

USO DE SEQUÊNCIAS DO mtDNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM EXEMPLAR DE GOLFINHO ROTADOR, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), ENCALHADO NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL

Identifying a spinner dolphin, *Stenella longirostris* (Gray, 1828), stranded in Bahia State, Brazil, using mtDNA sequences

Manuel Antonio A. Furtado-Neto¹, Everaldo L. Queiroz², Alexandre Novaes Zerbini³, Steven M. Carr⁴

RESUMO

Um filhote de golfinho do gênero *Stenella* foi encontrado morto na praia de Stella Mares (13°00'30"S e 38°27'20"W), Salvador-Bahia, em 7 de Junho de 1995. As características externas desse indivíduo indicavam tratar-se de um golfinho-rotador, *Stenella longirostris*. Entretanto, a possibilidade do exemplar corresponder a um golfinho de Clymene, *S. clymene*, não pode ser descartada em consequência do desconhecimento dos padrões morfológicos e de coloração de exemplares juvenis desta espécie os quais são muito semelhantes aos de *S. longirostris*. Para confirmar a identidade do exemplar da Bahia, um fragmento de 401 pares de bases nitrogenadas do gene do citocromo b do DNA mitocondrial (mtDNA) foi amplificado e sequenciado a partir de amostra do tecido muscular deste indivíduo. Sequências de DNA de 8 espécies da família Delphinidae (*Stenella attenuata*, *S. frontalis*, *S. longirostris*, *Steno bredanensis*, *Sotalia fluviatilis*, *Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus* e *Lagenorhynchus acutus*) foram obtidas de amostras de tecidos ou do banco de genes NCBI GenBank, e usadas para realizar uma análise filogenética tendo a baleia azul (*Balaenoptera musculus*) como grupo externo. Foram observadas duas diferenças de pares de bases nitrogenadas entre a sequência de mtDNA do animal da Bahia e a sequência de *S. longirostris* proveniente de Fernando de Noronha, e nove diferenças para um indivíduo da mesma espécie do Atlântico Norte, enquanto 17 diferenças foram reportadas para *S. clymene*. Estes resultados confirmam que o exemplar da Bahia pertence a espécie *S. longirostris*. Análise filogenética usando máxima parsimônia deram suporte ao resultado. Este trabalho constitui um exemplo de como genética molecular pode ser utilizada para resolver problemas de identificação de mamíferos marinhos.

Palavras-chaves: *Stenella longirostris*, DNA mitocondrial, identificação, genética molecular, Estado da Bahia.

ABSTRACT

On June 7th 1995, a young dolphin (genus *Stenella*) was found dead at Stella Mares beach (13°00'30"S; 38°27'20"W), Salvador-Bahia. External characteristics of this individual suggested that it should be a spinner dolphin, *Stenella longirostris*. However, because morphometry and color patterns of young *Clymene's* dolphin, *S. clymene*, are very similar to *S. longirostris* the chances of this dolphin being a *Clymene's* could not be dismissed. In an attempt to confirm the identification of this animal, a 401-bp fragment of the cytochrome b mitochondrial DNA (mtDNA) gene was amplified and sequenced from muscle tissue. DNA sequences from 8 other Delphinidae species (*Stenella attenuata*, *S. frontalis*, *S. longirostris*, *Steno bredanensis*, *Sotalia fluviatilis*, *Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus* and *Lagenorhynchus acutus*) were obtained from fresh tissue or from the NCBI GenBank and were used to perform a phylogenetic analysis with the blue whale (*Balaenoptera musculus*) sequence as an outgroup. Two base pairs substitutions were observed between the mtDNA sequence of the unidentified individual and the sequence of a *S. longirostris* from Fernando de Noronha Island, and nine differences were found between it and a same species of dolphin from North Atlantic, while 17 substitutions were reported between this dolphin and *S. clymene*. These results confirm that the dolphin from Bahia is a spinner dolphin. Phylogenetic analysis using maximum parsimony supported the results. This paper is an example of how molecular genetics can be useful to solve problems of identification of marine mammals.

Key words: *Stenella longirostris*, mitochondrial DNA, identification, molecular genetics, Bahia State (Brazil).

¹ Pesquisador do Grupo de Estudo de Cetáceos do Ceará (GECC), Laboratório de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição 3207, Fortaleza, 60165-081 e bolsista de Doutorado da Canadian International Development Agency (CIDA), na Memorial University of Newfoundland, Canadá.

² Professor do Instituto de Biologia e pesquisador do Grupo de Estudo de Cetáceos da Bahia (GECET), Universidade Federal da Bahia.

³ Bolsista de Mestrado do CNPq, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

⁴ Associate Professor, Department of Biology, Memorial University of Newfoundland, Canadá.

INTRODUÇÃO

Genética molecular é uma ciência nova que tem despertado interesse de pesquisadores de diversas áreas da Biologia por oferecer soluções rápidas e precisas a diferentes problemas biológicos. A partir do advento da *polymerase chain reaction*, ou PCR (Mullis & Faloona, 1987), que permitiu a cópia ou amplificação *in vitro* de genes, sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) têm sido cada vez mais usadas em estudos de evolução, genética de populações, e para identificação de organismos a nível de espécie.

