorda, tubo nervoso dorsal, cauda pós-anal e fendas faríngeas (RUPPERT et al., 2004). O tamanho da cauda é bastante expressivo em relação ao tamanho da larva (Figura 4). Durante as observações, a maioria das larvas foi encontrada na cavidade atrial, porém uma larva foi encontrada próxima das gônadas e outras três fora do zoóide, mas ainda dentro da colônia, fato incomum de acontecer.



Figura 4: Larva de *Eudistoma vannamei* fotografada em microscópio estereoscópico.

3.2- Aspectos Ecológicos:

As colônias de *Eudistoma vannamei* estão distribuídas de várias maneiras em relação ao substrato, sendo encontradas em fendas, poças, sempre evitando exposição da luz. Possuem várias inclinações, horizontais ou verticais, positivas ou negativas, e apresentam uma grande variedade de organismos associados, desde outras espécies de ascídias, como também a presença de esponjas, poliquetas, anfípodas, pequenos ofiuróides e algas.

Esses organismos podem estar sobre a *Eudistoma vannamei*, assim como, foi possível constatar o crescimento dela sobre esponjas.

3.3- Aspectos Reprodutivos:

Durante as coletas foram tomadas 60 amostras de colônia da espécie *Eudistoma vannamei* dos quais apenas 50 puderam ser analisados. Para cada coleta foram retirados 100 zoóides, sendo 10 por colônia, e descritos com base na maturação das gônadas e na presença de larvas, totalizando 500 zoóides observados durante o estudo.

Abaixo, na Tabela 2, está indicado o número de zoóides que durante as observações apresentaram gônadas de qualquer sexo, seu estágio de maturação e presença de larvas. Para as cinco coletas foram identificados 34 zoóides sem gônadas, 126 zoóides com as gônadas em início de maturação, 340 zoóides com as gônadas maduras e a presença de 34 larvas.

Tabela 2: Número de zoóides relacionados com o estágio de maturação gonadal: ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas.

COLETA	DATA	AG	IMG	GM	LARVAS
2	2/12/2006	15	35	50	4
3	18/2/2007	9	28	63	13
4	18/4/2007	3	12	85	9
5	15/6/2007	3	24	73	2
6	31/8/2007	4	27	69	6
Total		34	126	340	34

As gônadas estão situadas na porção basal do corpo do zoóide, na região abdominal, próximas ao trato intestinal e normalmente quando estão maduras, possuem uma coloração castanho-alaranjada bastante acentuada junto à região abdominal. Isso não é verificado no início da maturação permanecendo as gônadas com uma coloração esbranquiçada. Outra característica durante a maturação é a de que o abdômen torna-se mais largo do que o tórax, o tecido do corpo é mais fino, translúcido e fácil de rasgar.

Normalmente, quando não há maturação, o tórax e o abdômen podem ser da mesma largura e o tecido é mais espesso e opaco, dificultando a visualização das gônadas. Zoóides menores são mais fáceis de serem retirados inteiros da colônia, porém zoóides bastante compridos são difíceis de tirar e o manto fino tem mais facilidade de rasgar, não sendo possível retirar a parte abdominal onde se encontram as gônadas.

Foram encontradas 30 larvas se desenvolvendo dentro da cavidade atrial, característica comum para as espécies do gênero *Eudistoma* que incubam ovos e larvas no interior do zoóide. Foram encontradas ainda 1 larva próxima das gônadas e 3 larvas fora do zoóide mais ainda dentro da túnica da colônia, podendo ter ocorrido como um estímulo de proteção garantindo que a larva conseguisse sair da colônia com o estresse da coleta. O tamanho das larvas é bastante considerável em relação ao tamanho do zoóide, são ovais, com cauda pós-anal bastante comprida e estatocisto visível. A maioria tinha o tecido opaco ou leitoso não sendo possível identificar outros órgãos internos em desenvolvimento.

