



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOÃO PEDRO NASCIMENTO DE SOUSA

**SERIA A POPULAÇÃO DO ESTREITO DE MAGALHÃES, NO EXTREMO SUL DO
CHILE, O PONTO DE CONTATO ENTRE OS LEÕES-MARINHOS-SUL-
AMERICANOS DOS OCEANOS ATLÂNTICO E PACÍFICO?**

FORTALEZA

2025

JOÃO PEDRO NASCIMENTO DE SOUSA

SERIA A POPULAÇÃO DO ESTREITO DE MAGALHÃES, NO EXTREMO SUL DO
CHILE, O PONTO DE CONTATO ENTRE OS LEÕES-MARINHOS-SUL-AMERICANOS
DOS OCEANOS ATLÂNTICO E PACÍFICO?

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Vicente Vieira Faria
Coorientadora: Dra. Larissa Rosa de Oliveira

Fortaleza

2025

JOÃO PEDRO NASCIMENTO DE SOUSA

SERIA A POPULAÇÃO DO ESTREITO DE MAGALHÃES, NO EXTREMO SUL DO
CHILE, O PONTO DE CONTATO ENTRE OS LEÕES-MARINHOS-SUL-AMERICANOS
DOS OCEANOS ATLÂNTICO E PACÍFICO?

Monografia apresentada ao Programa de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovado em: 20/01/2026.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Vicente Vieira Faria (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Larissa Rosa de Oliveira (Coorientadora)
Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS)
PPG Eng. Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rômulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre me dar suporte quando preciso, aos meus amigos da graduação, principalmente ao Ari e à Mafe (Arieudson da Silva e Maria Fernanda Paiva, respectivamente), que tornaram minha jornada acadêmica mais leve.

Aos parceiros de trabalho, em especial à Hivila Pâmela, que é uma parceira de trabalho e da vida, e ao Marcus Vinícius Chagas e à Luzanira Fraga, que sempre acreditaram no meu potencial como biólogo.

Ao Dr. Vicente Vieira Faria (UFC) e à Dra. Larissa Rosa de Oliveira (Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS e UFC), pela orientação e contribuição na formação do meu arcabouço teórico e aprimoramento como biólogo.

À Dra Maritza Sepulveda (Universidad del Valparaiso, Chile), pela disponibilização das amostras de pinípedes da Ilha Magdalena (Chile) e ao Dr. Victor Hugo Valiati (UNISINOS), pelo sequenciamento de DNA das amostras.

RESUMO

Os leões-marinhos-sul-americanos (*Otaria flavescens*) são otariídeos com uma ampla distribuição ao longo da costa da América do Sul. Suas populações dos oceanos Atlântico e Pacífico apresentam evidências de estrutura genética com baixo fluxo gênico nas análises usando marcadores matrilineares, o que levou a sugestão de Unidades Evolutivamente Significativas distintas. Contudo, estudos recentes indicaram a existência de fluxo gênico considerável no extremo sul do continente, região onde está localizado o Estreito de Magalhães, e mais especificamente a população da Ilha Magdalena, objeto de estudo da presente análise. Para verificar a relação dos leões-marinhos-sul-americanos desta ilha com as populações dos oceanos Atlântico e Pacífico, foram obtidas cinco amostras, mas apenas duas sequências da região controladora do DNA mitocondrial (mtDNA) foram obtidas com boa qualidade, as quais possuíam 518 pares de base (pb). Essas sequências foram alinhadas com outras 182 disponíveis para a espécie na plataforma GenBank e foram considerados 289 sítios, após o recorte das extremidades. Os haplótipos foram identificados para o local de estudo e sua relação com as demais populações das localidades nos oceanos Atlântico e Pacífico foi estabelecida por uma rede de haplótipos. Além disso, a análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para compreender a estruturação genética das populações estudadas comparando-as par-a-par com países: Brasil= 6, Uruguai= 13, Argentina= 104, Ilhas Falklands= 7, Ilha Magdalena= 2, Chile= 40 e Peru= 12. Por fim, três cenários com grupos distintos foram testados para avaliar estruturação: 1) Atlântico, Pacífico e Magdalena como três grupos distintos; 2) Atlântico + Ilha Magdalena e Pacífico; 3) Pacífico + Ilha Magdalena e Atlântico. A rede de haplótipos formou três agrupamentos principais: o primeiro formado principalmente pelas populações do Pacífico e alguns indivíduos da Argentina; o segundo por haplótipos oriundos do Brasil, Uruguai, Argentina e Ilhas Falklands/Malvinas, e terceiro formado por haplótipos do Uruguai e da Argentina. Os dois haplótipos da Ilha Magdalena foram alocados no primeiro agrupamento, localizando-se ao lado de haplótipos do extremo sul do continente, com representantes tanto do Chile quanto da Argentina. As comparações par-a-par indicam uma relativamente grande divergência entre a população de Magdalena e todas àquelas do Atlântico (FST: 0,41-0,67), e os resultados de AMOVA apontam para uma estrutura entre o Atlântico e o Pacífico. Dessa maneira, os haplótipos compartilhados entre os oceanos corroboram que estes não formam Unidades Evolutivamente Significativas independentes. De todo modo, há divergência entre as populações dos dois oceanos, mas a população da Ilha Magdalena está intimamente relacionada com haplótipos do extremo sul de ambos os oceanos, o que indica que as populações do Estreito de Magalhães atuam no fluxo de gênico mediado por fêmeas de leões-marinhos-sul-americanos.

Palavras-chave: Pinípedes, Estreito de Magalhães, Região controle mitocondrial.

ABSTRACT

South American sea lions (*Otaria flavescens*) are otariids with a wide distribution along the South American coast. Populations from the Atlantic and Pacific oceans show evidence of genetic structure with low gene flow in analyses using matrilineal markers, which led to the suggestion that they represent distinct Evolutionarily Significant Units. However, recent studies have indicated the existence of considerable gene flow at the southern tip of the continent, a region where the Strait of Magellan is located, and more specifically the population of Magdalena Island, which is the focus of the present study. To assess the relationship between South American sea lions from this island and populations from the Atlantic and Pacific oceans, five samples were obtained; however, only two sequences of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region were recovered with good quality, each comprising 518 base pairs (bp). These sequences were aligned with 182 other sequences available for the species in the GenBank database, and 289 sites were retained after trimming the ends. Haplotypes were identified for the study location, and their relationships with populations from Atlantic and Pacific localities were inferred using a haplotype network. In addition, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to evaluate the genetic structure of the studied populations through pairwise comparisons among countries: Brazil = 6, Uruguay = 13, Argentina = 104, Falkland Islands = 7, Magdalena Island = 2, Chile = 40, and Peru = 12. Finally, three scenarios with different groupings were tested to evaluate genetic structure: (1) Atlantic, Pacific, and Magdalena as three distinct groups; (2) Atlantic + Magdalena Island and Pacific; and (3) Pacific + Magdalena Island and Atlantic. The haplotype network revealed three main clusters: the first composed mainly of Pacific populations and some individuals from Argentina; the second consisting of haplotypes from Brazil, Uruguay, Argentina, and the Falkland/Malvinas Islands; and the third formed by haplotypes from Uruguay and Argentina. The two haplotypes from Magdalena Island were assigned to the first cluster, positioned alongside haplotypes from the southernmost region of the continent, including representatives from both Chile and Argentina. Pairwise comparisons indicated relatively high divergence between the Magdalena population and all Atlantic populations (F_{ST} : 0,41–0,67), and AMOVA results pointed to genetic structuring between the Atlantic and Pacific. Thus, the presence of shared haplotypes between the two oceans supports the conclusion that they do not constitute independent Evolutionarily Significant Units. Nevertheless, despite the divergence between populations from the two oceans, the Magdalena Island population is closely related to haplotypes from the southern extremes of both oceans, indicating that populations from the Strait of Magellan play a role in female-mediated gene flow in South American sea lions.

Keywords: Pinnipeds, Strait of Magellan, Mitochondrial control region.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Índices de fixação para cenários alternativos de agrupamento das populações do leão-marinho-sul-americano (<i>Otaria flavescens</i>).	17
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Lista de haplótipos de leões-marinhos-sul-americanos compartilhados entre diferentes localidades, segundo a região controle do mtDNA. 13
- Tabela 2: Distribuição geográfica dos haplótipos de leões-marinhos-sul-americanos, suas diversidades haplotípica e nucleotídica, segundo a região controle do mtDNA. 14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Localização da Ilha Magdalena, onde foram coletadas as amostras..... 9
- Figura 2: Rede de haplótipos (median-joining network) da região controle do mtDNA populações do leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*) do Brasil, Uruguai, Argentina, Ilhas Falklands, Ilha Magdalena, Chile e Peru. 15
- Figura 3: Mapa de calor dos índices de fixação F_{st} par-a-par entre as populações de leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*), segundo a região controle do mtDNA. 16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UES - Unidades Evolutivamente Significativas

UC – Unidades para Conservação

LEM - Laboratório de Ecologia de Mamíferos Marinhos

LGBM - Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UNISINOS

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

pb – Pares de base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1 O leão-marinho-sul-americano (<i>Otaria flavescens</i>).....	5
3.2 Unidades Evolutivamente Significativas	6
3.3 Região de controladora mitocondrial.....	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4.1 Área de estudo e coleta das amostras	8
4.2 Processamento das amostras	9
4.2.1 Extração do DNA pelo protocolo de fenol-clorofórmio	10
4.2.2 Extração do DNA pelo protocolo de Salting-out.....	10
4.2.3 Amplificação e sequenciamento	11
4.2.4 Alinhamento	11
4.2.5 Estrutura populacional e filogeografia	12
5. RESULTADOS	13
5.1 Alinhamento e diversidades haplotípica e nucleotídica.....	13
5.2 Estrutura populacional e filogeográfica	14
5.2.1 Comparações par-a-par do índice de fixação (F_{st}) entre os países e a Ilha Magdalena	15
5.2.2 Estrutura entre grupos (AMOVA)	16
6. DISCUSSÃO	18
6.1 Alinhamento e número de haplótipos	18
5.2 Estrutura populacional e filogeografia.....	19
7. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
ANEXOS.....	30

1. INTRODUÇÃO

Pinípedes são mamíferos (Ordem: Carnívora) altamente adaptados ao ambiente marinho. Eles são divididos nas famílias Odobenidae (morsas), Phocidae (focas verdadeiras) e Otariidae (leões e lobos marinhos) (Brunner, 2004). A família Otariidae, atualmente composta por 15 espécies de leões e lobos-marinhos, teve sua origem no Oceano Pacífico Norte, há aproximadamente 9 milhões de anos e, a partir de uma dispersão transequatorial há 6-7 milhões de anos, estendeu sua área de distribuição para o hemisfério sul (Yonezawa, Kohno, Hasegawa, 2009; Berta; Churchill; Boessenecker, 2018; Nyakatura, Bininda-Emonds, 2012; Lopes *et al.*, 2021).