Trabalhos recentes têm relatado a utilização de sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) para identificação de cetáceos. Baker & Palumbi (1994) e Baker *et al.* (1996) verificaram que mercados do Japão e da Coreia comercializavam ilegalmente carne de 5 espécies de baleias (subordem Mysticeti) e 4 espécies de golfinhos (subordem Odontoceti), desrespeitando a legislação internacional de proteção a estes animais. A constatação desta atividade ilegal foi baseada em sequências de nucleotídeos da região controle do mtDNA de amostras de carne comercializadas livremente. Henshaw *et al.* (1997) utilizaram sequências do gene da prolina do ácido ribonucleico (RNA) e da região controle do mtDNA para identificar 11 indivíduos da família Ziphiidae pertencentes a 3 espécies.

Encalhes de pequenos cetáceos são frequentes na costa do Nordeste do Brasil, tendo sido registrados em vários estados (*e.g.* Alves-Júnior *et al.*, 1996). Um filhote de golfinho do gênero *Stenella* foi encontrado morto na praia de Stella Maris (13°00'30"S e 38°27'20"W), Salvador, Bahia em 7 de Junho de 1995. As características externas desse indivíduo indicavam tratar-se de um golfinho-rotador, *Stenella longirostris* (Gray, 1828). Entretanto, a possibilidade do exemplar corresponder a um golfinho-de-Clymene, *S. clymene* (Gray, 1846) não pode ser descartada em consequência do desconhecimento dos padrões de variação morfológicos e de coloração de exemplares juvenis desta espécie os quais são muito semelhantes aos de *S. longirostris*. Reis & Queiroz (1994) haviam registrado a ocorrência de *S. clymene* para o litoral norte da Bahia, mas até então *S. longirostris* não havia sido registrado para o estado. O golfinho-rotador tem distribuição circumblobal em regiões tropicais e subtropicais (Perrin & Gilpatrick Jr., 1994). A espécie aparenta ser comum no Oceano Atlântico Sul-ocidental. Avistagens em águas oceânicas foram reportadas para o Nordeste do Brasil por Best *et al.* (1986) e Vaske-Júnior *et al.* (1994), porém nessa região os golfinhos-rotadores são frequentemente observados próximos a ilhas oceânicas como o Atol das Rocas e o Arquipélago de Fernando de Noronha (*e.g.* Lodi & Fiori, 1987; Silva-Júnior *et al.*, 1996). *S. longirostris* tem sido também observado mais ao sul, na costa do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná

(Daniel *et al.*, 1992; Secchi & Siciliano, 1995; Zerbini *et al.*, 1996). Um exemplar acidentalmente capturado em redes de deriva no litoral do Rio Grande do Sul representa o registro mais meridional da espécie no Oceano Atlântico Sul-ocidental (Zerbini & Kotas, com. pes.). O golfinho-de-Clymene é endêmico do Oceano Atlântico e apresenta distribuição semelhante à do golfinho-rotador (Perrin & Mead, 1994). Ocorrências de *S. clymene* no litoral do Brasil são mais raras. Alguns encalhes foram registrados para os estados do Ceará (Alves-Júnior *et al.*, 1996), Alagoas (Fragoso *et al.*, 1994), Bahia (Reis & Queiroz, 1994) e Santa Catarina (Simões-Lopes *et al.*, 1994). Uma provável avistagem foi reportada por Zerbini *et al.* (1996) no litoral de Santa Catarina. Perrin & Mead (1994) e Perrin & Gilpatrick Jr. (1994) enfatizam a semelhança dos padrões de coloração das duas espécies, porém demonstram que ambas podem ser facilmente diferenciadas quando exemplares adultos vivos ou frescos são examinados. Filhotes ou indivíduos juvenis são mais difíceis de distinguir porque os padrões de coloração de *S. clymene* são pouco conhecidos e não estão ainda bem definidos nestas fases do desenvolvimento.

Para confirmar a identidade do indivíduo do gênero *Stenella* encontrado na Bahia, técnicas de genética molecular foram utilizadas para comparar sequências do mtDNA do animal em questão com sequências de mtDNA de oito espécies de golfinhos da família Delphinidae.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Coleta e Transporte de Amostras: um pedaço de tecido muscular com 1cm³ do filhote de golfinho encalhado morto na Bahia em 7 junho de 1995 foi coletada por membros do Grupo de Estudo de Cetáceos da Bahia (GECET) e acondicionada em freezer. Amostras de tecido de indivíduos das espécies *Sotalia fluviatilis*, *Steno bredanensis*, e *Stenella frontalis* foram coletadas por membros do Grupo de Estudo de Cetáceos do Ceará (GECC) durante o anos de 1995 e 1996. Amostra de tecido de *Stenella longirostris* do Arquipélago de Fernando de Noronha foi fornecida pelo Oceanógrafo José Martins da Silva Júnior., do projeto Golfinho Rotador, em abril de 1997. Amostras de tecido das espécies *Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus* e *Lagenorhynchus acutus* foram cedidas pelo Dr. Jon Lien, do Whale Research Group da Memorial University of Newfoundland, Canadá, em maio de 1995. As amostras coletadas no Brasil foram acondicionadas em solução de dimetil sulfoxido (DMSO) a 25%, em NaCl 6M para transporte para o Laboratório de Genética, Evolução e Sistemática Molecular (GEMS Lab.) da Memorial University, sob permissão número AH.1996.114 do Ministério da Agricultura do Canadá.

b) Isolamento do DNA: DNA mitocondrial foi isolado do tecido muscular utilizando o método de extração pelo ácido guanidínio e tiosulfato-fenol-clorofórmio adaptado de Chomczynski & Sacchi (1987). DNA foi extraído com álcool isoamil-clorofórmio, precipitado com isopropanol, lavado com etanol a 75% e resuspenso em 50µl de água destilada.