Com base nos dados já apresentados, foi possível estabelecer os percentuais relativos aos estágios de maturação das gônadas e à presença de larvas (Figura 5). A fecundidade de *Eudistoma vannamei* mostrou-se diferente para o intervalo entre dezembro de 2006 e agosto de 2007. O número de zoóides com gônadas maduras durante o período amostrado foi bastante expressivo com valores acima de 50% e pico de 85% em abril. O mesmo não ocorreu para o número de larvas encontradas que não ultrapassou o pico de 13% em fevereiro. Percebeu-se no gráfico que durante o verão ocorreu um aumento quase simultâneo de gônadas maduras e presença de larvas até fevereiro, e em seguida o número de larvas decresceu significativamente, tendo em junho seu menor valor registrado, 2%.

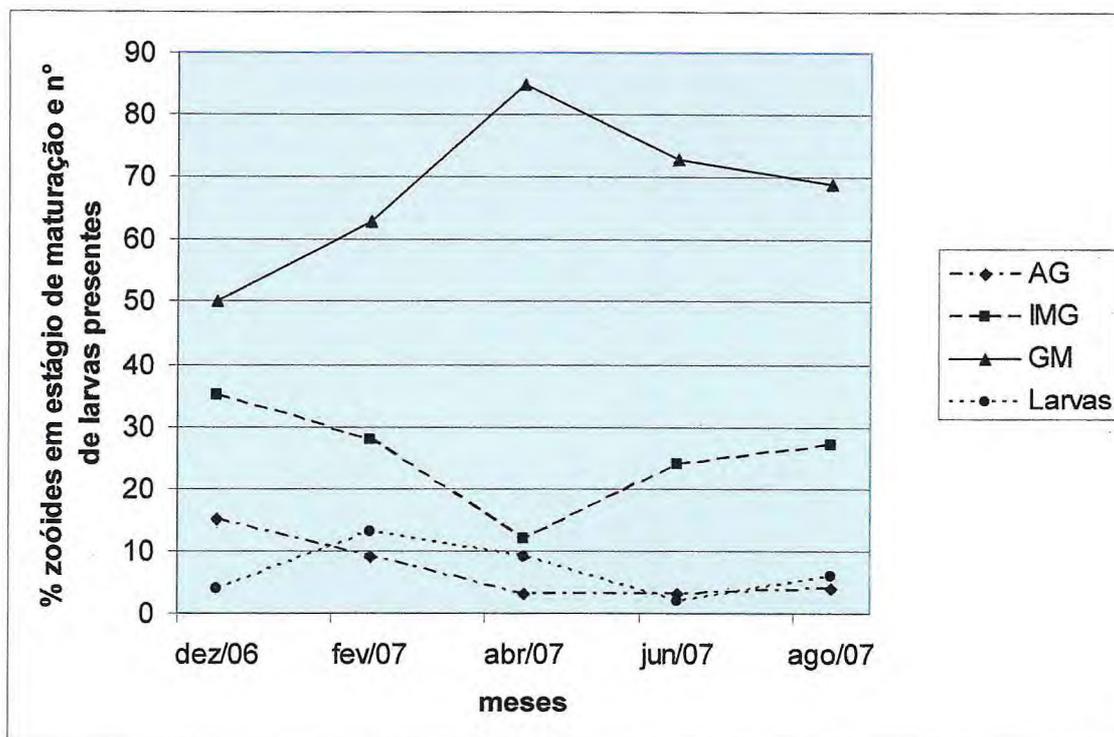


Figura 5: Porcentagem de zoóides em cada estágio de maturação e de larvas de acordo com cada mês de coleta. Ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas.

A relação entre o número de zoóides no início da maturação de suas gônadas e o de zoóides com gônadas maduras mostrou-se inversamente proporcional. No intervalo de dezembro a abril, o primeiro decresce com pico mínimo de 12% e o segundo cresce com pico de 85%, ambos para o mês de abril. Já no intervalo de abril a agosto ocorreu o inverso, o número de zoóides no início da maturação cresce registrando 27% e, o de zoóides com gônadas maduras decresce atingindo 69%, ambos em agosto, o que não foi significativo muito, pois os mesmos durante o mês de dezembro apresentaram valores iniciais mais expressivos, 35% e 50% respectivamente.

