



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rodrigo Goldenberg Barbosa

**O uso do DNA ambiental (eDNA) e da geoquímica
orgânica na prospecção de paleo-pinguineiras na Ilha
Rei George/Península Antártica**

Rio de Janeiro

2023

Rodrigo Goldenberg Barbosa

O uso do DNA ambiental (eDNA) e da geoquímica orgânica na prospecção de paleo-pinguineiras na Ilha Rei George/Península Antártica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Rogério Leal do Amaral

Coorientador: Prof. Dr. Heitor Evangelista

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CTC/A

B238 Barbosa, Rodrigo Goldenberg.
 O uso do DNA ambiental (eDNA) e da geoquímica orgânica na
 prospecção de paleo-pinguineiras na Ilha Rei George/Península Antártica/
 Rodrigo Goldenberg Barbosa. – 2023.
 131 f. : il.

 Orientador: Cesar Rogério Leal do Amaral
 Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do
 Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

 1. Pinguins - Antártida - Teses. 2. Rei George - Ilha (Antártica) -
 Teses. I. Amaral, Cesar Rogério Leal do. II. Universidade do Estado do
 Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 598.45(1-923)

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rodrigo Goldenberg Barbosa

O uso do DNA ambiental (eDNA) e da geoquímica orgânica na prospecção de paleo-pinguineiras na Ilha Rei George/Península Antártica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em 23 de julho de 2023.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cesar Rogerio Leal do Amaral (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Lena Geise
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes-UERJ

Dra. Maithê Gaspar Pontes Magalhães
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Beatriz Grosso Fleury
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Dr. Harrison Magdinier Gomes
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo aos meus pais, Telma
Goldenberg e Oscar Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, Oscar e Telma, por todo a força e carinho, e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador e companheiro de Antártica, Prof. Cesar Amaral, que está comigo nessa jornada acadêmica desde a graduação, e sempre acreditou no meu potencial. Agradeço por todas as oportunidades e conselhos que me fizeram crescer como profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Heitor Evangelista, pela colaboração e pelas oportunidades oferecidas.

À todos do LARAMG-UERJ, em especial minhas companheiras de laboratório, Anna Donato e Dafne Anjos, pela amizade em horas de descontração e por todo o apoio na pesquisa.

Ao pessoal da OPERANTAR XLI, em especial aos militares do Grupo Base “Orca” e a tripulação do Navio de Apoio Oceanográfico “Ary Rongel”, por toda a ajuda na coleta de amostras e pela recepção na Estação Antártica Comandante Ferraz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado fornecida.

It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers.

Kvothe, "O Medo do Sábio"

RESUMO

BARBOSA, Rodrigo Goldberg. **O uso do DNA ambiental (eDNA) e da geoquímica orgânica na prospecção de paleo-pinguineiras na Ilha Rei George/Península Antártica**. 2023. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

A Antártica é conhecida como o lugar mais seco e frio do planeta. Devido aos seus extremos em relação ao clima, habitat e biogeografia, a região antártica se apresenta como um importante laboratório a céu aberto para diversas pesquisas relacionadas a processos fundamentais da vida que apresentam implicações globais. Uma das principais abordagens empregadas para este tipo de estudo relaciona-se com o recente avanço das tecnologias moleculares, com o uso do DNA ambiental (eDNA) como uma ferramenta valiosa de prospecção e avaliação de problemas relacionados à biodiversidade. Como por exemplo, no monitoramento de espécies de interesse, uma vez que possibilita a investigação de fenômenos e processos recentes bem como o acompanhamento temporal dos efeitos das mudanças climáticas globais nas populações destas espécies. Por possuir populações sensíveis às mudanças climáticas do planeta, os pinguins antárticos se tornam um importante táxon a ser observado no monitoramento dos efeitos das mudanças climáticas na Antártica. Porém, poucos estudos obtiveram sucesso na extração de eDNA de vertebrados antárticos, deixando uma lacuna na literatura. No presente estudo realizamos uma revisão bibliográfica de como o eDNA de vertebrado é utilizado no Ártico e como técnicas empregadas no norte podem influenciar o futuro da pesquisa com eDNA antártico. O estudo também comparou alterações na quantidade de eDNA bacteriano encontrada em amostras de sedimento lacustre com flutuações de marcadores biogeoquímicos e com outros levantamentos populacionais de pinguins já publicados na literatura. Também testamos o potencial do uso do eDNA no monitoramento de espécies de vertebrados antárticas, obtivemos as primeiras sequências de vertebrados extraídos de amostras de solo antártico, com sucesso na identificação da espécie *Pysgocelis adeliae* através da região COX 1 do genoma mitocondrial.

Palavras-chave: Antártica. eDNA. Monitoramento. Pinguim.

ABSTRACT

BARBOSA, Rodrigo Goldberg. **The use of environmental DNA (eDNA) and organic geochemistry in the prospect of paleo-penguin colonies in King George Island/Antarctic Peninsula**. 2023. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Antarctica is known as the driest and coldest place on the planet. Due to its extremes in relation to climate, habitat and biogeography, the Antarctic region presents itself as an important open-air laboratory for various research related to fundamental life processes that present global implications. One of the main approaches employed for this type of study is related to the recent advancement of molecular technologies, with the use of environmental DNA (eDNA) as a valuable tool for prospecting and evaluating problems related to biodiversity. For example, in monitoring species of interest, since it enables the investigation of phenomena and recent processes as well as the temporal monitoring of the effects of climate change on the populations of these species. As a sensitive species to climate change the Antarctic penguin species becomes an important taxon to be observed in monitoring the effects of climate change in Antarctica. However, few studies have been successful in extracting eDNA from Antarctic vertebrates, leaving a gap in the literature. In the present study, we performed a literature review of how vertebrate eDNA is used in the Arctic and how techniques employed in the North may influence the future of Antarctic eDNA research. The study also compared changes in the amount of bacterial eDNA found in lake sediment samples with fluctuations in biogeochemical markers and with other penguin population surveys already published in the literature. To test the potential of using eDNA in the biomonitoring of Antarctic vertebrate species we obtained the first vertebrate sequences extracted from Antarctic soil samples, successfully identifying the species *Pygoscelis adeliae* through the COX 1 region of the mitochondrial genome.

Keywords: Antarctica. eDNA. Monitoring. Penguin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de artigos encontrados na revisão do uso de eDNA de vertebrados no Ártico.....	27
Figura 2 -	Representação de como ocorre a deposição de sedimentos no fundo de um lago glacial junto de matéria orgânica de organismos lacustres, formando uma “linha-do-tempo” das populações locais.....	36
Figura 3 -	Mapa detalhado de Ponta Turret a ocorrência das espécies de vertebrados que habitam a região, assim como a localização do ponto de coleta do testemunho (●).....	39
Figura 4 -	Vegetação de musgos e líquens é encontrada por toda a região de Ponta Turret.....	40
Figura 5 -	Local de coleta do testemunho no lago de derretimento, localizado na parte debaixo de um planalto com a presença de pinguins.....	40
Figura 6 -	a. Mapa com as localizações de lagos glaciais da Ilha Rei George com datação sedimentar já conhecidas. b. Nome das localidades, coordenadas e tamanho do sedimento retirado.....	42
Figura 7 -	Testemunho de fundo de lago coletado na Ponta Turret dividido por centímetro e data aproximada dos segmentos do testemunho.....	44
Figura 8 -	Valores de $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, C_{total} e N_{total} encontrados no testemunho sedimentar de Ponta Turret.....	46
Figura 9 -	Variações populacionais para as espécies de pinguins encontradas na região da Ponta Turret (1975-2005).....	48
Figura 10 -	As áreas livres de gelo da Antártica divididas em 16 Regiões Biogeográficas de Conservação Antártica.....	53
Figura 11 -	Mapa da distribuição das espécies de pinguim.....	54
Figura 12 -	Espécies de pinguins antárticos mais ameaçadas pelas mudanças climáticas.....	55
Figura 13 -	Localização do ponto de coleta em Ponta Thomas (●), Ilha Rei George, Ilhas Shetland do Sul, Antártica.....	60
Figura 14 -	Pesquisadores realizando a coleta com o apoio do NApOc Ary Rongel, da Marinha do Brasil.....	61
Figura 15 -	Coleta de amostras de solo em Ponta Thomas, Ilha Rei George, Antártica.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 16 -	Trincheiras para a coleta de amostras nos três pontos da localidade Ponta Thomas.....	62
Figura 17 -	Espécies de pinguim encontradas em Ponta Thomas, Ilha Rei George, Antártica.....	63
Figura 18 -	Outras espécies faunísticas encontradas em Ponta Thomas, Ilha Rei George, Antártica.....	64
Figura 19 -	Alteração no protocolo tradicional do kit DNeasy PowerSoil® Pro (QIAGEN).....	66
Figura 20 -	Árvore de neighbor-joining (K2P) (bootstrap x1000) de espécies de pinguins antárticos.....	70
Figura 21 -	Gel de agarose com amplificações positivas para 180 pares de base da região COX1 do DNAm de pinguim.....	71
Figura 22 -	Eletroferograma representativo do sequenciamento da região COX1 do DNA mitocondrial de <i>Pygoscelis adeliae</i>	72
Figura 23 -	Resultado representativo da identificação ao nível de espécie para <i>Pygoscelis adeliae</i> , feito pela ferramenta BLASTN.....	72
Figura 24 -	Árvore Neighbor-Joining (K2P) do marcador COX1, exibindo acima dos nós, valores de bootstrap acima de 80. As setas indicam as novas sequências adquiridas nesse estudo.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista de todos os artigos publicados revisados que usam eDNA no Ártico, separados por organismo, tipo de amostra e, se presente, um tipo de amostra secundária.....	24
Tabela 2 -	Condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação da região COI do DNA mitocondrial.....	41
Tabela 3 -	Medidas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ encontradas no testemunho sedimentar da Ponta Turret, Ilha Rei George, Antártica, separados por profundidade.....	45
Tabela 4 -	Códigos de acesso GenBank para as sequências de pinguins antárticos utilizadas no banco de dados	65
Tabela 5 -	Condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação da região COI do DNA mitocondrial	67
Tabela 6 -	Condições termocíclicas utilizadas nas reações de purificação das amostras amplificadas.....	68
Tabela 7 -	Condições termocíclicas utilizadas nas reações de sequenciamento das amostras após a etapa de purificação.....	68
Tabela 8 -	Matriz de distância K2P entre espécies de pinguins antárticos	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCA	Corrente Circumpolar Antártica
COX1	Citocromo c oxidase subunidade 1
Ctotal	Carbono orgânico total
Ntotal	Nitrogênio total
eDNA	DNA ambiental
mtDNA	DNA mitocondrial
Ma	Milhões de anos
EACF	Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz
PAO	Península Antártica Ocidental
IPCC	Painel Intergovernamental em Mudanças Climáticas
POP	Poluentes orgânicos persistentes
SedaDNA	DNA ambiental proveniente de sedimentos
$\delta C13$	Delta carbono (C) treze
$\delta N15$	Delta Nitrogênio (N) quinze

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: O USO DE DNA AMBIENTAL PARA A RECONSTRUÇÃO DE POPULAÇÕES PRESENTES E PASSADAS DE VERTEBRADOS POLARES.....	23
1.1	Objetivos	25
1.1.1	<u>Objetivos gerais</u>	25
1.1.2	<u>Objetivos específicos</u>	25
1.2	Material e Métodos.....	26
1.3	Resultados.....	26
1.4	Discussão.....	31
1.5	Uso de eDNA no estudo de vertebrados no Ártico.....	31
1.5.1	<u>Amostras de água.....</u>	31
1.5.2	<u>Amostras de sedimentos.....</u>	32
1.5.3	<u>Amostras de solo.....</u>	33
1.5.4	<u>Outras amostras.....</u>	34
1.6	Pesquisa de eDNA de vertebrados: Ártico e Antártica.....	35
1.7	Conclusões	38
2	A APLICAÇÃO COMBINADA DE DNA AMBIENTAL (eDNA) E GEOQUÍMICA ORGÂNICA NA PROSPECÇÃO DE PALEO-PINGUINERASNA ILHA REI GEORGE/PENÍNSULA ANTÁRTICA	39
2.1	Objetivos	44
2.1.1	<u>Objetivos gerais</u>	44
2.1.2	<u>Objetivos específicos</u>	44
2.2	Material e Métodos.....	45
2.3	OPERANTAR XXXVI – Amostras Ponta Turret (Verão 2018/2019).....	45
2.4	Extração de DNA.....	48
2.5	Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	48
2.6	Análise de isótopos estáveis.....	49
2.7	Taxa de sedimentação de lagos glaciais da Ilha Rei George.....	49
2.8	Resultados.....	51

2.9	Amostras de Ponta Turret.....	51
2.10	Datação aproximada a partir da taxa de sedimentação de lagos glaciais.....	51
2.11	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.....	52
2.12	Discussão.....	54
2.13	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em sedimentos ornitogênicos e a variação populacional de pinguins antárticos.....	54
2.14	Bactérias como biomarcadores de pinguins antárticos.....	59
2.15	Conclusões.....	60
3	DETECÇÃO DE eDNA DE PINGUIM-DE-ADÉLIA (<i>Pygoscelis adeliae</i>) EM AMOSTRAS DE SOLO ANTÁRTICO.....	62
3.1	Continente antártico e sua biodiversidade.....	62
3.2	Família Spheniscidae e as ameaças às suas populações.....	64
3.3	DNA Ambiental (eDNA).....	68
3.4	Objetivos.....	71
3.4.1	<u>Objetivo Geral.....</u>	71
3.4.2	<u>Objetivo específico.....</u>	71
3.5	Material e Métodos.....	71
3.6	OPERANTAR XLI - Amostras Ponta Thomas (Verão 2022/2023).....	71
3.7	Análises Moleculares.....	77
3.7.1	<u>Marcadores moleculares.....</u>	77
3.7.2	<u>Identificação molecular de pinguins antárticos.....</u>	77
3.7.3	<u>Extração de DNA.....</u>	78
3.7.4	<u>Determinação da concentração do DNA.....</u>	79
3.7.5	<u>Reação de polimerização em cadeia (PCR).....</u>	79
3.7.6	<u>Purificação e sequenciamento das regiões de interesse do DNAm.</u>	80
3.7.7	<u>Alinhamento e análise das sequências.....</u>	81
3.8	Resultados.....	82
3.9	Análises Moleculares.....	82
3.9.1	<u>Filogenia de pinguins antárticos.....</u>	82
3.9.2	<u>Amostras Ponta Thomas.....</u>	84
3.9.3	<u>DNA Barcode de <i>Pygoscelis adeliae</i>.....</u>	85
3.10	Discussão.....	87

3.11	Conclusões.....	91
	CONCLUSÕES FINAIS.....	92

INTRODUÇÃO GERAL

A Antártica é conhecida como o lugar mais seco e frio do planeta, com temperaturas que chegam aos 93,2 °C negativos (NASA, 2013) e representa cerca de 8-10% das áreas continentais do planeta (CONVEY et al., 2014). É a massa terrestre de grande tamanho mais isolada do mundo, possuindo uma extrema variabilidade sazonal, com variações extremas de fotoperíodo e temperatura (CONVEY et al., 2014). Essas características criam alguns dos gradientes ambientais mais fortes na Terra (CONVEY et al., 2014). Devido aos seus extremos em relação ao clima, habitat e biogeografia, a região antártica se apresenta como um importante laboratório a céu aberto para diversas pesquisas relacionadas a processos fundamentais da vida que apresentam implicações globais (WYNN-WILLIAMS, 1996; CONVEY et al., 2014). O continente apresenta também um desafio para a pesquisa de sua biodiversidade, dado a inacessibilidade de alguns locais (GRIFFITHS et al., 2011), assim como a dificuldade de se realizar estudos em alguns meses, durante o inverno antártico (HOWELL et al., 2021).

Localizada no extremo sul do planeta, a Antártica é circundada pelo Oceano Austral (CONVEY et al., 2014). Sua massa continental tem cerca de 14 milhões de km², (HOWELL et al., 2021) e se destaca por possuir cerca de 90% de todo o gelo do planeta e 70% de toda água doce (PIENITZ, 2008; TEIXEIRA DE JESUS et al., 2007). Aproximadamente 98% de sua superfície está coberta por gelo, acumulado nos últimos 15 milhões de anos (DALIA et al., 2004).

A passagem de Drake, que divide a Antártica da América do Sul, permite a Corrente Circumpolar Antártica (CCA) existir, sendo a maior corrente marinha do mundo em termos de transporte, carregando $137 \pm 8 \times 10^6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de água (RINTOUL, 2009). A existência dessa corrente tem implicações para o clima e a circulação oceânica global (RINTOUL, 2009). Ao transportar água entre os oceanos, a CCA contribui para o transporte de calor, umidade, e CO₂, influenciando decisivamente o clima de maneira global (MAYEWSKI et al., 2009). Esse fenômeno recebe o nome de circulação termohalina (TALLEY et al., 2011). Este padrão de circulação oceânica é o responsável por trazer águas de alta densidade para o Oceano Austral, que, quando em contato com a superfície trocam calor, oxigênio e CO₂ com a atmosfera, sendo este processo extremamente importante para a manutenção

dos ecossistemas de águas profundas (RINTOUL, 2009). A estrutura ecológica e biogeográfica do Oceano Austral é altamente influenciada pela CCA, e a circulação termohalina tem um papel importante nos ciclos do carbono marinho e dos nutrientes oceânicos (RINTOUL, 2009).

No inverno o oceano que circunda a Antártica congela, cobrindo uma área cerca de 1,5x o tamanho do continente (TURNER & COMISO, 2017). O clima da região Antártica é profundamente influenciado pela camada de gelo, que pode chegar até os 4km de altura (TURNER & COMISO, 2017). Esse gelo exerce um papel muito importante resfriando o planeta ao refletir raios solares de volta para o espaço, reduzindo assim a temperatura do hemisfério Sul (MAYEWSKI et al., 2009; TURNER & COMISO, 2017). Plataformas de gelo como as que se desenvolvem no continente antártico têm como importância fundamental estabilizar as geleiras que as mantêm, atrasando assim seu movimento e o transporte de água congelada para o mar (GILLE, 2014). Também apresentam uma grande sensibilidade às mudanças climáticas como, por exemplo, mudanças abruptas de temperatura (VÄLISUO et al., 2014). Geologicamente, a cobertura de gelo é relativamente recente, e se desenvolveu quando o continente passou a ter um clima polar nos últimos 50 Ma, com as primeiras coberturas de gelo se formando por volta de 34 Ma (ZACHOS et al., 1992; 2001). Essa cobertura de gelo aumentou a resposta da Terra em relação às variações orbitais, que nos últimos milhões de anos alterna entre ciclos longos de glaciação, quando a temperatura média terrestre são alguns graus mais frias e o nível do mar é mais baixo que o observado atualmente, com períodos interglaciais menores como, por exemplo, o dos últimos 10 mil anos, com temperaturas mais elevadas e nível do mar mais alto (MAYEWSKI et al., 2009; ZACHOS et al., 2003).

Com o objetivo de preservar esta região e regular sua exploração, em 1948 foi criado o Tratado Antártico. O Tratado Antártico é assinado por 49 países, onde 28 são considerados como Membros Consultivos e estabelece a Antártica como “uma reserva natural dedicada à paz e à ciência” (DUDENEY & WALTON, 2012). Como um ambiente sem populações humanas nativas, as interações do bioma local com as atividades exploratórias humanas podem ter um impacto amplificado (COETZEE & CHOWN, 2016). No entanto, a Antártica é cada vez mais influenciada por humanos através das atividades de pesquisadores, turistas, funcionários de estações e embarcações de pesca (BESTLY et al. 2020). Além

disso, a Antártica vem sofrendo consequências negativas em decorrência com influência indireta de atividades humanas no planeta. Observando as mudanças recentes, em especial em relação ao aumento da média da temperatura global, nota-se que este foi maior nas regiões polares do que em regiões temperadas e tropicais. O relatório do Painel Intergovernamental em Mudanças Climáticas (IPCC, em inglês) em 2021 demonstrou como as atividades antrópicas estão gerando o aquecimento das zonas de latitudes altas no planeta, de uma maneira mais rápida do que o observado em zonas temperadas e tropicais. HANSEN e colaboradores (1999) revelaram uma área de rápido aquecimento atmosférico na Península Antártica e no mar de Bellingshausen, adicionando a mais outras duas já descobertas e reportadas no noroeste da América do Norte e na Sibéria. Os estudos de Folland e colaboradores (2002) confirmaram que essas três áreas tiveram um aumento rápido de temperatura entre 1976 e 2000, e no caso da Antártica, podem representar um aumento considerável no derretimento da camada de gelo do continente (VAUGHAN, 2006). Acredita-se que o maior aumento na temperatura do inverno austral já registrado nos últimos 50 anos, de 5°C registrados na Estação Akademik Vernadsky, seja relacionado com a perda da cobertura de gelo marinho e o derretimento de plataformas de gelo nos mares de Amundsen e Bellingshausen (MAYEWSKI et al., 2009). O derretimento das plataformas acontece principalmente a partir da entrada de água mais quente por baixo da plataforma, derretendo o gelo de baixo para cima. Esse processo, além de levar ao derretimento das plataformas de gelo também desestabiliza as geleiras ao seu redor, o que pode acarretar, em última análise, um aumento considerável no nível do mar ocasionando consequências eventualmente catastróficas para populações de cidades costeiras (GILLE, 2014).

Em condições normais, a água de superfície do Oceano Austral esfria e aumenta sua porcentagem de sal com a formação do gelo oceânico do verão para o inverno, e aquecem e perdem sal quando da passagem do inverno para o verão (KLINCK, 1998). Como demonstrado para a Península Antártica (MEREDITH et al., 2005), a água superficial do Oceano Austral possui variação termal considerável e o aquecimento da mesma pode gerar forte estratificação com camadas de superfície consideravelmente mais quentes que as camadas mais profundas. Mesmo ocupando 25% da área global de oceanos, o Oceano Austral

se mostrou o responsável pelo maior aumento percentual de calor registrado nos oceanos entre 2005-2017 (45-67%) (IPCC, 2019). Esse fenômeno influencia de maneira negativa a dinâmica entre oceano e atmosfera, afetando os importantes ciclos de troca de calor, oxigênio e CO₂ no Oceano Austral, o que pode gerar consequências para os ecossistemas do mundo inteiro (IPCC, 2019).

Considerando a influência atmosférica no clima do continente antártico, é importante discutir o papel da camada de ozônio acima da Antártica e sua dinâmica em relação aos níveis de clorofluorcarbonos na atmosfera. O Cloro e o Bromo que são emitidos por conta das atividades industriais, acumulam-se durante o inverno na estratosfera e, ao reagirem com a radiação solar, em especial raios ultravioletas (UV), que atravessam a atmosfera, catalisam a degradação de moléculas de ozônio - O₃ (MAYEWSKI et al., 2009). Apesar do declínio da emissão de substâncias que degradam O₃ e da diminuição no buraco formado na camada de ozônio acima da Antártica (SOLOMON, 2019), ainda se observa uma persistência na irradiação extrema de raios ultravioleta decorrente deste fenômeno (CORDERO et al., 2022). A persistência da redução dos níveis de ozônio está atualmente sendo correlacionada aos níveis de lodo na atmosfera, um composto anteriormente descartado como um problema devido a supostos baixos níveis na estratosfera. O lodo tem a capacidade de aumentar a perda de ozônio durante a primavera e alterar a sazonalidade na Antártica (CUEVAS et al., 2022).

A Antártica também possui uma grande contaminação por metais pesados. Níveis elevados de cobre (Cu), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) foram encontrados no continente, derivados de ações antropogênicas como combustão de combustíveis fósseis, derramamento de óleo, incineração de lixo e descarte de esgoto, sendo estas umas das principais fontes de metais pesados na Antártica (CHU et al., 2019). Em seus estudos (DUQUESNE & RIDDLE, 2002) mostraram como os metais pesados são acumulados pelas espécies de invertebrados na Estação Casey (Austrália), indicando que a concentração de metais pesados é consistente com um gradiente de contaminação, e que esta pode acabar por contaminar toda a teia alimentar local.

Da mesma forma, os poluentes orgânicos persistentes (POPs), são componentes bioacumulativos e tóxicos que são introduzidas no ambiente através

de atividades antropogênicas como queima de combustíveis fósseis e pesticidas (NASH, 2011; BHARDWAJ et al., 2018). Os POPs também se tornaram um problema para o ecossistema Antártico nas últimas décadas, sendo reportado em diversos locais do continente (FUOCO et al., 2009; POZO et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2018; WANG et al., 2022). O estudo de HALE et al. (2008) indica que a poluição por POPs na Antártica pode estar relacionada à atividade humana, em especial relacionadas às atividades de bases de pesquisa. Devido ao ambiente seco e propenso a incêndios, diversas estações utilizam produtos com retardantes de fogo, os quais possuem POPs em sua composição (HALE et al., 2008).

A extensão da perturbação cumulativa, tanto para o ecossistema e vida selvagem, muitas vezes não é clara (PANDE et al., 2017). O contínuo monitoramento do clima e as consequências das mudanças climáticas no continente Antártico e Oceano Austral é muito importante para o futuro da rica biodiversidade no extremo sul do planeta (CASSANO; UOTILA & LYNCH, 2006; MAYEWSKI et al., 2009). A cada novo relatório do IPCC as previsões e modelos apresentados se tornam mais exatos e mais representativos da realidade (CASSANO; UOTILA & LYNCH, 2006; MAYEWSKI et al., 2009). Apesar dos modelos do IPCC apresentarem incertezas, todos os cenários apresentados são considerados igualmente prováveis. MAYEWSKI e colaboradores (2009) recomendam cautela e ação imediata. Desde 1990 o IPCC se tornou uma ferramenta importante no combate às mudanças climáticas e na proteção dos delicados sistemas biológicos e ciclos que ocorrem no círculo polar sul e sua influência no resto do planeta, evidenciando assim a conexão existente entre o futuro da Antártica e o futuro do planeta como um todo. Desta forma, a compreensão dos processos relacionados às mudanças climáticas globais e seus efeitos nas comunidades biológicas na região antártica apresentam-se como prioritárias uma vez que as alterações ali observadas podem acarretar o colapso de diversos sistemas cruciais para a biosfera terrestre.

Dentre os vários métodos possíveis de utilização para investigação destes vários compartimentos que se relacionam a preservação do ambiente antártico, um método possível para o monitoramento complementar dos organismos que são afetados por essas perturbações é o DNA Ambiental (eDNA; BEAN et al. 2017). O DNA ambiental descreve o material genético detectado em um ambiente amostral (OGRAM et al. 1987). Os organismos liberam DNA em seu ambiente

através de uma série de processos naturais, por ex. muda, defecação ou lesão (FICETOLA et al., 2008; TABERLET et al., 2012; 2018), sendo este o eixo principal no presente estudo. Desta forma o texto desta Dissertação foi dividido em três capítulos, todos com o tema principal relacionado ao uso do eDNA em regiões polares, com ênfase na Antártica. O primeiro capítulo é uma revisão bibliográfica que aborda o uso do eDNA no Ártico, fazendo um levantamento total de estudos com eDNA entre 2005 e 2022, e discutindo se a lacuna na literatura presente na Antártica para estudos com vertebrados (HOWELL et al., 2021), também existe para o Ártico, bem comocomparando as pesquisas sobre o uso de eDNA entre estas duas regiões polares.

O segundo capítulo relaciona-se à primeira tentativa de encontrar DNA de pinguins em amostras de sedimento lacustre, que, apesar do insucesso na amplificação do DNA alvo devido às condições inadequadas de preservação, gerou resultados interessantes em relação ao uso de eDNA na observação de flutuações populacionais de organismos lacustres. O estudo comparou alterações na quantidade de eDNA bacteriano encontrada nas amostras com flutuações de marcadores biogeoquímicos e com outros levantamentos populacionais já publicados na literatura.

O terceiro estudo foi realizado em decorrência da incapacidade de amplificar DNA de pinguim na amostra de sedimento inicial. O trabalho envolveu amostras recém coletadas e adequadamente preservadas, onde podemos demonstrar a primeira extração, amplificação e sequenciamento de eDNA de um vertebrado na Antártica. Assim como validar a metodologia empregada.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: O USO DE DNA AMBIENTAL PARA A RECONSTRUÇÃO DE POPULAÇÕES PRESENTES E PASSADAS DE VERTEBRADOS POLARES

INTRODUÇÃO

Devido aos seus extremos em termos de clima, habitat e biogeografia, as regiões polares correspondem a um importante laboratório ao ar livre para várias pesquisas relacionadas com processos fundamentais da vida que têm implicações globais (WYNN- WILLIAMS, 1996). Da mesma forma, como as regiões mais afetadas pelas mudanças climáticas, também representam uma importante área de pesquisa relacionada aos seus efeitos sobre a biodiversidade (POST et al., 2019; REIST et al., 2006).

Vertebrados antárticos e árticos parecem ser especialmente afetados por essas mudanças. Por exemplo, o declínio de populações de pinguim-imperador, na Antártica, e de ursos polares, no Ártico, ambos em decorrência do declínio de gelo oceânico (BARBRAUD & WEIMERSIRCH, 2001; WIIG et al., 2008). Como ambientes principalmente intocados (especialmente a Antártica, por nunca ter possuído população humana nativa), os métodos de pesquisa que não requerem contato direto com as espécies-alvo tornam-se mais valiosos (LEFORT et al., 2019). Nesse sentido, o uso do DNA ambiental se apresenta como uma importante ferramenta de monitoramento de espécies de interesse, pois permite a investigação de fenômenos e processos recentes, bem como ajuda a fornecer uma percepção temporal dos efeitos das mudanças climáticas globais sobre as populações dessas espécies (BELLEMAIN et al., 2013a; GIGUET-COVEX et al., 2014; JØRGENSEN et al., 2012).

O uso do DNA ambiental é relativamente recente para estudos em biodiversidade, usado pela primeira vez por Ogram e colaboradores em 1987, e refere-se ao material genético presente em um determinado ambiente, não coletado diretamente do organismo. Esse DNA pode ser extraído de diferentes tipos de amostras ambientais (por exemplo, água, sedimento, solo e fezes). No entanto, o uso desse material apresenta vários desafios como, por exemplo, a possibilidade dele se deteriorar rapidamente no ambiente (COLLINS et al., 2018),

as amostras podem conter inibidores que podem dificultar processos como a extração e a amplificação do material genético (MURCHIE et al., 2021) e, por vezes, os resultados obtidos podem não refletir a real riqueza de espécies de uma determinada área (CAPO et al., 2019).

O Ártico, com o uso do DNA ambiental antigo (aDNA), apresenta-se como uma região única para o estudo da paleofauna de vertebrados como, por exemplo, o mamute (MURCHIE et al., 2021) e suas interações com humanos no passado recente (WANG et al., 2021), ao contrário da Antártica, que possui animais preservados nos registros fósseis como, por exemplo, a espécie extinta de pinguim *Palaeudyptes klekowskii* (MYRCHA et al., 1990), mas nenhuma população humana nativa (HOWELL et al., 2021). Milhares de anos de interações entre a espécie humana e paleofauna coexistente podem ser observados utilizando o eDNA presente em sedimentos de *permafrost* no Ártico e, junto com o uso de técnicas de datação, podem fornecer uma perspectiva única de quanto tempo essas interações ocorreram e quando cessaram, fornecendo evidências de como ocorreu o processo de extinção de parte desses animais e suas prováveis causas (MURCHIE et al., 2021; WANG et al., 2021).

No entanto, comparando as regiões ártica e antártica, Howell e colaboradores (2021) indicaram que há uma lacuna nos estudos de eDNA de vertebrados na Antártica, relatando apenas quatro artigos sobre o assunto até 2020. Nesse sentido, realizamos uma revisão de literatura sobre o uso de eDNA de vertebrados no Ártico, buscando responder se essa lacuna também existe no Norte. Também separamos cada tipo de amostra citada e o organismo-alvo, além de discutirmos como o eDNA está sendo usado em cada artigo incluído na análise. Finalizamos com a comparação do uso destes métodos nas regiões polares e discutimos como a pesquisa de eDNA na Antártida pode se beneficiar dos estudos já conduzidos no Ártico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Elaborar um levantamento bibliográfico extenso e inclusivo sobre o uso do eDNA em regiões polares, com ênfase no ambiente ártico.

1.1.2 Objetivos específicos

- Separar cada tipo de amostra ambiental (ex: água, solo, água e sedimentos) e o organismo-alvo (Vertebrados, Invertebrados, Algas, Plantas, Fungos, Bactérias/Archeae e “outros organismos”)

- Discutir como o eDNA está sendo usado em pesquisas para cada artigo publicado no Ártico e como podem servir para o futuro da pesquisa com eDNA na Antártida.