c) Amplificação do DNA: O gene do citocromo b do DNA mitocondrial foi amplificado por PCR (*polymerase chain reaction*) usando os primers L14724 (5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3') e H15149 (5'-GCCCCCTCAGAATGATATTGTCTCA-3') (Irwin *et al.*, 1991). As amplificações foram realizadas em reações individuais de 100µl, cada uma contendo: 10µl de tampão de Amplificação (67mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.96 mM HCl, 9.94 mM β-mercaptoethanol); 2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0.4µM de cada primer, e duas unidades da enzima *Amplitaq*TM DNA Polymerase (Perkin-Elmer Cetus), e 2 µl da solução de mtDNA isolado anteriormente. As condições para PCR em um Thermal Cycler da Perkin Elmer Cetus modelo 480, foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos consistindo de 93°C por 1 minuto (desnaturação), 40°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos (ligação), 72°C por 2 minutos (extensão), e uma etapa final de 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose NuSieve a 2%, para confirmar a obtenção do produto amplificado.

d) Purificação do DNA: O produto amplificado foi purificado usando o sistema de purificação da Wizard (Promega Corp., Madison, USA) seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado através de um Fluorômetro modelo TKO 100 (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA). As concentrações de DNA (ng/µl) foram obtidas usando solução de fluorocromo bis-benzimide-zole (Hoechst 33258).

e) Sequenciamento do DNA. Sequências de 401 pares de bases nitrogenadas do gene do citocromo b do mtDNA de sete espécies da família Delphinidae: *Stenella frontalis*, *S. longirostris*, *Steno bredanensis*, *Sotalia fluviatilis*, *Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus* e *Lagenorhynchus acutus*, foram obtidas utilizando uma máquina automática sequenciadora de DNA modelo ABI 373A da Applied Biosystems, Inc.). Amostras foram eluídas em gels de poliácridamida a 6%, e eletroforeses foram realizadas a 32 Watts durante 8 horas.

f) Análise filogenética: Análise filogenética pelo método de procura heurística e máxima parsimônia foram realizadas utilizando o programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versão 3.1.1 (Swofford, 1993), com o objetivo de verificar a proximidade genética entre as espécies. Às sequên-

cias obtidas por sequenciamento automático foram acrescentadas mais duas sequências de espécies do gênero *Stenella* e a da baleia azul (*Balaenoptera musculus*), visando construir um banco de dados para análise. As sequências do gene do citocromo b do mtDNA de *S. attenuata* e *S. longirostris* são de Arnason & Gullberg (1994) e da *B. musculus* de Arnason e Gullberg (1993), e foram obtidas no Banco Genético (GenBank) do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA) via internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os códigos de acesso a estas sequências são X92525 para *S. attenuata*, X92524 para *S. longirostris*, e X72204 para *B. musculus*. Análise de *bootstrap* para 300 replicantes foram realizadas usando PAUP 3.1.1., considerando cada transversão (substituição de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa) três vezes mais pesada que uma transição (substituição de uma purina por outra purina, ou de uma pirimidina por outra pirimidina) (Hillis *et al.*, 1996). Uma matriz de distância genética baseada no número de diferenças entre pares de bases nitrogenadas das sequências de diferentes espécies foi construída seguindo o modelo de Henshaw *et al.* (1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências de 401 pares de bases nitrogenadas do gene do citocromo b do DNA mitocondrial de 11 espécies de cetáceos obtidas por sequenciamento automático e do NCBI GenBank, são mostradas na Figura 1. A matriz de distância genética, considerando o número absoluto de diferença de pares de base entre espécies é mostrada na Tabela I.

A espécie que apresentou mais similaridade genética com o animal não identificado (*Stenella* sp.) foi *S. longirostris*. Foram detectadas apenas duas diferenças de bases nitrogenadas entre a sequência do animal da Bahia e a sequência de DNA de um exemplar de golfinho-rotador de Fernando de Noronha, (tabela I) o que equivale a uma similaridade de 99,995% entre os dois indivíduos. Foi também observada uma diferença de nove bases nitrogenadas entre a sequência do golfinho da Bahia e a de *S. longirostris* do Atlântico Norte obtida por Arnason & Gullberg (1994). Este valor, apesar de ser o maior registrado entre o exemplar da Bahia e o de Fernando de Noronha, está de acordo com o critério usado por Henshaw *et al.* (1997), segundo o qual diferenças de 10 ou menos bases nitrogenadas confirmavam a identificação de um indivíduo da mesma espécie.

A análise filogenética pelo método de procura heurística e máxima parsimônia realizadas utilizando o programa PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993), identificou quatro grupos monofiléticos dentro da família Delphinidae (figura 2). Um grupo monofilético é for-