O leão-marinho-sul-americano, *Otaria flavescens* (Shaw 1800), é uma espécie da família Otariidae com distribuição ao longo de 10.000 km da costa da América do Sul, ocupando as margens do Pacífico e do Atlântico. O limite sul de distribuição da espécie é a ilha de Cabo Horn, no Chile; quanto aos limites ao norte, estes são: (a) no oceano Pacífico: Peru e, (b) no oceano Atlântico: sul do Brasil (Cárdenas-Alayza, Crespo, Oliveira, 2016). A origem da espécie ocorreu no Pacífico, nas proximidades do Peru, a partir de onde estendeu sua distribuição para a costa do Chile, e depois, por canais inter-oceânicos, para o oceano Atlântico, ao longo da costa até atingir sua distribuição geográfica atual. Alguns autores propõem que a dispersão do Pacífico para o Atlântico ocorreu a partir da migração de uma única fêmea (Churchill, Boessenecker, Clementz, 2014).

Em decorrência de dinâmicas ambientais e geológicas do Pleistoceno, as populações do Atlântico e do Pacífico experienciaram diversos eventos de isolamento e reconexão, que marcam sua história biogeográfica. Com as glaciações do Pleistoceno, quando a espécie já ocupava a região sul do Atlântico, as conexões marinhas entre os oceanos foram fechadas, levando ao isolamento das populações e impedindo o fluxo gênico (Oliveira *et al.*, 2017). Durante este período, o Estreito de Magalhães, que representa uma conexão marinha entre o Pacífico e o Atlântico, foi completamente fechado (Ponce *et al.*, 2011).

Nos últimos dois séculos, as populações de leões-marinhos-sul-americanos passaram por um forte declínio populacional (Crespo *et al.*, 2012), consequência principalmente da caça, que acontece desde os tempos pré-colombianos e foi intensificada a partir de 1515, em especial nas áreas reprodutivas da costa do Atlântico (Strange, 1979; Dans *et al.*, 2004). Foi apenas a partir da década de 1960 que a caça começou a cessar (Baylis *et al.*, 2015; Dans *et al.*, 2004),

mesmo que mantida no Uruguai até 1991 (Feijoo *et al.*, 2011). Atualmente, a interação com a atividade de pesca é a maior ameaça a conservação da espécie (Oliveira *et al.*, 2017; Crespo *et al.*, 2012), além da alta mortalidade no Peru, decorrente da escassez de alimentos provocada por eventos de El Niño (Oliveira *et al.*, 2017).

Estima-se que, atualmente existam 376.700 indivíduos da espécie na natureza (Crespo, Oliveira, Sepúlveda, 2021). Destes, aproximadamente 233.000 estão no Pacífico (128.000 no Chile e 105.000 no Peru) (Oliva *et al.*, 2020; Cárdenas-Alayza, Crespo, Oliveira, 2016; IMARPE 2013). Já no Atlântico, existem 142.900, com a maioria dos indivíduos concentrados principalmente na Argentina (123.200 animais) (Cárdenas-Alayza, Crespo, Oliveira, 2016). Os demais se distribuem no Uruguai (12.000) (Páez 2006, Franco-Trecu, 2015), Ilhas Falklands (7.500) (Crespo *et al.*, 2012) e Brasil (200) (Sanfelice, Vasques, Crespo, 1999; Pavanato *et al.*, 2013).

Alguns autores defendem que as populações do Pacífico e do Atlântico formam Unidades Evolutivamente Significativas (UES) distintas (Túnez *et al.*, 2007; Túnez *et al.*, 2010; Feijoo *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2017), em decorrência de diferenças significativas a nível anatômico e genético. A morfologia do crânio (Brunner, 2004; Drehmer, 2005), por exemplo, difere consideravelmente de acordo com sua área de distribuição, assim como genes mitocondriais e loci de microssatélites (Hoffman *et al.*, 2016; Feijoo *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2017).

Ao longo da história, diversos critérios já foram utilizados para definir uma UES, como uma longa história evolutiva, informações da história natural, e dados morfométricos, que eram utilizados em conjunto com critérios genéticos a nível mitocondrial e nuclear (Ryder, 1986). Foi padronizado, então, que para que uma população seja de fato considerada uma UES, é necessário que tenha monofilia haplotípica recíproca de alelos mitocondriais, ou seja, que não compartilhe haplótipos mitocondriais com outra UES, e apresente uma divergência significativa em loci nuclear (Mortiz, 1994).

Análises do mtDNA (DNA mitocondrial) das populações do Atlântico e do Pacífico indicam que elas não possuem quase nenhum haplótipo compartilhado (Túnez *et al.*, 2007; Artico *et al.*, 2010; Feijoo *et al.*, 2011; Hoffman *et al.*, 2016). Este cenário pode ser explicado pela alta filopatria de fêmeas, um padrão comum em muitas espécies de pinípedes, que têm o fluxo gênico mediado principalmente por machos, que performam grandes dispersões (Riedman, 1990; Fabiani *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2015).

A região controle do mitocondrial D-loop, região onde estão os principais elementos regulatórios para a replicação e expressão do genoma mitocondrial dos mamíferos, é muito utilizada para estudos relacionados à estrutura populacional de mamíferos (Sbisà *et al.*, 1997). Esta é a região que evolui mais rapidamente em todo o genoma mitocondrial, variando muito em tamanho, mesmo entre indivíduos da mesma espécie, em decorrência da diferença nas quantidades de repetições “in tandem” (Saccone, Attimonelli, Sbisà. 1987). Considerando que são necessárias novas análises acerca dos leões-marinhos-sul-americanos que ocupam regiões de conexão entre o Pacífico e o Atlântico (Oliveira *et al.*, 2017), e os esforços para investigar a estrutura populacional esbarra na carência de dados sobre a os indivíduos que ocupam o extremo sul da América do Sul, onde pode haver fluxo genético entre as populações do Atlântico e do Pacífico (Peralta *et al.*, 2021). Nesse contexto, o presente estudo buscou determinar a posição filogeográfica da população da Ilha Magdalena, localizada no Estreito de Magalhães, uma possível zona de contato.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi identificar a relação genética de leões-marinhos-sul-americanos (*O. flavescens*) que habitam na Ilha Magdalena, localizada no Estreito de Magalhães, no sul do Chile, com as outras populações do Atlântico e do Pacífico, baseando-se nas análises da região controle do DNA mitocondrial.

2.2 Objetivos Específicos

- Sequenciar a região controle do DNA mitocondrial (D-loop) de leões-marinhos-sul-americanos da Ilha Magdalena;
- Estimar a distância genética entre população da Ilha Magdalena e as outras ao longo de sua área de distribuição e
- Determinar quais haplótipos estão mais próximos àqueles da Ilha Magdalena.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*)

Previamente descrito como *Otaria byronia* (Blainville 1820), o leão-marinho-sul-americano, atualmente classificado como *Otaria flavescens* (Shaw 1800), divergiu das outras linhagens de Otariídeos da América do Sul há aproximadamente 3 milhões de anos (Lopes *et al.*, 2021). Ele é nativo do Peru, Chile, Argentina, Ilhas Falklands, Uruguai e Brasil, sendo classificado como LC (baixa preocupação) pela lista vermelha da IUCN (Cárdenas-Alayza, Crespo, Oliveira, 2016). Embora não seja considerada uma espécie migratória, machos adultos já foram registrados performando grandes migrações, com observações a mais de 300 km da costa (Campagna *et al.*, 2001; Hückstädt, Krautz 2004), enquanto as fêmeas apresentam alta filopatria (Oliveira *et al.*, 2017).

A espécie tem uma expectativa de vida de aproximadamente 20 anos e é caracterizada por um evidente dimorfismo sexual (Cappozzo, 2002). Machos adultos podem atingir até 2,6 m de comprimento e 350 kg, ao passo que fêmeas podem alcançar 2 m de comprimento e 170 kg (Grandi *et al.*, 2010; Rosas, Haimovici, Pinedo, 1993; Cappozzo, Perrin 2009; Riet-Sapriza *et al.*, 2013). Os machos atingem a maturidade sexual entre 4 e 7 anos e as fêmeas entre 4 e 5 anos (Cárdenas-Alayza, Crespo, Oliveira, 2016; Grandi *et al.*, 2010). Sua temporada reprodutiva se inicia em dezembro, com a duração variando de acordo com a latitude. Em regiões próximas ao equador, a temporada dura mais tempo, enquanto em altas latitudes, é mais rápida (Campagna, 1985). Os filhotes nascem do meio de dezembro até o início de fevereiro, e a maioria das colônias reprodutivas atingem seu pico demográfico na metade de janeiro (Cárdenas-Alayza, Crespo, Oliveira, 2016).

Estudos acerca da estrutura filogeográfica dos leões-marinhos-sul-americanos indicam estrutura genética entre as populações do Atlântico e do Pacífico, tanto para marcadores mitocondriais quanto para loci nuclear (Túnez *et al.*, 2010; Feijoo *et al.*, 2011; Hoffman *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017). Nessa perspectiva, alguns autores chegaram a sugerir que formassem duas Unidades Evolutivamente Significativas, mas haplótipos compartilhados entre as populações do Atlântico e do Pacífico levaram à rejeição da classificação (Hoffman *et al.*, 2016; Peralta *et al.*, 2021).

3.2 Unidades Evolutivamente Significativas

A proposta de Unidades Evolutivamente Significativas veio como resultado de esforços para conservação, procurando estratégias de manejo baseadas em informações como história natural, morfometria, área de distribuição, eletroforese de proteínas e análises citogenéticas (Ryder, 1986). Contudo, a classificação deixou critérios muito subjetivos, dificultando seu uso prático, o que culminou na revisão do conceito, por Moritz (1994), que definiu os critérios de monofilia haplotípica recíproca em marcadores mitocondriais, e divergência significativa em loci nuclear para definição de uma UES.

Seguindo esses critérios, as populações de leões-marinhos-sul-americanos no Atlântico e do Pacífico já foram caracterizadas como UES (Oliveira et al. 2017) Todavia, esse tema tem passado por diversas modificações ao longo do tempo, sempre mantendo o foco na preservação de sustentabilidade ecológica de populações, considerando a influência dos processos evolutivos para estratégias de conservação (Rato *et al.*, 2024). Nesse contexto, Hoelzel (2023), motivado pela importância de identificar populações ou grupos de populações evoluindo independentemente, para estratégias de manejo efetivas, sugeriu uma nova designação a partir do conceito de UES: Unidade para Conservação Evolutivamente Sustentável (UCES), com o objetivo de conservar unidades demográficas em diferentes trajetórias evolutivas. Assim é possível evitar a maneira binária adotada para a classificação atual de UES, utilizada para sistemas em constante evolução.