1.2. Material e Métodos

Realizamos uma busca sistemática no mecanismo SCOPUS usando uma combinação dos termos “Arctic”, “Environmental DNA”, “metabarcoding”, “SedaDNA” e “Ancient DNA”, aceitando trabalhos entre 2005 e 2022. Examinamos os resultados e determinamos quais artigos discutem o uso de eDNA de vertebrados no Ártico e discutimos juntamente com a revisão de HOWELL e colaboradores (2021) que usou dados da Antártica. Excluimos resenhas de literatura, notas, capítulos de livros e errata. Qualquer artigo que incluísse os termos pesquisados, mas com amostras coletadas fora do círculo ártico (66° 33' N) foi excluído (ex. HAILE et al., 2009).

1.3 Resultados

De acordo com os critérios empregados na metodologia, encontramos um total de 95 artigos que usaram eDNA na região do Ártico com foco em eDNA de vertebrados (Tabela 1). A amostra mais predominante de eDNA no Ártico foi a água, que incluiu água do mar e água doce (n = 38 artigos), número este similar ao encontrado em estudos de sedimentos (n = 38 artigos), sendo seguidos pelos estudos com solo (n = 13). Fezes, gelo/neve e ar apresentaram o menor número de resultados e foram incluídos na categoria “outros” (n = 11) (Figura 1). Excluimos amostras de conteúdo estomacal, por não ser uma amostra ambiental e por requerer contato direto com o táxon estudado. Alguns artigos usaram mais de um tipo de amostra ou organismo de interesse (ex. DULIAS et al., 2017; KNUDSEN et al., 2022). Dos 95 artigos publicados, um total de 18 estudos utilizaram DNA de vertebrados em sua análise. Desses 18 artigos, 9 utilizaram amostras de água (ex. KNUDSEN et al., 2022; SEVELLEC et al., 2021), 6 utilizaram sedimentos (ex. MURCHIE et al., 2021; WANG et al., 2021), 2 utilizaram fezes (GRANQUIST et al., 2018; SCHMIDT et al., 2022) e um utilizou solo (EPP et al., 2012).

Os vertebrados encontrados nos estudos são representados por espécies da megafauna extinta, como os mamutes e o rinoceronte-lanudo (MURCHIE et

al., 2021; WANG et al., 2021) e pela biota contemporânea, por exemplo, a baleia-da-Groenlândia ou espécies de peixes do Ártico (RODGERS et al., 2018; SZÉKELY et al., 2021).

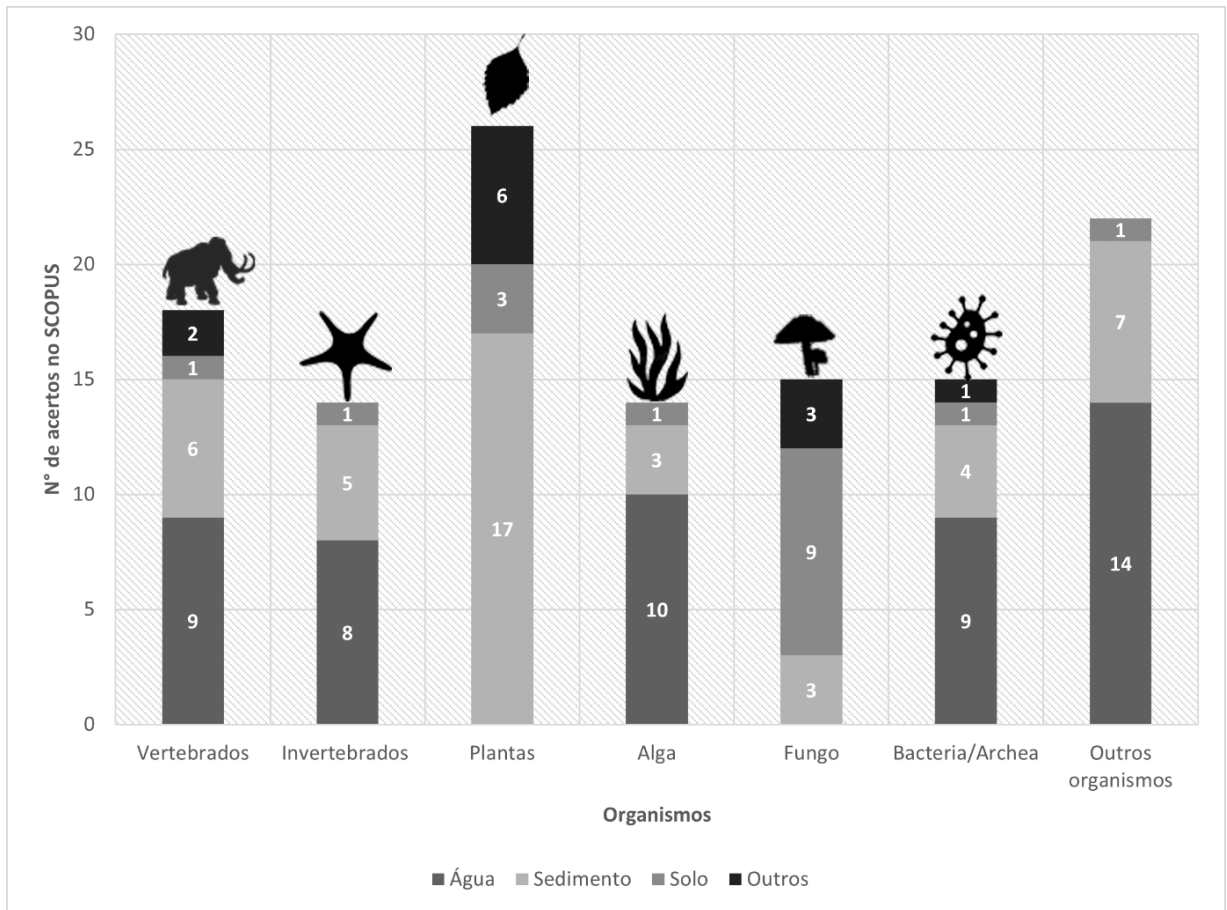
Tabela 1 - Lista de todos os artigos publicados revisados que usam eDNA no Ártico, separados por organismo, tipo de amostra e, se presente, um tipo de amostra secundária.

Referência	Organismo	Amostra	Amostra Secundária
Knudsen et al., 2022	Vertebrados/Invertebrados/Alga	Água	
Willerslev et al., 2014	Planta	Sedimento	
Pedersen et al., 2013	Planta	Sedimento	
Duncan et al., 2022	Bactéria ou Archaea /Outros organismos	Água	
Aggerbeck et al., 2022	Bactéria ou Archaea	Solo	
Ørberg et al., 2018	Alga	Sedimento	
Young & Hebert, 2022	Invertebrados	Solo	
Wang et al., 2021	Vertebrados/Planta	Sedimento	
Liu et al., 2021	Planta	Sedimento	
Sevellec et al., 2020	Vertebrados/Invertebrados	Água	
van den Heuvel-Greve et al., 2021	Vertebrados/Invertebrados	Sedimento	
Rego et al., 2021	Bactéria ou Archaea	Água	
Székely et al., 2020	Vertebrados	Água	
Zawierucha et al., 2020	Invertebrados/Outros organismos	Sedimento	
Alsos et al., 2020	Planta	Sedimento	
Pawłowska et al., 2020a	Outros organismos	Sedimento	
Stoof-Leichsenrin et al., 2020	Planta	Sedimento	
Karlsson et al., 2020	Bactéria ou Archaea /Fungo	Ar	
Capo et al., 2019	Vertebrados	Água	
Leduc et al., 2019	Vertebrados/Invertebrados	Água	
Milyutina et al., 2019	Alga	Água	
Wutkowska et al., 2019	Fungo	Solo	
Rodgers et al., 2017	Vertebrados	Água	
Ramírez et al., 2018	Bactéria ou Archaea	Sedimento	
Lacoursière-Roussel et al., 2018	Vertebrados/Invertebrados	Água	
Klobucar et al., 2017	Vertebrados	Água	
Dulias et al., 2016	Outros organismos	Sedimento	Água
Thomsen et al., 2016	Vertebrados	Água	

Dong et al., 2015	Bactéria ou Archaea	Sedimento	
Zhang et al., 2015	Bactéria ou Archaea	Sedimento	
Stoof-Leichsenring et al., 2014	Outros organismos	Sedimento	Água
Pawłowska et al., 2014	Outros organismos	Sedimento	
Cottrell & Kirchman, 2012	Bactéria ou Archaea	Água	
Epp et al., 2012	Vertebrados/Invertebrados/Plantas/Fungo	Solo	Sedimento
Pawłowski et al., 2011	Vertebrados/Invertebrados/Fungo	Sedimento	
Lovejoy & Vincent, 2007	Alga	Água	
Cottrell et al., 2005	Bactéria ou Archaea	Água	
Lammers et al., 2018	Vertebrados/Invertebrados	Sedimento	
Collins et al., 2011	Bactéria ou Archaea /Outros organismos	Água	Gelo
Joo et al., 2022	Outros organismos/Alga	Água	
Schmidt et al., 2022	Vertebrados	Fezes	
Stoof-Leichsenring et al., 2022	Alga	Sedimento	
Belevich et al., 2022	Alga	Água	
Han et al., 2022	Bactéria ou Archaea	Água	
Seeber et al., 2022	Fungo	Sedimento	
Huang et al., 2021	Planta	Sedimento	
Egge et al., 2021	Alga/Outros organismos	Água	
Zhang et al., 2021	Alga	Água	
Alsos et al., 2021	Planta	Sedimento	
Han et al., 2020	Bactéria ou Archaea	Água	
Geml et al., 2021	Fungi	Solo	
Bruhn et al., 2021	Outros organismos	Água	
Belevich et al., 2020	Alga	Água	
Leasi et al., 2020	Invertebrados/Outros organismos	Sedimento	
Kashulin et al., 2021	Alga/Outros organismos	Água	
Murchie et al., 2020	Vertebrados/Planta	Sedimento	
Botnen et al., 2020	Fungo	Solo	
Huang et al., 2020	Outros organismos	Água	Sedimento
Cabrol et al., 2020	Bactéria ou Archaea	Água	
Liu et al., 2020	Planta	Sedimento	
Elferink et al., 2020b	Outros organismos	Água	
Voldstad et al., 2020	Planta/Alga	Sedimento	
Elferink et al., 2020a	Outros organismos	Água	
Yau et al., 2020	Alga	Água	
De Schepper et al., 2019	Vertebrados/Invertebrados/Outros organismos	Sedimento	
Botnen et al., 2019	Fungo	Solo	
Sandaa et al., 2018	Outros organismos	Água	
Granquist et al., 2018	Vertebrados	Fezes	

Schmidt et al., 2018	Planta	Fezes	
Rippin et al. 2018	Planta/Alga/Outros organismos	Solo	
Schuelke et al., 2018	Invertebrados	Sedimento	
Edwards et al., 2018	Planta	Solo	
Zimmermann et al., 2017	Planta	Sedimento	
Soininen et al., 2017	Planta	Fezes	
Grau et al., 2017	Fungo	Solo	
Balzano et al., 2016	Outros organismos	Água	
Meshram et al., 2017	Bactéria ou Archaea /Outros organismos	Água	
Geml et al., 2016	Fungo	Solo	
Brown et al., 2016	Invertebrados	Água	
Semenova et al., 2016	Fungo	Solo	
Rämä et al., 2016	Fungo	Outro	
Chain et al., 2016	Invertebrados/Outros organismos	Água	
Alsos et al., 2015	Planta	Sedimento	
Geml et al., 2015	Fungo	Solo	
Soininen et al., 2015	Planta	Fezes	
Epp et al., 2015	Planta	Sedimento	
Soininen et al., 2013a	Planta	Fezes	
Soininen et al., 2013b	Planta	Fezes	
Bellemain et al., 2012	Fungo	Gelo	
Supraha et al., 2022	Outros organismos	Água	
Liang et al., 2021	Bactéria ou Archaea	Sedimento	
von Hippel et al., 2022	Fungo/Planta	Sedimento	
Bjune et al., 2022	Planta	Sedimento	
Crump et al., 2021	Planta	Sedimento	
Meuchi et al., 2020	Planta	Sedimento	

Figura 1 - Número de artigos encontrados na revisão do uso de eDNA no Ártico.



Legenda: É categorizado por "organismos" e "número de resultados no SCOPUS", além de separar cada categoria por tipo de amostra. Os artigos na categoria "Outros organismos" incluíam aqueles que visavam comunidades bentônicas. Fonte: Autor.

1.4 Discussão

1.5 Uso de eDNA no estudo de vertebrados no Ártico

1.5.1 Amostras de água

O tipo de amostra mais comum (38 artigos) também tem o maior número de estudos que extraíram com sucesso o eDNA de vertebrados, representando o segundo grupo de organismos mais estudado (~23%) nesses artigos, apenas um pouco atrás dos estudos sobre a diversidade de algas (~26%). Alguns estudos (LEDUC et al., 2019; SEVELLEC et al., 2021; SZÉKELY et al., 2021) usaram *metabarcoding* de amostras de eDNA para detectar transições da fauna marinha no Ártico, capturando o DNA de vertebrados, invertebrados e organismos bentônicos presentes em amostras de água. Esses estudos destacam a importância de considerar a variação temporal das comunidades, a fim de garantir que o biomonitoramento de áreas costeiras usando eDNA seja realizado adequadamente. Da mesma forma, KNUDSEN e colaboradores (2022) utilizou eDNA para monitorar espécies não nativas no Atlântico Nordeste. Ao realizar amostragens ao longo de um ano, os pesquisadores conseguiram demonstrar a mudança sazonal na distribuição de espécies marinhas invasoras na região de estudo. Um outro artigo descreveu a diversidade genética de baleias-da-groenlândia (*Balaena mysticetus*) no oeste da Groenlândia usando eDNA (SZÉKELY et al., 2021), onde os resultados sugerem que a amostragem de água na “pegada” ou “rastro” de animais pode ser uma técnica promissora para entender melhor a diversidade genética da megafauna marinha.

O DNA ambiental extraído de amostras de água também mostrou resultados promissores no monitoramento de populações de peixes em lagos do Ártico (RODGERS et al., 2018; CAPO et al., 2019). Rodgers e colaboradores (2018) criaram e testaram 4 ensaios quantitativos de PCR (qPCR) para detecção de cinco espécies de peixes árticos: *Lota lota*, *Cottus cognatus*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus malma* e *Thymallus arcticus*, permitindo a detecção eficiente e econômica dessas espécies em lagos.

Em sua maioria, os estudos aqui representados demonstram um grande potencial para o uso do eDNA no monitoramento de espécies marinhas e lacustres, especialmente aquelas afetadas pelas mudanças climáticas, uma vez que o melhor entendimento de sua distribuição é fundamental o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação e manejo. Por ser um método de amostragem rápido e fácil, esses estudos reforçam o uso do eDNA como uma vantagem sobre outros métodos de monitoramento, revelando uma correlação significativa entre eles em termos de número de espécies encontradas (KNUDSEN et al., 2022). No entanto, ainda existem limitações e dificuldades a serem superadas na aplicação dessa metodologia em pesquisas sobre biodiversidade. Székely e colaboradores (2021) destacam a rápida degradação do material genético uma vez que é exposto a fatores ambientais (por exemplo, temperatura, salinidade, pH, UV, atividade microbiana, dentre outros). Já Capo e colaboradores (2019) não encontraram nenhuma correlação entre as concentrações de eDNA e as estimativas da população de peixes do Ártico usando ensaios de PCR digital (ddPCR), mostrando menos de 70% de sucesso na detecção de espécies de peixes de um lago.

1.5.2 Amostras de sedimentos

O DNA ambiental extraído de amostras de sedimentos é comumente designado de DNA sedimentar (sedaDNA) (MURCHIE et al., 2021). Em nossa revisão, um total de 6 artigos detectou sedaDNA de vertebrados em amostras de sedimentos. Com o uso de datação por carbono, as amostras de sedimentos de lago oferecem uma oportunidade única para reconstrução da dinâmica ecológica do passado (HOWELL; LARUE & FLANAGAN, 2021), tendo sido usado na reconstrução detalhada da fauna e flora passadas desta região (LAMMERS et al., 2018; MURCHIE et al., 2021; WANG et al., 2021). Wang e colaboradores (2021) conseguiram atribuir DNA antigo altamente degradado de cavalos a haplogrupos mitocondriais conhecidos, permitindo a possibilidade de analisar histórias populacionais em regiões com pouca ou nenhuma evidência fóssil. Também usando a presença de eDNA como evidência, suas descobertas sugerem que parte da megafauna do Ártico coexistiu com humanos por dezenas de milhares de anos durante o Holoceno, indicando que o suposto excesso de

exploração/predação de origem humana pode não ser um fator chave na extinção destes organismos. Usando sedaDNA, Murchie e colaboradores (2021) reconstruíram a biota ártica durante a transição Pleistoceno- Holoceno, também apontando novas evidências para a sobrevivência tardia de espécies como o mamute (*Mammuthus spp*) e cavalos (*Equus spp*) na região de Klondike em Yukon, Canadá. Semelhante à água, o eDNA extraído de amostras de sedimentos também pode ser um recurso importante no monitoramento de espécies marinhas vertebradas não- nativas (VAN DEN HEUVEL-GREVE et al., 2021). Com o objetivo de documentar a evolução passada do gelo marinho, De Schepper e colaboradores (2019) tentaram encontrar DNA antigo de dinoflagelados conhecidos, associados ao gelo marinho. Simultaneamente, eles também relataram a descoberta de DNA de vertebrados em sedimentos oceânicos profundos, mostrando que o eDNA de vertebrados antigos pode ser recuperado nestas condições. Os estudos de Pawlowski e colaboradores (2011) também relataram ter encontrado vertebrados (Mammalia) em amostras de sedimentos de águas profundas, apesar de terem discutido a possibilidade de contaminação laboratorial.

Tal como acontece com outros estudos de eDNA, existem limites e obstáculos quando se trata de estudar eDNA de sedimentos. Wang e colaboradores (2021) relataram que, devido a uma limitação no método de datação, a reconstrução da dinâmica da vegetação passada sob mudanças climáticas só pode ser capturada em uma escala mais ampla. Outras duas limitações comuns na extração do sedaDNA são o resíduo de outras substâncias que inibem as reações enzimáticas e a perda do sedaDNA ao tentar reduzir a coeluição do inibidor. No entanto, purificações e métodos de enriquecimento que superamos kits de extração padrão podem ajudar a restaurar o DNA, superando os inibidores enzimáticos (MURCHIE et al., 2021).

1.5.3 Amostras de solo

Similar a Antártica, existe uma escassez de artigos publicados que conseguiram encontrar eDNA de vertebrados em amostras de solo, com apenas um artigo (EPP et al., 2012). Tal como acontece com outros tipos de amostras, o solo oferece uma oportunidade ideal para avaliar a fauna do passado e do

presente. Usando sedimentos e solo, Epp e colaboradores (2012) sugeriram marcadores para o uso em análises de *metabarcoding* específicos para fungos, briófitas, enquitreídeos, besouros e pássaros, testando-os com sucesso usando sedimentos do Pleistoceno e amostras de solo modernas. Este estudo abriu caminho para futuros estudos de *metabarcoding*, uma vez que forneceu marcadores ideais para serem utilizados no estudo de eDNA.

1.5.4 Outras amostras

Esses tipos de amostras incluiriam amostras de fezes, gelo/neve e ar, mas apenas 2 artigos encontraram DNA de vertebrados e ambos usaram amostras de fezes (GRANQUIST et al., 2018; SCHMIDT et al., 2018). Este tipo de amostra apresenta-se como uma oportunidade ideal para analisar a dieta de diversos organismos pois o DNA de seu alimento pode permanecer na amostra coletada. Granquist e colaboradores (2018) conseguiram extrair o DNA de várias espécies de peixes de amostras de fezes da foca *Phoca vitulina*. Este estudo também sugeriu que os salmonídeos não são um componente importante em sua dieta, como previamente considerado, fazendo com que o abate de focas fosse sugerido como uma estratégia para reduzir a predação de salmonídeos na região. Em outro exemplo, Schmidt e colaboradores (2018) revelaram que a dieta da raposa ártica incluía a maioria dos vertebrados terrestres encontrados em sua região e que sua dieta exibia mudanças temporais e geográficas, refletindo a disponibilidade de presas durante os meses de verão/inverno. Essa variação pôde fornecer dados importantes sobre como essas populações de predadores respondem a eventos climáticos extremos causados pelas mudanças climáticas (SCHMIDT et al., 2018). Ambos os estudos refletem a importância das amostras de eDNA na descoberta de dietas de organismos carnívoros e também mostram grande sucesso na avaliação da diversidade de presas em uma determinada área. Isso adiciona mais uma camada para o uso do eDNA no monitoramento da biodiversidade, como também demonstrado em amostras anteriores.

1.6 Pesquisa de eDNA de vertebrados: Ártico x Antártica

À luz de nossa revisão de literatura, parece haver uma discrepância significativa nos estudos de eDNA de vertebrados entre os polos. Enquanto a grande maioria dos estudos de eDNA antárticos se concentra na diversidade microbiana, com apenas 2% dos artigos publicados focando no eDNA de vertebrados (HOWELL et al., 2021), um total de 18 artigos em 95 o utilizam em suas pesquisas no Ártico (~19%). Isso deixa os vertebrados como o grupo de organismos menos estudado na Antártica usando eDNA. Embora existam alguns estudos cujo foco é a diversidade microbiana no Ártico, há uma diferença significativa quando comparado aos artigos de eDNA da Antártica (HOWELL et al., 2021). Os estudos de eDNA de vertebrados no Ártico são o segundo tipo de organismo mais publicado, atrás apenas do eDNA que pesquisa a diversidade de plantas (22 artigos). Pode-se argumentar que no Ártico, na qual alguns países possuem ocupação real do território, a realização desses estudos deve-se à facilidade de acesso a algumas áreas. Isso é diferente na Antártica, como continente isolado da civilização e com o clima mais severo do mundo, o que poderia criar alguma dificuldade para a realização de tais estudos. No entanto, a Antártica tem um número maior de artigos de eDNA publicados (172; HOWELL et al., 2021) quando comparado ao Ártico (95), dando a noção de que talvez a maioria das pesquisas antárticas tomem uma rota diferente no estudo de eDNA, pois é mais simples encontrar uma maior abundância de DNA microbiano em amostras ambientais do que vertebrados (DJURHUUS et al., 2017). Este fato é ainda mais evidenciado pelos estudos do Ártico que, apesar de compartilhar as condições extremas em relação ao clima (STRICKLER et al., 2015), apresenta um número significativo de artigos publicados que encontraram eDNA de vertebrados.

Os estudos de Howell e colaboradores (2021) apresentam importantes pesquisas de diversidade já realizadas na Antártida que encontraram eDNA de vertebrados (COWART et al., 2018; MARIANI et al., 2019; MCINNIS et al., 2016), bem como estudo com objetivo de avaliar mudanças ecológicas devido a espécies invasoras (FICETOLA et al., 2018). No entanto, como destacado anteriormente, ainda há um pequeno número de artigos publicados sobre este

assunto.

Utilizando amostras de água, o estudo de Székely e colaboradores (2021) mostrou que é possível recriar a diversidade genética das espécies usando apenas o DNA ambiental. Sendo um continente com uma vasta diversidade de vertebrados marinhos (e.g. pinguins, baleias, focas, peixes, leões-marinhos), este tipo de investigação pode revelar-se uma técnica eficiente na avaliação da diversidade genética de espécies de vertebrados de forma não invasiva, possibilitando possíveis gargalos populacionais que podem prejudicar a preservação dessas espécies no atual cenário de mudanças climáticas (SZÉKELY et al., 2021).

Embora existam alguns estudos que tentam recriar populações passadas usando marcadores geoquímicos, eles parecem estar limitados a grupos específicos (por exemplo, pinguins, LIGUANG et al., 2004; ROBERTS et al., 2017). Conforme visto no segmento de “amostras de sedimentos” de nossa revisão, o eDNA abre oportunidades para avaliar muitos organismos que já fizeram parte da fauna de uma região (LAMMERS et al., 2018; MURCHIE et al., 2021; WANG et al., 2021). A reconstrução da antiga fauna de vertebrados austrais tornou-se uma possibilidade usando eDNA e pode ser um ponto de foco na pesquisa de eDNA antártico no futuro.

O tipo de amostra mais comum em artigos de eDNA da Antártica, as amostras de solo não têm artigos publicados usando DNA de vertebrados (HOWELL et al., 2021). Estudos no Ártico fornecem apenas um vislumbre do que pode ser feito com eDNA de vertebrados usando amostras de solo, mas ainda assim importantes, pois é o único estudo que conseguiu extrair DNA de vertebrados de amostras de solo nas regiões polares. Além de fornecer uma contribuição significativa para marcadores de eDNA de vertebrados que podem ser usados em futuras pesquisas na Antártica.

Após o estudo de Howell e colaboradores (2021), novos artigos que encontraram eDNA de vertebrados foram publicados. Clarke e colaboradores (2021) usaram amostras de água e sedimento para avaliar a biodiversidade de metazoários de ecossistemas bentônicos na Antártica, com o objetivo de descobrir se há diferença na produção de eDNA por tipo de amostra, profundidade ou

distância até a costa. Eles descobriram que a combinação de dados de amostras de sedimentos e água é ideal para o monitoramento baseado em DNA de ambientes próximos à costa, pois maximiza as chances de encontrar um número maior de táxons representativos. O eDNA de vertebrados só foi encontrado em amostras de água. Lee e colaboradores (2022) usaram *metabarcoding* duplo (regular e mini código de barras) em amostras de água para construir estruturas comunitárias de zooplâncton, mas relataram encontrar DNA de peixes. Outro artigo (TABASSUM et al., 2022) usou amostras de guano do pinguim-de-adélia para analisar sua dieta e descobriu que o alimento mais abundante em sua dieta são duas espécies de krill (*Euphausia superba* e *Euphausia crystallorophias*) e os peixes *Pleuragramma antarctica* e *Pagothenia borchgrevinki*. Eles não encontraram diferenças significativas na composição das presas com base na localização geográfica, mas descobriram variações com base nas condições ambientais e meteorológicas anuais da região costeira.

1.7 Conclusões

Mesmo com artigos publicados recentemente, ainda há uma grande predominância de eDNA microbiano nas pesquisas antárticas que utilizam o eDNA. No Ártico, os estudos de eDNA parecem se concentrar em muitos tipos diferentes de organismos. Os vertebrados representam o segundo organismo mais estudado no Ártico usando eDNA. Todos os tipos de amostras têm pelo menos um artigo sobre eDNA de vertebrado.

A maioria desses artigos foi publicada recentemente e desenvolveu novas metodologias para utilizar o eDNA em ambientes extremos. Como regiões polares, as regiões frias do planeta favorecem a preservação de eDNA (HOWELL; LARUE; FLANAGAN, 2021; LIANG et al., 2021), abrindo novas possibilidades para estudos. Todos os tipos de amostras têm grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas com vertebrados na Antártica, fornecendo dados essenciais para a reconstrução de ambientes ecológicos atuais e passados. Entretanto, compreender como as mudanças climáticas do passado afetaram os organismos pode ajudar na preservação da biota atual, à medida que o cenário de mudanças climáticas piora.

2 A APLICAÇÃO COMBINADA DE DNA AMBIENTAL (eDNA) E GEOQUÍMICA ORGÂNICA NA PROSPECÇÃO DE PALEO-PINGUINERAS NA ILHA REI GEORGE/PENÍNSULA ANTÁRTICA

INTRODUÇÃO

A Antártica é um dos ambientes mais frios do planeta (NASA, 2013). Ambientes com temperaturas baixas durante o ano todo são ideais para a conservação de DNA, tornando a Antártica um laboratório ideal para estudos que utilizam do DNA ambiental em suas metodologias (ZHU, 2006; EICHMILLER; BEST & SORENSEN, 2016). Os meios de recuperação e análise de eDNA melhoraram substancialmente graças ao desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento (TABERLET et al., 2018). Moléculas de DNA antigo sedimentares (sedaDNA) foram recuperadas com sucesso na tentativa de para avaliar a presença de animais (GIGUET-COVEX et al., 2014; HAILE et al., 2009; PEDERSEN et al., 2013), plantas (ALSOS et al., 2016; EPP et al., 2015), fungos (BELLEMAIN et al., 2013) e microbiota (AHMED et al., 2018; D'COSTA et al., 2011).

Acredita-se que grande parte do sedaDNA sobrevive na ausência de tecidos através da formação de complexos organominerais (GARDNER; GUNSCH, 2017; MORRISSEY et al., 2015), pois o material genético extracelular se liga a constituintes comuns de sedimentos, como ácidos húmicos (CRECCHIO & STOTZKY, 1998), calcita (CLEAVES et al., 2011), argilas (CAI et al., 2006) e outros silicatos (BEZANILLA et al., 1995). Descobriu-se que os minerais do solo estabilizam uma fração desses complexos, permitindo que as moléculas de DNA resistam à decomposição (MORRISSEY et al., 2015). No entanto, uma forte ligação mineral também pode resultar em baixa liberação de sedaDNA ao tentar isolar essas moléculas durante a extração de DNA (SAEKI; SAKAI & WADA, 2010).

Apesar dos rápidos avanços nas técnicas de eDNA, dois desafios persistem relacionados à extração das amostras que podem limitar a capacidade de explorar arquivos genéticos sedimentares: 1) a presença de inibidores enzimáticos em extratos de sedimentos e 2) a perda de sedaDNA devido à remoção excessivamente vigorosa do inibidor (MURCHIE et al., 2021). Os inibidores são

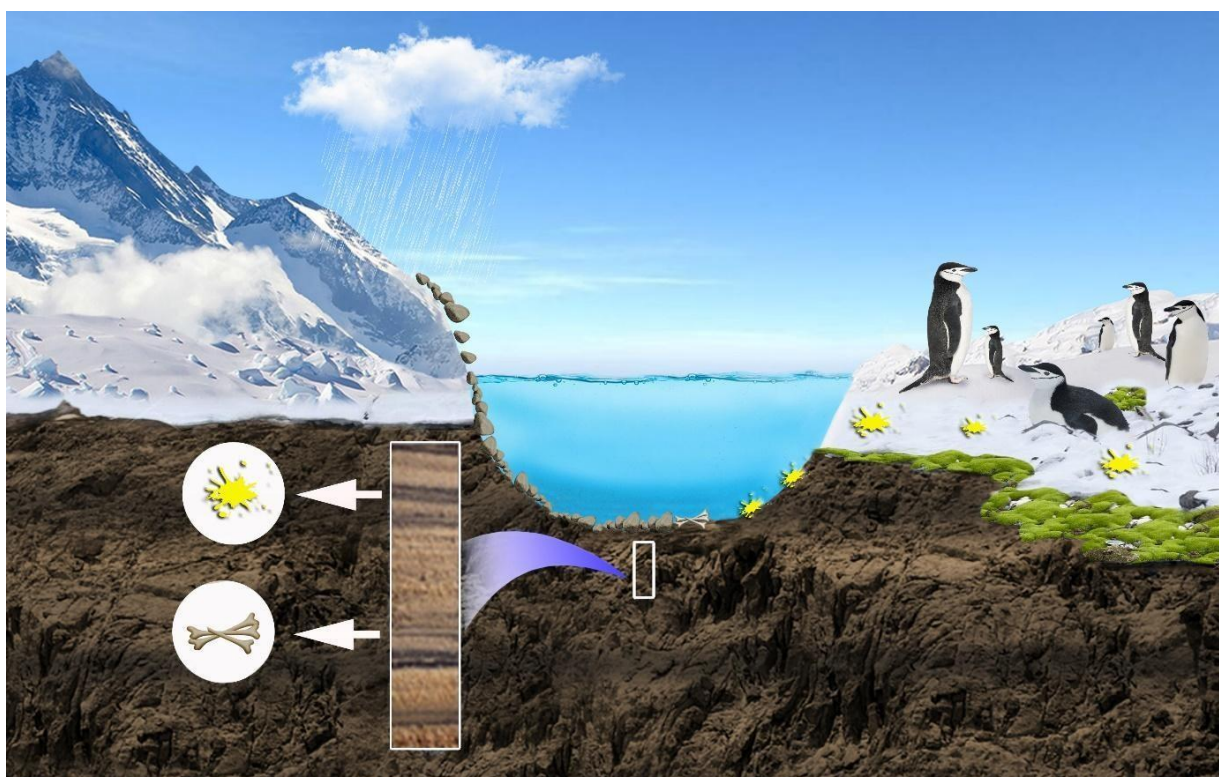
substâncias que inibem uma ampla gama de reações enzimáticas necessárias para preparar o DNA para o sequenciamento, como a reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) (MURCHIE et al., 2021). Frequentemente, os inibidores enzimáticos estão presentes em concentrações mais altas em amostras preparadas com técnicas projetadas para maximizar a recuperação de DNA (fragmentos danificados, caracteristicamente curtos) (MURCHIE et al., 2021). Os kits comerciais foram projetados com reagentes que removem os inibidores das amostras, mas esses reagentes também podem remover DNA potencialmente informativo que já está em baixas concentrações (DONG et al., 2006).