B.musculus	M	T	N	I	R	K	T	H	P	L	I	K	I	I	N	15
L.acutus	atg	acc	aac	atc	cga	aaa	aca	cac	cca	cta	ata	aaa	atc	atc	aac	45
S.fluviatilt	
S.bredanens	c..	..t	
S.attenuata	c..	..t	
S.frontalis	c..	..t	
S.longi-ANt	c..	..t	
S.longi-FN	c..	..t	
Stenella.sp	c..	..t	
D.delphis	c..	..t	
T.truncatus	c..	..t	
B.musculus	D	A	F	I	D	L	P	T	P	S	N	I	S	S	*	30
L.acutus	gat	gca	ttc	att	gat	ctc	cct	acc	cca	tca	aac	atc	tcc	tca	tga	90
S.fluviatil	..cc	t.a	...	t..t	
S.bredanens	a.cc	..a	..c	..tc	..y	
S.attenuata	..cc	..g	..c	..ttt	
S.frontalis	..ca	..c	..tt	..tt	
S.longi-AN	..cc	..ct	..t	..tt	
S.longi-FN	..ca	..ct	..t	..tt	
Stenella.sp	..ca	..ct	..t	..tt	
D.delphis	..ca	..c	..tt	..tt	
T.truncatus	..y	..gc	..y	..a	..c	..tt	..tt	
B.musculus	*	N	F	G	S	L	L	G	L	C	L	I	V	Q	I	45
L.acutus	tga	aac	ttc	ggc	tcc	cta	ctc	ggc	ctc	tgc	tta	att	gta	caa	atc	135
S.fluviatilt	..ta	a..	
S.bredanenst	..t	..ta	c..	...	a..	
S.attenuatat	..t	..t	t..	..a	c..	...	a..	
S.frontalist	..t	..t	t..	..a	c..	...	a..	
S.longi-ANt	..t	..t	t..	..at	...	c..	...	a..	
S.longi-FNt	..t	..t	t..	..at	...	c..	...	a..	
Stenella.spt	..t	..t	t..	..at	...	c..	...	a..	
D.delphist	..t	..t	t..	..a	c..	...	a..	
T.truncatust	..t	..t	t..	..a	c..	...	a..	
B.musculus	L	T	G	L	F	L	A	I	H	Y	T	P	D	T	I	60
L.acutus	cta	aca	ggc	cta	ttc	cta	gca	ata	cac	tat	aca	cca	gac	aca	ata	180
S.fluviatilt	t..	..tcc	tc.	
S.bredanenst	t..	..tcc	tc.	
S.attenuataa	t..	..tt	..c	..gc	tc.	
S.frontalisa	t..	..tt	..c	..gc	tc.	
S.longi-ANtt	..c	..gc	tc.	
S.longi-FNt	t..	..tt	..c	..gc	tc.	
Stenella.spt	t..	..tt	..c	..gc	tc.	
D.delphisatt	..c	..gt	..c	tc.	
T.truncatusa	t..t	..c	..gc	tc.	

(Continua)

Figura 1 - Variação entre seqüências de 401 pares de bases nitrogenadas do gene do citocromo b do DNA mitocondrial de 8 espécies de golfinhos da família Delphinidae *Stenella attenuata*, *S. frontalis*, *S. longirostris*, de Fernando de Noronha (*S.long-FN*), do Atlântico Norte (*S.long-AN*) *Steno bredanensis*, (*S.bredanens*), *Sotalia fluviatilis* (*S.fluviatil*), *Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus* e *Lagenorhynchus acutus*, do exemplar não identificado (*Stenella* sp.) e da baleia azul (*Balaenoptera musculus*). Os pontos indicam que os nucleotídeos são idênticos aqueles da primeira seqüência, exceto quando indicado pelas letras a (adenina), t (timina), c (citosina), g (guanina). Polimorfismo em algumas posições são indicados por códigos da *International Union of Biochemists* (IUB): r = a/g; y = c/t; w = a/t; k = g/t; s = c/g; m = a/c. As seqüências de aminoácidos geradas a partir das seqüências de DNA são mostradas na primeira linha de acordo com o código da IUB de uma letra. Números adjacentes a primeira e a segunda linhas indicam respectivamente as posições dos aminoácidos na seqüência da proteína e dos nucleotídeos na seqüência de mtDNA.

