



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Dafne Adriana Abreu dos Anjos

**Identificação molecular de remanescentes ósseos de cetáceos do
período de exploração baleeira da Antártica**

Rio de Janeiro
2024

Dafne Adriana Abreu dos Anjos

**Identificação molecular de remanescentes ósseos de cetáceos do período de
exploração baleeira da Antártica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Mestrado
Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e
Tecnologia Forense, da Universidade do Estado
do Rio de Janeiro

Orientador: Prof. Dr. Cesar Rogerio Leal do Amaral

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A599 Anjos, Dafne Adriana Abreu dos.
Identificação molecular de remanescentes ósseos de cetáceos do período
de exploração baleeira da Antártica / Dafne Adriana Abreu dos Anjos. – 2024.
100f.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Rogerio Leal do Amaral

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto
de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em
Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Cetáceos – Teses. 2. Almirantado, Baía do (Antártica) – Teses. 3. Antártica,
Península - Teses. 4. Evolução biológica. I. Amaral, Cesar Rogerio Leal do. II.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara
Gomes. III. Título.

CDU 599.51/.53 (995.1)

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Dafne Adriana Abreu dos Anjos

**Identificação molecular de remanescentes ósseos de cetáceos do período de
exploração baleeira da Antártica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Mestrado
Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e
Tecnologia Forense, da Universidade do Estado
do Rio de Janeiro

Aprovada em 19 de julho de 2024.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cesar Rogerio Leal do Amaral (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Dr. Salvatore Siciliano

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Às pessoas que mais me apoiaram, Olíbia, João, Wendy e Cesar.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Olíbia, João e Wendy, por todo o suporte, amor e valores ensinados no lar, abdicando de tudo que foi necessário para me proporcionar educação e me apoiar incessantemente a seguir meus sonhos, com toda a paciência que demandei. São minha base e não estaria onde cheguei sem vocês.

À família Amaral, por me acolherem com tanto carinho e cuidado, me dando todo o suporte. Espero muito um dia conseguir retribuir minha gratidão a vocês que me deram uma casa onde morar e hoje moram no meu coração.

Ao Dr. Cesar Amaral, pela orientação ao longo de todo o processo desde o final da minha graduação, por apoiar meus sonhos acadêmicos e possibilitar que eu os alcançasse. Pela experiência pessoal e profissional transmitida, pela amizade, pelos conselhos pacientes e momentos únicos. Esse trabalho não seria possível sem você como meu professor, orientador e grande parceiro.

Ao Dr. Elizeu Fagundes, meu coorientador, pela colaboração e acesso à plataforma genômica durante este trabalho.

A todos do NGA, em especial aos meus colegas Anna Donato e Rodrigo Goldenberg, por me acolherem gentilmente desde a minha chegada no laboratório, pela experiência compartilhada, parceria, ensinamentos e companhia descontraída. Também por todas as sugestões e revisões durante a realização deste trabalho.

A todos do LARAMG, por toda a ajuda e espaço durante o primeiro ano do meu mestrado, em especial ao Dr. Heitor Evangelista pela Bolsa DTI-C que me proporcionou condições de me manter durante o início do mestrado.

A todos do LDD, por toda a ajuda durante os testes de extração e o sequenciamento, em especial à professora Dayse pelos conselhos no início do meu mestrado e o compartilhamento de insumos.

Ao professor Paulo Câmara e ao projeto Bryoantar, por me proporcionarem a oportunidade de participar da OPERANTAR XL ao final da minha graduação, onde todo este trabalho foi arquitetado e tomou forma.

Aos órgãos de fomento CNPq pela bolsa DTI-C de dez meses, e FAPERJ pela bolsa Qualitec.

De tudo ficarão três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar.

Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.

Fernando Sabino

RESUMO

ANJOS, Dafne Adriana Abreu dos. **Identificação molecular de remanescentes ósseos de cetáceos do período de exploração baleeira da Antártica**. 2024. 100f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