O sedaDNA ligado ao mineral é recuperado na forma de biomoléculas curtas e disseminadas de uma ampla variedade de organismos. Isso geralmente proíbe reconstruções genômicas de indivíduos a partir de amostras de eDNA, mas pode permitir a identificação da presença (e, potencialmente, ausência e abundância relativa) de organismos ao longo do tempo (MURCHIE et al., 2020). Tal afirmação destaca-se especialmente na análise de amostras de testemunhos sedimentares de fundo de lago e testemunhos de gelo (NELSON-CHORNEY et al., 2019; VAROTTO et al., 2021). Ao longo do tempo, organismos que vivem em ambientes lacustres tem sua matéria orgânica depositada no fundo de lagos, seja por excretas ou por restos mortais (NELSON- CHORNEY et al., 2019; VAROTTO et al., 2021). Com a deposição de sedimentos no fundo do lago, o material orgânico é soterrado e o processo se repete ao longo do tempo. Juntando a extração de eDNA com métodos de datação radiométrica, que permite determinar a idade de cada parte dos testemunhos, podemos formar uma linha-do-tempo para a região e os organismos que estão ou estiveram presentes no local (NELSON- CHORNEY et al., 2019; VAROTTO et al., 2021). A representação do processo na Figura 2 detalha como aconteceria a deposição de sedimento no fundo de um lago glacial junto de matéria orgânica de organismos vivos no ambiente lacustre.

A datação radiométrica funciona a partir da medição da meia-vida de um respectivo isótopo, como o ^{210}Pb em que a meia-vida é o tempo necessário para que metade do número de átomos de um isótopo se desintegre, ou seja, a metade de sua massa. Assim, a idade de uma determinada amostra é medida a

partir desta comparação. Quanto menos do isótopo original, mais antiga será a amostra (APPLEBY & OLDFIELD, 1983).

Figura 2 - Representação de como ocorre a deposição de sedimentos no fundo de um lagoglacial junto de matéria orgânica (restos mortais e fezes) de organismos lacustres, formando uma “linha-do-tempo” das populações locais.



Fonte: Autor.

O mesmo acontece para amostras de *permafrost*, um tipo de solo permanentemente congelado que ocorre em regiões polares, que permite a extração de DNA ambiental antigo e avaliação da paleofauna local (MURCHIE et al., 2021; WANG et al., 2021). Tais estudos já foram realizados em algumas regiões do Ártico (BELLEMAIN et al., 2013; LIANG et al., 2021; MURCHIE et al., 2021; WANG et al., 2021), porém, ainda existe potencial para essa pesquisa em regiões antárticas, nas quais nenhum estudo do tipo foi realizado até o momento.

Técnicas além da genética molecular também podem ser usadas como biomarcadores, possibilitando avaliar a presença de populações em amostras de sedimento. As populações de pinguins antárticos como um bioindicador confiável

do ecossistema e das mudanças ambientais foram estudadas na última década (BARRIE et al., 1993). Os resultados dos estudos mostraram que as mudanças nas populações podem refletir respostas ecológicas de forma direta e indireta às mudanças climáticas regionais e do nível do mar (BARRIE et al., 1993). Por exemplo, a superfície de solos ornitogênicos antigos contendo restos de pinguins pode ser totalmente erodida e corroída por avanços glaciais ou dissolvida na zona climática mais úmida da Antártica marítima (EMSLIE, 2001; TATUR; MYRCHA & NIEGODZISZ, 1997). Por outro lado, os remanescentes de excrementos antigos de pinguins nos sedimentos lacustres próximos às colônias de pinguins podem ser identificados por suas características geoquímicas (LIU et al., 2006). Portanto, essas características geoquímicas podem ter informações sobre mudanças históricas nas populações de pinguins (LIGUANG; ZHOUQING & JUNLIN, 2001; SUN; XIE & ZHAO, 2000).

Nove elementos, incluindo enxofre (S), fósforo (como P_2O_5), cálcio (como CaO), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), estrôncio (Sr), bário (Ba) e flúor (F) foram encontrados e significativamente correlacionados entre si nos sedimentos alterados por guano de pinguins (LIGUANG et al., 2004; LIGUANG; ZHOUQING & JUNLIN, 2001; SUN; XIE & ZHAO, 2000). Esses chamados “bioelementos” de pinguins são significativamente maiores nos sedimentos impactados pelos guanos dos pinguins do que naqueles não afetados (LIGUANG et al., 2004; LIGUANG; ZHOUQING & JUNLIN, 2001; SUN; XIE & ZHAO, 2000). Como esses elementos de guano de pinguim quase não são móveis nos sedimentos de lagos da Antártica, sua presença pode ser um importante sinal geoquímico para indicação de impacto de excrementos de pinguins em solos na Antártica (SUN; XIE & 2001; SUN; XIE & ZHAO, 2000). Embora os níveis desses “bioelementos” tenham sido usados para identificar a entrada de guano e para reconstruir as mudanças históricas de colônias de pinguins, incluindo populações, abundância e diversidade de vegetação nas áreas abandonadas por pinguins (LIGUANG et al., 2004), a origem da matéria orgânica e estes “bioelementos” em sedimentos de lagos ainda precisam ser explorados (LIU et al., 2006).

O uso de isótopos de C e N em sedimentos de lagos pode desvendar o mistério sobre a origem dessa matéria orgânica. Os isótopos de nitrogênio e

carbono podem ser importantes para estudar a função do ecossistema e a ecologia animal, pois fornecem informações distintas sobre a origem, formação e caminhos de diferentes materiais biológicos (WADA; MIZUTANI & MINAGAWA, 1991). Como esses isótopos seguem o caminho do carbono e nitrogênio assimilados nos organismos (TIESZEN & FAGRE, 1993), eles foram aplicados para rastrear as origens e a migração da vida selvagem (CHAMBERLAIN et al., 1997; HOBSON, 1999), e para examinar a troca de energia e nutrientes entre os ecossistemas, especialmente na interface oceano-terra (COCKS; BALFOUR & STOCK, 1998; COCKS; NEWTON & STOCK, 1998).

Liu e colaboradores (2006) observaram que solos ornitogênicos (influenciados por excretas de aves) possuem uma maior quantidade de nitrogênio (N) orgânico, mostrando uma grande influência das excretas de pinguim, ricas em nitrogênio, no ambiente local. Ao mesmo tempo, um aumento no número de pinguins em uma determinada área também influencia a vegetação local, o pisoteamento e a grande quantidade de excreta tóxica diminui ou elimina totalmente a população de plantas presente nos espaços de pinguineira (LIU et al., 2006). Esses mesmos autores também mostraram que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ estão significativamente e positivamente correlacionado com os “bioelementos” presentes no guano de pinguins, criando uma relação entre a presença de pinguins com a presença de valores mais elevados de $\delta^{15}\text{N}$. A conclusão acima é ainda apoiada por uma correlação inversa entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Vegetação antártica, como musgos, líquens e algas de lago geralmente têm menos $\delta^{15}\text{N}$, mas $\delta^{13}\text{C}$ mais pesado do que os de excrementos de animais. Logo, os altos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e baixos de $\delta^{13}\text{C}$ valores nos sedimentos indicam um decaimento na influência de pinguins no ambiente (LIU et al., 2006).

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo Geral

- Analisar o uso de eDNA como uma ferramenta para avaliar flutuações de populações de pinguins na Antártica.

2.1.2 Objetivos específicos

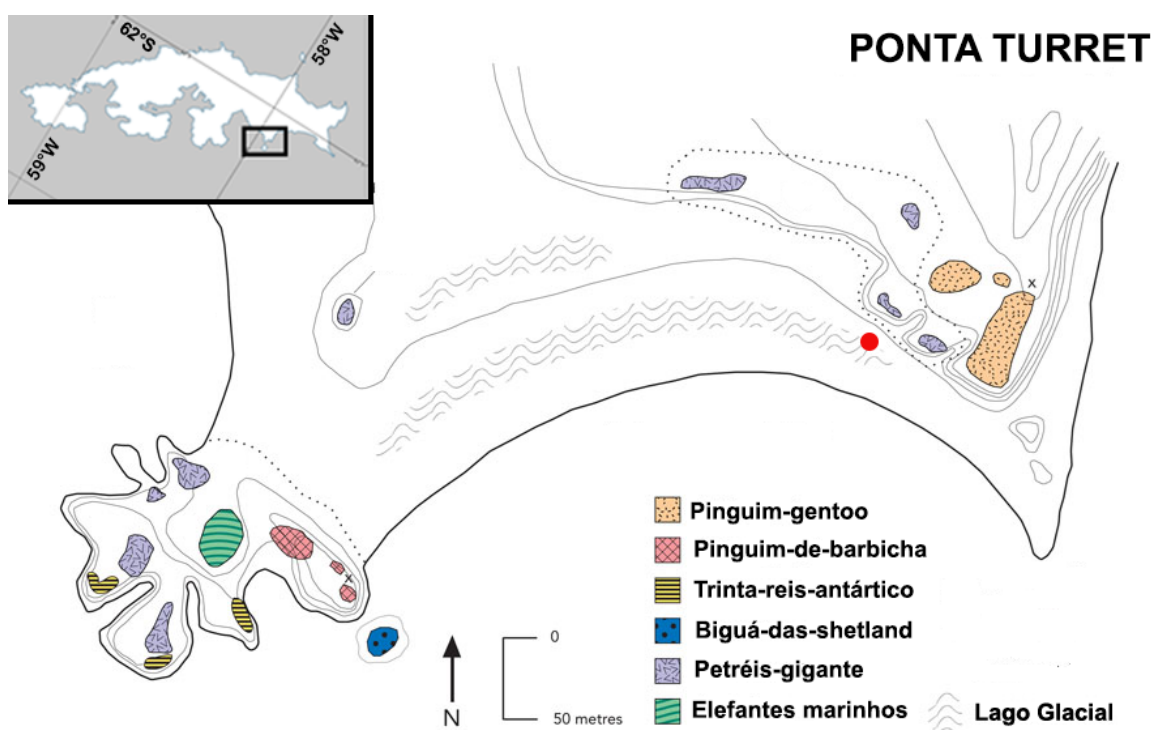
- Extrair e amplificar eDNA em amostras sedimentares.
- Analisar $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em testemunho sedimentar e excretas de pinguins no sentido de avaliar a possível presença de guano nas amostras

2.2 Material e Métodos

2.3 OPERANTAR XXXVI – Amostras Ponta Turret (Verão 2018/2019)

O testemunho de Ponta Turret do fundo de um lago glacial, no lado leste da Ilha ReiGeorge, próximo à Ilha Pinguim (62°5'S 57°55'W), foi coletado dentro das atividades da OPERANTAR XXXVI durante a temporada de verão antártico 2018/2019 (Figura 3).

Figura 3 – Mapa detalhado de Ponta Turret a ocorrência das espécies de vertebrados que habitam a região, assim como a localização do ponto de coleta do testemunho (●).



Fonte: Modificado da Secretaria do Tratado Antártico.

Ponta Turret é caracterizada pela presença de diversos vertebrados antárticos, como os pinguim-adélia, pinguim-de-barbicha, o trinta-réis-antártico, o biguá de shetland, os petréis-gigante e os elefantes marinhos. Ainda se pode observar a presença de muitas áreas livres de gelo, com rochas expostas e uma

alta presença de musgos e líquens antárticos (Figura 4). O local de coleta da amostra fica situado na parte de baixo de um planalto, no qual é situada uma colônia de pinguins-gentoo (Figura 5).

Figura 4 – Vegetação de musgos e líquens é encontrada por toda a região de Ponta Turret.



Fonte: Secretaria do Tratado Antártico.

Figura 5 – Local de coleta do testemunho no lago de derretimento, localizado na parte debaixo de um planalto com a presença de pinguins.



Fonte: Anna Beatriz Oaquim

2.4 Extração de DNA

O testemunho sedimentar foi dividido em 23 partes, cada uma com aproximadamente 1 cm de largura, e depois reservados para posterior extração de DNA e análises complementares.

O DNA ambiental contido nas amostras foi extraído utilizando o kit DNeasy PowerSoil® Pro (QIAGEN).

2.5 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Alíquotas contendo 2 µL de DNA total em concentração mínima de 10 ng/µL foram acondicionadas em tubos específicos para a realização da reação de PCR. Os *primers* utilizados foram confeccionados pelo autor, sendo específicos para a identificação de bactérias em amostras de eDNA. Eles amplificam uma parte do gene mitocondrial 16S. As sequências dos *primers* são: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1392R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Para a reação de PCR, adicionou-se 5,0 µL de tampão Platinum 4x (Applied Biosystems), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM) e 0,2 µL de Taq Platinum DNA polimerase (Applied Biosystems), 11 µL de água milli-Q, além de 2 µL de DNA, em volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termocicladores Veriti (Applied Biosystems) com base nas condições termocíclicas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação da região 16S do DNA mitocondrial.

Temperatura	Tempo	Ciclos
90 °C	2 minutos	
90 °C	30 segundos	
52 °C	40 segundos	30 ciclos
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	

Para avaliar o sucesso do processo de amplificação, os produtos de PCR

foram aplicados em gel de agarose a concentração de 1,5% e separados por eletroforese em média tensão (110V por 30 minutos).

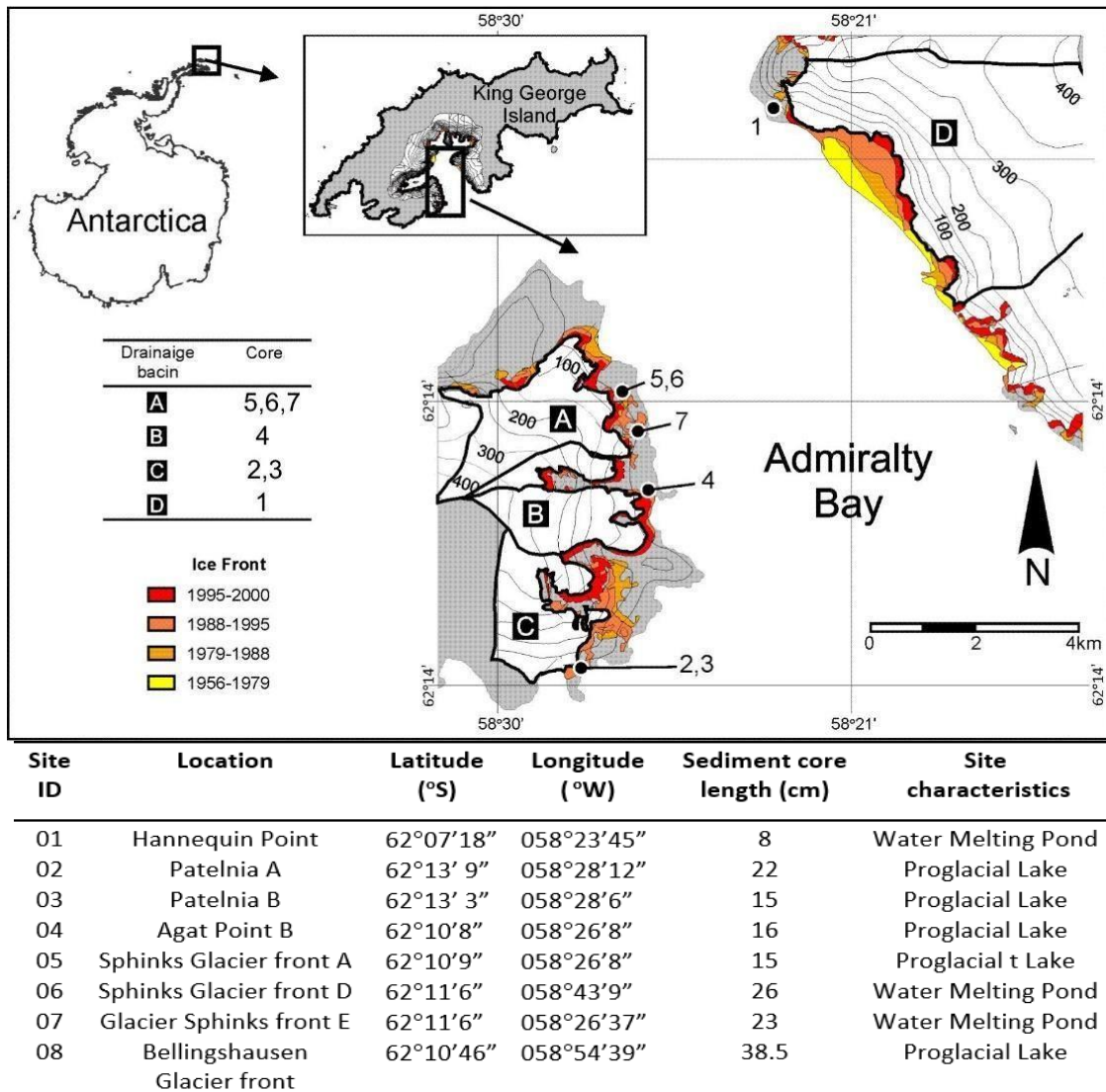
2.6 Análises de isótopos estáveis

Para cada uma das camadas de sedimento, análises isotópicas de carbono e nitrogênio foram realizadas, com ajuda do Laboratório de Ciências Ambientais; Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense. As 23 amostras de cada sedimento e 3 amostras de fezes de pinguim foram secas e moídas em pó. Cerca de 10 g de amostra pulverizada foram queimados a $\sim 900\text{ }^{\circ}\text{C}$ para produzir gases CO_2 e N_2 . As composições isotópicas de carbono e nitrogênio e dos gases CO_2 e N_2 resultantes foram determinados utilizando Espectrômetro de Massa de Fluxo Contínuo de Gás.

2.7 Taxa de sedimentação de lagos glaciais da Ilha Rei George

Sem a possibilidade de realizar a datação por isótopos, utilizamos dados de outros lagos glaciais de regiões próximas como referência. A partir da datação já conhecida desses outros lagos e a sua média de sedimentação anual, conseguimos gerar uma datação aproximada para o testemunho coletado na Ponta Turret (EVANGELISTA et al., 2023) (Figura 6).

Figura 6 – a. Mapa com as localizações de lagos glaciais da Ilha Rei George com datação sedimentar já conhecidas. b. Nome das localidades, coordenadas e tamanho do sedimento retirado.



Fonte: Adaptado de EVANGELISTA et al., 2023.

2.8 Resultados

2.9 Amostras de Ponta Turret

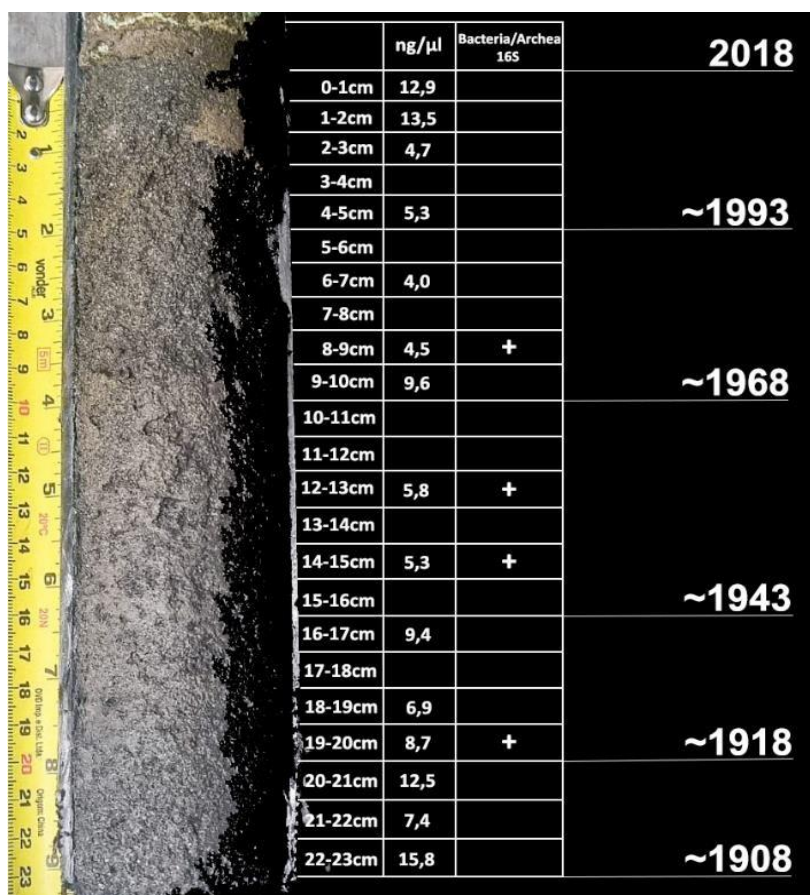
A extração de DNA do testemunho foi realizada com sucesso, obtendo alguma quantidade de DNA na maioria dos segmentos da amostra. Não foi obtido sucesso na amplificação de eDNA de pinguim.

Entretanto, a amplificação de eDNA de bactérias e archeas, com o uso da região do genoma mitocondrial 16S (Figura 7) foi realizada com sucesso, levantando a possibilidade de um sucesso na amplificação de DNA de vertebrados, caso a amostra tivesse sido preservada corretamente.

2.10 Datação aproximada a partir da taxa de sedimentação de lagos glaciais

Com os dados de datações de lagos glaciais similares e próximos da Ponta Turret foi possível chegar em uma média da taxa de sedimentação anual de 0,3m em lagos glaciais na Ilha Rei George (Evangelista et al., 2023). A partir disso, podemos inferir os períodos aproximados para algumas porções do testemunho utilizadas no presente estudo. A datação aproximada usando a taxa de sedimentação anual para o testemunho da Ponta Turret podem ser observados na Figura 7.

Figura 7 - Testemunho de fundo de lago coletado na Ponta Turret dividido por centímetro e data aproximada dos segmentos do testemunho.



	ng/μl	Bacteria/Archea 16S	
0-1cm	12,9		2018
1-2cm	13,5		
2-3cm	4,7		
3-4cm			
4-5cm	5,3		~1993
5-6cm			
6-7cm	4,0		
7-8cm			
8-9cm	4,5	+	~1968
9-10cm	9,6		
10-11cm			
11-12cm			
12-13cm	5,8	+	
13-14cm			
14-15cm	5,3	+	~1943
15-16cm			
16-17cm	9,4		
17-18cm			
18-19cm	6,9		
19-20cm	8,7	+	~1918
20-21cm	12,5		
21-22cm	7,4		
22-23cm	15,8		~1908

Legenda: Na segunda coluna se encontra a quantidade de DNA encontrada em cada segmento, enquanto na terceira, o sinal “+” indica a presença de uma amplificação para 16S de bactérias/archea.

Fonte: o autor

2.11 $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

A medição de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ na amostra de testemunho de fundo de lago da Ponta Turret foi realizada com sucesso. Os valores de cada porção de profundidade podem ser encontrados na Tabela 2. A média encontrada para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas excretas de pinguim são -27,86 e 23,5, respectivamente.

Tabela 3 – Medidas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ encontradas no testemunho sedimentar da Ponta Turret, Ilha Rei George, Antártica, separados por profundidade.

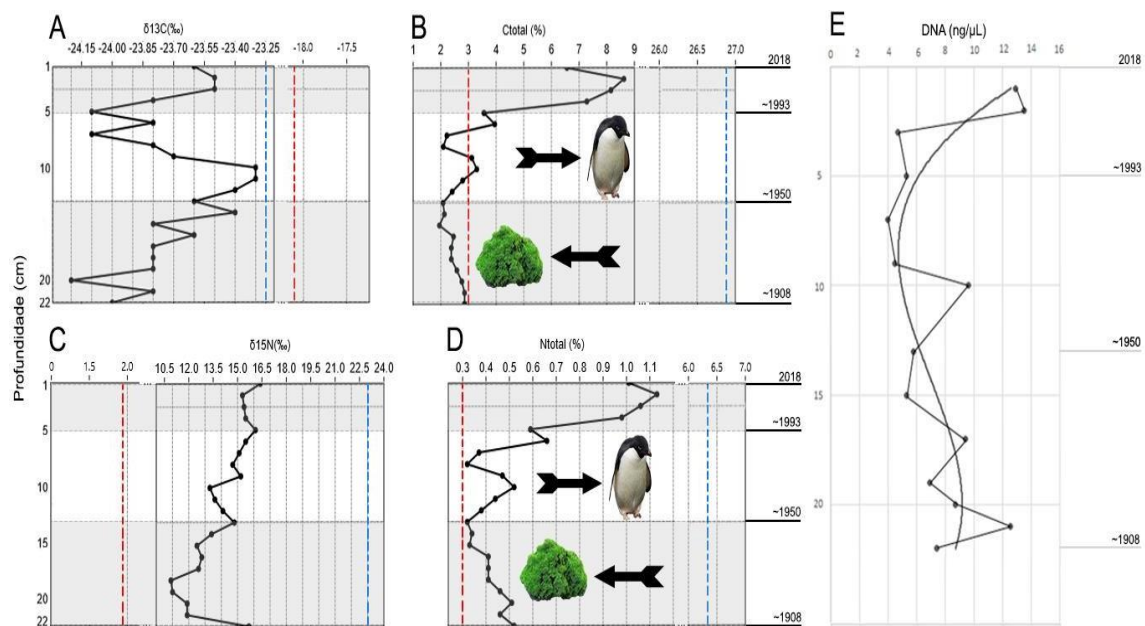
Profundidade	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	Ntotal(%)	Ctotal(%)
1cm	-23.6	16.4	1.01	6.56
2cm	-23.5	15.3	1.13	8.62
3cm	-23.5	15.4	1.06	8.15
4cm	-23.8	15.5	0.98	7.28
5cm	-24.1	16.1	0.59	3.56
6cm	-23.8	15.5	0.66	3.95
7cm	-24.1	15.1	0.37	2.22
8cm	-23.8	14.7	0.32	2.09
9cm	-23.7	15.2	0.47	3.12
10cm	-23.3	13.3	0.52	3.30
11cm	-23.3	13.6	0.44	2.79
12cm	-23.4	14.1	0.38	2.41
13cm	-23.6	14.8	0.32	2.08
14cm	-23.4	13.4	0.34	2.13
15cm	-23.8	12.5	0.33	1.95
16cm	-23.6	12.8	0.41	2.46
17cm	-23.8	12.6	0.41	2.38
18cm	-23.8	10.9	0.41	2.38
19cm	-23.8	11	0.46	2.38
20cm	-24.2	11.9	0.51	2.76
21cm	-23.8	11.9	0.46	2.86
22cm	-24	15.7	0.52	2.86
23cm	-26	17.7	5.21	17.51

2.12 Discussão

2.13 $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em sedimentos ornitogênicos e a variação populacional de pinguins antárticos

A partir do estudo feito por Liu e colaboradores. (2006), podemos fazer algumas observações dos valores encontrados na amostra coletada para o presente estudo na Ponta Turret. Conforme contemplado nas Figuras 8a e 8c, obtivemos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ com uma correlação inversa em dois instantes. O primeiro ocorre nas camadas mais superficiais (1993-2018), onde observamos um aumento na quantidade de $\delta^{13}\text{C}$ e uma diminuição de $\delta^{15}\text{N}$. De acordo com Liu e colaboradores (2006), isso poderia evidenciar uma redução populacional de pinguins viventes no ambiente lacustre, porém, o mesmo não é confirmado pela quantidade total de C e N nas amostras (Figuras 8b e 8d). Durante o mesmo período ambos os isótopos estão em quantidades mais elevadas, evidenciando um aumento na quantidade de N e C total no sedimento. Contudo, nem sempre o valor de N total aumenta com a razão de $\delta^{15}\text{N}$. No estudo de Galimov (2000) para líquens e musgos antárticos, valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ aumentam e diminuem sem ter uma relação direta com a quantidade total de N e C, sem tornar evidente uma relação de aumento proporcional entre as duas medidas. O mesmo é observado em camadas mais profundas (1908-1950), nas quais também existe a correlação inversa entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$, com uma diminuição de $\delta^{15}\text{N}$ em um aumento de $\delta^{13}\text{C}$, acompanhado de um acrescentamento de ambos N e C totais em relação à períodos anteriores.

Figura 8 – Valores de $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, C_{total} e N_{total} encontrados no testemunho sedimentar de Ponta Turret.



Legenda: (a) Flutuações dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) nas camadas do testemunho sedimentar. (b) Flutuações dos valores de C_{total} (%) nas camadas do testemunho sedimentar. (c) Flutuações dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nas camadas do testemunho sedimentar. (d) Flutuações dos valores de N_{total} (%) nas camadas do testemunho sedimentar. (e) Flutuações dos valores de eDNA (ng/μL) nas camadas do testemunho sedimentar. Linhas pontilhadas em vermelho representam as médias dos valores totais de C e N em líquens e musgos antárticos (GALIMOV et al., 2000). Linhas pontilhadas em azul representam a média do valor encontrada em fezes de pinguim.

Fonte: o Autor

Ambos, solos não-ornitogênicos e fezes de pinguim, possuem valores altos de $\delta^{13}\text{C}$ (Figura 8a), levantando dúvidas sobre as afirmações feitas por Liu e colaboradores (2006) em que se conclui que ocorre uma diminuição de $\delta^{13}\text{C}$ em períodos de mais abundância populacional de pinguins. Com ambas as médias sendo altas, se torna impossível afirmar se qualquer flutuação para baixo seria pela falta de influência do guano e uma entrada de C proveniente de vegetação, já que as fezes também possuem um alto valor de $\delta^{13}\text{C}$, podendo elevar as medidas na amostra sedimentar. Para $\delta^{15}\text{N}$, existe uma distinção clara na média da quantidade do isótopo encontrada em solos não-ornitogênicos e o quanto é encontrado em fezes de pinguim (Figura 8c). A influência do guano é demonstrada pelo desvio em direção à média de $\delta^{15}\text{N}$ encontrada nas excretas do animal, assinalando uma mudança de plantas para guano de pinguim como

fonte de N no sedimento, confirmando as observações feitas por Liu et al., 2006.

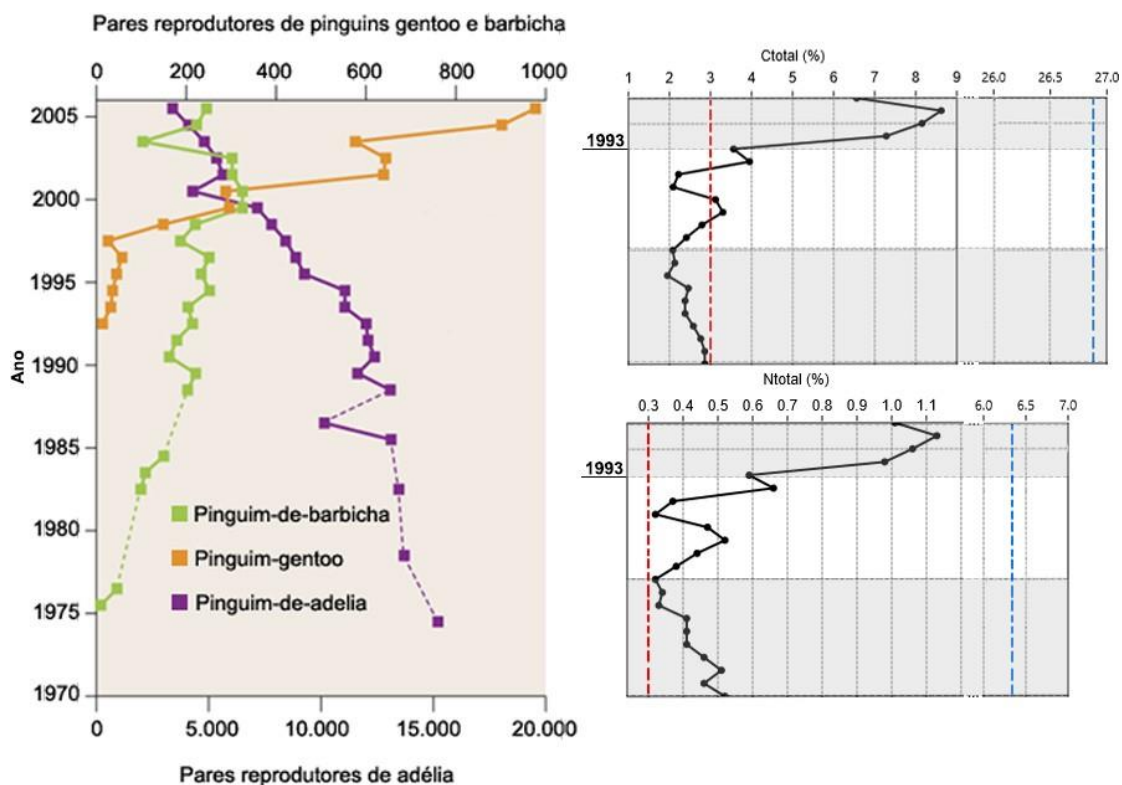
O trabalho de Galimov (2000) com musgos e líquens, distingue uma média de 0,3% de N_{total} para solos com alta influência de vegetações antárticas e sem a presença de pinguins. Conforme observado, algumas camadas do sedimento demonstram valores de N_{total} consideravelmente mais elevados nas amostras em relação aos solos observados por Galimov, 2000. Pode-se ressaltar que, durante períodos mais antigos (1908-1950), ocorreu uma diminuição na entrada de N no sedimento, talvez influenciado pela diminuição populacional de pinguins no entorno do lago e, por consequência, uma diminuição na quantidade de guano, rico em N, que chega ao fundo lago, deixando mais próximo de valores encontrados em ambientes de solos não ornitogênicos (0,3%, em média; GALIMOV, 2000). Desta forma, um novo aumento recente (1993-2018) pode ser observado na quantidade total de N no ambiente, aumentando a um máximo de 1% até a camada mais superficial, significativamente superior aos valores encontrados em solos sem a influência de uma fonte rica em N, tendendo mais aos valores encontrados em fezespinguim, em torno de 6%. Esse aumento pode ser a influência da presença de pinguins em torno do lago após um declínio observado anteriormente, esse acréscimo também é evidenciado pela presença atual de espécies no local. Vale destacar que, assim como N, o guano também possui um alto valor de C orgânico, em média, 26,75%, e sua presença também parece influenciar a quantidade de C_{total} encontrado nas amostras, evidenciado por uma média baixa de C_{total} em solos não ornitogênicos (3%; GALIMOV, 2000). Portanto, os valores mais elevados de C_{total} nas camadas superficiais (5-1cm), também podem ser levados como evidência de um crescimento populacional de pinguins nesses respectivos períodos. No entanto, ao contrário do que foi observado com N_{total} , o C_{total} das amostras mais profundas (1908-1950) acompanha a média encontrada em solos não influenciados por guano, não demonstrando o possível tamanho populacional mais elevado para o período.