	T	A	F	S	S	V	T	H	I	C	R	D	V	N	Y	75
B.musculus	acc	gcc	ttc	tca	tca	gtc	aca	cat	att	tgc	cga	gac	gta	aac	tat	225
L.acutus	..tt	g..	..c	..c	..tc	
S.fluviatil	..y	..t	..t	g..	..c	..c	..tc	
S.bredanens	..y	..t	..t	g..	..c	..c	..tc	
S.attenuata	..t	..t	g..	..c	..cc	
S.frontalis	..t	..t	g..	..c	..cc	
S.longi-AN	..t	..t	g..	..c	..cc	
S.longi-FN	..t	..t	g..	..c	..cc	
Stenella.sp	..t	..t	g..	..c	..cc	
D.delphis	..t	..t	g..	..c	..cc	
T.truncatus	..t	..t	g..	..c	..cc	
	G	*	V	I	R	Y	L	H	A	N	G	A	S	I	F	90
B.musculus	ggc	tga	ggt	att	cgg	tac	tta	cat	gca	aac	gga	gcc	tcc	ata	ttc	270
L.acutus	t.c	..c	..c	..tt	..t	
S.fluviatil	t.c	..c	..c	..tt	
S.bredanens	t.c	..c	..c	..tt	
S.attenuata	t.c	..c	..c	..tt	
S.frontalis	t.c	..c	..c	..tt	
S.longi-AN	t..	..c	..c	..t	c..t	
S.longi-FN	t..	..c	..c	..t	c..t	
Stenella.sp	t..	..c	..c	..t	c..t	
D.delphis	t.c	..c	..c	..tt	
T.truncatus	t.c	..c	..c	..t	c..	..ct	
	F	I	C	L	Y	A	H	M	G	R	G	L	Y	Y	G	105
B.musculus	ttc	atc	tgc	ctc	tac	gcc	cac	atg	gga	cga	ggt	cta	tac	tac	ggc	315
L.acutustct	..c	t..t	...	
S.fluviatiltct	..ct	...	
S.bredanenstt	..tt	..ct	..t	...	
S.attenuatat	..att	..t	..ct	...	
S.frontalisatt	..t	..ct	...	
S.longi-ANat	..c	..gt	...	
S.longi-FNakt	..c	..gt	...	
Stenella.spakt	..c	..gt	...	
D.delphist	..att	..t	..ct	...	
T.truncatust	..att	..t	..ct	..t	
	S	H	A	F	R	E	T	*	N	I	G	V	I	L	L	120
B.musculus	tcc	cac	gct	ttt	cga	gaa	aca	tga	aat	att	gga	ggt	att	cta	cta	360
L.acutus	...	t.t	ata	..c	..ac	..t	..a	c..	
S.fluviatil	..t	t.t	ata	..c	..gcc	..a	c.c	..c	...	
S.bredanens	..t	t.t	ata	..c	..ac	..c	..c	..a	c.c	
S.attenuata	..t	t..	ata	..c	..act	..a	c.c	
S.frontalis	..t	t.t	ata	..c	..act	..a	c.c	t..	...	
S.longi-AN	...	t.t	ata	..c	..act	..g	c.c	
S.longi-FN	...	t.t	ata	..c	..act	..t	c.c	..t	...	
Stenella.sp	...	t.t	ata	..c	..act	..a	c.c	
D.delphis	..t	t.t	atg	..c	..act	..a	c.c	t..	...	
T.truncatus	..t	t.t	ata	..c	..act	..a	c.c	t..	...	
	F	T	V	I	A	T	A	F	V	G	Y	V	L			133
B.musculus	ttc	acg	ggt	ata	gcc	act	gca	ttc	gta	ggc	tac	gtc	ctg	cc		401
L.acutus	..a	..aca	..		
S.fluviatil	c.a	..a	..cra	..		
S.bredanens	c.a	..a	..cta	..		
S.attenuata	..a	..a	..ctt	..		
S.frontalis	c.a	..a	a..t	..		
S.longi-AN	..a	..a	..ca	..		
S.longi-FN	..a	..a	..ca	..		
Stenella.sp	..a	..a	..ca	..		
D.delphis	c.a	..a	..ca	..		
T.truncatus	..a	..a	..ca	..		

Tabela I - Matriz da distância genética com base no número absoluto de diferenças de pares de bases nitrogenadas para 7 espécies de golfinhos da família Delphinidae, 2 indivíduos da espécie *S. longirostris* de diferentes procedências (AN = Atlântico Norte; FN = Fernando de Noronha), um indivíduo do gênero *Stenella*, e para baleia azul. O exemplar não identificado da Bahia é referido como *Stenella* sp.

Species	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1. <i>Balaenoptera musculus</i>	62	61	57	59	51	59	56	62	62	51	-
2. <i>Lagenorhynchus acutus</i>	39	33	34	36	38	37	34	31	30	-	
3. <i>Sotalia fluviatilis</i>	31	24	25	27	34	22	24	19	-		
4. <i>Steno bredanensis</i>	33	27	30	32	37	27	27	-			
5. <i>Stenella attenuata</i>	12	10	15	17	22	11	-				
6. <i>Stenella frontalis</i>	14	8	13	15	20	-					
7. <i>Stenella longirostris</i> - AN	24	18	9	10	-						
8. <i>Stenella longirostris</i> - FN	20	16	2	-							
9. <i>Stenella</i> sp.	17	15	-								
10. <i>Delphinus delphis</i>	13	-									
11. <i>Tursiops truncatus</i>	-										