Poucos foram os registros de zoóides com ausência de gônadas não ultrapassando os 15% iniciais no mês de dezembro e, com valores mínimos de 3% em abril e junho.

Outra possibilidade utilizada para representar os dados, foi registrar a quantidade de amostras com relação à presença ou não de maturação (Tabela 3). Todas as 50 colônias indicaram presença de zoóides com gônadas maduras, 42 colônias com presença de zoóides no início da maturação das

gônadas, 23 colônias apresentaram indivíduos com ausência de gônadas e 17 amostras com presença de larvas no interior do zoóide ou não.

Tabela 3: Presença ou ausência de maturação por amostra de colônia. Ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas

COLETA	DATA	AG	IMG	GM	LARVAS
2	2/12/2006	5	10	10	3
3	18/2/2007	9	9	10	5
4	18/4/2007	3	5	10	5
5	15/6/2007	3	9	10	2
6	31/8/2007	3	9	10	2
Total		23	42	50	17

As variações destes dados no período de coleta estão apresentadas na Figura 6. A presença de zoóides com gônadas maduras foi a mais significativa, sendo identificada nas 10 colônias coletadas para cada mês.

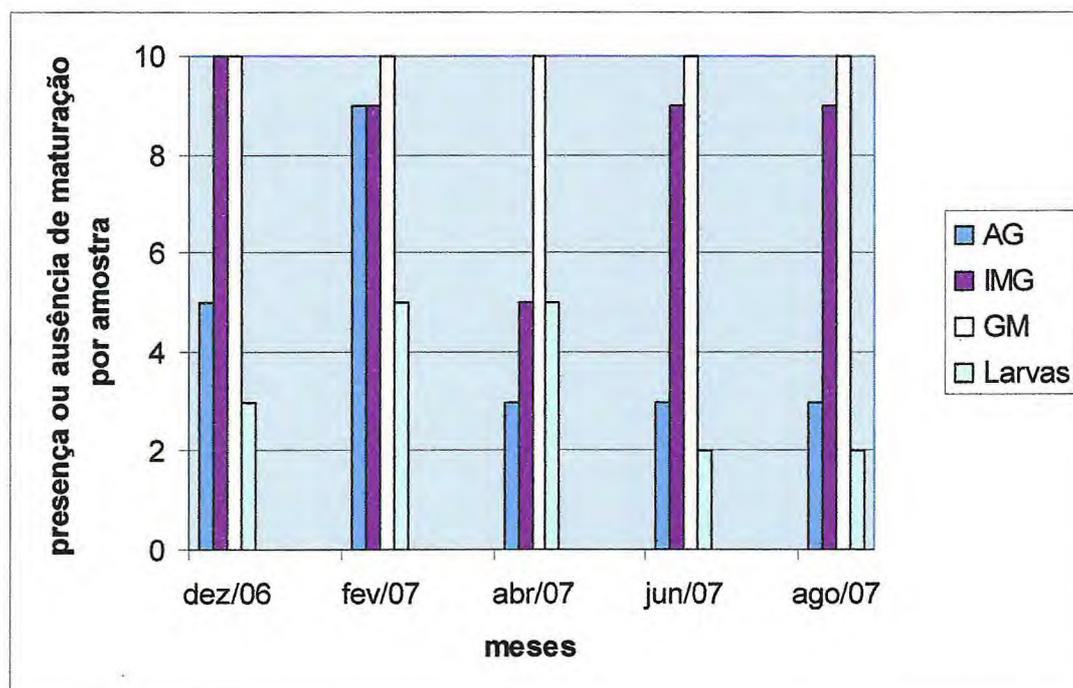


Figura 6: Frequência de colônias com presença ou ausência de maturação em zoóides nos meses do estudo. Ausência de gônadas (AG), início da maturação das gônadas (IMG), gônadas maduras (GM) e presença de larvas