Na Figura 8e, podemos observar que as flutuações de DNA no sedimento seguem o mesmo padrão observado para as medidas de C_{total} (Figura 8b) e N_{total} (Figura 8d). As medidas possuem valores mais elevados em camadas mais profundas, seguido de um decaimento em divisões intermediárias e finalmente um novo aumento na quantidade de DNA a partir dos 7cm e seguindo um

crescimento exponencial até a camada mais superficial. Com isso, é possível sugerir que a quantidade elevada de DNA nas camadas que coincidem com os valores dos isótopos elevados seja proveniente da influência de pinguins ou outras aves no ambiente. Essa influência se daria pela quantidade de guano depositada, que consequentemente deixaria o ambiente mais propício para a formação de colônias de bactérias (KIM et al., 2012), gerando um aumento na quantidade de DNA bacteriano encontrado.

As espécies de pinguim encontradas na Ponta Turret são os pinguim-de-adélia, os pinguim-gentoo e os pinguim-de-barbicha (SUN et al., 2002). As três apresentam variações populacionais diferentes nas últimas décadas (Figura 9).

Figura 9 - Variações populacionais para as espécies de pinguins encontradas na região da Ponta Turret (1975-2005).



Legenda: Linhas pontilhadas em vermelho representam as médias dos valores totais de C e N em líquens e musgos antárticos (GALIMOV et al., 2000). Linhas pontilhadas em azul representam a média do valor encontrado em fezes de pinguim.

Fonte: Adaptado de McClintock; Ducklow & Fraser, 2008.

Em geral, as populações dos pinguim-de-adélia estão diminuindo na Antártica. Parapinguins-de-barbicha, a tendência populacional parece manter uma estabilidade (Figura 9) (MCCLINTOCK; DUCKLOW & FRASER, 2008). Assim, o resultado obtido não condiz com o que é dito sobre as espécies na literatura. Contudo, as tendências populacionais de pinguins em um único local são vulneráveis a processos estocásticos e insuficientes para avaliar os efeitos de longo prazo da mudança ambiental (CHE-CASTALDO et al., 2017; DUGGER et al., 2010). As populações de pinguins expandem-se onde a produtividade primária é persistentemente alta e ocorre comumente em áreas sem extenso gelo marinho no verão, que pode bloquear o acesso à colônia durante a primavera austral (CASANOVAS et al., 2015). Esses autores citam a Baía de Marguerite, uma região ao sul da Península Antártica, onde a perda de gelo marinho decorrente de mudanças aumentou o acesso à colônia para reprodução, mas também resultou na redução da disponibilidade de alimentos para os predadores especializados em krill. Apesar disso, a região beneficia-se de uma produtividade primária consistentemente alta, e isso atenua as perdas regionais de habitat de krill devido ao declínio anual da cobertura de gelo marinho. O mesmo parece acontecer na Ilha Rei George, onde também existe um alto valor de produtividade primária, decorrente do derretimento de geleiras durante o verão (KHIM et al., 2001; YANG, 1990). Além disso, a diminuição do gelo marinho provavelmente permite que os pinguins-de-adélia recuperem qualquer diminuição na disponibilidade de presas com um esforço de forrageamento reduzido e com maior eficiência devido ao acesso a águas abertas. É possível que a redução contínua do gelo marinho exceda o limite no qual o benefício do acesso à colônia é superado pela perda concomitante de presas (CASANOVAS et al., 2015). Portanto, o possível recente aumento populacional de pinguins-de-adélia na Ponta Turret não está acompanhando a dinâmica populacional demonstrada na literatura para a Península Antártica.

Para pinguins-gentoo, a tendência populacional observada é de um crescimento que começa entre 1990 e 1995, aumentando exponencialmente nos anos seguintes até 2005 (Figura 8). Pode-se observar nos gráficos apresentados na Figura 7 e 8 que esse acréscimo coincide com a curva encontrada para a quantidade de DNA, N_{total} e C_{total} no testemunho sedimentar (1993-2018).

Como destacado anteriormente, esse crescimento populacional pode ser relacionado com o aumento de regiões livres de gelo em decorrência de mudanças climáticas, algo preferível pela espécie, aumentando a disponibilidade de áreas favoráveis para a construção de ninhos (FORCADA & TRATHAN, 2009). O resultado observado parece indicar os pinguins-gentoo como a espécie predominante na região do lago glacial da Ponta Turret, com uma sincronia bem definida entre as medições de isótopos e DNA e com as variações populacionais já observadas na literatura. Logo, o acompanhamento da curva de eDNA com as flutuações observadas provenientes de metodologias biogeoquímicas e de levantamentos populacionais já estabelecidas na literatura demonstram uma parte do potencial do seu uso como mais uma ferramenta útil no monitoramento de espécies antárticas.

2.14 Bactérias como biomarcadores de pinguins antárticos

Apesar do resultado negativo em achar eDNA de vertebrado no testemunho retirado da Ponta Turret, a presença do gene 16S de bactérias na amostra pode ser determinante para avaliar a presença de pinguins na região. Ao contrário das células de vertebrados, células bacterianas possuem parede celular, ajudando o material genético a ser conservado mesmo em condições não ideais de preservação das amostras (TABERLET et al., 2018). A deposição de grandes quantidades de guano provenientes de colônias de pinguins tem forte influência nas propriedades físico-químicas em solos antárticos, produzindo um tipo de solo especial, chamado de solo ornitogênico (HOFSTEE et al., 2006). Microrganismos são cruciais na decomposição e mineralização de matéria orgânica nesse tipo de solo, e uma maior atividade microbiana pode estar relacionada com o aumento de carbono orgânico e nitrogênio orgânico em solos antárticos (YERGEAU et al., 2007). A comunidade bacteriana de solos ornitogênicos é muitas vezes influenciada pela presença de nutrientes provenientes do guano de pinguim (KIM et al., 2012).

Estudos realizados com solos antárticos encontraram os filos Firmicutes, Bacteroides e Proteobacteria como as comunidades de bactérias mais abundantes em solos provenientes de pinguineiras (KIM et al., 2012; MA et al., 2013; WANG et al., 2015; GUO et al., 2018; YEW et al., 2018). O guano de

pinguim possui uma alta concentração de nitrogênio na forma de ácido úrico e NH_4N . A oxidação de amônia, a primeira etapa limitante da nitrificação, é realizada por bactérias oxidantes de amônia do filo Proteobacteria. Assim, a alta proporção de Proteobacteria ocorreu nestes perfis de solo provavelmente devido a uma grande quantidade de aporte de nitrogênio de guano de pinguim (MA et al., 2013). Além do nitrogênio, pinguins também são contribuidores importantes de outros compostos em ambientes terrestres, como o carbono orgânico e fósforo, necessários para o desenvolvimento de solos ornitogênicos (SPEIR; COWLING, 1984). Apesar de já ter sido observado o estabelecimento de microorganismos intestinais em mamíferos (FAEDO et al., 2002) e de cupins (OTANI et al., 2016) em solos, ainda não existe uma correlação direta entre as bactérias presentes no trato gastrointestinal dos pinguins com as comunidades de bactérias presentes em solos antárticos (YEW et al., 2018).

Assim, com a dificuldade de encontrar eDNA de vertebrados, a presença dos filos de bactéria mencionados anteriormente também pode servir como um indicador para a presença atual ou no passado de colônias de pinguins antárticos ou outras aves na região amostral. Logo, em um estudo posterior para a análise das comunidades de bactérias presentes na amostra do testemunho de lago glacial da Península Turret ainda seria possível determinar a presença ou não de colônias de pinguins através de um gradiente de tempo.

2.15 CONCLUSÕES

O presente estudo teve sucesso em extrair e amplificar eDNA de amostras sedimentares, e relacionar flutuações de DNA de bactérias com marcadores biogeoquímicos.

Na amostra utilizada no presente estudo, pode-se observar que a tendência populacional mostrada pelos pinguim-gentoo na Península Antártica, melhor reflete o resultado apresentado. Assim, se tornando mais evidente o uso de eDNA como uma forma de observar mudanças populacionais de pinguins em ambientes glaciais lacustres. A utilização dessa técnica junto de ferramentas biogeoquímicas, pode diminuir incertezas ou vieses gerados pela utilização de somente uma metodologia.

Apesar do insucesso em amplificar eDNA de pinguins, algumas famílias de bactérias podem ser associadas aos solos por onde pinguins e focas se

encontram, podendo servir como um biomarcador para a presença desses animais.

Um futuro estudo, utilizando análises metabarcoding, pode fornecer as informações necessárias para relacionar diretamente o eDNA encontrado nessas amostras com as famílias de bactérias associadas a solos ornitogênicos. Assim como, a utilização de amostras em um melhor estado de preservação para a possível amplificação de material genético de pinguins.

3 DETECÇÃO DE eDNA DE PINGUIM-DE-ADÉLIA (*Pygoscelis adeliae*) EM AMOSTRAS DE SOLO ANTÁRTICO

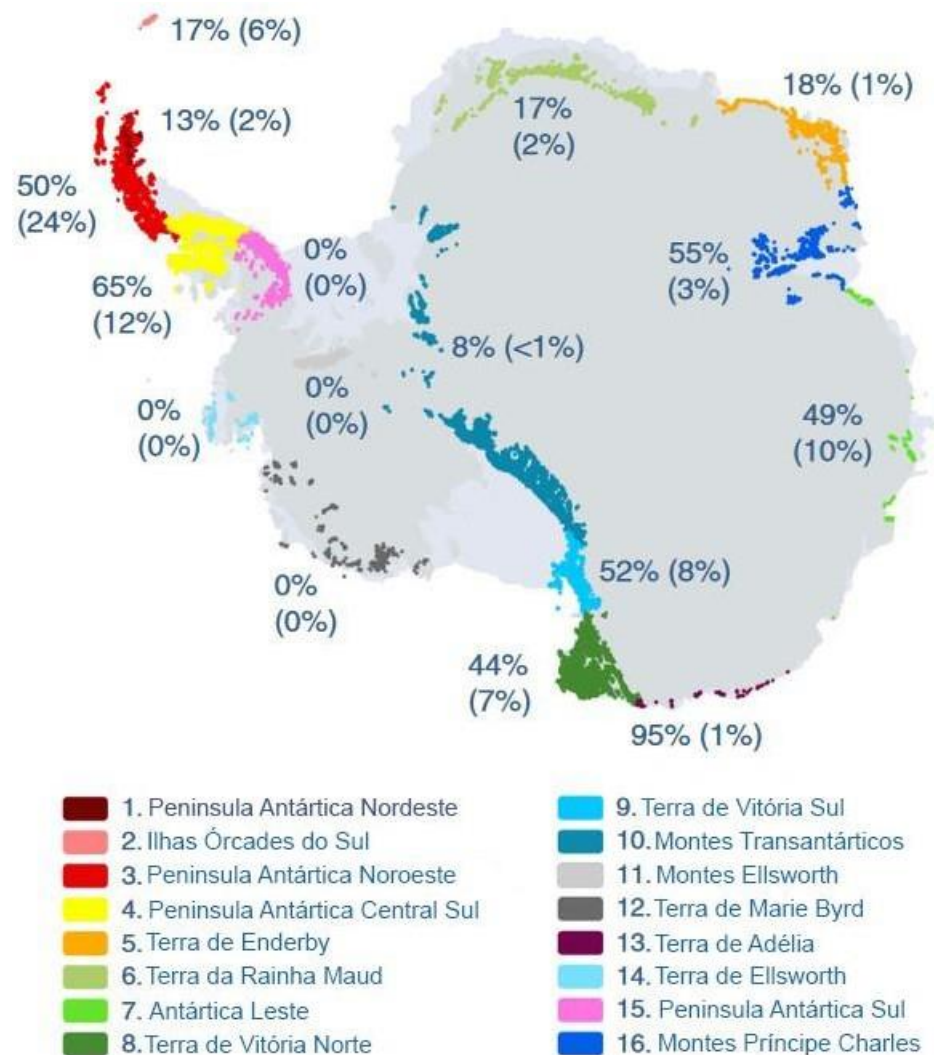
Introdução

3.1 Continente antártico e sua biodiversidade

Apesar das condições extremas, a Antártica abriga uma grande variedade de organismos, incluindo espécies de micro-organismos, invertebrados e vertebrados que dominam seus ambientes marinhos e terrestres, e exibem uma diversidade de estratégias ecofisiológicas que os possibilitam sobreviver, colonizar e mesmo florescer neste ambiente biologicamente hostil e extremo (WAUCHOPE et al., 2019). A biodiversidade terrestre na Antártica está predominantemente presente em áreas livres de gelo permanente, entre 0,2 e 0,5% da área total do continente (WAUCHOPE et al., 2019). A diversidade de metazoários nos sistemas antárticos terrestres, assim como em diversos outros, é determinada pela disponibilidade de água e energia (CHOWN et al., 2015). A temperatura também possui papel importante, ditando a disponibilidade de água líquida nos ambientes (CONVEY et al., 2014). Em escalas menores, espécies também podem ser afetadas por parâmetros de solo, como disponibilidade de carbono e nitrogênio (CONVEY et al., 2014).

Em áreas terrestres antárticas a diversidade de plantas e vertebrados é relativamente baixa, porém, a abundância de líquens, briófitas, invertebrados e a microbiota é substancial (CHOWN et al., 2015). Cerca de 44% das espécies de pássaros, plantas, líquens e invertebrados ocorre nas Áreas Antárticas Especialmente Protegidas (ASPAs – *Antarctic Specially Protected Area*), porém, de todas as espécies que ocorrem em ASPAs, 52% só ocorrem em uma delas (TERAUDS et al., 2016). As ASPAs estão inseridas em Regiões Biogeográficas de Conservação Antártica, definidas por suas comunidades biológicas, clima e características ambientais (Figura 10). Essas ecorregiões proporcionam um retrato útil na representação da diversidade de espécies e comunidades na Antártica (TERAUDS et al., 2016; WAUCHOPE et al., 2019).

Figura 10 - As áreas livres de gelo da Antártica divididas em 16 Regiões Biogeográficas de Conservação Antártica.



Legenda: A porcentagem de espécies em cada ecorregião que ocorrem dentro de ASPAs estão representadas pelas porcentagens fora dos parênteses. A porcentagem entre parênteses representa o número de espécies que ocorrem em ASPA dentro de cada região, em relação a todas as espécies Antárticas. Fonte: Modificado de WAUCHOPE et al., (2019) e TERAUDS et al., (2016).

No caso dos ambientes antárticos oceânicos, as teias alimentares caracterizam-se pelos organismos mais conhecidos como as focas, baleias, elefantes e lobos marinhos, pinguins, albatrozes, skuas, dentre outros (CHOWN et al., 2015). Até a fauna de regiões abissais são notáveis no continente

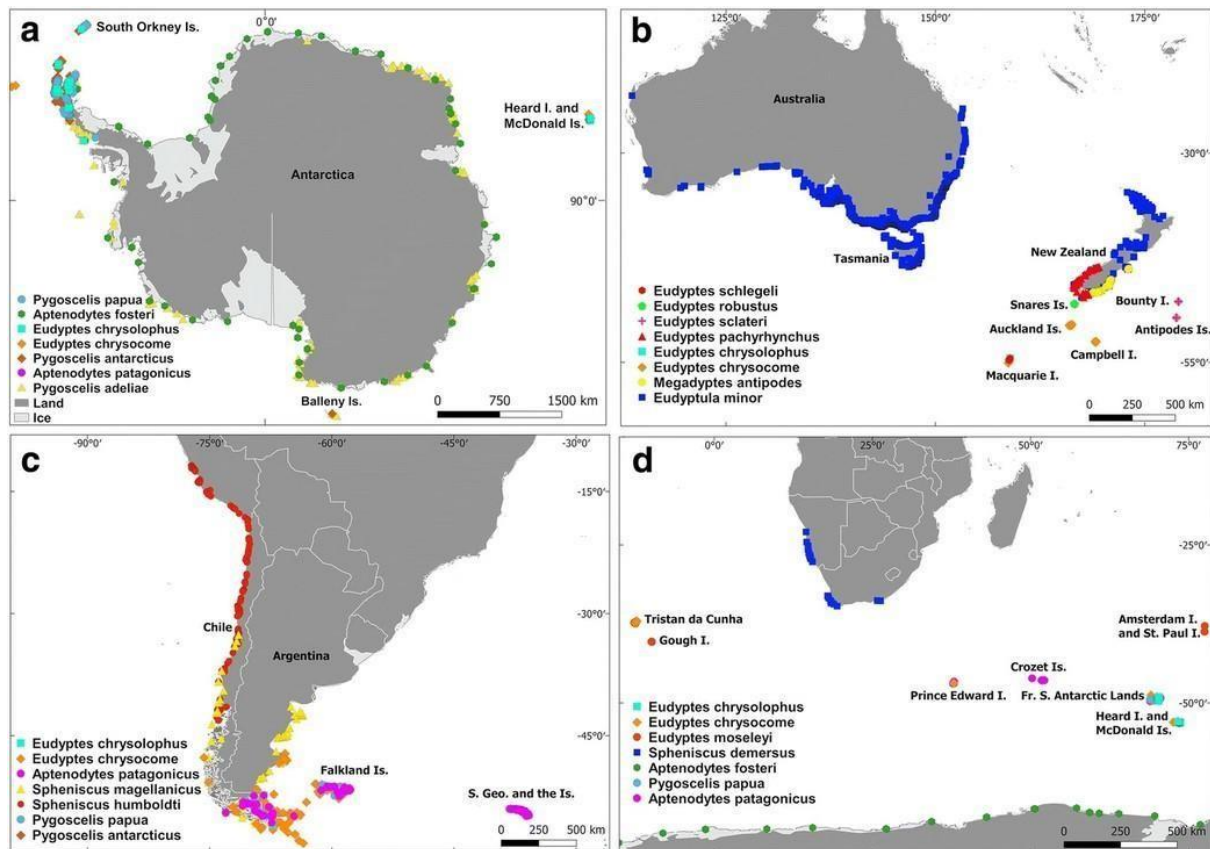
Antártico, sendo bem diferentes de outros locais (BRANDT et al., 2007). Por exemplo, as fontes hidrotermais, onde em outros locais são conhecidas pela presença de poliquetas, camarões e mexilhões, no mar profundo da Antártica são caracterizados por gastrópodes gigantes, estrelas do mar, crustáceos e até uma espécie recém-descoberta de decápode, conhecida como caranguejo-yeti (ROGERS et al., 2012). Dentre todos os organismos antárticos, vários possibilitam seu uso no monitoramento do funcionamento dos ecossistemas antárticos e na avaliação dos efeitos das mudanças climáticas globais nestas regiões, como é o caso de diversas espécies de microrganismos e algumas espécies de invertebrados e vertebrados como, por exemplo, as populações de pinguins (HAWKINS, 2018; WAUCHOPE et al., 2019).

3.2 Família Spheniscidae e as ameaças às suas populações

A família Spheniscidae é a única vivente dentro da ordem dos Sphenisciformes, caracterizada pelo grupo de aves conhecido como “pinguins”, compreendendo um total de 16 espécies dentro de 6 gêneros (TSUDA et al., 2001), sendo 7 destas com ocorrência no continente antártico e compondo cerca de 90% da biomassa total da avifauna da região (CROXALL; TRATHAN; MURPHY, 2002).

Os Spheniscidae ocorrem somente no hemisfério sul, no qual possuem uma ampla distribuição (TSUDA et al., 2001; HICKCOK et al., 2019) (Figura 11).

Figura 11 - Mapa da distribuição das espécies de pinguim.

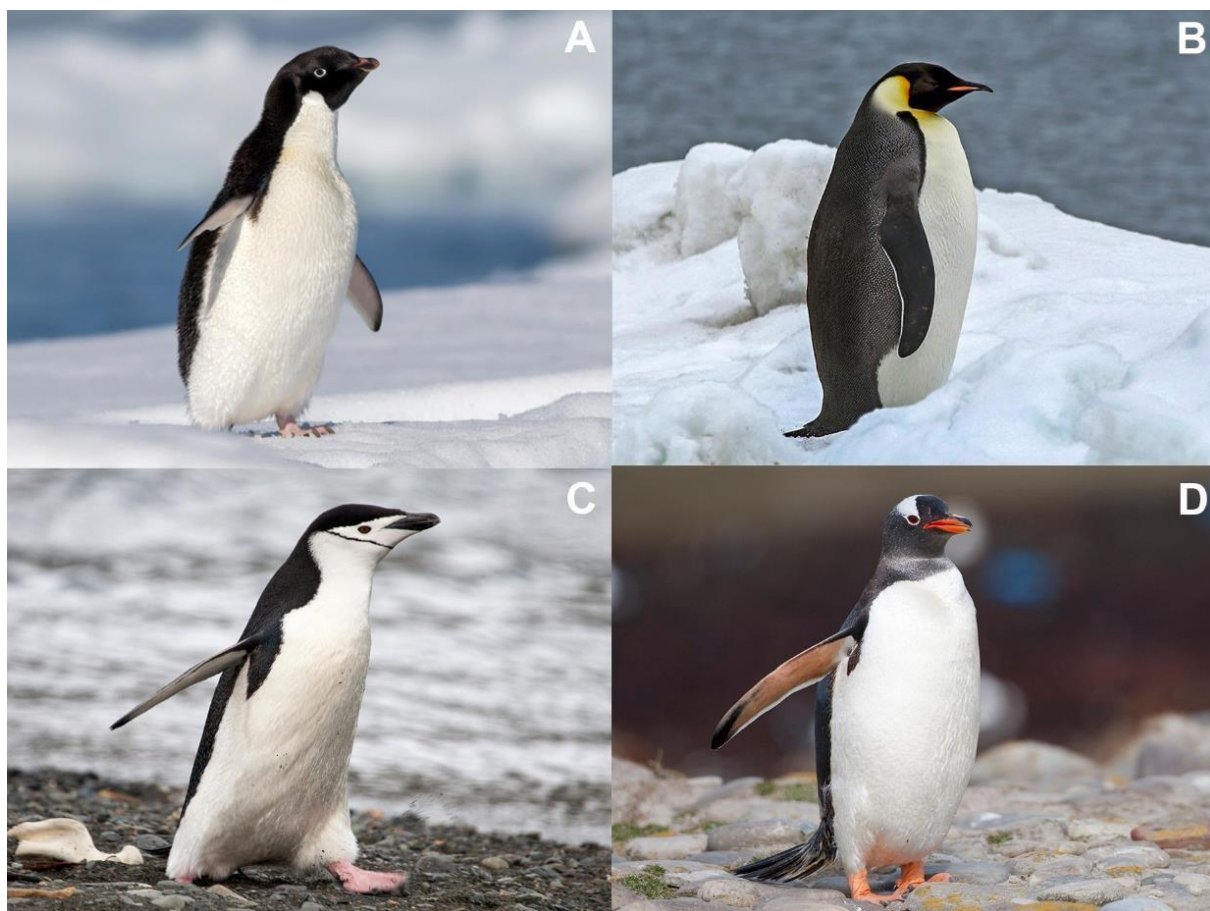


Legenda: a. Antártica, b. Austrália, NovaZelândia e ilhas subantárticas vizinhas, c. América do Sul e d. África do Sul e ilhas subantárticas vizinhas. Adaptado de Hickcox et al., 2019.

Os pinguins são principalmente conhecidos pela sua capacidade de “voar” debaixo d’água, principalmente na busca por alimentos, utilizando tanto ambientes pelágicos quanto bentônicos (KOOYMAN, 2002). As espécies de pinguim têm como principal alimento o krill antártico (*Euphausia superba*), assim como pequenos peixes e lulas (CROXALL et al., 2002).

Nas últimas décadas as mudanças climáticas vêm diminuindo ou aumentando as populações de algumas destas espécies, sendo que alguns modelos estimam uma diminuição drástica ou o total desaparecimento de várias colônias (AINLEY et al., 2010). Quatro das oito espécies de pinguim presentes na Antártica são as mais afetadas pelas mudanças climáticas de acordo com a literatura, são elas: Pinguins-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*), pinguins-de-barbicha (*Pygoscelis antarcticus*), pinguins-gentoo (*Pygoscelis papua*) e os pinguins-imperadores (*Aptenodytes forsteri*) (Figura 12).

Figura 12 - Espécies de pinguins antárticos mais ameaçadas pelas mudanças climáticas.



Legenda: A – Pinguim-de-adélia; B – Pinguim-imperador; C – Pinguim-de-barbicha; D – Pinguim-gentoo. Fonte: www.eBird.com.

Conforme alguns estudos apontam, a tendência de aumento/redução populacional em pinguins tem variado de acordo com a região geográfica analisada. Como exemplo, populações de pinguins de adélia estão diminuindo na Península Antártica Ocidental (PAO), apesar de apresentarem tendência de estabilidade ou aumento na região Antártica Oriental (CASANOVAS et al., 2015; LYNCH & LARUE, 2014). O declínio populacional de pinguins-de-adélia na PAO parece estar diretamente relacionado à cobertura de gelo marinho disponível no local (FORCADA; TRATHAN, 2009; LIMA; ESTAY, 2013). As populações de krill, um dos principais alimentos dos pinguins-de-adélia e outras espécies de pinguim, estão diretamente relacionadas com a cobertura de gelo local (LOEB et al., 1997), estas populações entram em declínio quando ocorre a diminuição de gelo

marinho em decorrência de mudanças climáticas (MURPHY et al., 2007), afetando assim diretamente as populações de pinguim.

Os pinguins-de-barbicha também apresentam variação populacional de acordo com região geográfica, com um declínio populacional na PAO, mas com uma população estável nas Ilhas Sandwich do Sul (CASANOVAS et al., 2015). Roberts e colaboradores teorizam que atividades vulcânicas podem ser a razão dos declínios populacionais na PAO, já que aumentos populacionais no passado foram interrompidos por grandes erupções e que resultaram na quase extinção de diversas colônias. Por outro lado, populações de pinguins-gentoo estão aumentando na PAO, indo cada vez mais para o sul de sua distribuição atual (LYNCH et al., 2012). Curiosamente, a redução do gelo antártico aumenta o nicho dos pinguins-gentoo, já que a espécie prefere regiões rochosas livres de gelo e regiões marítimas livres de gelo conectadas a arquipélagos (FORCADA & TRATHAN, 2009). Da mesma forma, os pinguins-imperador, assim como os de adélia, são espécies que precisam de gelo obrigatoriamente, assim, tiveram suas populações contraídas em decorrência das mudanças climáticas, se concentrando em regiões com mais gelo em direção ao polo sul (FORCADA & TRATHAN, 2009).

Os pinguins-imperador praticamente desapareceram ao noroeste da Península Antártica e diminuíram em 50% na Terra Adélia em decorrência de uma abrupta diminuição na sobrevivência de adultos durante os anos 70, um período em que a temperatura local aumentou e ocorreu uma diminuição drástica na cobertura de gelo antártico (BARBRAUD & WEIMERSIRCH, 2001). Barbraud & Weimersirch, (2001) obtiveram um resultado inesperado em seus estudos, sugerindo que a quantidade de cobertura de gelo nas regiões onde ocorrem os pinguins-imperador tem efeitos opostos nas populações da espécie. Durante o inverno, a quantidade de gelo marinho afeta negativamente as chances de eclosão de ovos, aumentando a distância entre a colônia e o local de forrageamento (BARBRAUD & WEIMERSIRCH, 2001). Por outro lado, a presença de gelo marítimo o ano todo favorece a espécie trazendo uma abundância maior de alimento, como ocorre com os pinguins-de-adélia (BARBRAUD & WEIMERSIRCH, 2001). Porém, Barbraud & Weimersirch (2001) argumentam que os benefícios de uma maior extensão de gelo marítimo superam as

desvantagens de uma fecundidade reduzida.

Desta forma, fica evidente que devido as modificações dos padrões climáticos observados na região ao longo dos últimos que, em última análise, vão influenciar a disponibilidade de habitat para estas espécies, estas colônias/populações apresentam um caráter temporal que se relaciona com estas alterações.

Uma das formas de buscarmos o entendimento destes ciclos de colonização para estes habitats é mapearmos no tempo o surgimento/desaparecimento destas colônias com técnicas moleculares como, por exemplo, o uso do DNA ambiental em um gradiente temporal sedimentar. Assim, podendo correlacionar a flutuação dessas populações com alterações climáticas, possibilitando entender como as espécies são afetadas por essas variações.

3.3 DNA Ambiental (eDNA)

O desenvolvimento recente das pesquisas na área de Geogenética utiliza o DNA ambiental (eDNA) como uma ferramenta valiosa de prospecção à avaliação de problemas relacionados à biodiversidade (MINAMOTO et al., 2012; WILCOX et al., 2018; LIU et al., 2020).

Usado pela primeira vez por Ogram e colaboradores em 1987, o eDNA geralmente refere-se a qualquer material genético coletado de uma amostra ambiental. Conforme um organismo interage com seu ambiente, é possível que seu material genético fique conservado no ambiente, através de fezes, pelos, dentre outros vestígios (HOWELL; LARUE & FLANAGAN, 2021). Segundo estes autores, este DNA pode ser detectado em diversos tipos de amostras como, por exemplo, água, solo e sedimentos. Devido ao fato do eDNA encontrar-se em diversos estados de preservação, eventualmente não mais protegido por uma estrutura celular, como a parede celular bacteriana (TABERLET et al., 2018), sua extração de amostras ambientais não é simples, já que DNA extracelular se degrada relativamente rápido e, por isso, a preservação apropriada da amostra coletada é extremamente importante (COLLINS et al., 2018).

A análise do eDNA pode ser abordada de duas maneiras, dependendo do tipo de estudo que precisa ser realizado (TABERLET et al., 2018). Lidando

com somente a detecção de uma espécie, o emprego da técnica de DNA *barcoding* se torna possível (FICETOLA et al., 2008; ARDURA & PLANES, 2017). Usando primers específicos de uma espécie, o DNA *barcoding* permite identificar um organismo através de uma “identidade” presente no genoma mitocondrial da espécie, comumente empregando genes mitocondriais como o gene COX1 (HEBERT et al., 2003). Porém, também há argumentos para a utilização da região no estudo com *metabarcoding*. A região é a mais disponível em banco de dados, com milhões de sequências publicamente disponíveis para milhares de espécies diferentes, sendo consideravelmente maior que qualquer outro marcador genético na literatura (ANDÚJAR et al., 2018). A alta taxa de mutação da região também permite a detecção de variações intraespecíficas, melhorando a capacidade de distinguir espécies intimamente relacionadas e espécies crípticas (ČANDEK; KUNTNER, 2015). Essa capacidade de analisar mudanças intraespecíficas utilizando o gene COX1 está sendo amplamente usada na literatura para verificar variações genéticas dentro de uma mesma espécie (BUCKLIN; STEINKE; BLANCO-BERCIAL, 2011; GOODALL- COPESTAKE; TARLING; MURPHY, 2012).

O uso da região COX1 pode ser utilizada para linhagens mais específicas em análises, onde 650pb são utilizados na identificação de espécies (HEBERT et al., 2003). No entanto, devido à alta degradação do DNA no ambiente, regiões menores que ainda conseguem realizar a identificação de espécies tornam mais fácil a amplificação de material genético da espécie, diminuindo a chance de um falso-negativo em amostras ambientais, e por consequência gerar resultados errôneos no monitoramento de espécies (JO et al., 2017).

Este tipo de estudo é considerado como ‘não invasivo’ e ‘não disruptivo’, pois pode ser realizado sem contato direto com os táxons alvo (LEFORT et al., 2019). Isto é especialmente importante na Antártica, dado que o continente não tem população humana nativa, e a vida selvagem apresenta-se suscetível e responsiva às atividades antrópicas que lá se desenvolvem desde o início de seu período de exploração como, por exemplo, a perturbação causada por pedestres/turismo, a perturbação veicular e a perturbação relacionada às atividades de pesquisa (COETZEE & CHOWN, 2016).