3.3 Região de controladora mitocondrial

A maioria dos vertebrados possui um genoma mitocondrial na faixa entre 16.000 e 18.000 pb (Cantatore, Saccone, 1987), com uma taxa de mutação mais alta que o DNA nuclear (Rand, Harrison, 1989). Dentro desse genoma, as sequências apresentam uma organização extremamente compacta, com apenas uma região não-codificante maior, localizada entre os genes para tRNA_{pro} (tRNA_{glu} em aves) e tRNA_{phe}. Essa região varia em comprimento entre espécies, e algumas vezes dentre indivíduos de uma mesma espécie, em decorrência de variações no número de repetições in tandem (Gemmell *et al.*, 1996).

A região controladora do DNA mitocondrial é rotineiramente utilizada para investigar a estrutura filogenética de populações animais e determinar estruturas filogenéticas (Awise, 2009; Paijmans, Gilbert, Hofreiter, 2013). A rápida taxa evolutiva e o alto polimorfismo característico da região justificam a escolha para investigar tanto as dinâmicas ancestrais quanto

as mais atuais (Kornienko *et al.*, 2019). Dentro do genoma mitocondrial, essa região é a porção de maior heteroplasmia (Termignoni-Garcia *et al.*, 2023), característica frequentemente ignorada nas análises (Biray, Peksen, Bilgin, 2025). Tal heteroplasmia representa a variação genética a nível de indivíduo, que pode ser decorrente de processos mutacionais ou por “escape paterno” (Ye *et al.*, 2022), quando ocorre a transmissão excepcional de DNA paterno — geralmente mitocondrial — para a prole, contrariando o padrão típico de herança exclusivamente materna.

Na região controladora estão presentes a origem de replicação, e promotores para transcrição dos genes responsáveis pela transcrição da fita pesada e da fita leve (Clayton, 1991). A nomenclatura de “fita leve” e “fita pesada” baseia-se na composição de bases das fitas, que possuem diferentes regiões promotoras, onde se ligam proteínas de origem nuclear (Ghivizzani *et al.*, 1993; Nass, 1995). O RNA transcrito entre o promotor da fita leve e a origem de replicação da fita pesada funciona como um *primer* para a replicação da fita pesada (Chang, Clayton, 1984). A replicação termina logo após as sequências associadas à terminação (TAS), dando origem a pequenas fitas, denominadas de fitas 7s (Doda, Wright, Clayton, 1981; Clayton, 1991). As fitas 7s permanecem associadas à fita leve, deslocando a fita pesada original, levando à formação de uma estrutura de fita tripla, conhecida como loop de deslocamento ou D-loop (Wilkinson *et al.*, 1997). Dessa maneira, o tamanho do D-loop está diretamente relacionado com o comprimento da fita 7s DNA, que varia de acordo com o sítio associado à terminação que é utilizado (Doda, Wright, Clayton, 1981).

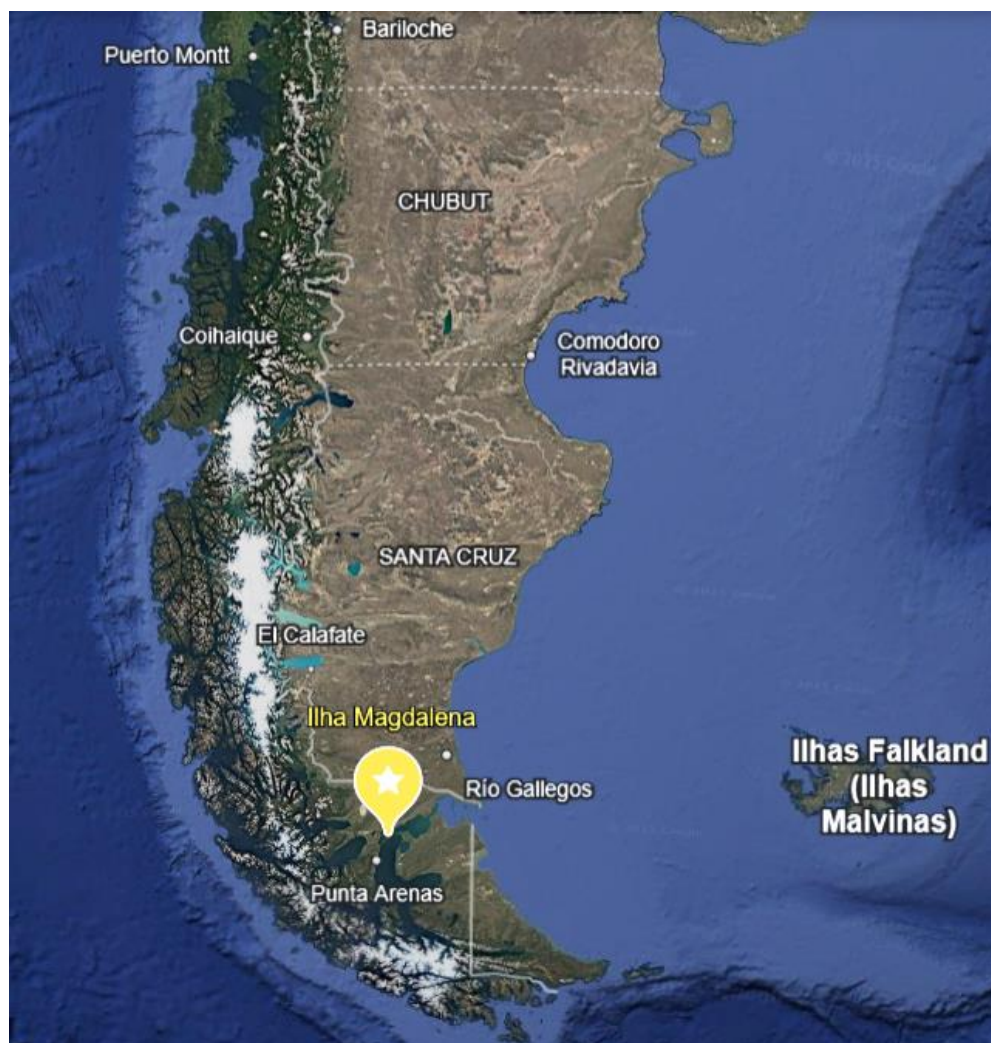
O loop de deslocamento (D-loop) passa por diversos eventos de substituição, deleção, inserção e duplicação, em um ritmo superar àquele observado no restante do genoma mitocondrial. Por essa razão, essa região foi historicamente utilizada em estudos filogeográficos de diversas espécies de vertebrados (e.g. Avise, 1989). As repetições in tandem comuns da região são compostas por sequências de DNA relativamente curtas (Stewart, Baker, 1994), e acredita-se que tenham um papel essencial na formação de estruturas secundárias termodinamicamente estáveis (Buroker *et al.*, 1990; Wilkinson, Chapman, 1991; Stewart, Baker 1994; Fumagalli *et al.*, 1996).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta das amostras

O local de coleta foi a Ilha Magdalena (52°55'10" S; 70°34'34" W), localizada no extremo sul do Chile, no Estreito de Magalhães, na chamada XII região de Magalhães e da Antártica Chilena, a aproximadamente 35 km ao norte da capital da província, Punta Arenas. Ela integra o Monumento Natural Los Pingüinos (Bingham; Herrmann, 2008; Edgington *et al.*, 2009), uma área protegida criada para conservar uma das maiores e mais importantes colônias de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) do Chile (Bingham, 2020). Seu tamanho é de aproximadamente 85 hectares com ambiente predominante de campo aberto, vegetação rasteira, solo arenoso e pedregoso. A região é caracterizada por correntes de ressurgência e uma alta produtividade biológica, principalmente durante o inverno (Funes-Rodríguez.; Gómez-Gutiérrez; Palomares-Garcia, 2007; Cervantes-Duarte *et al.*, 2013), com a temperatura média da superfície do mar entre 20°C, durante o primeiro trimestre do ano e 26,9°C durante o último (Cervantes-Duarte, 2010).

Figura 1: Localização da Ilha Magdalena, onde foram coletadas as amostras.



Fonte: Google Earth, 2026.

Amostras de tecidos de cinco indivíduos de *O. flavescens* da Ilha Magdalena foram coletadas pela Dra. Maritza Sepúlveda da Universidade de Valparaíso, no Chile. As amostras foram armazenadas em tubos com álcool 70% e identificadas, com as datas de coleta e suas respectivas localizações. Em seguida, o material foi encaminhado para o Laboratório de Ecologia de Mamíferos Marinhos (LEM) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, aos cuidados da professora Dra. Larissa Rosa de Oliveira.

4.2 Processamento das amostras

Para o processamento das amostras, foi firmada uma parceria com o professor Dr. Victor Hugo Valiate, do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da UNISINOS. Nesse

laboratório o DNA foi extraído e a região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) foi amplificada. As extrações foram realizadas segundo as metodologias fenol-clorofórmio (Sambrook, Russell, 2001) e *salting-out* (Miller, Dykes, Polesky, 1988).

4.2.1 Extração do DNA pelo protocolo de fenol-clorofórmio

O tecido das amostras foi cortado em pequenos fragmentos e misturado com 200µl da solução tampão T.E, permanecendo em repouso por 15 minutos. Após esse período, o tampão T.E foi retirado e substituído por 500 µl de tampão de lise (10 mM de Tris_HCL, 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA (pH 8) e SDS 2%) e 24 µl de proteinase K (20 µl/ml). A solução foi homogeneizada e incubada a 55 °C por uma noite. Na etapa seguinte, foi adicionado 500-525 µl de fenol-clorofórmio-isoamílico (24:25:1) à amostra, que foi homogeneizada manualmente por 5 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi retirado e transferido para um novo tubo, enquanto a fase orgânica foi descartada (esse procedimento foi repetido mais duas vezes). Após a última repetição, se adicionou 1 mL de etanol absoluto ao sobrenadante, que foi homogeneizado e incubado no freezer por 32 horas.

Para a purificação do DNA, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante obtido foi descartado, e manteve-se apenas o pellet. Após esta etapa, foi adicionado 300 µl de etanol 70% ao tubo com o pellet, que em seguida ficou por 10 minutos no freezer, e depois foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi então retirado sem perturbar o pellet, e o processo foi repetido outras duas vezes. Ao fim do processamento, o pellet permaneceu em uma estufa a 60 °C até secar, para receber 20µl de tampão T.E.

4.2.2 Extração do DNA pelo protocolo de *Salting-out*

As amostras de tecido foram cortadas em pedaços pequenos e adicionadas ao tubo contendo 500µl de Buffer de lise e 10µl de proteinase K, sendo incubadas de 15 a 20 minutos a 60 °C para digestão enzimática. Em seguida, foi adicionado 200µl de solução proteica de precipitação à solução, que foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex, e incubada em freezer por 5 minutos. Na etapa seguinte, a solução foi centrifugada a 16.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 600 µl de isopropanol, homogeneizado por inversão 5 vezes. A solução foi então centrifugada novamente a 16.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi removido, mantendo apenas o pellet. Em sequência,

foi adicionado 600µl de etanol 70%, que foi homogeneizado por inversão 5 vezes e centrifugado a 16.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi posto para secar. Após seco, foi adicionado 30 µl de T.E para dissolver o pellet desta solução.