O número de indivíduos em início de maturação teve também grande participação, com maior registro em dezembro, 10 amostras, e menor em abril, 5 amostras. A quantidade de colônias com ausência de gônadas foi mais evidente em fevereiro com 9 colônias e nos meses seguintes de abril, junho e agosto esta característica reduziu-se para apenas 2. Já a presença de larvas foi registrada em fevereiro e abril em 5 colônias e, em junho e agosto apresentaram-se apenas em 2 amostras. Pode-se perceber que a presença de zoóides com gônadas é constante, indicando a reprodução contínua, característica esta de espécies coloniais em regiões tropicais com oscilações ao longo do ano.

4- DISCUSSÃO

Apesar de serem encontradas em diversos ambientes marinhos, as ascídias são particularmente abundantes nas regiões costeiras rasas, podendo tornar-se o grupo dominante em alguns locais (LOTUFO, 1997). Alguns gêneros, como *Eudistoma*, embora não se limitem às regiões quentes, apresentam maior diversidade e abundância nessas regiões (MILLAR, 1971).

Os ecossistemas tropicais são reconhecidos por abrigarem a maior biodiversidade da Terra, e no caso dos ecossistemas marinhos tropicais, o conhecimento sobre essa biodiversidade ainda é considerada insuficiente Migotto (2000), fator este que deve ser modificado, já que o Brasil tem o privilégio do seu litoral possuir a maior costa tipicamente tropical do planeta (LOTUFO e SILVA, 2006).

A espécie *Eudistoma vannamei*, endêmica do litoral nordestino brasileiro (RODRIGUES et al., 1998) foi coletada na praia de Flecheiras, na região entremarés, porém há registro de que Millar (1977) tenha examinado exemplar da espécie coletado a 85m de profundidade.

Embora a maioria dos trabalhos sobre Ascidiacea sejam de cunho taxonômico, com o passar do tempo foi necessário abordar outros aspectos, como ecologia, distribuição geográfica, alimentação, competição, ciclo de vida, reprodução, importância econômica e outros mais, que pudessem oferecer informações significativas a respeito do desenvolvimento das espécies participantes e de suas possíveis contribuições, como é caso dos trabalhos farmacológicos que buscam novas substâncias bioativas, na esperança de encontrar a cura para diversas enfermidades, como o câncer.

O ciclo reprodutivo das ascídias tem sido estudado por diversos autores como Millar (1952, 1954, 1958a, 1971, 1974), Goodbody (1961), Yamaguchi (1975) e, no Brasil, Rocha (1991), proporcionando o acompanhamento das estações reprodutivas ao longo do ano e identificando em que regiões e épocas do ano elas são mais representativas.

A maioria dos trabalhos relaciona o evento reprodutivo com a temperatura da água do mar, já que os espécimes são coletados em regiões mais profundas e dependendo da localidade, a temperatura será determinante

na identificação das épocas de reprodução. Turon (1988) em seu trabalho na região nordeste da Espanha observou, dentre as espécies coloniais encontradas, que *Eudistoma planum* foi visualizada durante todo ano e teve sua máxima atividade reprodutiva nos meses mais quentes. Nesse estudo não foi analisada a temperatura como parâmetro, pois as coletas foram realizadas na baixa-mar quando a maioria das colônias estava exposta a temperatura ambiente. As análises de séries históricas, entretanto, revelam que a temperatura varia muito pouco no litoral do Ceará.