No início do século XX, houve intensa atividade baleeira na Antártica, cujos vestígios são representados na atualidade em forma de ruínas e numerosos ossos de baleia espalhados pelas Shetlands do Sul. Nesses anos, centenas de milhares de baleias foram capturadas, especialmente rorquais. Apesar desses vestígios históricos se encontrarem expostos durante longos anos a elementos degradantes, o ambiente antártico proporciona condições favoráveis à preservação desses ossos, com ciclos de congelamento e temperaturas baixas durante todo o ano. Desse modo, esses fragmentos ainda podem apresentar DNA viável para identificação molecular das espécies. O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso do sequenciamento Sanger e da metodologia SplnDel, que se baseia na análise de pequenas regiões de inserção e deleção (InDel), com foco na identificação das espécies, por meio da análise de regiões do DNA mitocondrial, de antigos fragmentos ósseos datados do período baleeiro moderno, encontradas ao longo da Baía do Almirantado. Utilizando as metodologias propostas, o estudo realiza a primeira identificação molecular dos ossos de baleia depositados na Baía do Almirantado e tem como produto de inovação o Kit de Identificação Molecular de Cetáceos Antárticos, baseado em apenas três regiões de inserção e deleção com cerca de 300 pb dentro da região 16S e t-RNAs adjacentes. Nossos resultados corroboram os registros históricos de caça nas proximidades da região, de modo que puderam ser identificadas duas espécies de baleias conhecidamente alvejadas durante o período baleeiro.

Palavras-chave: Antártica, Baía do Almirantado, identificação molecular; SplnDel; cetáceos.

ABSTRACT

ANJOS, Dafne Adriana Abreu dos. **Molecular identification of cetacean bone remains from the Antarctic whaling period.** 2024. 100f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

At the beginning of the 20th century, intense whaling activity took place in Antarctica, whose remains are represented today in the form of ruins and numerous whale bones scattered across the rocky beaches of the South Shetlands. In those years, hundreds of thousands of whales were captured, especially rorquals. Although these historical remains were found exposed for long years to degrading elements, the Antarctic environment provides conditions favorable for the preservation of these bone fragments, with freezing cycles and low temperatures throughout the year. This way, they can still present viable DNA for species' identification based on molecular analyses. The present study aimed to evaluate the use of Sanger sequencing and the SpInDel methodology, which is based on the analysis of small insertion and deletion regions (InDel), with a focus on identifying species, through the analysis of regions of mitochondrial DNA, of ancient bone fragments dating from the modern whaling period, found throughout Admiralty Bay. Using the proposed methodology, the study performs the first molecular identification of whale bones deposited in Admiralty Bay and it has as innovation product the Antarctic Cetacean Molecular Identification Kit, based on just three insertion regions and deletion of approximately 300 bp within the 16S region and adjacent t-RNAs. Our results corroborate historical hunting records in the vicinity of the region, so that two species of whales known to have been shot during the whaling period could be identified.

Keywords: Antarctica, Admiralty Bay, Molecular Identification, SpInDel, Cetaceans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa do continente antártico e a zona de convergência antártica.....	15
Figura 2 –	Mapa da Ilha Rei George e suas estações, com destaque para a Baía do Almirantado e a Estação Antártica Comandante Ferraz.....	17
Figura 3 –	Cetáceos avistados na Baía do Almirantado durante a OPERAÇÃO ANTÁRTICA XLI, no verão de 2022-2023.....	19
Figura 4 –	Principais espécies de cetáceos encontrados na Península Antártica.....	21
Figura 5 –	Capturas históricas de baleias ao redor do continente Antártico.....	23
Figura 6 –	Navio-fábrica Admiralen, em Seattle.....	24
Figura 7 –	Esquema das análises SplnDel, representando as regiões hipervariáveis e o comprimento das regiões considerando as variações associadas às inserções e deleções dentro dela.....	30
Figura 8 –	Mapa da Baía do Almirantado, pontos de coleta plotados em vermelho.....	33
Figura 9 –	Coletas na Península Keller.....	34
Figura 10 –	Amostra de sedimento contendo fragmentos ósseos.....	35
Figura 11 –	Amostras após o período de incubação.....	36
Figura 12 –	Eletroferograma ilustrativo do sequenciamento da região 16S, da amostra B13, identificada como <i>Balaenoptera musculus</i>	49
Figura 13 –	Árvore de Neighbor-Joining tree (K2P) da região parcial 16S rRNA (bootstrap x1000) dos cetáceos Antárticos, com base nas sequências-referência do Genbank e sequências obtidas (B13, B31, B23 e B3).....	50
Figura 14 –	Árvore de máxima verossimilhança (GTR+G+I) com base no 16S rRNA das espécies de baleias antárticas, mostrando a relação evolutiva e filogenia (LUDWIG et al. 2011).....	51