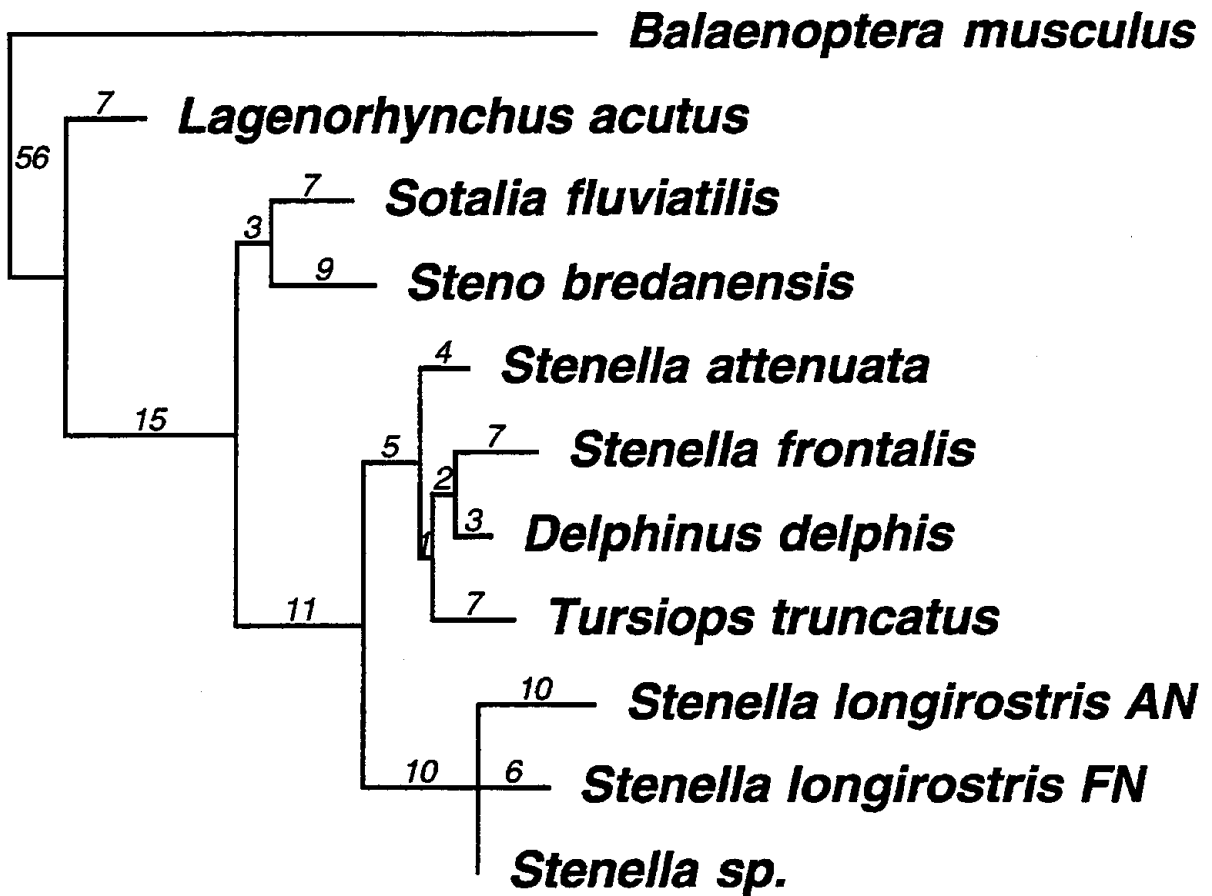


Figura 2 - Árvore filogenética obtida por procura heurística e máxima parsimônia com base em sequências de 401 pares de bases nitrogenadas do gene do citocromo b do mtDNA de 9 espécies de cetáceos, usando o programa PAUP 3.1.1. A baleia azul foi escolhida como grupo externo para a análise por pertencer a subordem mais próxima evolutivamente aos golfinhos. Cada transversão foi considerada três vezes mais forte que uma transição (Tv:Ts/3:1). Os números mostrados representam os valores ponderados das diferenças em números de substituições de nucleotídeos entre as espécies.

mado por espécies geneticamente próximas e que possuem um ancestral comum (Wiley, 1981). O primeiro grupo é formado apenas pela espécie *L. acutus*, um segundo grupo é constituído pelas duas espécies da subfamília *Steninae* (*S. bredanensis* e *S. fluviatilis*), o terceiro por *S. attenuata*, *S. frontalis*, *D. delphis* e *T. truncatus*, e o último formado pelos dois exemplares de *S. longirostris* (de Fernando de Noronha e do Atlântico Norte) e pelo animal da Bahia.

A análise de *bootstrap* usando o critério de máxima parsimônia apresentou um valor de 83% para o grupo constituído pelos golfinhos-rotadores e pelo exemplar da Bahia (figura 3), significando que este grupo está presente em mais da metade de todos os rearranjos testados nos 300 replicantes da análise. Valores acima de 50% são considerados confiáveis neste tipo de análise (Swofford, 1993). Valores de *bootstrap* entre 80% e 85% foram encontrados por Baker *et al.* (1996) quando reconstituição filogenética semelhante foi realizada com objetivo de identificar a comercialização da carne de baleias e golfinhos em mercados do Japão e da Coreia.

Não houve oportunidade de incluirmos na presente análise um exemplar de *S. clymene*, a espécie que parece mais similar a *S. longirostris* quando se trata de indivíduos jovens, pois não tivemos acesso a amostras de tecidos desta espécie. Por outro lado, a sequência de *Stenella* sp. foi enviado para o pesquisador Richard LeDuc, do Southwest Fisheries Science Center, em La Jolla, Califórnia, que está trabalhando na elaboração de uma filogenia molecular para a família Delphinidae com base em sequências do citocromo b do mtDNA (LeDuc *et al.*, 1995). Através

de comunicação pessoal, este nos informou que a sequência de 401 pares de bases do animal da Bahia apresentou entre 5 e 8 diferenças para as sequências dos três *S. longirostris* que ele possui, provenientes do Pacífico e do Atlântico Norte. Foram encontradas 17 diferenças entre a sequência do animal da Bahia e a sequência de *S. clymene*.

A diferença encontrada de 9 e 10 pares de bases nitrogenadas entre a sequência de mtDNA do exemplar de *S. longirostris* amostrado por Arnason & Gullberg (1994) no Atlântico Norte e os exemplares de *S. longirostris* da Bahia e de Fernando de Noronha, respectivamente, sugere que os animais encontrados no Brasil pertencem a um grupo geneticamente diferente ao indivíduo do Atlântico Norte. Para determinar o nível exato desta diferenciação (populacional ou de subespécies) seriam necessárias investigações mais detalhadas, com um maior número de amostras e análises de sequências de outros genes do mtDNA e do DNA nuclear.

O gênero *Stenella* mostrou-se parafilético de acordo com as análises realizadas (figuras 2 e 3), visto que *S. frontalis* e *S. attenuata* mostraram-se mais proximamente relacionadas geneticamente a *D. delphis* e *T. truncatus* do que a *S. longirostris*. Parafilia neste gênero já havia sido constatada anteriormente por LeDuc *et al.* (1995) que observaram que algumas espécies de *Stenella* estão mais proximamente relacionadas a *Delphinus* ou *Tursiops* do que a outras espécies do mesmo gênero. Também foi identificada parafilia no gênero *Lagenorhynchus*, o que levou LeDuc *et al.* (1995) a sugerir a necessidade de revisão taxonômica para a família Delphinidae, com base em filogenia molecular.