4.2.3 Amplificação e sequenciamento

A região alvo amplificada pelo método PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Saiki *et al.*, 1985) foi a região controladora do mtDNA. Os primers utilizados foram THR 5' e TDKD 5'. As reações de PCR foram realizadas com um volume de 20µl (1µl DNA, 1µl de cada primer, 4µl de master mix e 12µl de água ultrapura), seguindo o protocolo de 1 ciclo de 3 minutos a 94 °C; 10 ciclos de “*touchdown*” cada, incluindo 50 segundos a 94 °C; 50 segundos a 60 °C (-1 °C por ciclo), e 80 segundos a 72 °C; 30 ciclos de 50 segundos a 94 °C, 50 segundos a 50 °C e 80 segundos a 72 °C; e 1 ciclo de 5 minutos a 72 °C (etapa de extensão final). Em seguida, os produtos foram corados com “GelRed” e observados em gel de agarose 1% em transiluminador com luz ultravioleta. Por fim, após a confirmação das ampliações bem-sucedidas, estas foram encaminhadas para a empresa Macrogen, na Coreia do Sul, onde foram sequenciadas, utilizando-se o método de Sanger (sequenciador automático). Das cinco amostras, apenas duas foram amplificadas com boa qualidade.

4.2.4 Alinhamento

Além das duas sequências de DNA obtidas no presente estudo, para o alinhamento, foram adicionadas as sequências obtidas por meio da plataforma GenBank. Selecionou-se sequências considerando o critério de tamanho mínimo de 306 sítios, após o corte das extremidades das menores sequências, e dentre todas as sequências disponíveis na plataforma, identificadas como “D-loop” ou “mitochondrial control region”, foram selecionadas as seguintes 182 sequências: HM347787-HM347796; HM467619-HM467642; HM467644-HM467646; JQ434428-JQ434457; KY859197-859234; KY859236-859242; MG386937-MG386959; MW690594-MW690640. Assim, o alinhamento foi composto por 184 sequências. Em seguida, foram consultadas as referências associadas a cada sequência no GenBank, para determinar a localização de cada uma, e o alinhamento foi então realizado no software MEGA 12, por meio da ferramenta ClustalW.

Considerando que uma região específica das sequências analisadas apresenta alta variação no número de repetições in tandem, comuns da região de controladora do mitocondrial (D-loop), optou-se por desconsiderar os sítios com gaps nas análises.

4.2.5 Estrutura populacional e filogeografia

As sequências obtidas da Ilha Magdalena foram comparadas com outras disponíveis para a espécie na plataforma GenBank. As sequências de DNA previamente alinhadas foram convertidas em arquivos FASTA e organizadas de acordo com sua procedência geográfica. Em seguida, com o auxílio do DNASP v.6.12.03, foram obtidos os números de haplótipos, assim como suas sequências e a variação haplotípica de cada população. Já para a construção da rede de haplótipos foi realizada através da *median-joining network* (redes de conexão mediana), utilizando-se o programa POPART.

A partir dos resultados obtidos no DNASP, estimou-se a diversidade nucleotídica (π) (Nei, 1987) e Análise Molecular de Variância (AMOVA), para estimar a partição da variação genética (1.000 permutações, utilizando-se ARLEQUIN (Excoffier, Lischer, 2010).

Foram analisados três cenários para um dos dois alinhamentos gerados (completo e sem gaps) para o teste de AMOVA. No primeiro cenário, foram determinados três grupos distintos (Atlântico, Pacífico e Magdalena), enquanto nos outros dois cenários, foram apenas os grupos do Atlântico e Pacífico, com Magdalena alternando entre eles.

5. RESULTADOS

5.1 Alinhamento e diversidades haplotípica e nucleotídica

As 182 sequências selecionadas no GenBank pertenciam ao Brasil (n= 6), Uruguai (n= 13), Argentina (n= 104), Ilhas Falklands/Malvinas (n= 7), Chile (n= 40) e Peru (n= 12). As sequências parciais da região de controle mitocondrial obtidas para os dois espécimes de *Otaria flavescens*, da Ilha Magdalena, tinham 518 pb, e com elas o alinhamento completa 184 sequências, com 306 sítios após o corte das extremidades, contabilizando 127 haplótipos (Anexo 1), com o DNASP, não considerando sítios com “gaps” ou “missing”, em decorrência da alta variação no número de repetições de uma região específica do alinhamento. Contudo, após o alinhamento manual com as amostras do GenBank o tamanho final das sequências analisadas foi de 289 pb.

Dos haplótipos obtidos, nove são compartilhados entre populações, dentre os quais dois possuem representantes do Atlântico e do Pacífico. Os haplótipos compartilhados entre os oceanos são o 34, entre a Argentina e o Chile, e o 58, entre a Argentina, Falklands e o Chile. Já representando o mesmo oceano, tem-se o haplótipo 23, compartilhado entre o Brasil, o Uruguai e a Argentina, os 81, 82, 83, 84 e 85 compartilhados entre o Brasil e a Argentina, e o 96, entre a Argentina e Falklands (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de haplótipos de leões-marinheiros-sul-americanos compartilhados entre diferentes localidades, segundo a região controle do mtDNA.

	Brasil	Uruguai	Argentina	Falklands	Magdalena	Chile	Peru
Hap_23	1	2	2	0	0	0	0
Hap_34	0	0	4	0	0	1	0
Hap_58	0	0	1	1	0	1	0
Hap_81	1	0	3	0	0	0	0
Hap_82	1	0	1	0	0	0	0
Hap_83	1	0	1	0	0	0	0
Hap_84	1	0	1	0	0	0	0
Hap_85	1	0	1	0	0	0	0
Hap_96	0	0	2	1	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2026.

Na tabela 2, a seguir, é possível constatar os valores relacionados às diversidades haplotípica e nucleotídica de cada localidade considerada, assim como o número de sequências utilizadas no estudo e os haplótipos que formam.

Tabela 2: Distribuição geográfica dos haplótipos de leões-marinhos-sul-americanos, suas diversidades haplotípica e nucleotídica, segundo a região controle do mtDNA.

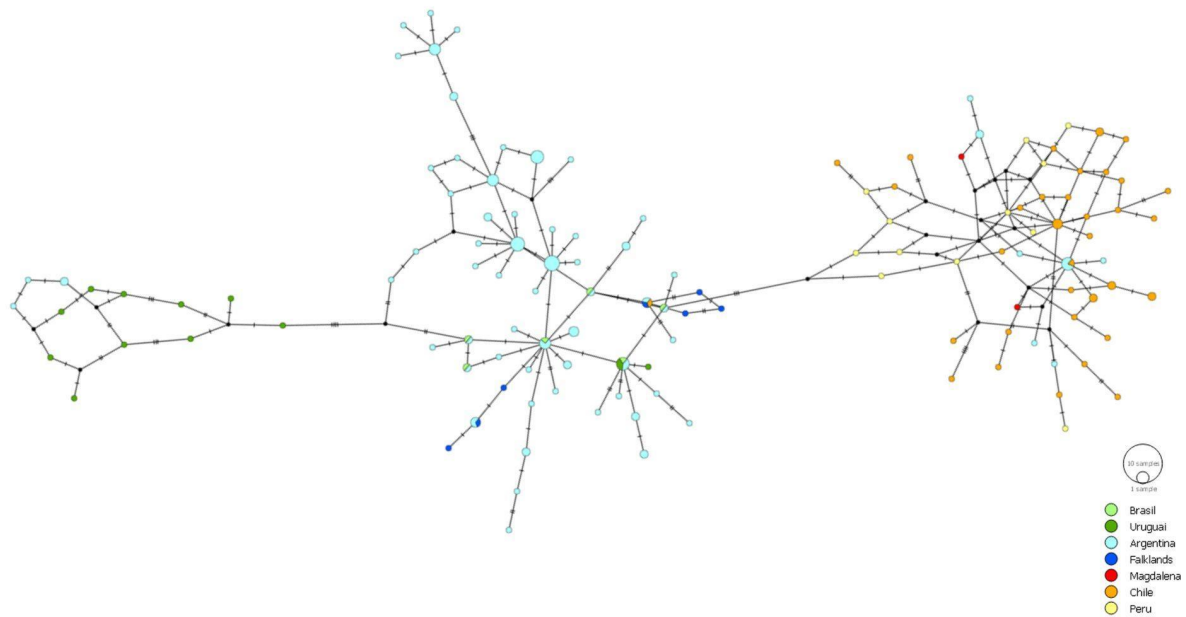
	Nº de sequências	Nº de haplótipos	Hd	π
Brasil	6	6	1,0000	0.020751 +/- 0.013251
Uruguai	13	12	0,9872	0.025725 +/- 0.014398
Argentina	104	65	0,9849	0.036974 +/- 0.018734
Falklands	7	7	1,0000	0.023336 +/- 0.014295
Magdalena	2	2	1,0000	0.013158 +/- 0.014711
Chile	40	34	0,9910	0.035973 +/- 0.018553
Peru	12	12	1,0000	0.012740 +/- 0.007798

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2026.

5.2 Estrutura populacional e filogeográfica

A rede de haplótipos de D-loop indicou segregação geográfica entre as diferentes regiões da América do Sul, representadas pelas localidades Brasil, Uruguai, Argentina, Ilhas Falklands/Malvinas, Isla Magdalena, Chile e Peru. Os dois haplótipos obtidos de exemplares da Isla Magdalena compuseram um cluster formado quase que exclusivamente por indivíduos do Pacífico (Chile e Peru; muito embora este referido grupo tenha representantes do Atlântico, isto ficou restrito à indivíduos da Argentina). Além deste cluster, dois outros foram observados, ambos incluindo indivíduos da Argentina, que estão agrupados com haplótipos do Brasil, Uruguai e Falklands no cluster intermediário, e apenas com indivíduos do Uruguai no cluster mais distante daquele composto principalmente por representantes do Pacífico. Apenas um haplótipo do Pacífico foi agrupado fora do seu cluster principal, representado por um indivíduo de Isla Marta, extremo sul do Chile (Figura 2).

iiiiFigura 2: Rede de haplótipos (*median-joining network*) da região controle do mtDNA populações do leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*) do Brasil, Uruguai, Argentina, Ilhas Falklands, Ilha Magdalena, Chile e Peru.