Com relação à estação reprodutiva de *Eudistoma vannamei* durante o período de pesquisa deste trabalho, a mesma apresentou uma distribuição temporal contínua de zoóides em algum estágio de maturação. Os zoóides com gônadas maduras foram os mais representativos, com 340 indivíduos coletados, equivalendo uma participação acima de 50% em todos os meses de coleta e um máximo de 85% em abril. Em seguida, zoóides com gônadas em início de desenvolvimento, 126 indivíduos, com máximo de 35% em dezembro e mínimo de 12% em abril. Os dados parecem apontar que os zoóides que estavam em início de maturação durante o final de ano, dezembro respectivamente, começaram a amadurecer, provavelmente acompanhando o início do verão mesmo em condições de temperatura não tão apropriadas. O evento perdura até abril, quando possivelmente todas tenham alcançado o amadurecimento e tenham agora suas gônadas, voltado à condição de imaturas ou os zoóides tenham se deteriorado devido ao tempo de vida. Então, outros indivíduos em crescimento iniciam o desenvolvimento de suas gônadas como uma forma de reposição.

A observação das larvas é a forma mais utilizada para identificar e acompanhar o ciclo reprodutivo das espécies. *Eudistoma* sp apresentou mais de 75% das colônias contendo larvas, com picos em agosto e setembro para o ano de 1972 (MILLAR, 1974). Já *Eudistoma planum*, apresentou o período de liberação das larvas durante maio e agosto (TURON, 1988).

O mesmo não foi percebido para *Eudistoma vannamei*, que apresentou 34% de amostras com larvas e a maior incidência nos meses de fevereiro e abril. Isso não era esperado para essa época, que é definida pela estação chuvosa e temperaturas amenas, e que não foi verificado para o segundo semestre devido à falta de dados de observação que pudessem completar o

ciclo anual para a espécie. Sabe-se, contudo, que temperaturas muito elevadas podem também inibir a maturação gonadal (MILLAR, 1971).

Quando comparada a proporção de larvas encontradas com o total de zoóides observados, vê-se que o número de larvas não foi tão significativo quanto o esperado. Apenas 6,8% dos zoóides apresentaram larvas, enquanto o número de zoóides maduros correspondia a 68%. Não se sabe ao certo o que poderia ter provocado essa pouca participação das larvas, podendo ter sido causada por diversos fatores, como temperatura, mudança de estágio reprodutivo, época de liberação das larvas não estabelecida, número de exemplares de colônia insuficientes, entre outros.

Turon (1988) cita que a duração do período reprodutivo é muito variável de acordo com a ocorrência das estações. Ele observou que a maioria das espécies da família Polycitoridae encontradas tinha grande variabilidade reprodutiva com boa parte da incubação dos embriões no primeiro semestre do ano, principalmente em maio e junho, durante a primavera do hemisfério norte. No segundo semestre, o número reduziu consideravelmente. A família Didemnidae apresentou um longo período de reprodução com liberação das larvas na primavera e início do verão com maior índice em junho. Já a família Polyclinidae teve seu período reprodutivo com incubação das larvas na estação fria, entre novembro e fevereiro, e muitas das suas espécies desapareceram durante os meses mais quentes.

Outros estudos relacionam o crescimento das colônias com o ciclo reprodutivo das espécies. Yamaguchi (1975) relacionou esses eventos para espécies solitárias e coloniais colonizadas sobre substrato artificial. O crescimento das colônias é bastante rápido com o aumento do número de zoóides em poucas semanas. Segundo o mesmo autor, em *Leptoclinum mitsukurii*, após a colonização e metamorfose das larvas sobre o substrato, em poucos dias a colônia começa a se reproduzir assexuadamente para aumentar o número de zoóides. Esse crescimento é exponencial e em poucas semanas o número já excede 1000 zoóides, 2 semanas no verão e 5 semanas na primavera para essa espécie. *Botrylloides violaceus*, outra espécie colonial, conseguiu exceder 100 zoóides por colônia em 2 semanas, no verão, e 4 semanas, na primavera. A reprodução sexual para essas espécies foi

observada, tendo relação direta com o aumento das colônias sobre os substratos.

Neste trabalho não foi realizada comparação entre o comprimento das colônias e ciclo reprodutivo da mesma forma, mas o tamanho das colônias foi registrado para verificar suas variações durante os intervalos de tempo entre as coletas.