Neste sentido, o uso do DNA ambiental apresenta-se como uma importante

ferramenta para o monitoramento de espécies de interesse, uma vez que possibilita a investigação de fenômenos e processos recentes bem como o acompanhamento temporal dos efeitos das mudanças climáticas globais nas populações destas espécies (JØRGENSEN et al., 2012; BELLEMAIN et al., 2013; GIGUET-COVEX et al., 2014).

3.4 OBJETIVOS

3.4.1 Objetivo Geral

Empregar técnicas de identificação molecular em amostras ambientais para avaliar o uso do eDNA como uma ferramenta para o biomonitoramento de espécies de vertebrados antárticos.

3.4.2 Objetivo específico

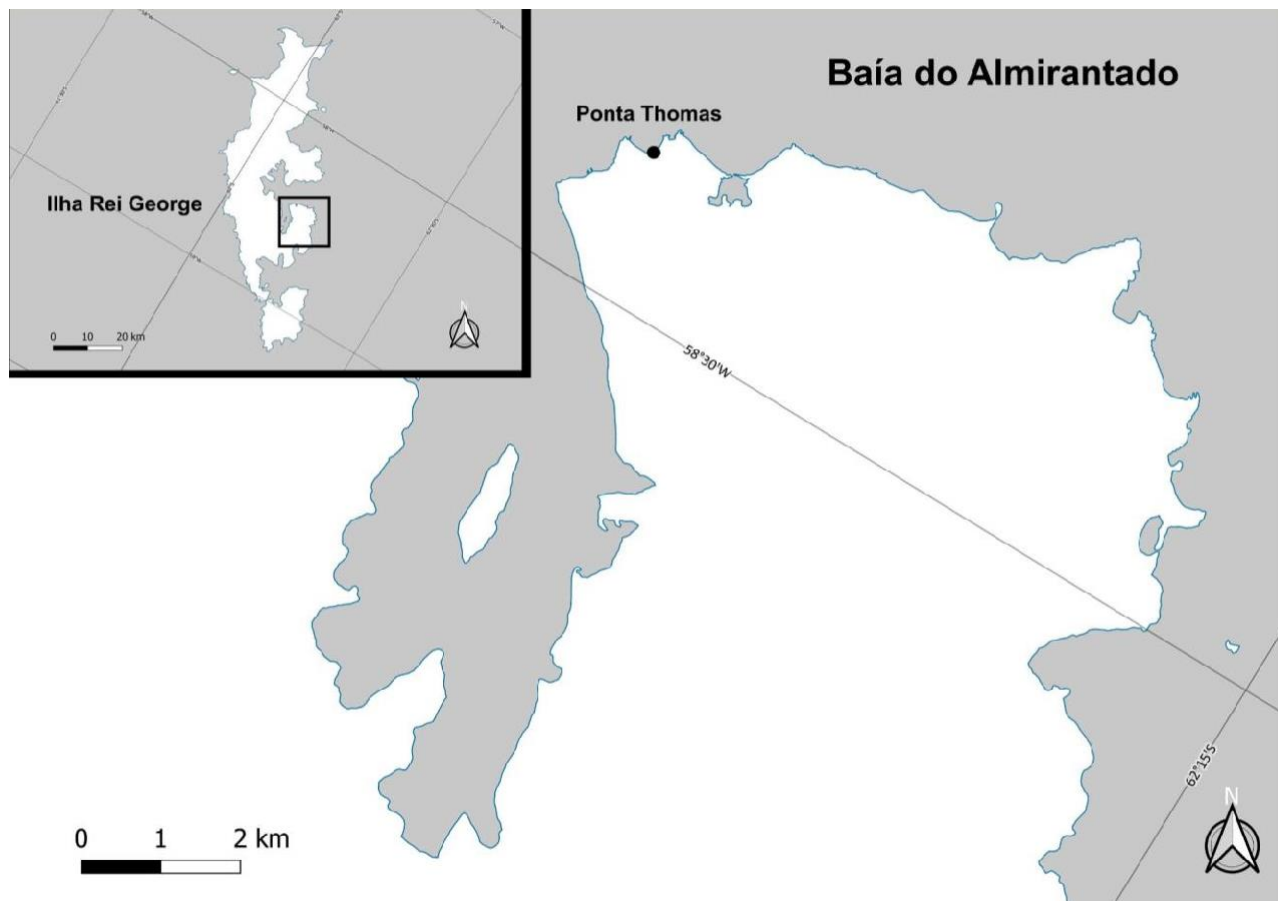
Extrair e amplificar o eDNA presente em amostras sedimentares coletadas em Ponta Thomas, na Ilha Rei George, Antártica, objetivando otimizar as técnicas de análise de eDNA para as amostras em estudo;

3.5 Material e Métodos

3.6 OPERANTAR XLI - Amostras Ponta Thomas (Verão 2022/2023)

Um total de 9 amostras de solo foram retiradas de três pontos diferentes em uma região de pinguineira localizada em Ponta Thomas (Figura 13), no lado oeste da Baía do Almirantado, próximo da estação polonesa de pesquisa Arctowski (62°09'37"S 58°28'24"W), dentro das atividades da OPERANTAR XLI durante a temporada de verão antártico 2022/2023.

Figura 13 - Localização do ponto de coleta em Ponta Thomas (●), Ilha Rei George, Ilhas Shetland do Sul, Antártica



Fonte: Autor

Toda a operação de coleta foi realizada com o apoio do Navio de Apoio Oceanográfico Ary Rongel. A amostragem foi realizada pelo autor e o orientador deste projeto, Dr. Cesar Amaral, com o apoio de botes e mergulhadores da Marinha do Brasil (Figuras 14-15). Os três pontos de coleta correspondem a trincheiras escavadas com profundidade de 20-25 cm de onde três extratos foram separados de acordo com profundidade (5-10cm, 10-20cm, 20-25cm) (Figura 16).

Figura 14 - Pesquisadores realizando a coleta com o apoio do NApOc Ary Rongel, da Marinha do Brasil.



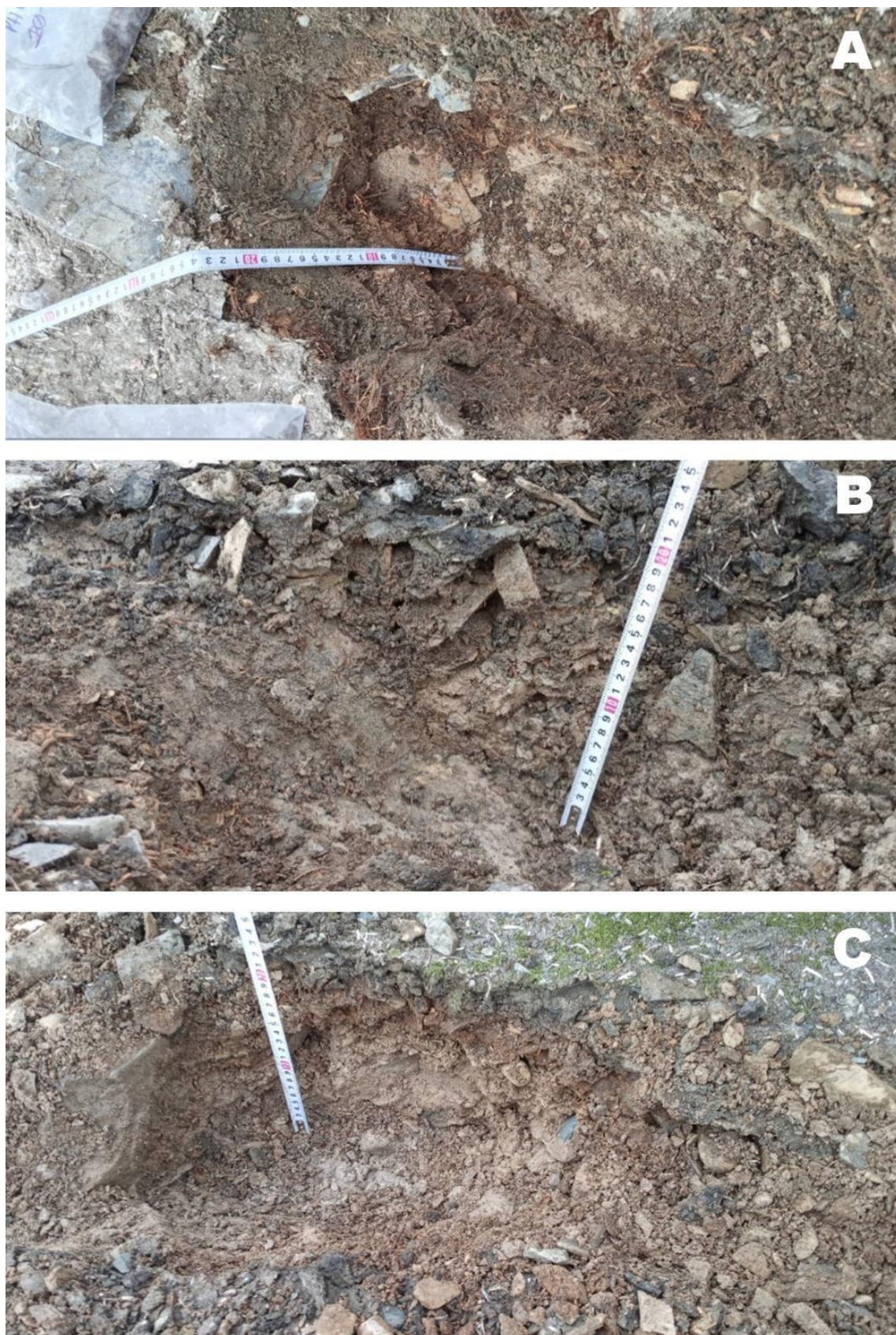
Fonte: Edson Vandeira.

Figura 15 - Coleta de amostras de solo em Ponta Thomas, Ilha Rei George, Antártica.



Fonte: Felipe Sugimoto/MCTI.

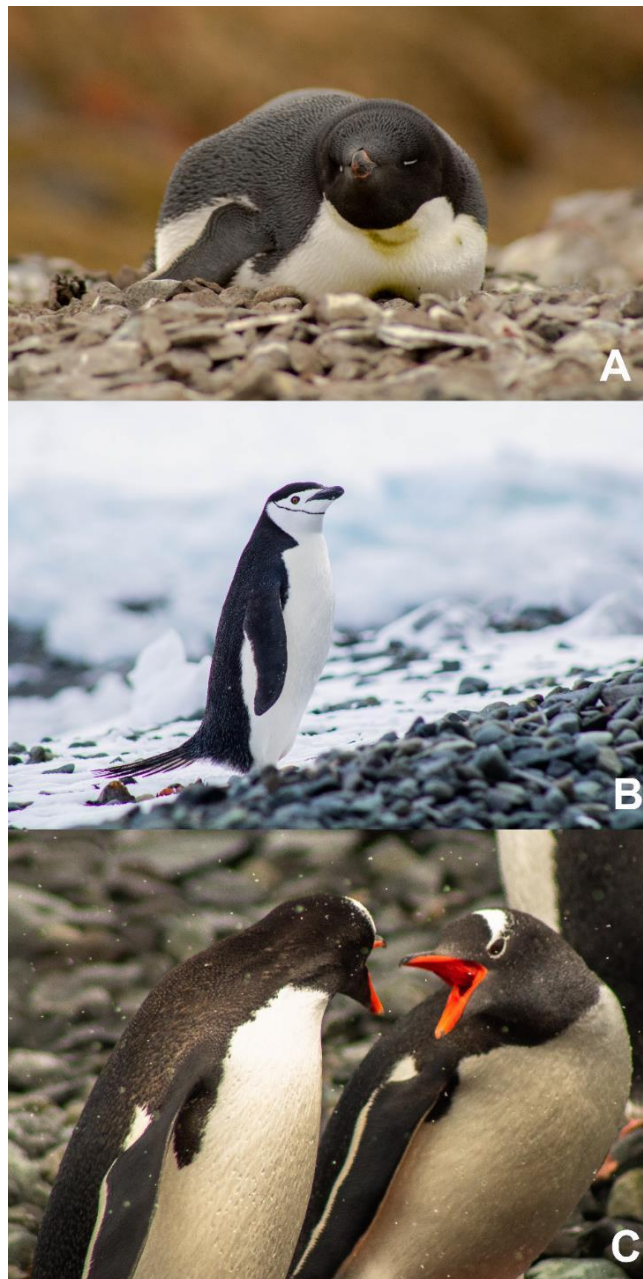
Figura 16 - Trincheiras para a coleta de amostras nos três pontos da localidade Ponta Thomas.



Legenda: A – Ponto 1; B – Ponto 2; C – Ponto 3. Fonte: Cesar Amaral.

Na localidade amostrada em Ponta Thomas existe uma pinguineira estabelecida nas últimas décadas em que é registrada a ocorrência de três espécies de pinguins: adélia, gentoo e pinguins de barbicha (Figura 17), além da presença de outras espécies, tais como os biguás-das-shetland, os petréis, as skuas e os elefantes marinhos, focas e lobos marinhos, dentre outros (Figura 18).

Figura 17 - Espécies de pinguim encontradas em Ponta Thomas, Ilha Rei George, Antártica.



Legenda: A - Pinguim-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*); B – Pinguim de

barbicha (*Pygoscelis antarcticus*); C –
Pinguim-gentoo (*Pygoscelis papua*).
Fonte: Autor.

Figura 18 - Outras espécies faunísticas encontradas em Ponta Thomas, Ilha Rei George, Antártica.



Legenda: A – Foca-de-Weddel (*Leptonychotes weddellii*); B – Elefante-marinho (*Mirounga leonina*); C – Skua (*Stercorarius antarcticus*); D – Biguá-das-Shetland (*Leucocarbo bransfieldensis*). Fonte: Autor

As coletas foram realizadas usando luvas estéreis de nitrilo e pá. Após cada ponto as luvas foram trocadas e a pá esterilizada. Cada amostra foi armazenada em sacos individuais estéreis. Após a coleta, as amostras foram devidamente refrigeradas e armazenadas em ultra freezers (-80°C) no NApOc Ary Rongel até o desembarque na Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF). Ainda na Antártica, as amostras foram extraídas e amplificadas utilizando o laboratório de Genética Molecular disponível na EACF. Após o término da operação, as amostras foram transportadas devidamente refrigeradas pelo autor até o Rio de Janeiro, onde foram armazenadas em freezer -20°C nas dependências do NGA/LARAMG.

As amostras foram coletadas em três pontos na pinguineira localizada em Ponta Thomas, na Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Antártica.

3.7 Análises moleculares

3.7.1 Marcadores moleculares

Para a identificação de eDNA de pinguins antárticos em amostras de solo, foi selecionado a subunidade 1 do citocromo oxidase – COX1, do genoma mitocondrial, conhecida como a região *barcoding*, amplamente usada na identificação de organismos em estudos com eDNA (ANDÚJAR et al., 2018; LANGLOIS et al., 2021). Os *primers* foram confeccionados a partir da utilização do software MEGA-X, com um banco de dados construído com sequências de pinguins antárticos, compreendendo uma região de 180pb do gene COX1. As características do *primer* foram analisadas utilizando a ferramenta OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

3.7.2 Identificação molecular de pinguins antárticos

A partir do banco de dados com sequências da região COX1 do banco público National Center of Biotechnology Information (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), realizou-se um alinhamento das sequências, como objetivo de realizar as análises moleculares. Usando o software MEGA-X, cortamos as sequências da literatura no mesmo local do gene COX1 onde novas sequências foram adquiridas, e com o mesmo número de pares de base (~180pb). Os códigos de acesso para as sequências da literatura utilizadas podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 4 - Códigos de acesso GenBank para as sequências de pinguins antárticos utilizadas no banco de dados.

Espécie	Código
<i>Pygoscelis papua</i>	EU525485.1
	FJ028185.1
	EU525487.1
	EU525488.1

<i>Pygoscelis antarcticus</i>	EU525471.1
	EU525474.1
	EU525473.1
<i>Pygoscelis adeliae</i>	MK262577.1
	MK262540.1
	MK262598.1
	MK262533.1
	MK262496.1
<i>Aptenodytes forsteri</i>	EU525298.1
	EU525297.1
	EU525299.1
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	EU525304.1
	EU525302.1
	EU525303.1
	EU525301.1
<i>Eudyptes chrysolophus</i>	MG740184.1
	MG740183.1
	MG740182.1
	MG740180.1
<i>Eudyptula minor</i>	JN801446.1
	MK262196.1
	MK262308.1
	MK262100.1

3.7.3 Extração de DNA

O DNA ambiental contido nas amostras foi extraído utilizando o kit DNeasy PowerSoil® Pro (QIAGEN). O protocolo foi alterado após uma primeira rodada de extrações, onde não foi possível a obtenção de eDNA de pinguim nas amostras recentes de Ponta Thomas (Figura 19).

Figura 19 - Alteração no protocolo tradicional do kit DNeasy PowerSoil® Pro (QIAGEN)

Protocolo DNeasy® PowerSoil® Pro Kit	Protocolo DNeasy® PowerSoil® Pro Kit modificado
Colocar o tubo PowerBead Pro no Vortex em velocidade máxima por 10min	Colocar o tubo PowerBead Pro no Termo Mixer à 600rpm e misturar por 2 (duas) horas

As amostras foram separadas em tubos contendo até 250mg de sedimento e extraídos de acordo com o protocolo adaptado do kit (DNeasy® PowerSoil® Pro Kit)

3.7.4 Determinação da concentração do DNA

As concentrações do DNA extraído pelo kit DNeasy® PowerSoil® Pro foram determinadas através de análise por espectrofotometria, com a utilização do equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Este equipamento, através de um sistema de retenção, quantifica o volume da amostra e a sua concentração de DNA em um pedestal óptico com espectro variando entre 190 e 840nm (AMARAL, 2014).

3.7.5 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Alíquotas contendo 2 µL de DNA total em concentração mínima de 10 ng/µL foram acondicionadas em tubos específicos para a realização da reação de PCR. Os *primers* utilizados foram confeccionados pelo autor, sendo específicos para a identificação de pinguins antárticos em amostras de eDNA, recebendo o nome Cox1Pen. Eles amplificam uma parte do gene mitocondrial COX1, com cerca de 180 pares de base. As sequências dos *primers* são: Cox1Pen (forward – CACAAAGATATCGGCACCC; reverse – AGTCAGTTTCCGAACCCTC). Para a reação de PCR, adicionou-se 5,0 µL de tampão Platinum 4x (Applied Biosystems), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM) e 0,2 µL de Taq Platinum DNA polimerase (Applied Biosystems), 11 µL de água milli-Q, além de 2 µL de DNA, em volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termocicladores Veriti (Applied Biosystems) com base nas condições termocíclicas apresentadas na Tabela 3.

Tabela 5 - Condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação da região COI do DNA mitocondrial.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	2 minutos	35 ciclos
94 °C	30 segundos	
51 °C	40 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	

Para avaliar o sucesso do processo de amplificação, os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a concentração de 1,5% e separados por eletroforese em média tensão (110V por 30 minutos).

3.7.6 Purificação e sequenciamento das regiões de interesse do DNAm

Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado através da adição de 2 µL da enzima ExoSAP-IT® (USB Corporation) a uma alíquota de 5 µL do produto amplificado. Esta preparação foi levada ao termociclador programado com as condições apresentadas na Tabela 4.

Tabela 6 - Condições termocíclicas utilizadas nas reações de purificação das amostras amplificadas.

Temperatura	Tempo
37 °C	15 minutos
85 °C	15 minutos

Após a etapa de purificação, foi realizada para cada amostra as reações de sequenciamento para as fitas senso e anti-senso do marcador analisado. A reação de sequenciamento é composta por: 3 µL do iniciador (10 µM), 1 µL de Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems), 2 µL de tampão Big Dye e 3 µL do produto purificado. As condições termocíclicas utilizadas nas reações de sequenciamento estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 7 - Condições termocíclicas utilizadas nas reações de sequenciamento das amostras após a etapa de purificação.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95 °C	10 segundos	25 ciclos
50 °C	5 minutos	
60 °C	4 minutos	

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados novamente em resina Sephadex® G-50. Para o preparo da resina, 750 µL de Sephadex® G-50 (preparado em solução de 10 g em 150 mL de água Milli-Q) serão aplicados em coluna de purificação apropriada, sendo esta acondicionada em tubo de 1,5 mL e centrifugada a 8000 rpm por 90 segundos (Centrífuga Centrimicro 242 – FANEM). Após o descarte do filtrado, uma nova centrifugação nas mesmas condições da anterior foi executada, concluindo assim a etapa de formação da coluna. Após a formação da coluna, a mesma foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL onde foi adicionada uma alíquota de 10 µL de produto de sequenciamento, sendo novamente centrifugadas a 8000 rpm por 180 segundos.

Uma alíquota final deste produto purificado de 6 µL foi adicionada a 10 µL de formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) e estes foram aplicados na placa de sequenciamento de 96 poços. As amostras foram então submetidas à eletroforese capilar utilizando o sequenciador automático ABI Prism 3130/3500 (Applied Biosystems), preenchido com polímero POP-7™ (Applied Biosystems).

3.7.7 Alinhamento e análise das sequências

As sequências obtidas através da eletroforese capilar (sequenciamento Sanger) foram analisadas nos programas Geneious 4.8.2 e MEGA-X, para a determinação da qualidade das sequências obtidas. Após análise e correção, as sequências foram alinhadas com a utilização do software MEGA-X, assim como uma análise Neighbor-Joining (K2P) (bootstrap x1000).

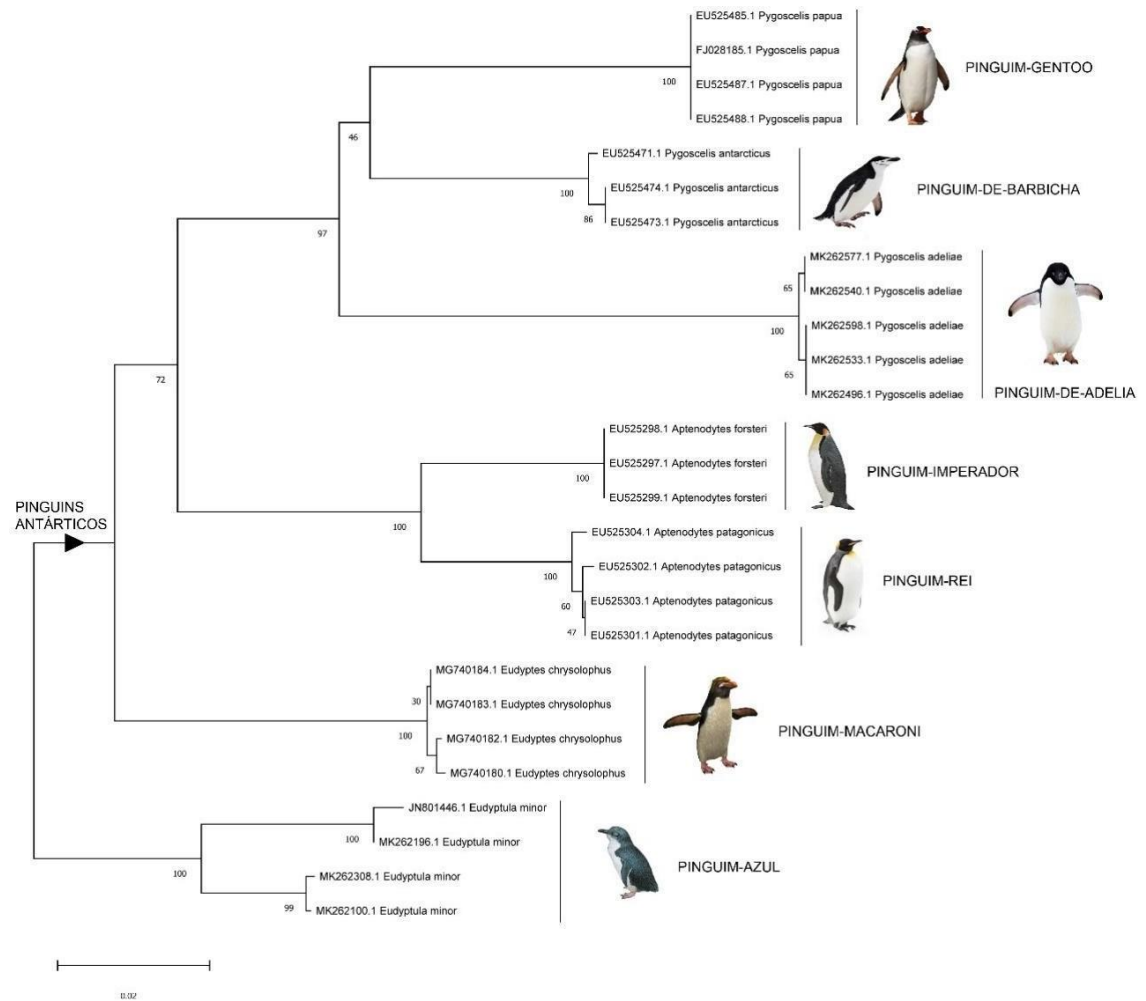
3.8 RESULTADOS

3.9 Análises Moleculares

3.9.1 Filogenia de pinguins antárticos

Para validação da região escolhida do gene mtDNA COX1 como viável para a metodologia barcoding, uma base de dados foi construída com 27 sequências previamente disponíveis na base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sendo composta por 23 sequências e 597pb incluindo seis espécies de pinguins antárticos (*Pygoscelis papua*, *P. antarcticus* e *P. adeliae*; *Aptenodytes patagonicus* e *A. forsteri*; *Eudyptes chrysolophus*) e quatro sequências da espécie *Eudyptula minor* como grupo-externo para as análises. *Eudyptula minor* foi escolhida como um grupo-externo por não ser um pinguim que ocorre na Antártica. A árvore de neighbor- joining (K2P) baseada na análise desta base de dados pode ser observada na Figura 20 e a matriz de distâncias K2P encontra-se na Tabela 5.

Figura 20 - Árvore de neighbor-joining (K2P) (*bootstrap* x1000) de espécies de pinguins antárticos.



Fonte: Autor

Tabela 5 - Matriz de distância K2P entre espécies de pinguins antárticos.

	1	2	3	4	5	6
1. <i>Pygoscelis papua</i>						
2. <i>Pygoscelis antarcticus</i>	0.0729					
3. <i>Pygoscelis adeliae</i>	0.1089	0.0931				
4. <i>Aptenodytes patagonicus</i>	0.1298	0.1077	0.1366			
5. <i>Aptenodytes forsteri</i>	0.1215	0.1114	0.1389	0.0455		
6. <i>Eudyptes chrysolophus</i>	0.1080	0.1141	0.1436	0.1019	0.1058	
7. <i>Eudyptula minor</i>	0.1205	0.1246	0.1483	0.1179	0.1260	0.1038

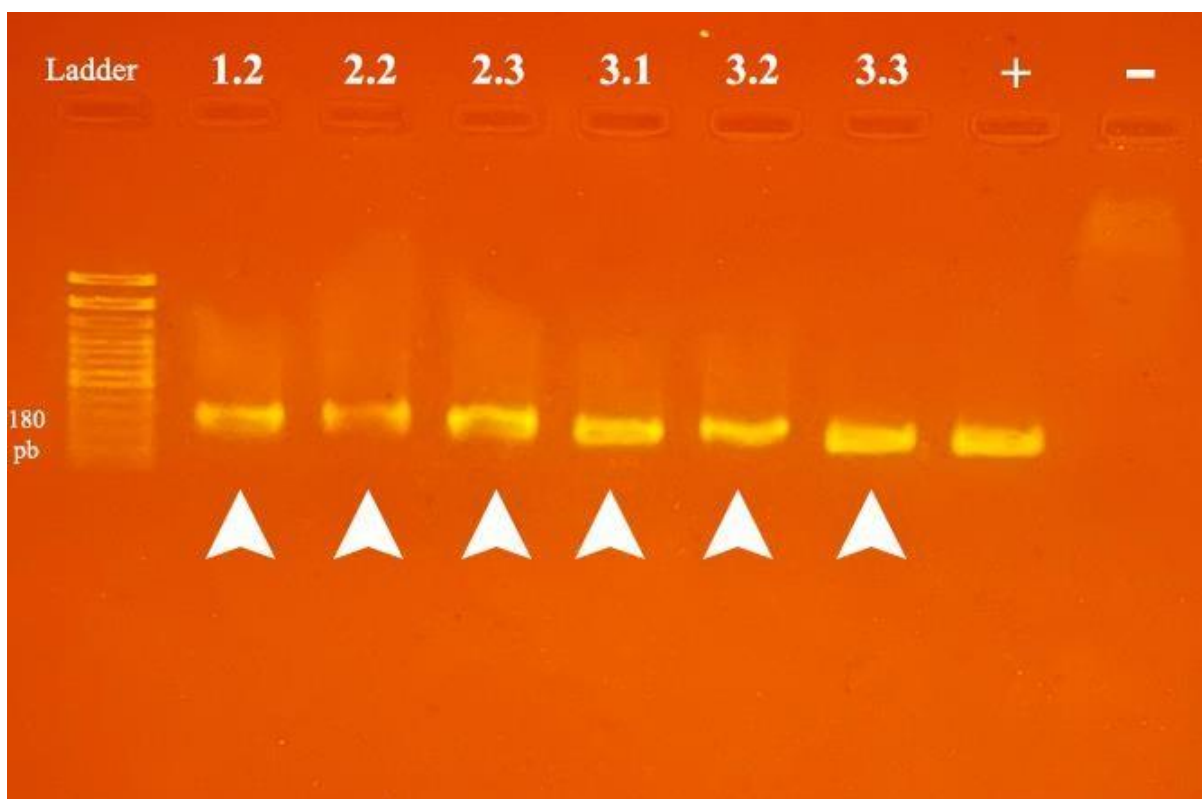
Legenda: Destacado em vermelho está a menor distância observada entre espécies do gênero *Aptedodytes* (4,5%), e a maior distância observada entre as espécies de *Eudyptula minor* e *Pygoscelis adeliae* entre as espécies (14,83%).

Como pôde ser observado, todas as espécies de pinguins antárticos foram agrupados como grupos claramente monofiléticos. O gênero *Eudyptula* foi o grupo-externo da análise que recuperou o gênero *Eudyptes* em posição basal seguido do gênero *Aptenodytes* e *Pygoscelis*, recuperados como grupos irmãos. As distâncias K2P (Tabela 6) observadas variaram entre 4 e 15% sendo, portanto, todas as espécies perfeitamente delimitadas e identificáveis dentro dos critérios da metodologia do DNA *Barcoding* proposta para o presente trabalho e conforme proposta originalmente por Hebert et al. (2003).

3.9.2 Amostras Ponta Thomas

A extração de DNA nos pontos de coleta de Ponta Thomas foi realizada com sucesso para todas as amostras. Inclusive, todos os 3 pontos de coleta tiveram pelo menos 1 amostra em que foi encontrado DNA de pinguim. Das 9 amostras coletadas, obtivemos sucesso na amplificação do DNA de pinguim em 6 delas, como demonstrado no gel de agarose da Figura 21.

Figura 21 - Gel de agarose com amplificações positivas para 180 pares de base da região COX1 do DNAm de pinguim.

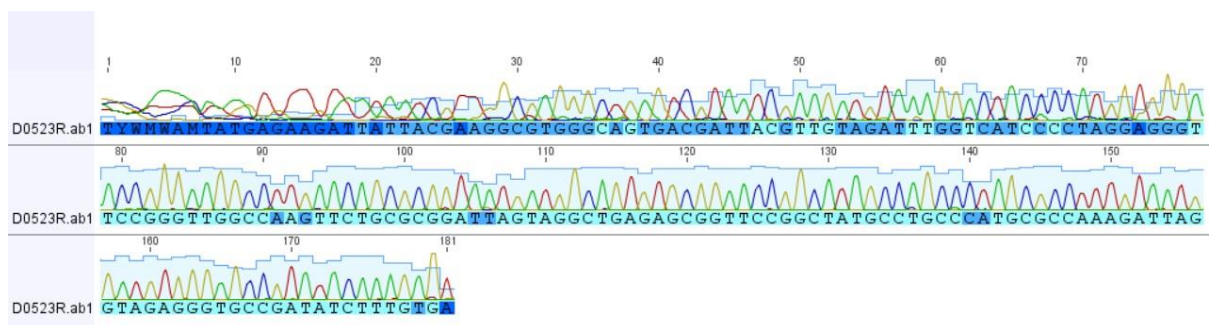


Fonte: Autor

3.9.3 DNA Barcode de *Pygoscelis adeliae*

Todas as amostras amplificadas foram sequenciadas com sucesso e os resultados foram posteriormente analisados e corrigidos utilizando-se o software Geneious v4.8.2. Um exemplo de eletroferograma do sequenciamento da região COX1 pode ser visualizada na Figura 22.

Figura 22 - Eletroferograma representativo do sequenciamento da região COX1 do DNA mitocondrial de *Pygoscelis adeliae*.