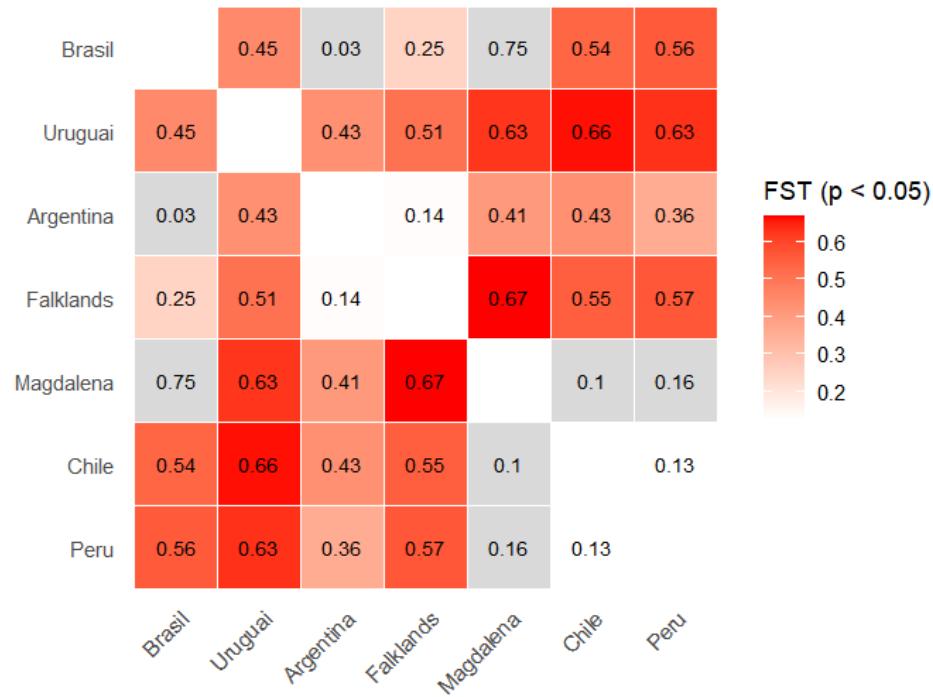


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2026.

5.2.1 Comparações par-a-par do índice de fixação (F_{st}) entre os países e a Ilha Magdalena

As comparações par-a-par do F_{st} da região controladora do DNA mitocondrial, exibem F_{st} s que variam entre 0,03 (Brasil e Argentina) e 0,75 (Brasil e Ilha Magdalena). Contudo, os valores-p das comparações entre Brasil e Argentina e Brasil e Magdalena são de 0.18919 ± 0.0344 e 0.05405 ± 0.0242 , respectivamente, sendo valores superiores a 0,05, e, portanto, resultados não-significativos, como aqueles entre Chile e Magdalena (F_{ST} : 0.09833, valor-p: 0.19820 ± 0.0445), e Peru e Magdalena (F_{st} : 0.16465 , valor-p: 0.14414 ± 0.0337). Os resultados significativos variaram entre 0,14 (Falklands e Argentina) e 0,67 (Magdalena e Falklands). Na figura 3 é possível observar todos os valores de F_{st} , distinguindo os resultados significativos dos não-significativos.

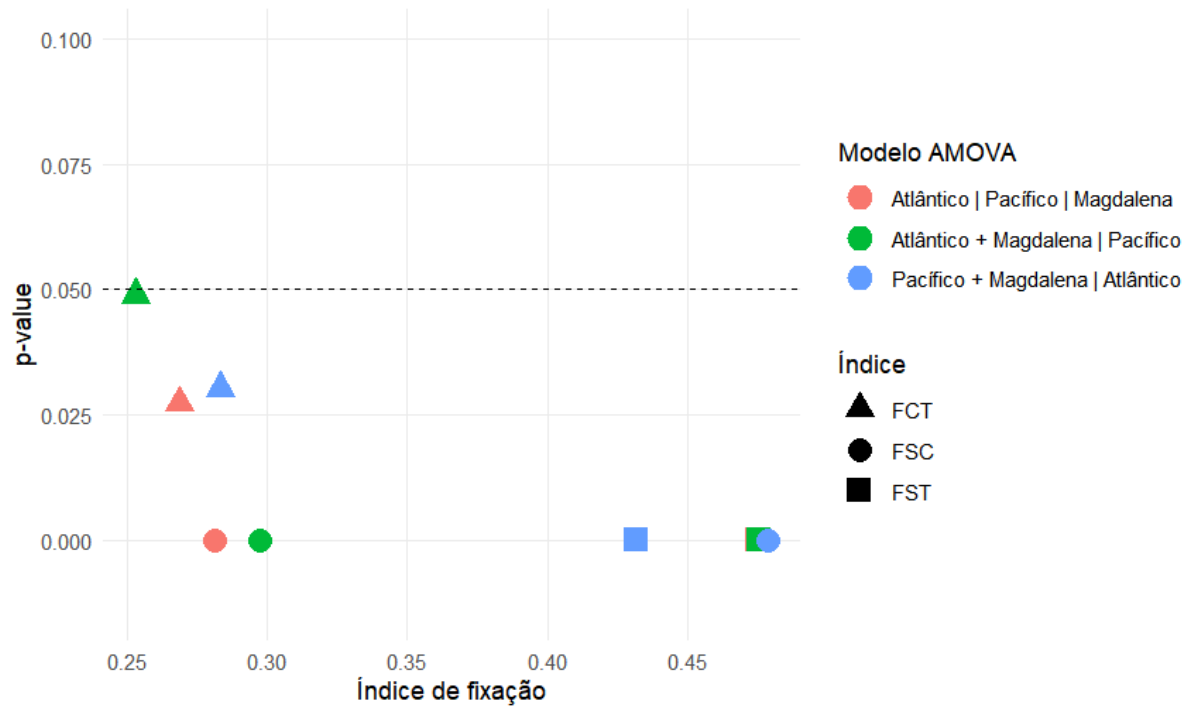
Figura 3: Mapa de calor dos índices de fixação F_{st} par-a-par entre as populações de leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*), segundo a região controle do mtDNA.



5.2.2 Estrutura entre grupos (AMOVA)

Os resultados das Análises de Variância Molecular (AMOVA), para três cenários diferentes: 1) Atlântico, Pacífico e Magdalena; 2) Atlântico + Magdalena, e Pacífico; e 3) Pacífico + Magdalena, e Atlântico, indicaram uma forte estrutura genética entre indivíduos dentro das populações. Para o cenário considerando três grupos separados, os valores de F_{st} , F_{sc} e F_{ct} foram 0.47465, 0.28141 e 0.26892, respectivamente, sendo o valor-p de F_{ct} mais elevado, mas ainda significativo (0.02737+-0.00514). No cenário onde a população Magdalena foi agrupada àquela do oceano Atlântico, os resultados de F_{st} , F_{sc} e F_{ct} foram de 0.47533, 0.29746 e 0.25319, respectivamente, com F_{ct} significativo (valor-p = 0.04888+-0.00574). Por fim, no cenário onde a população de Magdalena foi agrupada àquela do oceano Pacífico, os resultados de F_{st} , F_{sc} e F_{ct} de 0.47895, 0.27291 e 0.28337, respectivamente, com F_{ct} mais uma vez elevando, mas significativo (valor-p = 0.03030+-0.00659) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Índices de fixação para cenários alternativos de agrupamento das populações do leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*).



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2026.

6. DISCUSSÃO

6. 1 Alinhamento e número de haplótipos

Os resultados de diversidades haplotípica e nucleotídica das populações de *O. flavescens* aqui encontrados são bem elevados, o que pode ser explicado pelo baixo número de sequências utilizadas para representar algumas regiões, que possuem o número de haplótipos igual ao número de sequências, e portanto, diversidade haplotípica 1. Já as localidades com maior número de sequências são a Argentina, com 104 sequências e o Chile, com 40, apresentando diversidades haplotípicas de 0,9849 e 0,9910, respectivamente. Outros estudos, como os de Oliveira e colaboradores (2017) e Peralta e colaboradores (2021), registraram valores mais baixos para a diversidade haplotípica da Argentina, com respectivos valores de 0,83 e 0,869. Dessa maneira, é possível constatar que ao utilizar apenas sequências disponíveis no GenBank para representar todas as regiões, com exceção de Ilha Magdalena, que teve um baixo número de sequências (2), os valores de diversidade haplotípica sofrem um viés decorrente do fato de que cada sequência disponível na plataforma pode representar um ou mais indivíduos de um mesmo haplótipo.

Peralta e colaboradores (2021), que conduziram o primeiro estudo a investigar exaustivamente a população do extremo sul da Argentina, incluindo as províncias de Santa Cruz e Tierra del Fuego, registraram 69 haplótipos ao longo da costa da Argentina, dos quais 12 são exclusivos da Tierra del Fuego, o que aponta para uma alta diversidade genética das colônias na região mais sul do continente. A partir da análise conduzida pelos autores, determinou-se que a população da Patagônia, na Argentina, compõe uma Unidade para Conservação (UC) diferente daquela formada pela população da Tierra del Fuego, que compõe outra UC, composta pelas colônias da Península Mitre e do Canal Beagle. Todavia, como não há associação dos haplótipos específicos por código de identificação no GenBank, não foi possível agrupar as sequências de Magdalena àsquelas da UC da Tierra del Fuego, para formar um grupo representado por sequências provenientes do extremo sul do continente, que podem constituir uma zona de contato.

Nesse sentido, identificou-se dois haplótipos compartilhados entre o Pacífico e o Atlântico. O haplótipo 34 (HM467645.1; JQ434453.1; MW690613.1; MW690628.1; MW690637.1), compartilhado pela Argentina e o Chile, sendo que a sequência do Chile (JQ434453.1) corresponde um espécime de Rómulo e um da Ilha Marta, ambos no Chile, a

latitudes inferiores a 45° S, e uma das sequências da Argentina, da qual se tem a informação acerca da localidade (HM467645.1), sendo esta Cerro Bayo, também a latitudes abaixo de 45° S. O outro haplótipo compartilhado é o 58 (JQ434455.1; KY859241.1; MW690627.1), entre as Ilhas Falklands, a Argentina e o Chile, com a sequência do Chile representando um espécime também da Isla Marta. Esses resultados, corroboram que há fluxo de genes de linhagem maternal entre os oceanos, como já fora levantado por outros pesquisadores, que apontam uma ligação inter-oceânica representando uma zona de contato entre as populações do Atlântico e do Pacífico (Hoffman *et al.*, 2016; Peralta *et al.*, 2025).

5.2 Estrutura populacional e filogeografia

Ao observar a rede de haplótipos (Figura 2), é possível perceber uma clara divergência entre o grupo do Atlântico e do Pacífico, com poucos indivíduos da Argentina agrupados no lado do Pacífico. Hoffman e colaboradores (2016), ao investigar a estrutura populacional de leões-marinhos-sul-americanos das Ilhas Falklands, também observaram um padrão de separação entre o Atlântico e o Pacífico na sua rede de haplótipos, que também agrupou a população das Ilhas Falklands com o grupo do Atlântico. Em seguida, Oliveira e colaboradores (2017) também observaram o mesmo padrão de separação entre as populações do Atlântico e do Pacífico em suas redes de haplótipos para a região controle do DNA mitocondrial, e adicionalmente para o gene mitocondrial citocromo b. Estes resultados e a ausência de haplótipos compartilhados na época levou Oliveira e colaboradores (2017) a propor que as populações do Atlântico e do Pacífico formam duas Unidades Evolutivamente Significativas distintas.