Millar (1952), afirma que a maturidade sexual depende praticamente do tamanho do animal. Em *Ascidiella aspersa*, praticamente todos os indivíduos com 40mm de comprimento estão maduros, com órgãos masculinos e femininos, durante todo o ano. Grupos entre 30-40mm tem 80% de indivíduos maduros com órgãos masculinos durante o ano inteiro, só entre janeiro e junho cerca de 40-60% são maduros com gônadas femininas. Entre 25-30mm, o grupo tem um regular aumento com proporção de espermatozóides entre janeiro e maio quando todos tornam-se maduros. Entre 20-25mm, apresentam o maior aumento em porcentagem de indivíduos maduros, com órgãos masculinos e femininos entre janeiro e junho. *A. aspersa*, ascídia solitária, é caracterizada por ser protândrica, com o espermiduto se formando antes do oviduto.

Analisar o ciclo reprodutivo de Ascidiacea requer uma infinidade de informações que possam servir como base para determinar mais precisamente as variações ocorridas e os fatores que garantam o sucesso reprodutivo das espécies. Por isso, também é necessário avaliar os eventos ecológicos que acontecem paralelamente à reprodução. Assim como os demais invertebrados marinhos, as ascídias competem por espaço, luz, nutriente e necessitam de defesas especiais contra predadores (VERVOORT et al., 1998). As ascídias sofrem pouca predação por peixes e ocasionalmente por ouriços do mar, a maior incidência de predação inclui moluscos (MILLAR, 1971). É possível encontrar defesas físicas, como espículas e rigidez da túnica, e defesas químicas, como pH ácido e metabólitos secundários bioativos (VERVOORT et al., 1998; TARJUELO et al., 2002) presentes de acordo com cada espécie.

Ainda não existem trabalhos sobre os possíveis predadores para *Eudistoma vannamei*, mas existe evidência da presença de metabólitos bioativos. Jimenez et al., (2003) pôde comprovar que dentre as espécies coletadas no nordeste brasileiro para o seu trabalho, os extratos de *Eudistoma*

vannamei apresentou a maior atividade em três dos quatro ensaios realizados, indicando a presença de compostos citotóxicos nessa espécie.

As preferências alimentares são outros requisitos pouco investigados para as ascídias, principalmente para *Eudistoma vannamei*, sem nenhum registro. A análise dos ácidos graxos pode indicar aspectos relacionados à fisiologia dos animais e suas preferências tróficas, pois grande parte de suas moléculas são conservadas após a digestão (GRAEVE et al., 1997).

5- CONCLUSÕES

Os dados obtidos sugerem um período reprodutivo contínuo para *Eudistoma vannamei*, com um pico de atividade durante o primeiro semestre do ano. Com relação ao total de zoóides coletados, zoóides com gônadas maduras foram os mais representativos, seguidos de zoóides com gônadas no início da maturação, zoóides com ausência de gônadas. A presença de larvas foi um bom indício da ocorrência do ciclo reprodutivo da espécie.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIS, A.R.; WRIGHT, A.E. Interspecific differences in fouling of two congeneric ascidians (*Eudistoma olivaceum* and *E. capsulatum*): is surface acidity an effective defense?. **Marine Biology**, v.102,p. 491-497, 1989.

DURANTE, K.M.; SEBENS, K.P. Reproductive ecology of the ascidians *Molgula citrina* Alder & Hancock, 1848 and *Aplidium glabrum* (Verrill, 1871) from the gulf of Maine, U.S.A. **OPHELIA**, v. 39, n.1, p. 1-21, 1994.

GOODBODY, I. Continuous breeding in three species of tropical ascidian. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v.136, p.403-409, 1961.

GRAEVE, M.; KATTNER, G.; PIEPENBURG, D. Lipids in Artic benthos: does the fatty acid and alcohol composition reflect feeding and trofic interactions?. **Polar Biology**, v.18, p. 53-61,1997.

HARVELL, C.D.; FENICAL, W. Chemical and structural defenses of Caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.); intracolony localization of defense. **Limnology and Oceanography**, v.34, p.382-389, 1989.