Fonte: Autor

Utilizando a ferramenta BLAST, podemos identificar ao nível de espécie o organismo representado em uma sequência específica. Todas as 6 amostras foram identificadas como pinguim-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*) com um alto grau de certeza (99-100%). Um exemplo dos resultados identificados pela ferramenta BLAST pode ser observado na Figura 23.

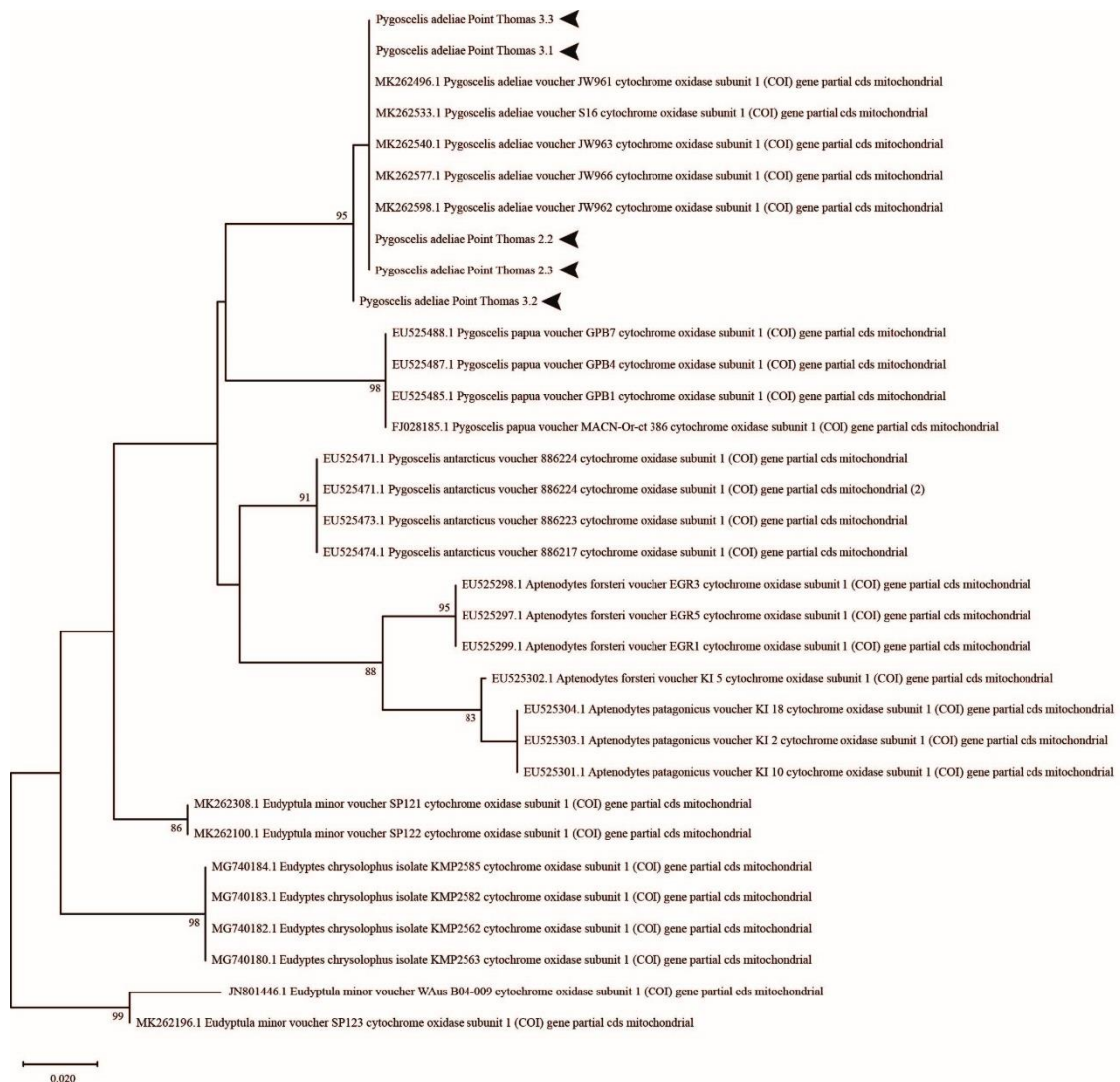
Figura 23 - Resultado representativo da identificação ao nível de espécie para *Pygoscelis adeliae*, feito pela ferramenta BLASTN.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Pygoscelis adeliae voucher JW966 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	694	MK262577.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher JW963 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	694	MK262540.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher S 16 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	695	MK262533.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher JW961 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	694	MK262496.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher JW960 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	686	MK262398.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher BROMB_D4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	712	MK262363.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher C 79 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	794	MK262281.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher C 98 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	710	MK262217.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher JW959 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	655	MK262174.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher BROMB_D9 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	766	MK262132.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher D 20 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	673	MK262016.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher JW965 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	655	MK261936.1
✓	Pygoscelis adeliae voucher B 59 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	Pygoscelis adeliae	302	302	98%	1e-77	99.39%	896	MK261839.1

Fonte: Autor

Uma árvore de Neighbor-Joining baseada na distância K2P foi feita com suporte de uma análise *bootstrap* com 1000 réplicas (Figura 24). Todas as novas sequências foram corretamente pareadas com outros indivíduos de *Pygoscelis adeliae*, apoiado por um alto valor de *bootstrap*.

Figura 24 - Árvore Neighbor-Joining (K2P) do marcador COX1, exibindo acima dos nós, valores de bootstrap acima de 80. As setas indicam as novas sequências adquiridas nesse estudo.



Fonte: Autor

3.10 Discussão

Desde sua primeira aplicação na literatura (OGRAM; SAYLER & BARKAY, 1987), o uso do eDNA tem expandido consideravelmente (CRISTESCU; HEBERT, 2018), e na última década vem crescendo principalmente em estudos populacionais (ADAMS et al., 2019). Avanços recentes na metodologia possibilitaram o uso de polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, SNPs) para distinguir entre assinaturas genéticas (AYLWARD et al., 2018; STEPIEN; SNYDER; ELZ, 2019) e a possibilidade de determinação sexual através do eDNA (NICHOLS; SPONG, 2017). Levantamentos populacionais que utilizam o eDNA geralmente dependem no mtDNA, devido a sua maior abundância na célula, e consequentemente em amostras ambientais (GOLDBERG et al., 2016). Entretanto, melhorias nas metodologias aplicadas na extração de eDNA poderia permitir uma maior sensibilidade em ensaios que visam encontrar eDNA nuclear, permitindo inferências mais detalhadas em nível populacional sobre táxons de conservação e interesse de monitoramento (HELLSTRÖM et al., 2019; VON DUYKE et al., 2019).

O uso de eDNA em estudos de identificação molecular e estudos populacionais, embora promissores, não são tão robustos como os métodos de amostragem tradicionais e continua a enfrentar uma série de desafios, como a dificuldade de extrair DNA de boa qualidade e a diminuição de sinais de variação genética rara (FERNÁNDEZ et al., 2018; ADAMS et al., 2019). Entretanto, eDNA não requer o avistamento ou captura dos táxons-alvo que pode ser crítico em estudos com espécies ameaçadas, crípticas ou perigosas (HELLSTRÖM et al., 2019; JANEČKA et al., 2011; MONDOL et al., 2009; VON DUYKE et al., 2019). Em teste realizado por Barber-Meyer e colaboradores (2020) foi encontrado a maior quantidade de eDNA em amostras que continham urina ou fezes. O solo de pinguineiras é rico em fezes (GUO et al., 2018), aumentando a possibilidade de se encontrar amostras de alta qualidade de eDNA. Os resultados do presente estudo demonstram tal possibilidade, uma vez que a extração de DNA de pinguim se deu na proximidade de uma pinguineira, onde a presença de guano é abundante.

Apesar disso, devido à dificuldade de encontrar amostras de DNA de alta qualidade, existe um obstáculo na identificação de espécies usando o eDNA

(ADAMS et al., 2019). A robustez de uma identificação por eDNA está diretamente relacionada com a qualidade dos primers utilizados na análise, assim, a escolha dos genes apropriados e qualidade da sequência obtida são cruciais. Os genes mitocondriais são mais utilizados devido a sua maior abundância na célula (diversas mitocôndrias, somente um núcleo) e sua utilidade na identificação de espécies através da metodologia de DNA *barcoding*, como uso do gene COX1 (LANGLOIS et al., 2021).

Apesar de ser amplamente usado em análises moleculares para a identificação de espécies (ANDÚJAR et al., 2018; DEINER et al., 2017; LANGLOIS et al., 2021), o uso da região COX1 ainda é contestado como um marcador em análises que utilizam *metabarcoding* (DEAGLE et al., 2014; RAGOT; VILLEMUR, 2022). O principal fator citado como um problema é a alta variabilidade da região entre linhagens podendo gerar problemas na identificação de espécies usando *primers* “universais” (DEAGLE et al., 2014).

Assim, novos *primers* de comprovada funcionalidade e que codificam vertebrados antárticos podem se tornar uma preciosa adição à escassa literatura de trabalhos com eDNA desses organismos, vindo a ajudar em estudos que utilizam espécies de pinguim como foco. Apesar de ter sido detectada somente uma espécie, o *primer* mostrou potencial em distinguir todas as espécies de pinguins antárticos

Em uma revisão recente sobre os efeitos das mudanças climáticas em populações de aves e mamíferos marinhos antárticos. Bestley e colaboradores (2020), atribuíram o aumento no entendimento de ecossistemas marinhos em parte devido ao aumento de novas e mais baratas técnicas e tecnologias de monitoramento.

Dentre estas técnicas, o DNA ambiental já foi sugerido como uma nova ferramenta de monitoramento para áreas de proteção ambiental no Oceano Austral (AIZU et al., 2017; COTTIER-COOK; MOGG; SAYER, 2019; GOLD et al., 2021). O uso de amostragem de eDNA juntamente com métodos tradicionais, como pesquisas de mergulho (GOLD et al., 2021) fornece uma abordagem complementar para a construção de estimativas da biodiversidade que podem ser usadas para cobrir lacunas e abordar vieses nos dados de monitoramento

tradicionais (BANI et al., 2020; COTTIER-COOK; MOGG; SAYER, 2019). Por exemplo, a estrutura complexa do fundo do mar oferece um desafio para levantamentos tradicionais de arrasto, enquanto que com o uso do eDNA as pesquisas não são afetadas por obstáculos no ambiente (LACOURSIÈRE-ROUSSEL et al., 2018; THOMSEN et al., 2016).

Tal como acontece com novos estudos de identificação populacional que usam eDNA, houve progresso no uso de eDNA para estimativas de abundância de espécies (KNUDSEN et al., 2022; LACOURSIÈRE-ROUSSEL et al., 2018; SEVELLEC et al., 2021; SPEAR et al., 2021; TILLOTSON et al., 2018; YATES et al., 2021). Embora esses estudos indiquem uma correlação entre a concentração de eDNA e a biomassa das espécies, a complexa interação de fatores bióticos e abióticos, como por exemplo a produção, degradação e dispersão de eDNA do organismo afetam a consistência e a confiabilidade dessas estimativas, e os métodos requerem otimização adicional (HINLO et al., 2018; JERDE, 2021). As estimativas quantitativas atuais são, portanto, limitadas pela confiança em uma série de suposições. A inclusão de dados sobre a persistência de eDNA de espécies específicas, como no peixe-gelo, um nototeniíide da Península Antártica Ocidental (COWART; MURPHY & CHENG, 2018), tende a fortalecer as estimativas futuras, assim como a integração de modelos que explicam a ecologia e o transporte de eDNA (FUKAYA et al., 2021). Desse forma, o progresso nas estimativas de abundância de eDNA ajudaria nas avaliações da biodiversidade antártica e no monitoramento da pesca (JERDE, 2021), dentre outras aplicações.

Dentre os estudos com eDNA, Pansu e colaboradores (2015) extraíram eDNA de uma espécie de vertebrado em amostras de solo, porém, era uma espécie invasora de coelho e realizado em regiões pré-antárticas. O presente trabalho é o primeiro a extrair eDNA de vertebrados antárticos em amostras de solo da Antártica. Tal feito também é raro no Ártico, onde somente um artigo publicado conseguiu extrair eDNA de vertebrado em amostras de solo (EPP et al., 2012). Porém, o estudo desses autores utilizou *metabarcoding* para identificar as espécies de vertebrados encontradas, enquanto o presente estudo utilizou a técnica mais tradicional de sequenciamento DNA *Barcoding* e Sanger. Apesar de impossibilitar a identificação de diversas espécies presentes em uma amostra,

como quando utilizado o *metabarcoding*, o sucesso em identificar uma espécie através de um sequenciamento Sanger demonstrou-se mais útil quando se realiza o monitoramento de uma ou poucas espécies, uma vez que possui um custo menor, cerca de US\$ 5,00 por amostra (CAMERON; RUBINOFF & WILL, 2006), enquanto *metabarcoding* tem um custo de US\$ 120,00 (ELBRECHT et al., 2017). A viabilidade de usar uma técnica de menor custo para a análise de eDNA amplia a acessibilidade para esse tipo de pesquisa, ajudando no preenchimento das lacunas de estudos de vertebrados antárticos.

Além disso, como um kit usado preferencialmente para a extração de eDNA de microorganismos (SPERLING et al., 2018), o nosso sucesso na extração e amplificação das amostras se deu em decorrência de uma alteração no protocolo do Kit DNeasy PowerSoil® Pro (QIAGEN), possibilita o uso da mesma mudança em futuros estudos que utilizarem o Kit para a extração de eDNA de vertebrados. Com a possibilidade de um maior sucesso na extração e amplificação do eDNA em amostras de solo de vertebrados antárticos, a lacuna gerada pelos poucos estudos publicados pode ser preenchida com maior facilidade. Uma vez que é um kit de ampla distribuição, o uso modificado do seu protocolo pode servir como uma importante contribuição para o futuro das análises moleculares baseadas em amostras sedimentares com foco em vertebrados.

3.11 Conclusões

Através do presente estudo, foi possível detectar DNA de pinguim-de-adélia em seis das nove amostras de solo coletadas. Esse estudo é o primeiro a conseguir extrair, com sucesso, o DNA de um vertebrado antártico de amostras de solo.

A natureza extrema da Antártica faz com que o continente se torne o local ideal para a investigação do uso de DNA ambiental e sua aplicação em diversas áreas da genética molecular. A aplicação do eDNA demonstra um grande potencial para futuros estudos, porém ainda é preciso cuidado em relação a fragmentação e qualidade das sequências obtidas, podendo levar a interpretações errôneas.

O sucesso no desenvolvimento de novos marcadores genéticos para pinguins antárticos demonstram ser uma importante ferramenta para o futuro do monitoramento dessas espécies.

A possibilidade de estudar espécies de vertebrados antárticos, como o pinguim-de-adélia, de uma maneira não-invasiva, é uma adição promissora para o futuro do monitoramento da fauna antártica. As pesquisas com eDNA representam uma ferramenta de diagnóstico não invasiva e facilmente acessível que se mostra promissora para a pesquisa atual e futura no continente, contribuindo para os esforços de monitoramento de médio e longo prazo.

CONCLUSÕES GERAIS

O DNA ambiental é um campo em rápido crescimento, no entanto, dentro da pesquisa antártica, a aplicação do eDNA aos vertebrados permanece praticamente inexplorada. Pôde-se observar o oposto no Ártico, onde diversos trabalhos já exploraram o potencial da técnica para o estudo de vertebrados, podendo assim, servir como modelo para futuros trabalhos com vertebrados Austrais.

A presente dissertação objetivou abordar esse problema, desenvolvendo pela primeira vez na literatura um protocolo de eDNA que utiliza solo antártica para detectar eDNA de vertebrados, mais especificamente pinguins, estabelecendo as bases para futuras investigações sobre amostras de solo como fonte de DNA de vertebrados. Pode-se obter sucesso ao extrair o DNA de Pinguim-de-adélia a partir da mudança do protocolo de um kit de extração mais comumente usado na obtenção do DNA de bactérias.

Unindo metodologias moleculares e biogeoquímicas, foi possível observar um acompanhamento da quantidade de eDNA em uma amostra de solo ornitogênico com a abundância de nitrogênio e carbono nas mesmas. Apesar de nenhum DNA de pinguim ter sido encontrado, as taxas de eDNA acompanham o crescimento populacional do pinguim-gentoo observado nas últimas décadas, podendo ser proveniente de bactérias associadas à presença da ave. Tal observação ainda não foi feita na literatura, demonstrando mais uma vez o potencial do uso do eDNA para estudos na Antártica.

Em luz dos desafios que as mudanças climáticas apresentam a conservação e monitoramento da biodiversidade, pesquisas com eDNA mostram-se promissoras para avaliações futuras da fauna Antártica, com progresso sendo feito em uma série de áreas-chave para a conservação e gestão do meio ambiente austral

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. I. M. et al. Beyond biodiversity: Can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool? *Genes*, v. 10, n. 3, 2019.
- AHMED, E. et al. Archaeal community changes in Lateglacial lake sediments: Evidence from ancient DNA. *Quaternary Science Reviews*, v. 181, p. 19–29, 2018.
- AIZU, M. et al. Environmental DNA metabarcoding with MiFish primer reveals marine fish fauna of Tsushima Island, Nagasaki for establishing a marine protected area Fisheries Science for Future Generations. *Fisheries Science for Future Generations*, 2017
- ALSOS, I. G. et al. Sedimentary ancient DNA from Lake Skartjørna, Svalbard: Assessing the resilience of arctic flora to Holocene climate change. *Holocene*, v. 26, n. 4, p. 627– 642, 2016.
- ANDÚJAR, C. et al. Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. *Molecular Ecology*, v. 27, n. 20, p. 3968–3975, 2018.
- ARDURA, A.; PLANES, S. Rapid assessment of non-indigenous species in the era of the eDNA barcoding: A Mediterranean case study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 188, p. 81–87, 2017.
- AYLWARD, M. L. et al. An environmental DNA sampling method for aye-ayes from their feeding traces. *Ecology and Evolution*, v. 8, n. 18, p. 9229–9240, 2018.
- BANI, A. et al. Informing marine spatial planning decisions with environmental DNA. *Em: Advances in Ecological Research*. Academic Press Inc., v. 62, p. 375–407, 2020.
- BARBER-MEYER, S. M.; DYSTHE, J. C.; PILGRIM, K. L. Testing Environmental DNA from Wolf Snow Tracks for Species, Sex, and Individual Identification. *Canadian*

Wildlife Biology and Management, v. 9, n. 1, 2020.

BARBRAUD, C.; WEIMERSIRCH, H. Emperor penguins and climate change. *Nature*, v. 411, p. 183–186, 2001.

BELLEMAIN, E. et al. Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 1176–1189, 2013

BESTLEY, S. et al. Marine Ecosystem Assessment for the Southern Ocean: Birds and Marine Mammals in a Changing Climate. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 8, 2020.

BEZANILLA, M. et al. Adsorption of DNA to Mica, Silylated Mica, and Minerals: Characterization by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, v. 11, p. 655-659, 1995

BHARDWAJ, L. et al. Persistent Organic Pollutants in Biotic and Abiotic Components of Antarctic Pristine Environment. *Earth Systems and Environment*, v. 2, n.1, p. 35-54, 2018.

BRANDT, A. et al. First insights into the biodiversity and biogeography of the Southern Ocean deep sea. *Nature*, v. 447, n. 7142, p. 307–311, 2007.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA barcoding of marine metazoa. *Annual Review of Marine Science*, v. 3, p. 471–508, 2011.

CAI, P. et al. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 3, p. 471–476, 2006.

CAMERON, S.; RUBINOFF, D.; WILL, K. Who will actually use DNA barcoding and what will it cost? *Systematic Biology*, 2006, v. 55, n. 5, p. 844-847, 2006

ČANDEK, K.; KUNTNER, M. DNA barcoding gap: Reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources*, v. 15, n. 2, p.

268–277, 2015.

CAPO, E. et al. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. PLoS ONE, v. 14, n. 12, 2019.

CASANOVAS, P. et al. A comprehensive coastal seabird survey maps out the front lines of ecological change on the western Antarctic Peninsula. Polar Biology, v. 38, n. 7, p. 927–940, 2015

CASSANO, J. J.; UOTILA, P.; LYNCH, A. Changes in synoptic weather patterns in the polar regions in the twentieth and twenty-first centuries, Part 1: Arctic. International Journal of Climatology, v. 26, n. 8, p. 1027–1049, 2006.

CHAMBERLAIN, C. P. et al. The use of isotope tracers for identifying populations of migratory birds. Oecologia, v. 109, p. 132–141, 1997.

CHE-CASTALDO, C. et al. Pan-Antarctic analysis aggregating spatial estimates of Adélie penguin abundance reveals robust dynamics despite stochastic noise. Nature Communications, v. 8, n. 1, 2017.

CHOWN, S. L. et al. The changing form of Antarctic biodiversity. Nature, v. 522, n. 7557, p. 431–438, 2015.

CHU, Z. et al. Quantitative evaluation of heavy metals' pollution hazards and estimation of heavy metals' environmental costs in leachate during food waste composting. Waste Management, v. 84, p. 119–128, 2019.

CLARKE, L. J. et al. Environmental DNA metabarcoding for monitoring metazoan biodiversity in Antarctic nearshore ecosystems. PeerJ, v. 9, 2021.

COCKS, M. P.; BALFOUR, D. A.; STOCK, W. D. On the uptake of ornithogenic products by plants on the inland mountains of Dronning Maud Land, Antarctica, using stable isotopes. Polar Biology, v. 20, p. 107–111, 1998.

COCKS, M. P.; NEWTON, I. P.; STOCK, W. D. Bird effects on organic processes in soils from five microhabitats on a nunatak with and without breeding snow petrels in Dronning Maud Land, Antarctica. *Polar Biology*, v. 20, p. 112–120, 1998.

COETZEE, B. W. T.; CHOWN, S. L. A meta-analysis of human disturbance impacts on Antarctic wildlife. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 91, n. 3, p. 578–596, 2016.

COLLINS, R. A. et al. Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, v. 1, n. 1, 2018.

CONVEY, P. et al. The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, v. 84, n. 2, p. 203-244, 2014

CORDERO, R. R. et al. Persistent extreme ultraviolet irradiance in Antarctica despite the ozone recovery onset. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, 2022.

COTTIER-COOK, E.; MOGG, A.; SAYER, M. D. Biosecurity implications of the highly invasive carpet sea-squirt *Didemnum vexillum* Kott, 2002 for a protected area of global significance. *Management of Biological Invasions*, v. 10, n. 2, p. 311-323, 2019.

COWART, D. A.; MURPHY, K. R.; CHENG, C. H. C. Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. *Marine Genomics*, v. 37, p. 148–160, 2018.

CRECCHIO, C.; STOTZKY, G. BINDING OF DNA ON HUMIC ACIDS: EFFECT ON TRANSFORMATION OF *BACILLUS SUBTILIS* AND RESISTANCE TO DNase. *Soil Biol. Biochem*, v. 8, n. 9, p. 1061–1067, 1998.

CRISTESCU, M. E.; HEBERT, P. D. N. Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, v. 49, p. 209–230, 2018.

CROXALL, J et al. Environmental Change and Antarctic Seabird Populations. *Science*, v. 297, p. 1510-1514, 2002

CUEVAS, C. et al. The influence of iodine on the Antarctic stratospheric ozone hole. *Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences*, v. 119, n. 7, 2022.

DALIA, K. C. et al. Sazonalidade de aerossóis atmosféricos e microanálise individual por EDS em testemunho de gelo da ilha Rei George. *Brazilian Antarctic Research*, v. 4, p. 25–36, 2004.

D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, v. 477, n. 7365, 2011.

DE SCHEPPER, S. et al. The potential of sedimentary ancient DNA for reconstructing past sea ice evolution. *ISME Journal*, v. 13, n. 10, p. 2566–2577, 2019.

DEAGLE, B. E. et al. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: Not a perfect match. *Biology Letters*, v. 10, n. 9, 2014.

DEINER, K. et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular ecology*, v. 26, n. 21, p. 5872-5895, 2017.

DJURHUUS, A. et al. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Frontiers in Marine Science*, v. 4, p. 314, 2017.

DONG, D. et al. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, n. 2, p. 217–222, 2006.

DUGGER, K. M. et al. Survival differences and the effect of environmental instability on breeding dispersal in an Adélie penguin meta-population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 27, p.

12375–12380, 2010.

DULIAS, K. et al. Sedimentary DNA versus morphology in the analysis of diatom-environment relationships. *Journal of Paleolimnology*, v. 57, n. 1, p. 51–66, 2017.

DUQUESNE, S.; RIDDLE, M. J. Biological monitoring of heavy-metal contamination in coastal waters off Casey Station, Windmill Islands, East Antarctica. *Polar Biology*, v. 25, n. 3, p. 206–215, 2002.

EICHMILLER, J. J.; BEST, S. E.; SORENSEN, P. W. Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. *Environmental Science and Technology*, v. 50, n. 4, p. 1859–1867, 2016.

ELBRECHT, V. et al. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 8, n. 10, p. 1265–1275, 2017.

EMSLIE, S. D. Radiocarbon dates from abandoned penguin colonies in the Antarctic Peninsula region. *Antarctic Science*, v. 13, n.3, p. 289-295, 2001.

EPP, L. S. et al. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: Potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 8, p. 1821–1833, 2012.

EPP, L. S. et al. Lake sediment multi-taxon DNA from North Greenland records early post-glacial appearance of vascular plants and accurately tracks environmental changes. *Quaternary Science Reviews*, v. 117, p. 152–163, 2015.

FAEDO, M. et al. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. *Biological Control*, v. 23, n. 1, p. 64–70, 2002.

FERNÁNDEZ, S. et al. Evaluating freshwater macroinvertebrates from eDNA metabarcoding: A river Nalón case study. *PLoS ONE*, v. 13, n. 8, 2018.

FICETOLA, Gentile Francesco et al. DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion. *Science Advances*, v. 4, n. 5, p. 4292, 2018.

FICETOLA, G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, v. 4, n. 4, p. 423–425, 2008.

FOLLAND, C. K.; KARL, T. R.; SALINGER, M. J. Observed climate variability and change. *Weather*, v. 57, n. 8, p. 269–278, 2002.

FORCADA, J.; TRATHAN, P. N. Penguin responses to climate change in the Southern Ocean. *Global Change Biology*, v. 15, n. 7, p. 1618–1630, 2009.

FUKAYA, K. et al. Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, v. 30, n. 13, p. 3057-3067, 2021.

FUOCO, R. et al. Persistent organic pollutants (POPs) at Ross Sea (Antarctica). *Microchemical Journal*, v. 92, n. 1, p. 44–48, 2009.

GALIMOV, E. M. Carbon isotope composition of Antarctic plants. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 64, n. 10, p. 1737-1739, 2000.

GARDNER, C. M.; GUNSCH, C. K. Adsorption capacity of multiple DNA sources to clay minerals and environmental soil matrices less than previously estimated. *Chemosphere*, v. 175, p. 45–51, 2017.

GIGUET-COVEX, C. et al. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nature Communications*, v. 5, 2014.

GILLE, S. How ice shelves melt. *Science*, v. 346, n. 6214, p. 1180-1181, 2014.

GOLD, Z. et al. eDNA metabarcoding as a biomonitoring tool for marine protected

areas. PLoS ONE, v. 16, n. 2, 2021.

GOLDBERG, C. S. et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* British Ecological Society, 2016.

GOODALL-COPESTAKE, W. P.; TARLING, G. A.; MURPHY, E. J. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: A case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*, v. 109, n. 1, p. 50–56, 2012.

GRANQUIST, S. M. et al. Fish consumption of harbour seals (*Phoca vitulina*) in north western Iceland assessed by DNA metabarcoding and morphological analysis. *Polar Biology*, v. 41, n. 11, p. 2199–2210, 2018.

GRIFFITHS, H. J et al. Quantifying Antarctic marine biodiversity: The SCAR-MarBIN data portal. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, v. 58, n. 1–2, p. 18–29, 2011.

GUO, Y. et al. Direct and indirect effects of penguin feces on microbiomes in Antarctic ornithogenic soils. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

HAILE, J. et al. Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 52, 2009.

HALE, R. C. et al. Antarctic research bases: Local sources of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Environmental Science and Technology*, v. 42, n. 5, p. 1452–1457, 2008.

HANSEN, J. et al. GISS analysis of surface temperature change. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, v. 104, n. D24, p. 30997–31022, 1999.

GIBSON, R; ATKINSON, R. J. A.; GORDON, John DM (Ed.). *Oceanography and Marine Biology: An annual review*, v. 45. 2007.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HELLSTRÖM, Micaela et al. Footsteps in the snow—Pilot study for future monitoring of individual lynx (*Lynx lynx*) from eDNA in snow tracks. *AquaBiota Report*, v. 10, 2019.

HICKCOX, R. P. et al. Global terrestrial distribution of penguins (Spheniscidae) and their conservation by protected areas. *Biodiversity and Conservation*, v. 28, n. 11, p. 2861–2876, 2019.

HINLO, R. et al. Performance of eDNA assays to detect and quantify an elusive benthic fish in upland streams. *Biological Invasions*, v. 20, n. 11, p. 3079–3093, 2018.

HOBSON, Keith A. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia*, v. 120, p. 314–326, 1999.

HOFSTEE, H. et al. Soils of Seabee Hook, Cape Hallett, northern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Science*, v. 18, n. 4, p. 473–486, 2006.

HOWELL, L et al. Environmental DNA as a tool for monitoring Antarctic vertebrates. *New Zealand Journal of Zoology*, v. 48, n. 3–4, p. 245–262, 2021.

JAMES-CLEAVES, H. et al. The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to mineral surfaces. *Chemosphere*, v. 83, n. 11, p. 1560–1567, 2011.

JANEČKA, J. E. et al. Comparison of noninvasive genetic and camera-trapping techniques for surveying snow leopards. *Journal of Mammalogy*, v. 92, n. 4, p. 771–783, 2011.

JERDE, C. L. Can we manage fisheries with the inherent uncertainty from eDNA?. *Journal of fish biology*, v. 98, n. 2, p. 341–353, 2021.

JO, T. et al. Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, v. 17, n. 6, p. 25–33, 2017.

JØRGENSEN, T. et al. A comparative study of ancient sedimentary DNA, pollen and macrofossils from permafrost sediments of northern Siberia reveals long-term vegetational stability. *Molecular Ecology*, v. 21, n. 8, p. 1989–2003, 2012.

KHIM, B. K. et al. Late Holocene stable isotope chronology and meltwater discharge event in Maxwell and Admiralty bays, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*, v. 13, n. 2, p. 167–173, 2001.

KIM, O. S. et al. Bacterial diversity in ornithogenic soils compared to mineral soils on King George Island, Antarctica. *Journal of Microbiology*, v. 50, n. 6, p. 1081–1085, 2012.

KLINCK, J. M. Heat and salt changes on the continental shelf west of the Antarctic Peninsula between January 1993 and January 1994. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, v. 103, n. 3334, p. 7617–7636, 1998.

KNUDSEN, S. W. et al. Monitoring of environmental DNA from nonindigenous species of algae, dinoflagellates and animals in the North East Atlantic. *Science of the Total Environment*, v. 821, 2022.

KOOYMAN, G. Evolutionary and ecological aspects of some Antarctic and sub-Antarctic penguin distributions. *Oecologia*, v. 130, p. 485-495, 2002.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A. et al. EDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *International Journal of Business Innovation and Research*, v. 17, n. 3, p. 7763–7777, 2018.

LAMMERS, Y. et al. Clitellate worms (Annelida) in lateglacial and Holocene

sedimentary DNA records from the Polar Urals and northern Norway. *Boreas*, v. 48, n. 2, p. 317-329, 2019.

LANGLOIS, V. S. et al. The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. *Environmental DNA*, v. 3, n. 3, p. 519– 527, 2021.

LEDUC, N. et al. Comparing eDNA metabarcoding and species collection for documenting Arctic metazoan biodiversity. *Environmental DNA*, v. 1, n. 4, p. 342– 358, 2019.

LEE, J. H. et al. Application of Dual Metabarcoding Platforms for the Meso- and Macrozooplankton Taxa in the Ross Sea. *Genes*, v. 13, n. 5, 2022.

LEFORT, Marie-Caroline et al. Blood, sweat and tears: a review of non-invasive DNA sampling. *Peer Community Journal*, v. 2, 2022.

LIANG, R. et al. Genomic reconstruction of fossil and living microorganisms in ancient Siberian permafrost. *Microbiome*, v. 9, n. 1, 2021.

LIGUANG, S. et al. A geochemical method for the reconstruction of the occupation history of a penguin colony in the maritime Antarctic. *Polar Biology*, v. 27, n. 11, p. 670–678, 2004.

LIGUANG, S.; ZHOUQING, X.; JUNLIN, Z. The sediments of lake on the Ardley Island, Antarctica: Identification of penguin-dropping soil. *Chinese Journal of Polar Science*, v. 12, p. 1–8, 2001.

LIMA, M.; ESTAY, S. A. Warming effects in the western Antarctic Peninsula ecosystem: The role of population dynamic models for explaining and predicting penguin trends.