Todavia, os dois haplótipos compartilhados entre as propostas UESs, entre o Chile e as Ilhas Falklands (Hoffman *et al.*, 2016), contradizem a hipótese de monofilia haplotípica recíproca entre os oceanos, necessária para a classificação como UES (Hoffman *et al.*, 2016; Peralta *et al.*, 2021). Os haplótipos compartilhados aqui identificados reforçam que não há suporte genético para a separação duas UESs diferentes, para o Atlântico e o Pacífico, em contraste aos resultados de Oliveira e colaboradores (2017).

Contudo, em todos os cenários de AMOVA propostos, o FCT foi significativo, mesmo que baixo em relação ao FSC e o FST, e com valores-p mais elevados. Isso indica certa estrutura genética entre os grupos do Atlântico e do Pacífico, como observado em outros estudos de estrutura populacional de leões-marinhos-sul-americanos, baseados em dados genéticos (Feijoo

et al., 2011; Hofmann *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017) e morfométricos, como da morfometria do crânio (Drehmer *et al.*, 2005). Então, mesmo que não haja suporte para a classificação de duas UESs, uma estrutura genética entre as populações do Atlântico e do Pacífico ainda é presente, e indica fluxo gênico de origem materna mediado no extremo sul do continente.

Historicamente, a relativamente baixa amostragem em latitudes inferiores a 45° S para fins de análise da estrutura populacional dos leões-marinhos-sul-americanos levou, por um tempo, a conclusões imprecisas acerca da estrutura genética entre os oceanos, uma vez que as possíveis zonas de contato não foram contempladas. Contudo, estudos mais atuais, com amostras provenientes de latitudes abaixo 45° S, vêm desvendando a história filogeográfica da espécie (Weinberger, 2013; Hoffman *et al.*, 2016, Oliveira *et al.*, 2017; Peralta *et al.*, 2021).

O lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*), outra espécie da família Otariidae, também apresenta estrutura genética entre os grupos do Atlântico e do Pacífico, e como as fêmeas dessa espécie também apresentam alta filopatria, fica evidente a presença de alguma barreira ao fluxo de gênico mediado por fêmeas de otarídeos da região (Túnez *et al.*, 2007; Oliveira, Ott, Malabarba, 2008). Como os machos realizam grandes migrações, é possível concluir que tal barreira não é física, e para ser identificada é necessário encontrar o ponto de contato entre as populações do Atlântico e do Pacífico, o que demanda mais amostras advindas do extremo sul do continente (Oliveira *et al.*, 2017).

Alguns autores levantam que a estrutura genética entre as populações do Atlântico e do Pacífico podem ser resultantes da primeira, e talvez única, dispersão de fêmeas do Pacífico para o Atlântico (Churchill, Boessenecker, Clementz, 2014). Porém, considerando o cenário atual de fluxo gênico de origem materna no extremo sul do continente, é mais plausível considerar a estrutura como resultado da dinâmica climática do Pleistoceno, que pode estar diretamente relacionada à origem e manutenção dessa estrutura filogeográfica. Isto porque a única rota de migração da espécie, no extremo sul do continente, é uma região de condições extremas ao longo da maior parte do tempo, desde os ciclos glaciais do Pleistoceno, levando as populações de leões-marinhos-sul-americanos a permanecerem isoladas por um longo período de tempo (Oliveira *et al.*, 2017). Durante a Última Máxima Glacial, por exemplo, o Estreito de Magalhães, região investigada no presente estudo, estava congelado (McCulloch, Bentley, 1998), bloqueando o fluxo gênico entre as populações do Atlântico e do Pacífico, tendo permanecido assim durante a maior parte do Pleistoceno tardio (Ponce *et al.*, 2011).

A separação dos leões-marinhos-sul-americanos em duas UESs, uma vez suportada por evidências genéticas (Oliveira *et al.*, 2017; Feijoo *et al.*, 2011; Túnez *et al.*, 2010; Artico *et al.*, 2010) e morfológicas (Brunner, 2004; Drehmer *et al.*, 2005), foi uma ferramenta essencial para o planejamento de estratégias de manejo eficientes, considerando as particularidades de cada lada do continente sul-americano. Contudo, a separação das populações do Atlântico e do Pacífico como UESs distintas foi refutada a partir de novas análises, que utilizaram amostras obtidas a partir de latitudes abaixo de 45° S e registraram haplótipos compartilhados entre as UESs propostas (Hoffman *et al.*, 2016; Peralta *et al.*, 2021). Dessa maneira, as iniciativas para a conservação da espécie atualmente devem considerar a separação em cinco Unidades para a Conservação, como proposto por Peralta e colaboradores (2021) após uma extensa análise da estrutura populacional da espécie por toda sua área de distribuição.

As estratégias de manejo devem considerar, então, as particularidades de cada UC, como o declínio populacional durante eventos de El Niño no Pacífico (Oliveira, 2011), a caça ilegal que ocorre no Peru, as interações com a aquacultura de salmão, no Chile (Sepúlveda, Oliva, 2005), a caça histórica ao longo da costa Atlântica, e a baixa variabilidade genética e declínio populacional no Uruguai (Crespo *et al.*, 2012; Feijoo *et al.*, 2011; Franco-Trecu, 2015). Então, considerando o cenário onde é proposto que as colônias da Tierra del Fuego formam uma Unidade para Conservação independente (Peralta *et al.*, 2021), as informações genéticas provenientes dessa região são de suma importância para delimitação da estrutura filogenética da espécie, e o papel dessa unidade no fluxo de genes de origem materna entre o Atlântico e o Pacífico.

Dessa forma, fica clara a importância da disponibilidade de informações acerca de número de espécimes e suas localizações para cada sequência inserida na plataforma GenBank, o que possibilita que futuros estudos sobre a filogeografia de *O. flavescens* sejam conduzidos de maneira mais incisiva, propiciando o esclarecimento da estrutura filogeográfica dos leões-marinhos-sul-americanos. Para além disso, uma vez que diferentes marcadores variam em potencial para detectar estruturas populacionais (Hoffman *et al.*, 2009), e alguns marcadores moleculares de mtDNA apresentam baixa resolução para estudos relacionados à variabilidade genética, é pertinente que outros marcadores sejam utilizados em conjunto com o D-loop (Peralta *et al.*, 2021).

7. CONCLUSÃO

As populações de leões-marinhos-sul-americanos do Atlântico e do Pacífico, embora não cumpram os requisitos necessários para formar duas UESs distintas, por compartilharem haplótipos mitocondriais, possuem populações bem diferenciadas. Os indivíduos da Ilha de Magdalena estão agrupados no cluster composto majoritariamente por indivíduos do oceano Pacífico e são geneticamente mais próximos a haplótipos do Chile e de alguns haplótipos da Argentina, que também compõem este cluster. Contudo, embora tenha-se confirmado que os haplótipos mais próximos aos da Ilha Magdalena incluem sequências do extremo sul (abaixo de 45° S), não foi possível determinar a localização precisa de todas as sequências para determinar se a relação de proximidade é limitada à haplótipos de latitudes mais baixas.

Então, a população de Magdalena, que provavelmente faz parte da Unidade para Conservação da Tierra del Fuego, está claramente associada com haplótipos do extremo sul do continente sul-americano, indicando que as populações do Estreito de Magalhães atuam efetivamente no fluxo gênico de origem materna entre indivíduos do Atlântico e do Pacífico.

Por fim, são necessários estudos mais aprofundados para determinar com precisão a estrutura filogeográfica do leão-marinho-sul-americano, incluindo as localidades de amostragem das sequências disponíveis do Genbank e o número de indivíduos que representam cada haplótipo. Além disso, é imprescindível que se empreguem marcadores nucleares e outros marcadores mitocondriais com menor taxa de mutação para testar os achados associados à região controle do DNA mitocondrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANNEX, B. H.; WILLIAMS, R. S. Mitochondrial DNA Structure and Expression in Specialized Subtypes of Mammalian Striated Muscle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 11, p. 5671-5678, 1990.
- ÁRNASON, Ú. *et al.* The Nucleotide Sequence of the Mitochondrial DNA Molecule of the Grey Seal, *Halichoerus grypus*, and a Comparison with Mitochondrial Sequences of Other True Seals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 37, n. 1, p. 323-330, 1993.
- ARTICO, L. O. *et al.* Mitochondrial control region haplotypes of the South American sea lion *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 816-820, 2010.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- BARTHELD, J. *et al.* **Cuantificación poblacional de lobos marinos en el litoral de la I a IV región**: Informe Final. Proyecto FIP 2006-50, 2008.
- BAYLIS, A. M. M. *et al.* Disentangling the cause of a catastrophic population decline in a large marine mammal. **Ecology**, v. 96, n. 41, p. 2834-2847, 2015.
- BERTA, A.; CHURCHILL, M.; BOESSENECKER R. W. The Origin and Evolutionary Biology of Pinnipeds: Seals, Sea Lions, and Walruses. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 46, n. 1, p. 203-28, 2018.
- BINGHAM, M. Magellanic penguin (Spheniscidae) monitoring results for Magdalena island (Chile) and cabo Virgenes (Argentina): 2000 - 2019. **Anales Instituto Patagonia (Chile)**, v. 48, n. 1, p. 27-35, 2020.
- BINGHAM, M.; HERRMANN, T. M. Magellanic penguin (Spheniscidae) monitoring results for Magdalena Island (Chile) 2000 – 2008. **Anales Instituto Patagonia (Chile)**, v. 36, n. 2, p. 19-32, 2008.
- BIRAY, B.; PEKSEN, Ç. A.; BILGIN, C. C. Heteroplasmy in the mitochondrial D-loop region in Turkish domestic pigeon breeds (*Columba livia domestica*) obfuscates their phylogeny. **European Poultry Science**, v. 89, n. 1, p. 1-8, 2025.
- BRUNNER, S. Fur seals and sea lions (Otariidae): Identification of species and taxonomic review. **Systematics and Biodiversity**, v. 1, n. 3, p. 339-439, 2004.
- BUROKER, N. E. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. **Genetics**, v. 124, n. 1, p. 157-163, 1990.
- CAMPAGNA, C. The Breeding Cycle of the Southern Sea Lion, *Otaria byronia*. **Marine Mammal Science**, v. 1, n. 3, p. 210-218, 1985.