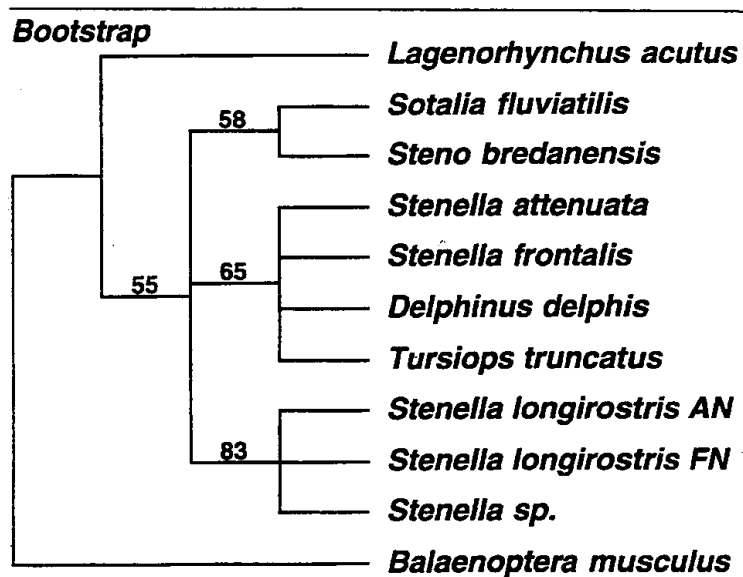


Figura 3 - Valores de *bootstrap* para 300 replicantes, com base em sequências de 401 pares de bases nitrogenadas do gene do citocromo b do mtDNA de 9 espécies de cetáceos, usando o programa PAUP 3.1.1. Relação de 3 para 1 foi utilizada entre transversões e transições (Tv:Ts/3:1).

CONCLUSÕES

O filhote de golfinho encontrado na Bahia pertence a espécie *Stenella longirostris* de acordo com as análises de reconstrução filogenética realizadas com base em seqüências do gene do citocromo b do DNA mitocondrial. Os golfinhos rotatores encontrados no Brasil são geneticamente diferentes dos encontrados no Hemisfério Norte, sendo o nível desta diferenciação um assunto a ser investigado em futuros trabalhos. O gênero *Stenella* mostrou-se parafilético, sugerindo que algumas espécies deste gênero sejam geneticamente mais próximas a outros gêneros da família Delphinidae.

Este trabalho constitui um exemplo de como genética molecular pode ser utilizada para resolver problemas de identificação de mamíferos marinhos, uma ferramenta a ser utilizada em futuros trabalhos.

Agradecimentos: Aos membros do Grupo de Estudo de Cetáceos do Ceará (GECC), em especial ao Prof. Cassiano Monteiro-Neto, ao biólogo Tarcísio Teixeira Alves Júnior e ao estudante de biologia Francisco Ávila, pela coleta e manutenção de amostras. Aos membros do Grupo de Estudo de Cetáceos da Bahia (GECET). Ao Oceanógrafo José Martins da Silva Júnior pela amostra de *Stenella longirostris*, de Fernando de Noronha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Júnior, T.T.; Ávila, F.J.C.; Oliveira, J. A.; Furta-
do-Neto, M. A. A. & Monteiro-Neto, C. Registros
de cetáceos para o litoral do estado do Ceará,
Brasil. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, vol. 30, n. 1-2, p.
79-92, 1996.
- Árnason, Ú. & Gullberg, A. Comparison between the
complete mtDNA sequence of the blue whale and
the fin whale, two species that can hybridize in
nature. *J. Mol. Evol.*, vol. 37, n. 4, p. 312-322, 1993.
- Árnason, Ú. & Gullberg, A. Relationship of baleen
whales established by cytochrome b gene sequences
comparison. *Nature*, v. 367, p. 726-728, 1993.
- Baker, C. S. & Palumbi, S. R. Which whales are hunted?
A molecular genetic approach to monitoring
whaling. *Science*, v. 265, p. 1538-1539, 1994.
- Baker, C. S.; Cipriano, F. & Palumbi, S. R. Molecular
genetic identification of whale and dolphin pro-
ducts from commercial markets in Korea and Japan.
Mol. Ecol., v. 5, p. 671-685, 1996.
- Best, R. C.; Rocha, J. M. & Silva, V. M. F. Registro de
pequenos cetáceos na costa nordeste do Brasil. In:
I Reunion de Trabajos de Expertos en Mamíferos
Acuáticos de América del Sur. 25 - 29 Junho de 1984,
Buenos Aires, p. 23-32, 1986.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of
RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-
phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v. 162,
p. 156-159, 1987
- Daniel, M. C.; Fioretti, M. M. & Rocha, A. R. Ocorrência
de *Stenella longirostris* (Cetacea: Delphinidae) na
região de Ubatuba, litoral norte do Estado de São
Paulo. In: *Anais, IV Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Marinhos da América do Sul*, p.
20-22, 1992..
- Fragoso, A. B. I.; Dorneles, P. R.; Lima, R. P.; Castro, D.
F. & Brito Jr., J. L. Registros de golfinho de Clymene,
Stenella clymene, e do golfinho cabeça-de-melão,
Peponocephala electra, para o litoral de Alagoas,
Brasil, in *Anais da 6ª Reunião de Trabalho de especialistas em mamíferos aquáticos da América do Sul*,
Florianópolis, 1994.
- Gray, J. E. *Spiciliogia Zoologica*. Treuttel, Wurtz and
Wood, London, 1828.
- Gray, J. E. On the cetaceous animals, in Richardson, J.
& Gray, J. E. (eds.), *The zoology of the voyage of H. M.*
S. Erebus and terror, under the command of Captain Sir
James Clark Ross. E. W. Janson, London, vol. 1, n. 3.,
p. 13-53, 1846.
- Henshaw, M. D.; LeDuc, R. G.; Chivers, S. & Dizon, A.
E. Identifying beaked whales (family Ziphiidae)
using mtDNA sequences. *Mar. Mam. Sci.*, vol. 13,
n. 3, p. 487-495, 1997.
- Hetzel, B. & Lodi, L. *Baleias, Botos e Golfinhos: guia de*
identificação para o Brasil. Editora Nova Fronteira,
Rio de Janeiro, 279 p., 1993.
- Hillis, D. M.; Moritz, C. & Mable, B. K. *Molecular*
systematics. Sinauer Associates Inc., Sunderland,
655 p., 1996.
- Irwin, D. M.; Kocher, T. D. & Wilson, A. C. Evolution
of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*,
v. 32, p. 128-144, 1991.
- IUCN. Klinowska, M. (ed.). *Dolphins, Porpoises and*
Whales of the World: the IUCN Red Data Book. IUCN
The World conservation Union, Gland, Switzerland,
and Cambridge, 429 p., 1991.
- LeDuc, R. G.; Dizon, A. E. & Perrin, W. F. Mitochondrial
systematics of the Delphinidae. In: *Abstracts of the*
Eveenth Biennial Conference on the Biology of Marine
Mammals. Orlando, 1995.
- Lodi, L. & Fiori, B. Observações sobre o comporta-
mento do golfinho rotador, *Stenella longirostris*
(Cetacea, Delphinidae) na Ilha de Fernando de
Noronha - Brasil, in *Anais da II Reunião de Trabalhos*