Population Ecology, v. 55, n. 4, p. 557–565, 2013.

LIU, S. et al. Holocene Vegetation and Plant Diversity Changes in the North-Eastern

Siberian Treeline Region from Pollen and Sedimentary Ancient DNA. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 8, 2020.

LIU, X. D. et al. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in the ornithogenic sediments from the Antarctic maritime as palaeoecological proxies during the past 2000 yr. *Earth and Planetary Science Letters*, v. 243, n. 3–4, p. 424–438, 2006.

LOEB, V. et al. Effects of sea-ice extent and krill or salp dominance on the Antarctic food web. *Nature*, v. 387, p. 897–900, 1997.

LYNCH, H. J. et al. Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology*, v. 93, n. 6, p. 1367–1377, 2012.

LYNCH, H. J.; LARUE, M. A. First global census of the Adélie Penguin. *Auk*, v. 131, n. 4, p. 457–466, 2014.

MA, D. et al. Ex-situ enzyme activity and bacterial community diversity through soil depth profiles in penguin and seal colonies on Vestfold Hills, East Antarctica. *Polar Biology*, v. 36, n. 9, p. 1347–1361, 2013.

MARIANI, S. et al. Sponges as natural environmental DNA samplers. *Current Biology*, v. 29, n. 11, p. 401–402, 2019.

MAYEWSKI, P. A. et al. State of the antarctic and southern ocean climate system. *Reviews of Geophysics*, 2009.

MCCLINTOCK, J.; DUCKLOW, H.; FRASER, W. Ecological Responses to Climate Change on the Antarctic Peninsula. *American Scientist*, v. 96, n. 4, p. 302, 2008.

MCINNES, J. C. et al. Simultaneous DNA-based diet analysis of breeding, non-breeding and chick Adélie penguins. *Royal Society Open Science*, v. 3, n. 1, 2016.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the

Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. *Geophysical Research Letters*, v. 32, n. 19, p. 1–5, 2005.

MINAMOTO, T. et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, v. 13, p. 193-197, 2012.

MONDOL, S. et al. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biological Conservation*, v. 142, n. 10, p. 2350–2360, 2009.

MORRISSEY, E. M. et al. Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 86, p. 42–49, 2015.

MURCHIE, T. J. et al. Optimizing extraction and targeted capture of ancient environmental DNA for reconstructing past environments using the PalaeoChip Arctic-1.0 bait-set. *Quaternary Research (United States)*, v. 99, p. 305–328, 2021.

MURPHY, E. J. et al. Climatically driven fluctuations in Southern Ocean ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 274, n. 1629, p. 3057–3067, 2007.

MYRCHA, A.; TATUR, A.; DEL VALLE, R. A new species of fossil penguin from seymour island, west antarctica. *Alcheringa*, v. 14, n. 3, p. 195–205, 1990.

NASH, S. Persistent organic pollutants in Antarctica: Current and future research priorities. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011.

NELSON-CHORNEY, H. T. et al. Environmental DNA in lake sediment reveals biogeography of native genetic diversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 17, n. 6, p. 313–318, 2019.

NICHOLS, R. V.; SPONG, G. An eDNA-based SNP assay for ungulate species and sex identification. *Diversity*, v. 9, n. 3, 2017.

OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, v. 7, n. 2-3, p. 57-66, 1987.

OTANI, S. et al. Bacterial communities in termite fungus combs are comprised of consistent gut deposits and contributions from the environment. *Microbial Ecology*, v. 71, n. 1, p. 207–220, 2016.

PANSU, J. et al. Long-lasting modification of soil fungal diversity associated with the introduction of rabbits to a remote sub-Antarctic archipelago. *Biology Letters*, v. 11, n. 9, 2015.

PAWLOWSKI, J. et al. Eukaryotic richness in the abyss: Insights from pyrotag sequencing. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, 2011.

PEDERSEN, M. W. et al. A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. *Quaternary Science Reviews*, v. 75, p. 161–168, 2013.

PIENITZ, R.; DOUGLAS, M. S. V; SMOL, J. P. (Ed.). Long-term environmental change in Arctic and Antarctic lakes. Springer Science & Business Media, 2005.

POST, E. et al. The polar regions in a 2°C warmer world. *Sci. Adv*, v. 5, 2019.

POZO, K.; CORSOLINI, S.; CINCINELLI, A. PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS IN THE ATMOSPHERE OF TWO ANTARCTIC ZONES (ANTARCTIC PENINSULA AND ROSS SEA) USING PASSIVE AIR SAMPLERS (PUF DISKS). *Organohalogen Compounds*, v. 76, p. 1047–1050, 2014.

RAGOT, R.; VILLEMUR, R. eDNA profiling of mammals, birds, and fish of surface waters by mitochondrial metagenomics: application for source tracking of fecal contamination in surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 194, n. 2, 2022.

REIST JD et al. General Effects of Climate Change on Arctic Fishes and Fish

Populations. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, v. 35, n. 7, p. 370–380, 2006.

KLINCK, L.; NOWLIN JR, Worth D. Southern Ocean-Antarctic Circumpolar Current. *Encyclopedia of Oceanography*, p. 151-159, 2001

ROBERTS, S. J. et al. Past penguin colony responses to explosive volcanism on the Antarctic Peninsula. *Nature Communications*, v. 8, 2017.

RODGERS, T. W. et al. Quantitative PCR assays for detection of five arctic fish species: *Lota lota*, *Cottus cognatus*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus malma*, and *Thymallus arcticus* from environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, v. 10, n. 4, p. 859–865, 2018.

ROGERS, A. D. et al. The discovery of new deep-sea hydrothermal vent communities in the Southern Ocean and implications for biogeography. *PLoS Biology*, v. 10, n. 1, 2012.

SAEKI, K.; SAKAI, M.; WADA, S. I. DNA adsorption on synthetic and natural allophanes. *Applied Clay Science*, v. 50, n. 4, p. 493–497, 2010.

SCHMIDT, N. M. et al. Limited dietary overlap amongst resident arctic herbivores in winter: Complementary insights from complementary methods. *Oecologia*, v. 187, n. 3, p. 689–699, 2018.

SEVELLEC, M. et al. Detecting community change in Arctic marine ecosystems using the temporal dynamics of environmental DNA. *Environmental DNA*, v. 3, n. 3, p. 573–590, 2021.

SOLOMON, S. The discovery of the Antarctic ozone hole. *Nature*, v. 575, p. 46–47, 2019.

SPEAR, M. J. et al. Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance. *Environmental DNA*, v. 3, n. 1, p. 83–91, 2021.

SPEIR, T. W.; COWLING, J. C. Ornithogenic soils of the Cape Bird Adelie penguin rookeries, Antarctica: 1. Chemical properties. *Polar Biology*, v. 2, p. 199-205, 1984.

SPERLING, T. et al. Novel procedure for improved results in soil microbiome analysis using the DNeasy PowerSoil Pro Kit. Hilden, Germany: Qiagen, 2018.

STEPIEN, C. A.; SNYDER, M. R.; ELZ, A. E. Invasion genetics of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* across North America: Differentiation of fronts, introgression, and eDNA metabarcode detection. *PLoS ONE*, v. 14, n. 3, 2019.

STRICKLER, K. M.; FREMIER, A. K.; GOLDBERG, C. S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, v. 183, p. 85–92, 2015.

SUN, Liguang et al. Emissions of nitrous oxide and methane from Antarctic tundra: role of penguin dropping deposition. *Atmospheric Environment*, v. 36, n. 31, p. 4977-4982, 2002.

SUN, Liguang; XIE, Zhouqing. Relics: penguin population programs. *Science progress*, v. 84, n. 1, p. 31-44, 2001.

SUN, Liguang; XIE, Zhouqing; ZHAO, Junlin. A 3,000-year record of penguin populations. *Nature*, v. 407, n. 6806, p. 858-858, 2000.

SZÉKELY, D. et al. Environmental DNA captures the genetic diversity of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) in West Greenland. *Environmental DNA*, v. 3, n. 1, p. 248–260, 2021.

TABASSUM, N. et al. Molecular Diet Analysis of Adélie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in the Ross Sea Using Fecal DNA. *Biology*, v. 11, n. 2, 2022.

TABERLET, P. et al. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring.

1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2018. v. 1

TALLEY, L. D. Descriptive physical oceanography: an introduction. Academic press, 2011.

TATUR, A.; MYRCHA, A.; NIEGODZISZ, J. Formation of abandoned penguin rookery ecosystems in the maritime Antarctic. *Polar Biology*, v. 17, p. 405–417, 1997.

DE JESÚS, D. T.; SOUZA, H. As atividades da Marinha do Brasil na Antártica. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2007.

TERAUDS, A.; LEE, J. R. Antarctic biogeography revisited: updating the Antarctic Conservation Biogeographic Regions. *Diversity and Distributions*, v. 22, n. 8, p. 836–840, 2016.

THOMSEN, P. F. et al. Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, 2016.

TIESZEN, L. L.; FAGRE, T. Effect of diet quality and composition on the isotopic composition of respiratory CO₂, bone collagen, bioapatite, and soft tissues. *Prehistoric human bone: archaeology at the molecular level*, p. 121-155, 1993.

TILLOTSON, M. D. et al. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, v. 220, p. 1–11, 2018.

TSUDA, T. T. et al. Phylogenetic analysis of penguin (Spheniscidae) species based on sequence variation in MHC class II genes. *Immunogenetics*, v. 53, n. 8, p. 712–716, 2001.

TURNER, J.; COMISO, J. Solve Antarctica's sea-ice puzzle. Macmillian Publishers , v. 547, p. 275–277, 2017.

VÄLISUO, I.; VIHMA, T.; KING, J. C. Surface energy budget on Larsen and Wilkins

ice shelves in the Antarctic Peninsula: Results based on reanalyses in 1989-2010. *Cryosphere*, v. 8, n. 4, p. 1519–1538, 2014.

VAN DEN HEUVEL-GREVE, M. J. et al. Early detection of marine non-indigenous species on Svalbard by DNA metabarcoding of sediment. *Polar Biology*, v. 44, n. 4, p. 653–665, 2021.

VAROTTO, C. et al. A pilot study of eDNA metabarcoding to estimate plant biodiversity by an alpine glacier core (Adamello glacier, North Italy). *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 2021.

VAUGHAN, D. G. Recent trends in melting conditions on the Antarctic Peninsula and their implications for ice-sheet mass balance and sea level. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, v. 38, n. 1, p. 147–152, 2006.

VON DUYKE, A. L. et al. Evaluation of environmental DNA (eDNA) collected from tracks in the snow as a means to monitor individual polar bears (*Ursus maritimus*) in the Chukchi and Beaufort Seas. *Research Reports, North Slope Borough Department of Wildlife Management, NSB. DWM. PRR*, v. 1, 2019.

WADA, E.; MIZUTANI, H.; MINAGAWA, M. The Use of Stable Isotopes for Food Web Analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 30, n. 4, p. 361–371, 1991.

WANG, D. et al. Occurrences and possible sources of persistent organic pollutants (POPs) in ice-free area soils in East Antarctica. *Catena*, v. 212, 2022.

WANG, N. F. et al. Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015.

WANG, Y. et al. Late Quaternary dynamics of Arctic biota from ancient environmental genomics. *Nature*, v. 600, n. 7887, p. 86–92, 2021.

WAUCHOPE, H. S.; SHAW, J. D.; TERAUDS, A. A snapshot of biodiversity protection in Antarctica. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019.

WIIG, Ø.; AARS, J.; BORN, E. W. Effects of climate change on polar bears. *Science Progress*, v. 91, n. 2, p. 151-173, 2008.

WILCOX, T. M. et al. Fine-scale environmental DNA sampling reveals climate-mediated interactions between native and invasive trout species. *Ecosphere*, v. 9, n. 11, 2018.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. *Biodiversity & Conservation*, v. 5, p. 1271-1293, 1996.

YANG, Jae Sam. Nutrients, Chlorophyll-a and Primary Productivity in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. *Korean Journal of Polar Research*, v. 1, n. 1, p. 11-18, 1990.

YATES, Matthew C. et al. The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, v. 30, n. 13, p. 3068-3082, 2021.

YERGEAU, E. et al. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 11, p. 2670–2682, 2007.

YEW, W. C. et al. Links between bacteria derived from penguin guts and deposited guano and the surrounding soil microbiota. *Polar Biology*, v. 41, n. 2, p. 269–281, 2018.

ZACHOS, J. et al. Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science*, v. 292, p. 686–693, 2001.

ZACHOS, J. et al. A Transient Rise in Tropical Sea Surface Temperature During the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Geophysical Research Letters*, v. 30, n. 5, 2003.

ZACHOS, J. C.; BREZA, J. R.; WISE, S. W. Early Oligocene ice-sheet expansion on Antarctica: Stable isotope and sedimentological evidence from Kerguelen Plateau, southern Indian Ocean. *Geology*, v. 20, n. 6, p. 569–573, 1992.

ZHU, B. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Research*, v. 40, n. 17, p. 3231–3238, 2006.

ANEXO – Produção bibliográfica durante o período do Mestrado

A produção apresentada nas páginas seguintes é relacionada com o tema específico da tese de extração de DNA de vertebrados e seu biomonitoramento no continente antártico, realizada durante o período do Mestrado entre julho de 2021 e junho de 2023. Esta produção relaciona-se ao presente projeto de mestrado e o da pesquisadora Dafne A. Anjos, sobre a identificação molecular de remanentes ósseos do período de exploração baleeira na baía do Almirantado, localizada na Ilha Rei George, Antártica.

“A review on the use of environmental DNA for the reconstruction of present and past polar vertebrates’ populations”

(Artigo científico publicado – Goldenberg-Barbosa et al. 2023 – Academia Biology)



The use of eDNA in the reconstruction of present and past polar vertebrates' populations

Rodrigo Goldenberg-Barbosa^{1*}, Anna Donato¹, Dafne Anjos¹, Cesar Amaral¹

Academic Editor: Andre J. van Wijnen

Abstract

The polar regions are home to a great biodiversity of vertebrates that are highly impacted by climate change. As extreme and pristine ecosystems, the use of environmental DNA (eDNA) presents itself as a noninvasive tool for the monitoring of polar vertebrates' species, essential for their preservation. In this article, we review the currently published research on vertebrate eDNA in the Arctic, as well as compare it with a similar already-published article on Antarctica. Our results show how the Arctic region is well represented with several studies focusing on vertebrates, being the second most researched group of organisms (19%), only behind plants, and with several studies related to the development of new approaches and methodologies for the use of eDNA from cold regions being published in the last years. In opposite, the Antarctic eDNA science on vertebrates is still poorly developed, with the vast majority of studies focusing on microbial life; therefore, the Antarctic region still remains with a great potential for the research development in vertebrates and the effects of the past and recent climate changes on their populations.

Keywords: *environmental DNA, polar, Arctic, Antarctica, vertebrates*

Citation: Goldenberg-Barbosa R, Donato A, Anjos D, Amaral CRL. The use of eDNA in the reconstruction of present and past polar vertebrates' populations. *Academia Biology* 2023;1. <https://doi.org/10.20935/AcadBiol6103>

1. Introduction

Due to its extremes in terms of climate, habitat, and biogeography, the polar regions correspond to an important open-air laboratory for various research related to fundamental processes of life that have global implications [1]. Similarly, as the most affected regions by climate change, they also represent an important area for research related to its effects on biodiversity [2–4]. Antarctic and Arctic vertebrates seem to be especially affected by these changes [5–7], and as mostly pristine environments with fauna not accustomed to a native human population (especially Antarctica), research methods that do not require direct contact with the target species become more valuable [8]. In this sense, the use of environmental DNA presents itself as an important tool for monitoring species of interest since it enables the investigation of recent phenomena and processes as well as the temporal monitoring of the effects of global climate change on populations of these species [9–11].

Environmental DNA is a relatively new method for studying biodiversity; first used by Ogran et al. [12], it refers to genetic material present in any given environment, not collected directly from the organism. This DNA can be extracted from different types of environmental samples (e.g. water, sediment, soil, and feces). However, using this material comes with a number of challenges: it can decay rapidly in the environment due to UV radiation [13], samples could have inhibitors that can complicate

DNA amplification [14], and sometimes it does not reflect the reality of the area's biodiversity [15].

Studies using ancient environmental DNA (aDNA) in the Arctic have an unique opportunity in studying vertebrate paleofauna and past human interactions, unlike Antarctica that has past fauna but no indigenous human population [16]. Millions of years of past human–paleofauna interactions could be glimpsed using eDNA present in permafrost sediments and, together with the use of dating techniques, it can provide a unique perspective as to how long these interactions occurred and when they ceased. Using aDNA can also provide evidence for how the extinction of these animals occurred and what could have caused them [14, 17].

However, comparing the Arctic and Antarctic regions [16] indicated that there is a gap in the study of vertebrate eDNA in Antarctica, reporting only four articles until 2020. In this sense, we perform a literature review on the use of vertebrate eDNA in the Arctic, seeking to answer if such gap also exists in the north. We also separate each sample type and the targeted organism, and for vertebrates, we discussed how eDNA is being used for each published article. Additionally, we compared how this method is being used between poles, and how Antarctic eDNA research could benefit from already-published studies in the Arctic.

¹ Laboratory of Radioecology and Global Changes (LARAMG)/Nucleus of Environmental Molecular Genetics and Astrobiology/DBB/IBRAG, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*email: barbosa.rodrigo_1@posgraduacao.uerj.br; rodrigo1997@gmail.com

2. Materials and methods

We performed a systematic search on the SCOPUS engine using a combination of the terms "Arctic," "Environmental DNA," "metabarcoding," "SedaDNA," and "Ancient DNA," accepting articles between 2005 and 2022. We went through the results and determined which articles discuss the use of vertebrate eDNA in the Arctic and discussed together with the review of Howell et al., 2021 that used Antarctic data. We excluded literature reviews, notes, book chapters, and errata (Supplementary materials, Table S1). Any article that included the searched terms but with samples collected from outside the Arctic circle (66° 33' N) were excluded (e.g. [18]).

3. Results

We found a total of 95 articles that used eDNA in the Arctic region and focused on vertebrate eDNA. The most predominant sample for eDNA in the Arctic is water, which includes both seawater and freshwater ($n = 38$ articles), tied with sediment ($n = 38$ articles), and followed by soil ($n = 13$). Feces, ice/snow, and air returned the fewest results and were included in the "others" category ($n = 11$) (Figure 1). We excluded metabarcoding of stomach contents as it is not an environmental sample and requires direct contact with the studied taxon. Some articles used more than one type of sample or organism of interest (e.g. [19, 20]) (Table S1).

Of the total 95 articles, a total of 18 studies used vertebrate DNA in their analysis. Of these 18 articles, 9 used water samples (e.g. [20, 21]), 6 used sediment (e.g. [14, 17]), 2 used feces [22, 23], and 1 used soil [24]. Vertebrates found in the studies are represented by extinct megafauna, such as mammoths and the woolly rhinoceros [14, 17], and contemporary biota, for instance the bowhead whale or Arctic fish species [25, 26].

4. Discussion

4.1. Water samples

Our most common sample type (38 articles) also has the highest number of studies that successfully extracted vertebrate eDNA, representing the second most found organisms (~23%) in these articles, only slightly behind algae diversity studies (~26%). Some findings [21, 27, 28] used metabarcoding of eDNA samples to detect transitions of marine fauna in the Arctic, capturing the DNA of many vertebrates, invertebrates, and benthic organisms present in water samples. These studies highlight the importance of considering temporal variation of communities, in order to ensure that biomonitoring of coastal areas using eDNA is accomplished appropriately. Likewise, another article [20] used eDNA to monitor nonindigenous species in the Northeast Atlantic. By sampling twice in one year, the article managed to show a seasonal change in the distribution of invasive marine species. Another article managed to describe the genetic diversity of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) in West Greenland using eDNA [26]. Results suggest that sampling water in the footprint or wake of traveling animals could be a promising technique to better understand the genetic diversity of marine megafauna.

Environmental DNA extracted from water samples has also shown promising results in monitoring fish populations in Arctic lakes [25, 15]. A study [25] created and tested four quantitative PCR (qPCR) assays for detection of five Arctic fish species: *Lota*

lota, *Cottus cognatus*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus malma*, and *Thymallus arcticus*, perhaps enabling efficient and economical detection of these species in lakes.

Mostly, the studies presented here show great potential for the use of water eDNA in monitoring both marine and lake species, especially those that are affected by climate change, as improving the understanding of their distribution is vital for their conservation and management. These articles further support the use of eDNA as an advantage to other monitoring methods, revealing a significant correlation between them in terms of the number of species found [20]. However, there are still limitations and difficulties to be surpassed when applying this methodology in biodiversity research. It can be highlighted that the rapid degradation of genetic material occurs once it is exposed to environmental factors (e.g. temperature, salinity, pH, UV, microbial activity) [26]. And, there is no correlation found between eDNA concentrations and Arctic fish population estimates using droplet digital PCR (ddPCR) assays, showing less than 70% success in species detection [15].

4.2. Sediment samples

Environmental DNA extracted from sediment samples is sometimes called sediment DNA (sedaDNA) [14]. In our review, a total of six articles detected vertebrate eDNA in sediment samples. With the use of carbon dating, lake sediment samples provide a unique opportunity for the reconstruction of past ecological dynamics [16]. Ancient eDNA can be used to recreate the past of Arctic biotic dynamics, with a detailed reconstruction of past fauna and flora [17, 14, 29]. A recent study managed to assign highly degraded ancient DNA from horses to mitochondrial haplogroups, allowing for the possibility to analyze population histories in regions with a few or no fossil evidence [17]. Also using eDNA presence as evidence, their findings suggest that some of the Arctic megafauna coexisted with humans for tens of thousands of years during the Holocene, indicating that the human overkill may not be a key factor in their extinction. Likewise, another article using sedaDNA reconstructed past biota during the Pleistocene–Holocene transition, also appointing new evidence for the late survival of mammoth (*Mammuthus* sp.) and horse (*Equus* sp.) in the Klondike region of Yukon, Canada [14]. Similar to water, eDNA extracted from sediment samples can also be an important asset in monitoring nonindigenous vertebrate marine species [30]. With the objective of documenting past sea-ice evolution, De Shepper et al., 2019 attempted to find ancient DNA of known sea-ice associated dinoflagellate in the sediment core [31]. Simultaneously, they also reported finding vertebrate DNA from deep-ocean sediment, showing that ancient vertebrate eDNA can be recovered mostly from oxic bottom waters. There are also reports that managed to find vertebrate (Mammalia) in deep-sea sediment samples, but it could be from laboratory contamination [32].

As with other eDNA studies, there are limits and obstacles when it comes to studying sediment eDNA. Some studies report that, due to a limitation in the dating method, the reconstruction of past vegetation dynamics under climate change can only be captured in a broader scale [17]. Other two common limitations in sedaDNA extraction are the residue of other substances that inhibit enzymatic reactions, and the loss of sedaDNA when trying to reduce inhibitor co-elution. However, purifications and enrichment methods that outperform standard extraction kits can help restore aDNA, overcoming enzymatic inhibitors [14].

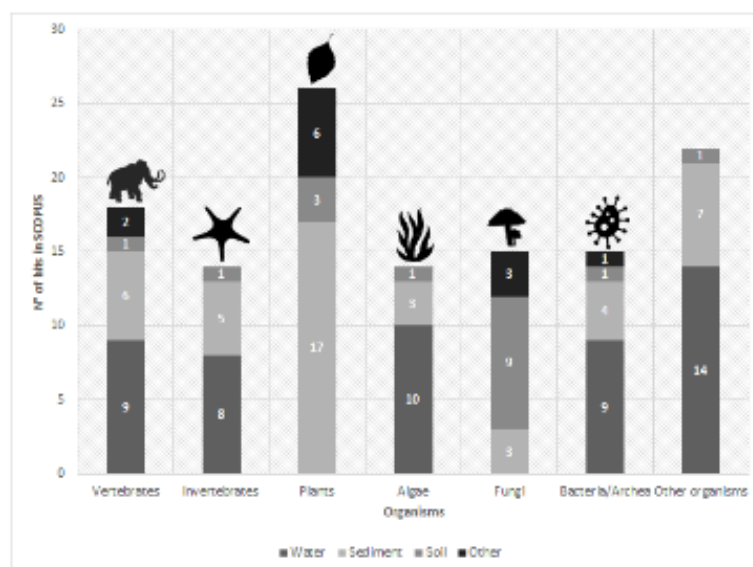


Figure 1 • Number of articles found in our review of eDNA in the Arctic. It is categorized by “organisms” and “number of hits in SCOPUS”, while also separating each category in sample type. Articles in the “Other organisms” category included those that targeted benthic communities.

4.3. Soil samples

Only one article that used soil samples extracted vertebrate eDNA [24]. As with other sample types, soil provides an ideal opportunity to assess past and present fauna. Using both sediment and soil, they created specific metabarcoding markers for fungi, bryophytes, enchytraeids, beetles, and birds, successfully testing them using sediment from the Pleistocene and modern soil samples [24]. This study paved the way for future metabarcoding studies, providing ideal markers to be used when studying eDNA.

4.4. Other samples

These types of samples would include feces, ice/snow, and air samples, but only two articles found vertebrate DNA, and both used feces samples [22, 23]. This type of sample presents itself as an ideal opportunity for discovering carnivore vertebrates' diet, as their preys' DNA could remain in the collected sample. A study managed to extract many species of fish from feces samples of the harbor seal *Phoca vitulina* [22]. The article showed that salmonid is not an important prey in their diet, and the culling of harbor seals should be reconsidered as a manner to reduce predation of salmonids in the region. Another article revealed that the diet of the Arctic fox included most terrestrial vertebrates found in their region [23]. They also showed that their diet exhibited temporal and geographical changes, reflecting their prey availability during summer/winter months. This variation can provide important data as to how these predator populations could respond to extreme climatic events caused by climate change [23]. Both of these studies reflect the importance of eDNA samples in discovering carnivorous diets and also showing great success in evaluating prey diversity in a given area. This adds another layer for the use of eDNA in the monitoring of biodiversity, as also shown in previous samples.

4.5. Arctic vs Antarctic vertebrate eDNA research

In light of our literature review, there seems to be a significant discrepancy of vertebrate eDNA studies between poles. While the vast majority of Antarctic eDNA studies concentrate on microbial diversity, with only 2% of published articles focusing on vertebrate eDNA [16], a total of 18 articles out of 95 use it in their research in the Arctic (~19%). This leaves vertebrates as the less-studied group of organisms in Antarctica using eDNA. Even though there are some articles that focus on microbial diversity in the Arctic, there is a significant difference in focus on the group when compared to Antarctic eDNA articles [16]. Vertebrate studies in the Arctic that use eDNA are the second most published type of organism, only behind eDNA researching plant diversity (22 articles). This is different in Antarctica; as an isolated continent from civilization and with the harshest climate in the world, it could create some difficulty for such studies. However, Antarctica has a larger number of published eDNA articles (472 studies; [16]) when compared to the Arctic (95 studies), giving the notion that perhaps most Antarctic research takes a different route in studying eDNA, as it is simpler to find a higher amount of microbial DNA in environmental samples than in vertebrates [33]. It is evidenced even more by Arctic studies, sharing similar extreme conditions in relation to climate [34] (and the ones that study eDNA already have), having a significant number of published articles that found vertebrate eDNA.

A recent literature review features important diversity research that has already been conducted in Antarctica and found vertebrate eDNA [35–37], as well as to assess ecological changes due to invasive species [16, 38]. However, as highlighted above, there is still a small number of published articles in this matter, and Arctic research has already opened new opportunities for vertebrate eDNA research in Antarctica, with new possibilities using all types of samples.

Water samples have shown that it is possible to recreate genetic diversity of species using only environmental DNA [26]. In a continent with a vast diversity of marine vertebrates (e.g. penguins, whales, seals, fish, sea lions), this type of research could prove to be an efficient technique in assessing the genetic diversity of vertebrate species in a noninvasive manner. This could be important in evaluating potential population bottlenecks that could hinder the preservation of these species in the current climate change scenario.

Although there are some studies that attempt to recreate past populations using geochemical markers, they seem to be limited to specific groups (e.g. penguins, [39, 40]). As seen in the "sediment samples" segment of our review, eDNA opens up opportunities to assess a large number of organisms that were once part of a region's fauna [14, 17, 29]. The reconstruction of ancient austral vertebrate fauna has become a possibility using sedaDNA and could be a focus point in Antarctic eDNA research in the future.

As the most common sample type in eDNA articles based on Antarctica, soil samples have no published articles using vertebrate DNA [16]. Arctic studies provide only a glimpse into what can be done with vertebrate eDNA using soil samples, with only one published article [24], but are important nonetheless, as it is the only study that managed to extract vertebrate DNA from soil samples in the polar regions.

Using the same search parameters implemented by Howell and collaborators [16], we found 43 new eDNA published articles based on Antarctica in the 2021–2022 period, of which 3 managed to find vertebrate eDNA [41–43]. One used water and sediment samples to evaluate the metazoan biodiversity of benthic ecosystems in Antarctica, aiming to find if there is a difference in eDNA yield by sample type, depth, or distance to the shore [41]. They found that combining data from sediment and water samples is ideal to DNA-based monitoring of nearshore environments, as it maximizes the chances of finding a greater number of representative taxa. Vertebrate eDNA was only found on water samples. Another study [42] used dual metabarcoding (regular and mini barcode) in water samples to construct community structures of zooplankton, but also reported finding fish DNA. Another article used Adelie penguin guano samples to analyze their diet and found that the most abundant aliment in their diet is two krill species (*Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias*) and the nonothenioid fishes (*Pleuragramma antarctica* and *Pagothenia borchgrevinkii*). They found no significant difference in prey composition based on geographic location, but discovered variations based on the annual environmental and meteorological conditions of the coastal region [43].

Even with recent published articles, there is still a vast predominance of microbial eDNA being published. On the Arctic, eDNA studies seem to focus on many different types of organisms. Even with the majority of articles using plant-based eDNA in their method, all organisms cited in this review have ample research, lessening gaps literature. Vertebrates represent the second most studied organisms in the Arctic using eDNA. All sample types have at least one article on vertebrate eDNA. Most of these articles were published in recent years and developed new methodologies for studying eDNA in extreme environments. As polar regions, the cold biome potentializes the preservation of eDNA [16, 44], opening up new possibilities for Antarctic eDNA studies to be developed

focusing on vertebrate eDNA. All sample types have showed great potential for faunistic studies, providing essential data on the reconstruction of present and past ecological environments. Understanding how past climatic changes affected organisms could help with the preservation of present biota as the current climate change scenario worsens.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for the financial support provided. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Author contributions

The author(s) declare that all author(s) contributed equally, approve of this work, and take full responsibility.

Conflicts of interest

The author(s) declare no conflict of interest.

Data availability statement

Not applicable.

Institutional review board statement

Not applicable.

Informed consent statement

The author(s) declare no human participants were involved in the study.

Sample availability

The author(s) declare no physical samples were used in the study.

Supplementary materials

Supplementary materials are currently available upon request.