- CAMPAGNA, C. *et al.* Movements and location at sea of South American sea lions (*Otaria flavescens*). **Journal of Zoology**, v. 255, n. 2, p. 205-220, 2001.
- CANTATORE, P.; SACCONI, C. Organization, Structure, and Evolution of Mammalian Mitochondrial Genes. **International Review of Cytology**, v. 108, n. 1, p. 149-208, 1978.
- CAPPOZZO, H. L. South American sea lion *Otaria flavescens*. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (eds) **Encyclopedia of Marine Mammals**, pp. 1143-1146. Academic Press, 2002.
- CAPPOZZO, H. L.; PERRIN, W. F. South American Sea Lion: *Otaria flavescens*. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (Eds.) **Encyclopedia of Marine Mammals**. 2 ed. 1076-1079p. Amsterdam: Academic Press, 2009.
- CÁRDENAS-ALAYZA, S.; CRESPO, E.; OLIVEIRA, L. R. *Otaria byronia*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2016.
- CERVANTES-DUARTE, R. *et al.* Annual patterns of nutrients and chlorophyll in a subtropical coastal lagoon under the upwelling influence (SW of Baja-California Peninsula). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 120, n. 1, p. 54-63, 2013.
- CERVANTES-DUARTE, R. *et al.* Ciclo estacional de nutrientes, temperatura, salinidad y clorofila a en Bahía Magdalena, BCS, México (2006-2007). **CICIMAR Océánides**, v. 25, n. 2, p. 111-120, 2010.
- CHANG, D. D.; CLAYTON, D. A. Precise Identification of Individual Promoters for Transcription of Each Strand of Human Mitochondrial DNA. **Cell**, v. 36, n. 1, p. 635-643, 1984.
- CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 1, p. 215-220, 1994.
- CHURCHILL, M.; BOESSENECKER, R. W.; CLEMENTZ, M. T. Colonization of the Southern Hemisphere by fur seals and sea lions (Carnivora: Otariidae) revealed by combined evidence phylogenetic and Bayesian biogeographical analysis. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 172, n. 1, p. 200-225, 2014.
- CLAYTON, D. A. Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. **Trends in Biological Science**, v. 16, n. 1, p. 107-111, 1991.
- CONTRERAS, F. *et al.* **Cuantificación poblacional de lobo marino común (*Otaria flavescens*) en el litoral de la XV, I y II Regiones**: Informe Final Proyecto 2012-6-FAP-1, 2014, 86p.
- CRESPO E. A. *et al.* **Estado de situación del lobo marino común en su área de distribución**: Current status of the South American sea lion along the distribution range. Valparaíso: Editorial Universidad de Valparaíso, 2012. 144p.
- CRESPO, E. A.; OLIVEIRA, L. R.; SEPÚLVEDA, M. South American Sea Lion (*Otaria flavescens*, Shaw 1800). In: SCHRAMM, Y.; HECKEL, G. (Eds.) **Ecology and Conservation**

of Pinnipeds in Latin America. 93-118 pp. Suíça: Springer Nature Switzerland, 2021.

DANS, S. L. *et al.* Recovery of the South American sea lion (*Otaria flavescens*) population in northern Patagonia. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, n. 1, p. 1681-1690, 2004.

DODA, J. N.; WRIGHT, C. T.; CLAYTON, D. A. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 10, p. 6116-6120, 1981.

DREHMER C. J. 2005. **Variação geográfica em *Otaria byronia* (de Blainville, 1820) (Pinnipedia, Otariidae) com base na morfometria sincraniana**. 2005. 202 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005

EDGINGTON, S. *et al.* *Steinernema australe* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile. **Nematology**, v. 11, n. 5, p. 699-717, 2009.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. ARLEQUIN suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FABIANI, A. *et al.* Long-range paternal gene flow in the Southern Elephant Seal. **Science**, v. 299, n. 5607, p. 676, 2003.

FEIJOO, M. *et al.* Mitochondrial and microsatellite assessment of population structure of South American sea lion (*Otaria flavescens*) in the Southwestern Atlantic Ocean. **Marine Biology**, v. 158, n. 1, p. 1857-1867, 2011.

FRANCO-TRECU, V. **Tácticas comportamentales de forrajeo y apareamiento y dinámica poblacional de dos espécies de otáridos simpátricas com tendências poblacionais contrastantes**. 2015. 225 f. Tese (Ciências Biológicas – Área Biologia (sub-área Ecologia)) - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2015.

FRANKHAM, R. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

FUMAGALLI, L. *et al.* Origin and Evolution of Homologous Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region of Shrews. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 1, p. 31-46, 1996.

FUNES-RODRÍGUEZ, R; GÓMEZ-GUTIÉRREZ, J.; PALOMARES-GARCIA, R. **Estudios Ecológicos en Bahía Magdalena**. México: Instituto Politécnico Nacional, 2007. 311 p.

GEMMELL, N. J. *et al.* Evolution of the Mammalian Mitochondrial Control Region – Comparisons of Control Region Sequences Between Monotreme and Therian Mammals. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 6, p. 798-808, 1996.

- GHIVIZZANI, S. C. *et al.* Transcribed Heteroplasmic Repeated Sequences in the Porcine Mitochondrial DNA D-loop Region. **Journal of Molecular Evolution**, v. 37, n. 1, p. 36-47, 1993.
- GRANDI, M. F. *et al.* Growth and age at sexual maturity of South American sea lions. **Mammalian Biology**, v. 75, n. 1, p. 427-436, 2010.
- HAMILTON, J. E. A second report on the southern sea lion, *Otaria byronia* (de Blainville). **Discovery Reports**, v. 19, n. 1, p. 121-164, 1939.
- HOELZEL, A. R. Where to now with the evolutionarily significant unit? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 38, n. 12, p. 1134-1142, 2023.
- HOELZEL, A. R. *et al.* Rapid Evolution of a Heteroplasmic Repetitive Sequence in the Mitochondrial DNA Control Region of Carnivores. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, n. 1, p. 191-199, 1994.
- HOFFMAN, J. I. *et al.* Population structure and historical demography of South American sea lions provide insights into the catastrophic decline of a marine mammal population. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2016.
- HÜCKSTÄDT, L. A.; KRAUTZ, M. C. Interaction between southern sea lions *Otaria flavescens* and jack mackerel *Trachurus symmetricus* commercial fishery off Central Chile: a geostatistical approach. **Marine Ecology Progress Series**, v. 282, n. 1, p. 285-294, 2004.
- IMARPE. Anuario Científico y Tecnológico. v.13. Callao: Instituto del Mar del Perú, 2013. 211p.
- KORNIENKOA, I. V. *et al.* Structural and Functional Organization of the Mitochondrial DNA Control Region in the Woolly Mammoth (*Mammuthus primigenius*). **Molecular Biology**, v. 53, n. 4, p. 560-570, 2019.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-Strand Mismatching: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, n. 3, p. 203-221, 1987.
- LOPES, F. *et al.* Fine-scale matrilineal population structure in the Galapagos fur seal and its implications for conservation management. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 1, p. 1099-1113, 2015.
- LOPES, F. *et al.* Phylogenomic Discordance in the Eared Seals is best explained by Incomplete Lineage Sorting following Explosive Radiation in the Southern Hemisphere. **Systematic Biology**, v. 70, n. 4, p. 786-802, 2021.
- MADSEN, C. S.; GHIVIZZANI, S. C.; HAUSWIRTH, W. W. In vivo and in vitro evidence for slipped mismatching in mammalian mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 1, p. 7671-7675, 1993.
- MCCULLOCH, R. D.; BENTLEY, M. J. Late Glacial Ice Advances in the Strait of Magellan, Southern Chile. **Quaternary Science Reviews**, v. 17, n. 1, p. 775-787, 1998.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215-1215, 1988.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 9, n. 10, p. 9-10, 1994.

NASS, M. M. K. Precise sequence assignment of replication origin in the control region of chick mitochondrial DNA relative to 5' and 3' D-loop ends, secondary structure, DNA synthesis, and protein binding. **Current Genetics**, v. 28, n. 1, p. 401-409, 1995.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Nova York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NYAKATURA, K.; BININDA-EMONDS, O. R. P. Updating the evolutionary history of Carnivora (Mammalia): a new species-level supertree complete with divergence time estimates. **BMC Biology**, v. 10, n. 12, p. 1-31, 2012.

OLIVA, D. *et al.* **Cuantificación poblacional de lobos marinos en las Regiones X –XI y propuesta de escenarios de manejo**: Informe Final. Proyecto FAP ID 4728-46-LP11, 2012. 100p.

OLIVA, D. *et al.* **Estimación poblacional de lobos marinos e impacto de la captura incidental**. Pre-informe Final Proyecto FIP 2018-54, 190 pp + Anexos.

OLIVEIRA, L. R. *et al.* Ancient female philopatry, asymmetric male gene flow, and synchronous population expansion support the influence of climatic oscillations on the evolution of South American sea lion (*Otaria flavescens*). **PLOS One**, v. 12, n. 6, p. 1-23, 2017.

OLIVEIRA, L. R. Vulnerability of South American Pinnipeds Under El Niño Southern Oscillation Events. pp. 237-252. *In*: CASALEGNO, S. **Global Warming Impacts - Case Studies on the Economy, Human Health, and on Urban and Natural Environments**. Rijeka: InTech, 2011.

OLIVEIRA, L. R.; OTT, P. H.; MALABARBA, L. R. Ecologia alimentar dos pinípedes do Sul do Brasil e uma avaliação de suas interações com atividades pesqueiras. pp. 97-116. *In*: REIS, N. R.; PERACCI, A. L.; SANTOS, G. A. S. D. (Eds) **Ecologia de Mamíferos**. Technical Booksed, 2008.

PÁEZ, E. Situación de la administración del recurso lobos y leones marinos en Uruguay. *In*: MENAFRA, R. *et al.* (eds), **Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya**. p. 577-583. Montevideo: Vida Silvestre, Sociedad Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza, 2006.

PAIJMANS, J. L. A.; GILBERT, M. T. P.; HOFREITER, M. Mitogenomic analyses from ancient DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 1, p. 404-416, 2013.

PAVANATO, H. *et al.* Occupancy dynamics of South American Sea-Lions in Brazilian Haul-outs. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 4, p. 855-862, 2013.