- de *Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul*. 4 - 8 de Agosto de 1986, Rio de Janeiro, p. 60-68, 1987.
- Muller, M. & Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. in *Methods in Enzymology*, v. 155, part F, p. 335-350. 1987.
- Perrin, W. F. & Gilpatrick Jr., J. W. Spinner dolphin *Stenella longirostris* (Gray, 1828), p. 99-128, in Ridgway, S.H. & Harrison, R. (eds.), *Handbook of Marine Mammals*. Vol. 5. The First Book of Dolphins. Academic Press, London, xviii+362 p., 1994.
- Perrin, W. F. & Mead, J. G. Clymene dolphin *Stenella clymene* (Gray, 1846), p. 161-171. in Ridgway, S. H. & Harrison, R. (eds.), *Handbook of Marine Mammals*. Vol. 5. The First Book of Dolphins. Academic Press, London, xviii+362p, 1994.
- Reis, M. S. S. & Queiroz, E. L. Ocorrência de *Stenella CF S. clymene* Gray, 1850 (Cetacea, Delphinidae) para o litoral norte do Estado da Bahia, Brasil. In: *Anais da 6ª Reunião de Trabalho de especialistas em mamíferos aquáticos da América do Sul*. Florianópolis, 1994.
- Secchi, E. R. & S. Siciliano. Comments on the southern range of the spinner dolphin (*Stenella longirostris*) in the Western South Atlantic. *Aquat. Mam.*, v. 21, n. 2, p. 105-108, 1995.
- Simões-Lopes, P. C.; Praderi, R. & Paula, G. S. The Clymene dolphin, *Stenella clymene* (Gray, 1846), in the Southwestern South Atlantic Ocean. *Mar. Mam. Sci.*, v. 10, n.2, p. 213-217, 1994.
- Silva-Júnior, J. M.; Silva, F. J. L.; Pereira, J. A. & Groch, K. Ocorrências de cetáceos na região oceânica entre Atol das Rocas, Arquipélago de Fernando de Noronha e Penedos de São Pedro e São Paulo, Brasil, in *Resúmenes de la 7ª Reunión de Trabajo de especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur*. Viña del Mar, p. 29, 1996.
- Swofford, D. L. *PAUP: Phylogenetics Analysis Using Parsimony*. Version 3.1 manual. Illinois Natural Survey, Champaign, 1993.
- Vaske-Júnior, T.; Pimentel, G. P.; Sales, L.T.; Almeida, R. T. & Pimentel, D. S. Avistagens de cetáceos na Região Nordeste do Brasil durante cruzeiro do NPQ. Riobaldo no período entre 05/93 a 05/94, p. 65, in *Anais da VI Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul*. 24 - 28 Outubro, Florianópolis, 1994.
- Wiley, E. O. *Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetics systematics*. John Wiley & Sons, New York, 439 p., 1981.
- Zerbini, A. N.; Bassoi, M.; Secchi, E. R.; Möller, L. M.; Dalla-Rosa, L. & Santos, M. C. O. Observação de cetáceos durante o cruzeiro de prospecção pesqueira pelágica de inverno do Programa REVIZEE (SCORE SUL), in *III Simpósio Sobre Oceanografia do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo*. São Paulo, 1996.