HURLBUT, C.J. Larval release and Supply Predict Temporal Variation in Settlement of a Colonial Ascidian. **Marine Ecology Progress Series**, v. 80, p.215-219, 1992.

JIMENEZ, P.C., et al. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.287, p. 93-101, 2003.

JIMENEZ, P.C., et al. *In press*. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata, Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology. A**, 2007.

LÓPEZ-LEGENTIL, S. et al. Qualitative variation of alkaloids in color morphs of *Cystodytes* (Ascidiacea). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1107-1119, 2005a.

LOTUFO, T.M.C. **Ecologia das ascídias da Baía de Santos: período reprodutivo, crescimento e aspectos sucessionais**, (Dissertação de Mestrado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 113p, 1997.

LOTUFG, T.M.C. **Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro**, (Tese de Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 183p, 2002.

LOTUFO, T.M.C.; SILVA, A.M.B. Ascidiacea. *In*: Matthews-Cascon, H.M.C. & Lotufo, T.M.C. Orgs. **Biota Marinha da Costa Oeste do Ceará**. Ministério do Meio Ambiente, p. 221-247, 2006.

MILLAR, R.H. The annual growth and reproductive cycle in four ascidians. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.31, p.41-61, 1952.

MILLAR, R.H. The annual growth and reproductive cycle of the ascidian *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.33, p.33-48, 1954.

MILLAR, R.H. The breeding season of some littoral ascidians in Scottish Waters. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.37, p. 649-652, 1958a.

MILLAR, R.H. The biology of ascidians. **Advances in Marine Biology**, v. 9, p. 1-100, 1971.

MILLAR, R.H. A note on the breeding season of three ascidians on Coral Reefs at Galeta in the Caribbean Sea. **Marine Biology**, v.28, p. 127-129, 1974.

MILLAR, R.H. Ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the Northern and Northeastern Brazilian Shelf. **Journal of Natural History**, v.11, p.169-223, 1977.

MIGOTTO, A.E. Avaliação do estado de conhecimento da diversidade de invertebrados marinhos do Brasil. Avaliação do estado de conhecimento da diversidade biológica do Brasil. Ministério do Meio Ambiente, 2000. 75p.

ROCHA, R.M. Replacement of the compound ascidian species in a southeastern Brazilian Fouling Community. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v.39, n.2, p. 141-153, 1991.

RODRIGUES, S.A.; ROCHA, R.M.; LOTUFO, T.M.C. **Guia ilustrado para a identificação das ascídias do Estado de São Paulo**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 1 ed. São Paulo: Parma, 1998. 190p.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2004.

SMITH, A.; MORAIS, J.O. Estudos preliminares sobre a geologia ambiental costeira do estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v.23, p. 85-96, 1984.

STOECKER, D. Relationships between chemical defense and ecology in benthic ascidians. **Marine Ecology Progress Series**, v.3, p. 257-265, 1980.

TARJUELO, I., et al. Defence mechanisms of adults and larvae of marine invertebrates: patterns of toxicity and palatability in colonial ascidians. **Marine Ecology Progress Series**, v.235, p.103-115, 2002.

TURON, X. The ascidians of Tossa de Mar (NE of Spain) II. Biological cycles of the colonial species. **Cahiers de Biologie Marine**, v.29, p.207-418, 1988.

VAN NAME, W.G. The North and South American Ascidians. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.84, p.177-129, 1945.

VERVOORT, H.C.; PAWLIK, J.R.; FENICAL, W. Chemical defense of the Caribbean ascidian *Didemnum conchyliatum*. **Marine Ecology Progress Series**, v.164, p.221-228, 1998.

YAMAGUCHI, M. Growth and reproductive cycles of the marine fouling ascidians *Ciona intestinales*, *Styela plicata*, *Botrylloides violaceus*, and *Leptoclinum mitsukurii* at Aburatsubo-Moroiso Inlet (Central Japan). **Marine Biology**, v.29, p.253-259, 1975.