- PERALTA, D. M. *et al.* Phylogeography of *Otaria flavescens* (Carnivora: Pinnipedia): unravelling genetic connectivity at the southernmost limit of its distribution. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 134, n. 1, p. 11-27, 2021.
- PONCE, J. F. *et al.* Palaeogeographical evolution of the Atlantic coast of Pampa and Patagonia from the last glacial maximum to the Middle Holocene. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 1, p. 363-379, 2011.
- RAND, D. M.; HARRISON, R. G. Molecular Population Genetics of mtDNA Size Variation in Crickets. **Genetics Society of America**, v. 121, n. 1, p. 551-569, 1989.
- RATO, C. *et al.* The relevance of Evolutionary Significant Units for the conservation of island-restricted reptiles: *Tarentola boettgeri bischoffi* as a case study. **Amphibia-Reptilia**, v. 45, n. 1, p. 279-290, 2024.
- RIEDMANN, M. **The pinnipeds: Seals, Sea Lions, and walruses**. Oxford: University of California Press, 1990.
- RIET-SAPRIZA, F. G. *et al.* Foraging behavior of lactating South American sea lions (*Otaria flavescens*) and spatial-temporal resource overlap with the Uruguayan fisheries. **Deep-Sea Research II**, v. 1, n. 1, p. 106-119, 2013.
- ROSAS, F. C. W.; HAIMOVICI, M.; PINEDO, M. C. Age and Growth of the South American Sea Lion, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800), in Southern Brazil. **Journal of Mammology**, v. 74, n. 1, p. 141-147, 1993.
- RYDER, O. A. Species Conservation and Systematics: the Dilemma of Subspecies. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 1, n. 1, p. 9-10, 1986.
- SACCONI, C.; ATTIMONELLI, M.; SBISÀ, E. Structural Elements Highly Preserved During the Evolution of the D-Loop-Containing Region in Vertebrate Mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 26, n. 1, p. 205-211, 1987.
- SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic Amplification of P-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, n. 1, p. 1350-1354.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3rd ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- SANFELICE, D.; VASQUES, V. de C.; CRESPO, E. A. Ocupação sazonal por duas espécies de Otariidae (Mammalia, Carnivora) da Reserva Ecológica Ilha dos Lobos, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia: Série Zoologia**, v. 87, n. 1, p. 101-110, 1999.
- SBISÀ *et al.* Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene**, v. 205, n. 1, p. 125-140, 1997.

SEPÚLVEDA, M.; OLIVA, D. Interactions between South American sea lions *Otaria flavescens* (Shaw) and salmon farms in Southern Chile. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1062-1068, 2005.

STEWART, D. T.; BAKER, A. J. Patterns of Sequence Variation in the Mitochondrial D-Loop Region of Shrews. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 9-21, 1994.

STRANGE I. Sea lion survey in the Falkland. **Oryx**, v. 15, n. 1, p. 175-184, 1979.

TERMIGNONI-GARCIA, F.; BOUGIOURI, K.; EDWARDS, S. V. Heteroplasmy and tandem repeats reveal adaptation to elevation in the New World Jays (Aves: Corvidae). **bioRxiv** 12, 2023.

TÚNEZ, J. I. *et al.* Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). **Mammalian Biology**, v. 72, n. 4, p. 193-203, 2007.

TÚNEZ, J. I. *et al.* Population genetic structure and historical population dynamics of the South American sea lion, *Otaria flavescens*, in north-central Patagonia. **Genetica**, v. 138, n. 1, p. 831-841, 2010.

VENEGAS, C. *et al.* **Cuantificación poblacional de lobos marinos en la XII Región: Informe Final.** Punta Arenas: Universidad de Magallanes, 2001.

WANG, J. Y. Stock identity. *In*: PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J.G.M. **Encyclopaedia of Marine Mammals.** Ed. San Diego: Academic Press. p. 1189–1192, 2002.

WEINBERGER-ILLANES, C. S. El lobo marino común, *Otaria flavescens*, en Chile: distribución espacial, historia demográfica y estructuración genética. 2013. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências com menção em Ecologia) - Pontificia Universidad Católica de Chile, 2013.

WILKINSON, G. S. *et al.* Evolution of Repeated Sequence Arrays in the D-Loop Region of Bat Mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 146, n. 1, p. 1035-1048, 1997.

WILKINSON, G. S.; CHAPMAN, A. M. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. **Genetics**, v. 128, n. 3, p. 607-617, 1991.

XIMÉNEZ, I.; LANGGUTH, E. **Isla de Lobos.** Montevideo: Graphis ed, 2002.

YONEZAWA, T.; KOHNO, N.; HASEGAWA, M. The monophyletic origin of sea lions and fur seals (Carnivora; Otariidae) in the Southern Hemisphere. **Gene**, v. 441, p. 89-99, 2009.

ANEXOS

Anexo 1: Distribuição geográfica dos haplótipos de leões-marinhos-sul-americanos (*O. flavescens*) utilizados no alinhamento, segundo a região controle do mtDNA.

H	Brasil	Uruguai	Argentina	Falklands	Magdalena	Chile	Peru
Hap_1	0	0	0	0	1	0	0
Hap_2	0	0	0	0	1	0	0
Hap_3	0	0	6	0	0	0	0
Hap_4	0	0	4	0	0	0	0
Hap_5	0	0	7	0	0	0	0
Hap_6	0	0	1	0	0	0	0
Hap_7	0	0	1	0	0	0	0
Hap_8	0	0	1	0	0	0	0
Hap_9	0	0	4	0	0	0	0
Hap_10	0	0	1	0	0	0	0
Hap_11	0	0	2	0	0	0	0
Hap_12	0	0	1	0	0	0	0
Hap_13	0	1	0	0	0	0	0
Hap_14	0	1	0	0	0	0	0
Hap_15	0	1	0	0	0	0	0
Hap_16	0	1	0	0	0	0	0
Hap_17	0	1	0	0	0	0	0
Hap_18	0	1	0	0	0	0	0
Hap_19	0	1	0	0	0	0	0
Hap_20	0	1	0	0	0	0	0
Hap_21	0	1	0	0	0	0	0
Hap_22	0	1	0	0	0	0	0
Hap_23	1	2	2	0	0	0	0
Hap_24	0	1	0	0	0	0	0
Hap_25	0	0	2	0	0	0	0
Hap_26	0	0	1	0	0	0	0
Hap_27	0	0	1	0	0	0	0
Hap_28	0	0	1	0	0	0	0
Hap_29	0	0	1	0	0	0	0
Hap_30	0	0	1	0	0	0	0
Hap_31	0	0	1	0	0	0	0
Hap_32	0	0	1	0	0	0	0
Hap_33	0	0	1	0	0	0	0
Hap_34	0	0	4	0	0	1	0
Hap_35	0	0	1	0	0	0	0
Hap_36	0	0	0	0	0	3	0
Hap_37	0	0	0	0	0	2	0
Hap_38	0	0	0	0	0	1	0
Hap_39	0	0	0	0	0	2	0
Hap_40	0	0	0	0	0	1	0

Hap_41	0	0	0	0	0	1	0
Hap_42	0	0	0	0	0	2	0
Hap_43	0	0	0	0	0	1	0
Hap_44	0	0	0	0	0	1	0
Hap_45	0	0	0	0	0	1	0
Hap_46	0	0	0	0	0	1	0
Hap_47	0	0	0	0	0	1	0
Hap_48	0	0	0	0	0	1	0
Hap_49	0	0	0	0	0	1	0
Hap_50	0	0	0	0	0	1	0
Hap_51	0	0	0	0	0	1	0
Hap_52	0	0	0	0	0	1	0
Hap_53	0	0	0	0	0	1	0
Hap_54	0	0	0	0	0	1	0
Hap_55	0	0	0	0	0	1	0
Hap_56	0	0	0	0	0	2	0
Hap_57	0	0	0	0	0	1	0
Hap_58	0	0	1	1	0	1	0
Hap_59	0	0	0	0	0	0	1
Hap_60	0	0	0	0	0	0	1
Hap_61	0	0	0	0	0	0	1
Hap_62	0	0	0	0	0	0	1
Hap_63	0	0	0	0	0	0	1
Hap_64	0	0	0	0	0	0	1
Hap_65	0	0	0	0	0	0	1
Hap_66	0	0	0	0	0	0	1
Hap_67	0	0	0	0	0	0	1
Hap_68	0	0	0	0	0	0	1
Hap_69	0	0	0	0	0	0	1
Hap_70	0	0	0	0	0	0	1
Hap_71	0	0	0	0	0	1	0
Hap_72	0	0	0	0	0	1	0
Hap_73	0	0	0	0	0	1	0
Hap_74	0	0	0	0	0	1	0
Hap_75	0	0	0	0	0	1	0
Hap_76	0	0	0	0	0	1	0
Hap_77	0	0	0	0	0	1	0
Hap_78	0	0	0	0	0	1	0
Hap_79	0	0	0	0	0	1	0
Hap_80	0	0	0	0	0	1	0
Hap_81	1	0	3	0	0	0	0
Hap_82	1	0	1	0	0	0	0
Hap_83	1	0	1	0	0	0	0
Hap_84	1	0	1	0	0	0	0
Hap_85	1	0	1	0	0	0	0
Hap_86	0	0	2	0	0	0	0

Hap_87	0	0	1	0	0	0	0
Hap_88	0	0	5	0	0	0	0
Hap_89	0	0	1	0	0	0	0
Hap_90	0	0	1	0	0	0	0
Hap_91	0	0	0	1	0	0	0
Hap_92	0	0	0	1	0	0	0
Hap_93	0	0	0	1	0	0	0
Hap_94	0	0	0	1	0	0	0
Hap_95	0	0	0	1	0	0	0
Hap_96	0	0	2	1	0	0	0
Hap_97	0	0	3	0	0	0	0
Hap_98	0	0	2	0	0	0	0
Hap_99	0	0	1	0	0	0	0
Hap_100	0	0	2	0	0	0	0
Hap_101	0	0	1	0	0	0	0
Hap_102	0	0	1	0	0	0	0
Hap_103	0	0	1	0	0	0	0
Hap_104	0	0	1	0	0	0	0
Hap_105	0	0	1	0	0	0	0
Hap_106	0	0	2	0	0	0	0
Hap_107	0	0	1	0	0	0	0
Hap_108	0	0	2	0	0	0	0
Hap_109	0	0	1	0	0	0	0
Hap_110	0	0	1	0	0	0	0
Hap_111	0	0	1	0	0	0	0
Hap_112	0	0	1	0	0	0	0
Hap_113	0	0	1	0	0	0	0
Hap_114	0	0	2	0	0	0	0
Hap_115	0	0	1	0	0	0	0
Hap_116	0	0	1	0	0	0	0
Hap_117	0	0	1	0	0	0	0
Hap_118	0	0	1	0	0	0	0
Hap_119	0	0	1	0	0	0	0
Hap_120	0	0	1	0	0	0	0
Hap_121	0	0	2	0	0	0	0
Hap_122	0	0	1	0	0	0	0
Hap_123	0	0	1	0	0	0	0
Hap_124	0	0	1	0	0	0	0
Hap_125	0	0	1	0	0	0	0
Hap_126	0	0	1	0	0	0	0
Hap_127	0	0	1	0	0	0	0

Anexo 2: Alinhamento das seqüências da região controle do mtDNA de leões-marinhos-sul-americanos (*O. flavescens*) utilizadas no estudo, segundo a metodologia ClustalW.

Anexo 3: Rede de haplótipos (*median-joining network*) da região controle do mtDNA populações do leão-marinho-sul-americano (*Otaria flavescens*) do Brasil, Uruguai, Argentina, Ilhas Falklands, Ilha Magdalena, Chile e Peru.