Additional information

Received: 2022-10-23

Accepted: 2023-05-14

Published: 2023-07-21

Academia Biology papers should be cited as *Academia Biology* 2023, ISSN 2837-4010, <https://doi.org/10.20935/AcadBiol6103>. The journal's official abbreviation is *Acad. Biol.*

Publisher's note

Academia.edu stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations. All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright

© 2023 copyright by the authors. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

References

- Wynn-Williams, DD. Antarctic microbial diversity: The basis of polar ecosystem process. *Biodivers Conserv.* 1996;5:1271-93. doi: 10.1007/BF00051979
- IPCC, 2021: Summary for policymakers. In: Masson-Delmotte V, et al. editors. *Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. In Press. 44 pp.
- Post E, et al. The polar regions in a 2°C warmer world. *Sci Adv.* 2019;5:eaw9883. doi: 10.1126/sciadv.aaw9883
- Reist JD, et al. General effects of climate change on Arctic fishes and fish populations. *AMBIO: A J Hum Environ.* (2006);35(7):370-80. doi: 10.1579/0044-7447(2006)35[370:GEOCCO]2.0.CO;2
- Wiig O, Aars J, Born EW. Effects of climate change on polar bears. *Sci Prog.* 2008;91(2):151-73. doi: 10.3184/003685008X324506
- Barbraud C, Weimerskirch H. Emperor penguins and climate change. *Nature.* 2004;411:183-86. doi: 10.1038/35075554
- Wege M, Salas L, Larue M. Ice matters: Life-history strategies of two Antarctic seals dictate climate change eventualities in the Weddell Sea. *Glob Change Biol.* 2021;27(23):6252-62. doi: 10.1111/gcb.15828
- Lefort MC, et al. Blood, sweat and tears: A review of non-invasive DNA sampling. *Peer Commun Ecol.* 2019;4:385120. doi: 10.1101/385120
- Giguet-Covex C, Pansu J, Arnaud F. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA. *Nat Commun.* 2014;5:3211. doi: 10.1038/ncomms4211
- Bellemain E, et al. Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environ Microbiol.* 2013;15(4):1176-89. doi: 10.1111/1462-2920.1202011
- Jørgensen T, et al. A comparative study of ancient sedimentary DNA, pollen and macrofossils from permafrost sediments of northern Siberia reveals long-term vegetational stability. *Mol Ecol.* 2012;21:1989-2003. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05287.x
- Ogran A, Saylor GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Meth.* 1987;7:57-66. doi: 10.1016/0167-7012(87)90025-X
- Collins RA et al. Persistence of environmental DNA in marine systems. *Commun Biol.* 2018;1(1):1-11. doi: 10.1038/s42003-018-0192-6
- Murchie T, et al. Optimizing extraction and targeted capture of ancient environmental DNA for reconstructing past environments using the PalaeoChip Arctic-1.0 bait-set. *Quat Res.* 2021;99:305-28. doi: 10.1017/qua.2020.59
- Capo E, et al. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. *PLoS One* 2019;14(12). doi: 10.1371/journal.pone.0226638
- Howell L, Larue M, Flanagan SP. Environmental DNA as a tool for monitoring Antarctic vertebrates. *N Z J Zool.* 2021; 48:3-4, 245-62. doi: 10.1080/03014223.2021.1900299
- Wang Y, et al. Late Quaternary dynamics of Arctic biota from ancient environmental genomics. *Nature.* 2021;600:86-92. doi: 10.1038/s41586-021-04016-x
- Haile J, et al. Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(52):22352-7. doi: 10.1073/pnas.0912510106
- Dulias K, et al. Sedimentary DNA versus morphology in the analysis of diatom-environment relationships. *J Paleolimnol.* 2017;57:51-66. doi: 10.1007/s10933-016-9926-y
- Knudsen SW, et al. Monitoring of environmental DNA from nonindigenous species of algae, dinoflagellates, and animals in the Northeast Atlantic. *Sci Total Environ.* 2022;821:15. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153093
- Sevellec M, et al. Detecting community change in Arctic marine ecosystems using the temporal dynamics of environmental DNA. *Environ DNA.* 2020;3:373-90. doi: 10.1002/edn3.155
- Granquist SM, et al. Fish consumption of harbour seals (*Phoca vitulina*) in northwestern Iceland assessed by DNA metabarcoding and morphological analysis. *Polar Biol.* 2018;41:2199-210. doi: 10.1007/s00300-018-2354-x
- Schmidt NM, et al. Spatio-temporal patterns in arctic fox (*Vulpes lagopus*) diets revealed by molecular analysis of scats from Northeast Greenland. *Polar Sci.* 2022;32:100838. doi: 10.1016/j.polar.2022.100838
- Epp LS, et al. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: Potential for studying past and

- present ecosystems. *Mol Ecol*. 2012;21:1821–33. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x
25. Rodgers TW, et al Quantitative PCR assays for detection of five arctic fish species: *Lota lota*, *Cottus cognatus*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus malma*, and *Thymallus arcticus* from environmental DNA. *Conser Genet Resour*. 2017;10:859–65 (2018). doi: 10.1007/s12686-017-0883-1
 26. Székely D, et al. Environmental DNA captures the genetic diversity of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) in West Greenland. *Environ DNA*. 2021;3:248–60. doi: 10.1002/edn3.176
 27. Lacoursière-Roussel A, et al. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecol Evol*. 2018;8:7763–77. doi: 10.1002/ece3.4213
 28. Leduc N, et al. Comparing eDNA metabarcoding and species collection for documenting Arctic metazoan biodiversity. *Environ DNA*. 2019;1:342–58. doi: 10.1002/edn3.35
 29. Lammers Y, et al. Clitellate worms (Annelida) in lateglacial and Holocene sedimentary DNA records from the Polar Urals and northern Norway. *Boreas* 2019;48: 317–29. doi: 10.1111/bor.12363.
 30. Van Den Heuvel-Greve MJ, et al. Early detection of marine non-indigenous species on Svalbard by DNA metabarcoding of sediment. *Polar Biol*. 2021;44:653–65. doi: 10.1007/s00300-021-02822-7
 31. De Schepper S, et al. The potential of sedimentary ancient DNA for reconstructing past sea ice evolution. *ISME J*. 2019;13:2566–77. doi: 10.1038/s41396-019-0457-1
 32. Pawłowski J, et al. Eukaryotic richness in the Abyss: Insights from Pyrotag sequencing. *PLoS One*. 2011;6(4): 18169. doi: 10.1371/journal.pone.0018169
 33. Djurhuus A, et al. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Front Mar Sci*. 2017;13. doi: 10.3389/fmars.2017.00314
 34. Strickler KM, Premier AK, Goldberg CS. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol Conser*. 2015;183:85–92. doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.038
 35. McInnes JC, Emmerson L, Southwell C, Faux C, Jarman SN. Simultaneous DNA-based diet analysis of breeding, non-breeding and chick Adélie penguins. *R Soc Open Sci*. 2016;3(1):150443. doi: 10.1098/rsos.150443
 36. Cowart DA, Murphy KR, Cheng CHC Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. *Marine Genom*. 2018;37:148–60. doi: 10.1016/j.margen.2017.11.003
 37. Mariani S, Baillie C, Colosimo G, Riesgo A Sponges as natural environmental DNA samplers. *Curr Biol*. 2019; 29(11):401–2. doi: 10.1016/j.cub.2019.04.031
 38. Ficetola GF, et al. DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion. *Sci Adv*. 2018;4(5):4292. doi: 10.1126/sciadv.aar4292
 39. Liguang S, et al. A geochemical method for the reconstruction of the occupation history of a penguin colony in the maritime Antarctic. *Polar Biol*. 2004;27: 670–8. doi: 10.1007/s00300-004-0635-2
 40. Roberts S, et al. Past penguin colony responses to explosive volcanism on the Antarctic Peninsula. *Nat Commun*. 2017;8, 14914. doi: 10.1038/ncomms14914
 41. Clarke LJ, et al. Environmental DNA metabarcoding for monitoring metazoan biodiversity in Antarctic nearshore ecosystems. *PeerJ*. 2021;9:2458. doi: 10.7717/peerj.12458
 42. Lee JH, et al. Application of dual metabarcoding platforms for the meso- and macrozooplankton taxa in the Ross Sea. *Genes*. 2022;13:922. doi: 10.3390/genes13050922
 43. Tabassum N, et al. Molecular diet analysis of Adélie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in the Ross Sea using fecal DNA. *Biology*. 2022;11(2), 182. doi: 10.3390/biology11020182
 44. Liang R, et al. Genomic reconstruction of fossil and living microorganisms in ancient Siberian permafrost. *Microbiome*. 2021;9(1):110. doi: 10.1186/s40168-021-01057-2

“Identificação molecular de remanescentes ósseos do período de exploração baleeira na Antártica”

(Artigo científico publicado – Anjos et al. 2022 – Evidência

BIOLOGIA FORENSE E BIODIVERSIDADE:

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE REMANESCENTES ÓSSEOS DO PERÍODO DE EXPLORAÇÃO BALEEIRA NA ANTÁRTICA

Dafne Adriana Abreu dos Anjos, Anna Luíza dos Santos Donato, Rodrigo Goldenberg-Barbosa, Elizeu Fagundes de Carvalho, Cesar Rogerio Leal do Amarali

Ao longo dos séculos XIX e XX, atividades baleeiras foram desenvolvidas de maneira desenfreada na Antártica, local inevitável nas rotas migratórias de diversas espécies de baleias, devido ao ciclo de congelamento do mar que permite a reprodução de organismos planctônicos presentes na dieta da maioria desses mamíferos marinhos. Essas atividades sabidamente impactaram as populações de cetáceos presentes no Oceano Austral, levando algumas populações à beira da extinção, que ainda hoje estão em processo de recuperação, devido ao elevado número de captura de indivíduos [1-2]. Vestígios dessas atividades são encontrados em forma de ruínas das antigas estações e embarcações baleeiras, e também por diversos fragmentos ósseos pertencentes aos indivíduos caçados, ainda hoje depositados nas praias antárticas [3].



Figura 1. Registro histórico da captura de um indivíduo durante o período baleeiro na Antártica.

A biologia molecular forense apresenta-se como uma ferramenta importante na compreensão do impacto deste período de exploração na região, possibilitando a identificação específica dos fragmentos ósseos, dificilmente distinguíveis morfologicamente uma vez que encontram-se degradados pelo tempo e intempéries naturais às quais estiveram expostos desde sua deposição. O material biológico depositado em diversas praias antárticas encontra-se exposto a ciclos anuais de congelamento e descongelamento, o que acaba favorecendo a preservação do material genético quando comparamos aos processos de decomposição de carcaças que ocorrem em ambiente tropical, com altas temperaturas e uma rápida taxa de desagregação do material biológico. Desta maneira, é possível obter material genético desses fragmentos para as análises moleculares mesmo após um longo intervalo temporal com exposição prolongada ao tempo..



Figura 2. Esqueleto de baleia montado pela equipe de Jacques-Yves Cousteau com partes de possivelmente diversos indivíduos, durante uma expedição à Antártica em 1972, como memorial do período baleeiro da Região [4].

A degradação do material forense apresenta um desafio para as análises moleculares, uma vez que limita as regiões do DNA a fragmentos menores. Dentre as soluções para esse tipo de caso e questões, desenvolveu-se a técnica de identificação molecular forense baseada em regiões de inserção e deleção (InDels), denominada SpInDel. Baseada em um dos padrões-ouro em análises moleculares na área forense, as análises de fragmentos de inserção e deleção, esta análise permite analisar DNA degradado e realizar a identificação de espécies animais com base no padrão numérico do comprimento de fragmentos de inserção e deleção (InDels), localizados em regiões variáveis do DNA [5].

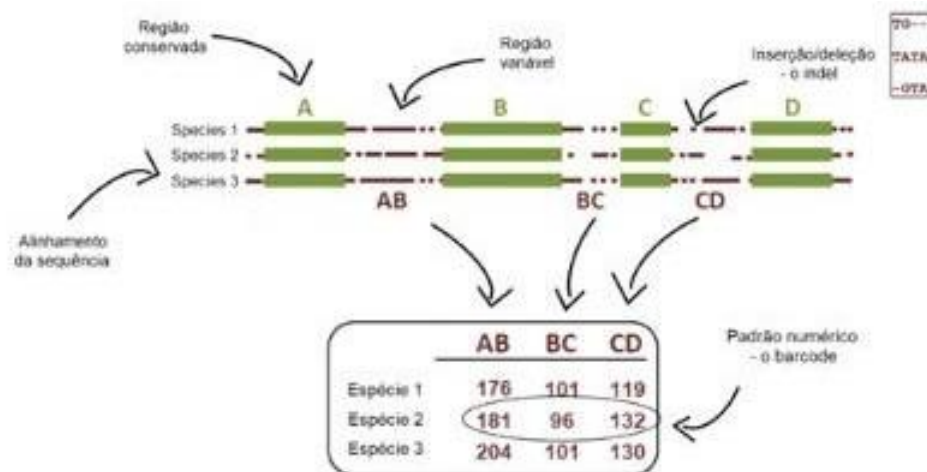


Figura 3. Esquema das análises SpInDel, representando as regiões hipervariáveis, o comprimento de regiões considerando as variações associadas às suas inserções e deleções (editado de Pereira et. al. 2010).

No caso apresentado neste estudo, fragmentos de ossadas encontradas depositadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica, foram coletados ao longo do verão de 2021 e 2022. As amostras foram coletadas junto ao substrato e preferencialmente associadas às peças occipitais, objetivando garantir ao máximo a diferenciação dos indivíduos amostrados. Em laboratório os fragmentos coletados foram submetidos à extração de DNA com o uso do Kit ExtractMe Total DNA/RNA seguindo da amplificação da região 16S rRNA do DNA mitocondrial pela técnica de PCR, sendo posteriormente sequenciadas através de sequenciamento Sanger com o uso do sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram utilizadas para o desenvolvimento do primers que serão utilizados nas análises de fragmentos InDel.



Figura 4. Exemplo de peça óssea remanescente do período baleeiro antártico depositadas em diversas praias antárticas e de fragmento ósseo em etapa de preparação laboratorial para a extração de material genético.



Figura 5. Mapa da distribuição dos fragmentos ósseos coletados na Península Keller, Ilha Rei George, Antártica

Diante de um levantamento do histórico de captura do período baleeiro na região e das espécies de baleias presentes na Antártica, foram determinadas as prováveis espécies a serem encontradas e a abundância proporcional a elas. Sendo a Baleia Jubarte a espécie mais capturada no início da caça e posteriormente, com inovações tecnológicas nos navios e instrumentos de caça, baleias maiores e mais velozes passaram a ser as mais capturadas, como baleias azuis e baleias fin [6-8].

Com base nisso, foi possível utilizar bancos de dados públicos para obter sequências de DNA mitocondrial das espécies selecionadas, realizar o alinhamento delas e traçar o perfil de inserção e deleção, seguindo a metodologia SpinDel [9] para cada uma das espécies. Foram selecionadas três regiões do gene mitocondrial 16S rRNA que possibilitaram distinguir, como sucesso, todas espécies de baleias antárticas pelos padrões numéricos encontrados nas regiões de inserção e deleção.

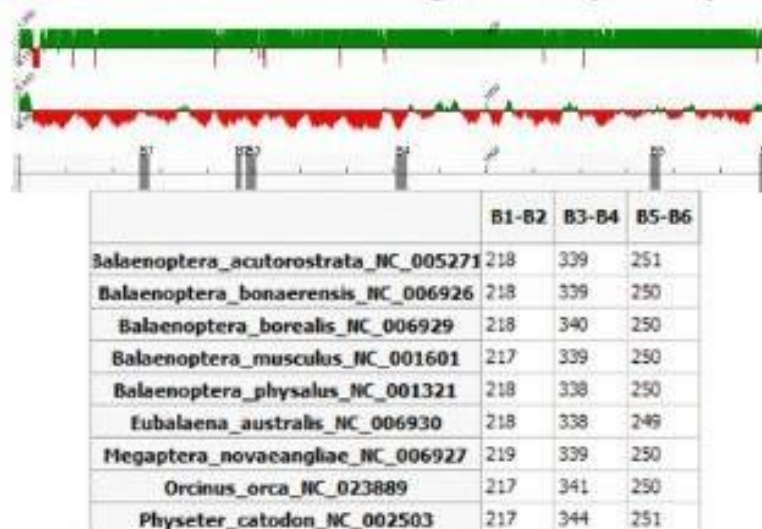


Figura 6. Regiões de inserção e deleção selecionadas para o desenvolvimento de primers para a análise de fragmentos e perfil SpinDel para cada uma das espécies de baleias que ocorrem nas águas do Oceano Austral.

A eficácia da metodologia de identificação molecular forense por regiões de inserção e deleção e, em especial, seu uso em amostras expostas ao tempo por longos períodos e degradadas, como é o caso para as amostras contempladas no presente estudo, abre novos horizontes para o estudo de vestígios de animais de maneira geral. Os dados gerados podem ser confrontados com os registros históricos e populacionais, possibilitando assim uma melhor compreensão dos impactos dessas atividades na vida marinha pretérita e atual.

Referências bibliográficas

1. Thomas P.O., Reeves R.R., & Brownell R.L. Status of the world's baleen whales. *Marine Mammal Science* (2015) 32(2):682–734.
2. Friedlaender, Ari & Modest, Michelle & Johnson, Chris. Whales of the Antarctic Peninsula - Science and Conservation for the 21st Century. A report for policymakers from the University of California, Santa Cruz and WWF; 2018.
3. Miller G.D. King George Island. In: Riffenburgh, B. *Encyclopedia of Antarctic*. Volume 1. Taylor & Francis, New York. 577–578; 2007.
4. Olmstead K. 2008. Jacques Cousteau – A life under the sea. New York. Sterling Biographies (2008) 128.
5. Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmao, L., & Amorim, A. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences, *Nucleic Acids Research* (2010) Volume 38, 22:e203.
6. Baker, C. S., Palumbi, S. R. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*. Sep 9;265(5178):1538–9; 1994.
7. Clapham, P. J., & Baker, C. S. Whaling, modern. In *Encyclopedia of marine mammals* (2018) 1070–1074. Academic Press.
8. Kittel, P. Inventory of whaling objects on the Admiralty Bay shores (King George Island, South Shetland Islands) in the years 1996–1998. *Pol Res* 22: 45–70; 2001.
9. Carneiro J., Pereira F., & Amorim A. SPInDel: a multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants. *Molecular ecology resources*, 12(6), 1190–1195; 2012.

Sobre os autores

Dafne Anjos é Mestranda do Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense da UERJ e Pesquisadora do Laboratório de Radioecologia e Mudanças Globais da UERJ

Anna Luiza dos Santos Donato é Mestre pelo do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ e Pesquisadora do Laboratório de Radioecologia e Mudanças Globais da UERJ

Rodrigo Goldenberg-Barbosa é Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ e Pesquisadora do Laboratório de Radioecologia e Mudanças Globais da UERJ

Elizeu Fagundes de Carvalho é Doutor em Ciências, Professor Associado e Coordenador do Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ

Cesar Rogerio Leal do Amaral é Doutor em Ciências, Professor Adjunto no Laboratório de Radioecologia e Mudanças Globais e pesquisador associado ao Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ

“Probing the potential of InDel polymorphisms on the molecular identification of cetaceans”

(Artigo científico publicado – Anjos et al., 2023 – Academia Biology



Probing the potential of InDel polymorphisms on the molecular identification of cetaceans

Dafne Adriana Abreu dos Anjos^{1,2,*}, Rodrigo Goldenberg Barbosa^{1,2}, Anna Luiza dos Santos Donato^{1,2}, Elizeu Fagundes de Carvalho⁴, Cesar Rogerio Leal do Amaral¹

Academic Editor(s): Christopher L. Brown, Andre van Wijnen

Abstract

Studies with cetaceans using degraded samples have faced challenges for molecular identification based on the barcoding methodology and other sequencing techniques due to the fragmented nature of the genetic material found on these samples. In this article, we evaluated the use of insertion-deletion regions for the molecular identification of cetaceans. The presented methodology allows the identification of species based on numeric profiles related to the chosen InDel regions, a forensic gold standard commonly used for degraded samples that cannot be sequenced easily. We carried out an *in silico* analysis using previously published 16S rRNA and adjacent tRNA-Leu mitochondrial sequences obtained from the NCBI database and found that accurate identification of all species included in our assay could be obtained by combining the lengths of three InDel regions. The regions selected in this study can be used for the construction of molecular identification assays for phylogeny and conservation studies, especially when degraded samples are included.

Keywords: cetaceans, whales, SpInDel, mtDNA, 16S rRNA, degraded

Citation: dos Anjos DAA, Barbosa RG, dos Santos Donato AL, de Carvalho EF, do Amaral CRL. Probing the potential of InDel polymorphisms on the molecular identification of cetaceans. *Academia Biology* 2023;1. <https://doi.org/10.20935/AcadBiol6032>

1. Introduction

Marine mammals' remains from many origins, time, and ways of preservation may be found in museums, archaeological collections, and mostly in their original deposition location. Molecular studies have been developed with distinct approaches, using different techniques and markers for both nuclear and mitochondrial DNA to retrieve genetic information from tissue, bones, baleen, and other kinds of samples from whales and seals [1–3]. But even in the cold environments inhabited for them, the DNA degradation represents a problem for molecular assays, since as an organic molecule, it is not expected to survive longer in exposure, tending to limit the DNA regions to smaller fragments [4].

The use of nuclear markers such as short tandem repeats (STR) and control region (CR) is widespread for molecular diagnostics of cetaceans. Mitochondrial markers are also used, due to the abundant number of copies, it increases the chances of being found in samples and amplified by the polymerase chain

reaction. In addition, the sequence conservation on many systematic boundaries of some mitochondrial genes has been successfully used in molecular and phylogenetic studies for cetaceans. The most used mitochondrial markers in cetacean studies are the mitochondrial cytochrome b (cyt b), cytochrome oxidase I (COX I) 12S rRNA and 16S rRNA. The analysis and sequencing using this sort of identification significantly increases both the time and financial costs of the project, or the amplified fragment can be much shorter than the chosen region [3, 5–7].

In this sense, the forensic molecular identification technique based on insertion and deletion regions (InDels), called SpInDel, presents itself as a possible and less expensive tool for identifying cetaceans in challenging samples [8]. Based on one of the gold standards in molecular analysis in the forensic area, the analysis of insertion and deletion polymorphisms allows analysing degraded DNA and performing the identification of animal species based on the unique numerical pattern of the length of InDels located in

¹Laboratório de Radioecologia e Mudanças Globais, Núcleo de Genética Molecular e Astrobiologia, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Departamento de Ecologia, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Mestrado Profissional em Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Laboratório de Diagnósticos por DNA, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*email: anjos.dafne@posgraduacao.uerj.br; dafne.adr@gmail.com

variable regions of DNA [8]. In this way, it becomes feasible to amplify short fragments from a longer reliable marker.

This article intends to probe the potential use of insertion–deletion polymorphisms on the molecular identification of cetacean species based on a panel of selected short regions of the 16S rRNA and tRNA-Leu mtDNA genes, applying the SpInDel approach for nine cetacean species' mitogenomes available on public databases, including seven baleen whales and two toothed whales.

2. Materials and Methods

The analyses were made *in silico*, based on sequences of cetaceans. The constructed database includes reference sequences of 16S rRNA from nine chosen cetaceans. All of them were obtained from the GenBank database repository (GenBank accession numbers in parentheses): *Balaenoptera acutorostrata* (NC_005271.1), *Balaenoptera bonaerensis* (NC_006926.1), *Balaenoptera borealis* (NC_006929.1), *Balaenoptera musculus* (NC_001601.1), *Balaenoptera physalus* (NC_001321.1), *Eubalaena australis* (NC_006930.1), *Megaptera novaeangliae* (NC_006927.1), *Orcinus orca* (NC_064558.1), and *Physeter*

macrocephalus (NC_002503.2). The sequences were aligned using the default parameters of MUSCLE found on the software Geneious v.4.8.2 and InDel regions were determined with the software SpInDel WorkBench v3 [9].

3. Results

Based on the obtained sequences of the mitochondrial DNA from the selected species, we performed their alignment and selected insertion–deletion regions and traced the InDel profile for each of the species, following the SpInDel methodology. Three regions of the 16S rRNA and tRNA-Leu mitochondrial genes were selected that made it possible to successfully distinguish all species of analyzed whales by the numerical patterns found in these insertion and deletion regions (Figure 1).

Following the alignment procedure, six regions were selected and the SpInDel profiles were generated for each one of them for each species, as shown in Table 1. Successful identification of each sequence is shown in Figure 2.

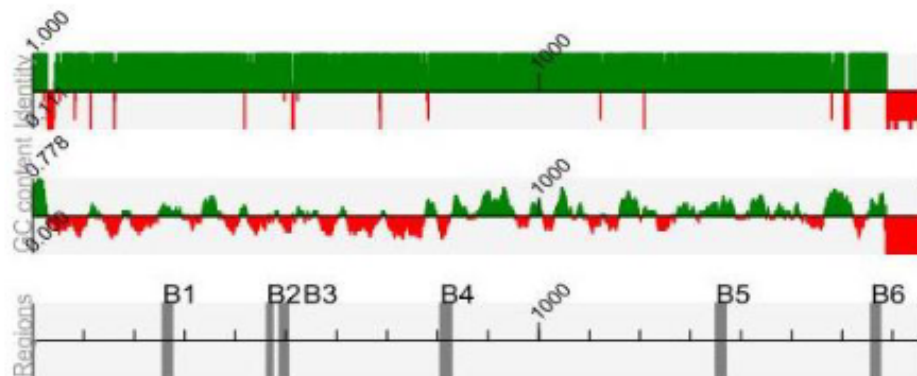


Figure 1 • Alignment performed by SpInDel WorkBench v3, with CG content profile, and the selected regions chosen to distinguish species (in gray).

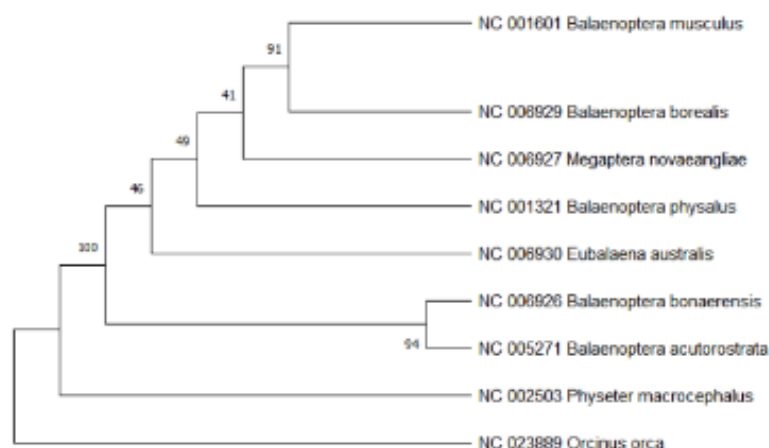


Figure 2 • UPGMA tree of included reference sequences with GenBank accession numbers showing the successful species identification based on the selected InDel regions. Bootstrap support values are represented at internal nodes.

Table 1 • SpInDel profiles of the three regions (B1–B2, B3–B4, and B5–B6) in 16S rRNA and tRNA-Leu for each species. The observed differences of length are due to the presence of insertion and deletion polymorphisms

	B1–B2	B3–B4	B5–B6
NC_006926.1:1122-2698	218	336	317
NC_005271.1:1122-2699	218	336	318
NC_006927.1:1115-2705	219	336	317
NC_001321.1:1539-3112	218	335	317
NC_006930.1:1115-2688	218	335	316
NC_064558.1:1113-2692	217	338	326
NC_006929.1:1118-2696	218	337	317
NC_002503.2:1110-2697	217	341	318
NC_001601.1:1535-3109	217	336	317

4. Discussion

Genetic identification of cetaceans often represents a challenge, since sampling and obtaining DNA from these marine mammals commonly involves implies working with stranding material, ambergris, fecal material and aged bone remains [2, 9–13]. In this sense, the use of InDels from 16S rRNA and tRNA-Leu regions to distinguish all cetaceans present in this study showed satisfactory results, with only three regions being enough to trace a unique profile for each one of the nine selected species. Questions about the use of 16S rRNA and flanking regions such as the tRNA-Leu gene have been discussed and its use has already been proved to be adequate for studies in different marine mammals [5–7].

The forensic identification of species, such as for investigating illegal trade of products from protected species in markets, has been growing in importance and studied with mostly muscular tissue [14–17]. In this context, different studies have been conducted to retrieve feasible DNA from these kinds of samples [13]. The most used approach for cetacean products was combining fragments of cyt B and CR and adjacent tRNAs and using it for solving the problem of covering small fragments of DNA, but it must not be enough for more degraded samples [7, 15–17]. Still, coding genes in the mitochondrial genome must not have enough heterogeneity overall due to functional constraints for SpInDel analysis [18, 19]. Thus, finding that InDels in the 16S rRNA and tRNA-Leu genes can be used in forensics for the identification of the selected cetacean species may prove itself a successful and low-cost method for retrieving fragmented DNA from non-trivial samples.

Recent studies have proved that this methodology is appropriate for molecular assays and have been used for other marine species identification [20, 21], but there are no specific assays for cetaceans in this area. In addition, the affordance of this kind of identification without needing of sequencing, only performing electrophoresis capillary for determination of fragment size [8, 18, 22], must enable new protocols. Stranding monitoring of species, commonly done with DNA barcoding, faces the same problems for amplifying entire regions, with the different conservation state of each sample [23], that must be solved with SpInDel methodology.

Probing the potential of 16S rRNA and tRNA-Leu for being used to distinguish all the nine cetacean species opens new horizons for the study and conservation for these species with the use of bones remains and degraded samples. These three hypervariable InDel regions of the 16S rRNA and tRNA-Leu genes are now selected for flanking primers development and are being tested for efficient cetacean species identification in a multiplex assay.

Acknowledgments

The authors would like to thank to Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for the financial support provided. We thank two anonymous reviewers for contributing with comments and criticism that much improved the final version.

Funding

Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) provided financial support.

Author contributions

DA designed the study, worked on analysis and wrote a preliminary and final version of the manuscript. CA designed the study, worked data interpretation and wrote a final version of the manuscript. EC collaborated on data interpretation and analysis. AD and RB collaborated in the analysis and reviewing the manuscript. All authors approve of this work and take responsibility for its integrity.

Conflicts of interest

The author(s) declare(s) that they have no competing interests.

Data availability statement

Data supporting these findings are available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Institutional review board statement

Not applicable.

Informed consent statement

Not applicable.

Sample availability

Not applicable.

Additional information

Received: 2022-10-13

Accepted: 2022-12-04

Published: 2023-04-19

Academia Biology papers should be cited as *Academia Biology* 2023, ISSN pending, <https://doi.org/10.20935/AcadBiol6032>. The journal's official abbreviation is *Acad. Biol.*

Publisher's note

Academia.edu stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations. All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright

© 2023 copyright by the authors. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

References

- Solazzo C, Fitzhugh W, Kaplan S, Potter C, Dyer JM. Molecular markers in keratins from Mysticeti whales for species identification of baleen in museum and archaeological collections. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183053. doi: 10.1371/journal.pone.0183053.
- Lindqvist C, Probst A, Martin AR, Wlig Ø, Bachmann L. Molecular species identification of historical whale remains from South Georgia. *Mar Mamm Sci*. 2009;25(1):229–38. doi: 10.1111/j.1748-7692.2008.00248.x
- Foot AD, Hofreiter M, Morin PA. Ancient DNA from marine mammals: Studying long-lived species over ecological and evolutionary timescales. *Ann Anat - Anatomischer Anzeiger*. 2012;194(1):112–20. doi: 10.1016/j.aanat.2011.04.010
- Willerslev E, Hansen AJ, Poinar HN. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol*. 2004;19:141–7. doi: 10.1016/j.tree.2003.11.010
- Milinkovitch MC, Dunn JL, Powell JR. Exfoliated cells as the most accessible DNA source for captive whales and dolphins. *Mar Mamm Sci*. 1994;10(1):125–8. doi: 10.1111/j.1748-7692.1994.tb00400.x
- Milinkovitch MC, Orti G, Meyer A. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature*. 1993;361(6410):346–8. doi: 10.1038/361346a0
- Tzika AC, et al. Molecular identification of small cetacean samples from Peruvian fish markets. *Conser Genet*. 2010; 11(6):2207–18. doi: 10.1007/s10592-010-0106-8.
- Carneiro J, Pereira F, Amorim A. SPInDel: A multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants. *Mol Ecol Resour*. 2012;12(6):1190–5.
- Macleod R, et al. DNA preserved in jetsam whale ambergris. *Biol Lett*. 2020;16:20190819. doi: 10.1098/rsbl.2019.0819
- Dalebout ML, van Helden A, van Waerebeek K, Baker CS. Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Mol Ecol*. 1998;7(6): 687–94. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00380.x
- Parsons KM, Durban JW, Claridge DE. Comparing two alternative methods for sampling small cetaceans for molecular analysis. *Mar Mamm Sci*. 2003;19(1):224–31.
- Speller C, et al. Barcoding the largest animals on Earth: Ongoing challenges and molecular solutions in the taxonomic identification of ancient cetaceans. *Phil Trans R Soc B*. 2016;371(1702):20150332.
- Rodríguez D, Olsson P, Bastida R. Extracción y amplificación de ADN a partir de tejidos formolizados de franciscana *Pontoporia blainvillei*. Report of the 3rd. Workshop for Coordinated Research and Conservation of the Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the Southwestern Atlantic (United Nations Environment Program/Convention on Migratory Species); 2000: 81–82.
- Baker CS, Palumbi SR. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*. 1994;265:1538–9. doi: 10.1126/science.265.5178.1538
- Baker CS, Cipriano F, Palumbi SR. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Mol Ecol*. 1996;5: 671–85.
- Teletchea F, Maudet C, Hänni C. Food and forensic molecular identification: Update and challenges. *Trends Biotechnol*. 2005;23:359–66.
- Alter SE, Palumbi SR. Comparing evolutionary patterns and variability in the mitochondrial control region and cytochrome b in three species of baleen whales. *J Mol Evol*. 2009;68:97–111.
- Pereira F, et al. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res Spec Publ*. 2010;38(22):203.
- Silva VS, et al. Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil. *Mammal Res*. 2021;66(2):349–69.
- Amaral CRL, et al. The shark panel: An InDel multiplex for shark species identification. *J Forensic Sci Supplement Series*. 2015;5:430–2.
- Amaral CRL, et al. Probing the potential of the Shark Panel InDel multiplex v2.0 on the forensic identification of batoid elasmobranchs. *J Forensic Sci Supplement Series*. 2017;6: 221–3.
- Alves C, et al. Species identification in forensic samples using the SPInDel approach: a GHEP-ISFG inter-laboratory collaborative exercise. *Forensic Sci Intl: Genet*. 2017;28: 219–24.
- Alfonsi E, et al. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. *Zookeys*. 2013;365:5–24. doi: 10.3897/zookeys.365.5873.