Figura 15 – Alinhamento do 16S e tRNA-Leu das sequências do banco de dados.....	52
Figura 16 – Gel de agarose com a escala alélica, o resultado da amplificação da amostra B13 em singleplex de cada par de primer, em multiplex com os três pares de primers e o controle negativo.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Capturas totais de todas as frotas baleeiras soviéticas na Antártica entre 1946 e 1986, por espécie de acordo com a contabilidade mais recente da IWC, de 21 de maio de 2012.....	24
Tabela 2 – Números de acesso das sequências publicadas anteriormente no Genbank e utilizadas nas análises.....	40
Tabela 3 – Lista de amostras, concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos pela extração por coluna.....	45
Tabela 4 – Lista de amostras, concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos pela extração por Fenol-clorofórmio.....	46
Tabela 5 – Lista de amostras, concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos pela extração por coluna em costelas e vértebras.....	47
Tabela 6 – Perfil SpInDel das mesmas regiões em 16 rRNA e tRNAs de cada espécie. As diferenças fornecidas pelos polimorfismos de inserção e deleção representam o padrão de comprimento único (em pb).....	54
Tabela 7 – Alcance, sequência e tamanho do amplicon dos primers desenhados e utilizados no multiplex.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aDNA	DNA antigo (do inglês, <i>Ancient DNA</i>)
COI	Citocromo c oxidase subunidade 1
CR	Região controle do DNA mitocondrial (do inglês, <i>control region</i>)
cytB	Citocromo b
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
D-loop	Ciclo de deslocamento (do inglês, <i>Displacement loop</i>), Região controle do DNA mitocondrial (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
InDel	Regiões de Inserção e Deleção
IWC	Comissão Baleeira Internacional (do inglês, <i>International Whaling Commission</i>)
LDD	Laboratório de Diagnósticos por DNA
mtDNA	DNA mitocondrial (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
NCBI	Centro Nacional de informações sobre biotecnologia (do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NGA	Núcleo de Genética Molecular Ambiental e Astrobiologia
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
rpm	Rotação por minuto
SpInDel	Identificação de Espécies baseada em Inserção e Deleção

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	OBJETIVOS.....	32
1.1	Objetivo geral.....	32
1.2	Objetivos específicos.....	32
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1	Amostragem.....	33
2.2	Processamento inicial das amostras.....	35
2.2.1	<u>Extração e purificação com kit ExtractMe Total Kit DNA/RNA blirt®.....</u>	36
2.2.2	<u>Extração orgânica por Fenol/Clorofórmio.....</u>	37
2.3	Marcadores moleculares.....	38
2.4	Amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR).....	38
2.5	Purificação e sequenciamento.....	39
2.6	Análises das sequências.....	40
2.7	Identificação de espécies.....	41
2.8	SpInDel.....	42
3	RESULTADOS.....	44
3.1	Extração e quantificação do DNA.....	44
3.2	<u>Identificação de espécies.....</u>	48
3.2.1	<u>DNA Barcoding.....</u>	48
3.2.2	<u>SpInDel.....</u>	51
4	DISCUSSÃO.....	55
4.1	Recuperando DNA antigo dos ossos depositados nas praias da Península Keller, Ilha Rei George, Antártica.....	55
4.2	Identificação Molecular dos espécimes analisados.....	57
4.3	SpInDel.....	58
4.4	Identificação molecular dos remanescentes ósseos e sua relação com o histórico da atividade baleeira na região da Baía do Almirantado.....	60
	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE - Produção bibliográfica durante o período do Mestrado...	73

INTRODUÇÃO

O período baleeiro na Antártica, do século XIX ao XX, impactou intensamente as populações de baleias distribuídas no oceano austral, reduzindo algumas espécies até a beira de sua extinção (THOMAS *et al.* 2016). Os vestígios desse período podem ainda hoje ser encontrados em diversas regiões antárticas e subantárticas, com os numerosos ossos de baleia abandonados nas praias e próximos as antigas estações de processamento. Por décadas, os epicentros da caça foram as ilhas Geórgia do Sul e Shetlands do Sul (BASBERG & HACQUEBORD 2023). Um dos pontos de concentração e deposição desses ossos é a Baía do Almirantado, na Ilha Rei George, apesar de não serem encontradas ruínas de instalações baleeiras na região. Embora componham a paisagem há mais de um século, pouco se sabe sobre a origem desses ossos, além de seus números e idades aproximadas.

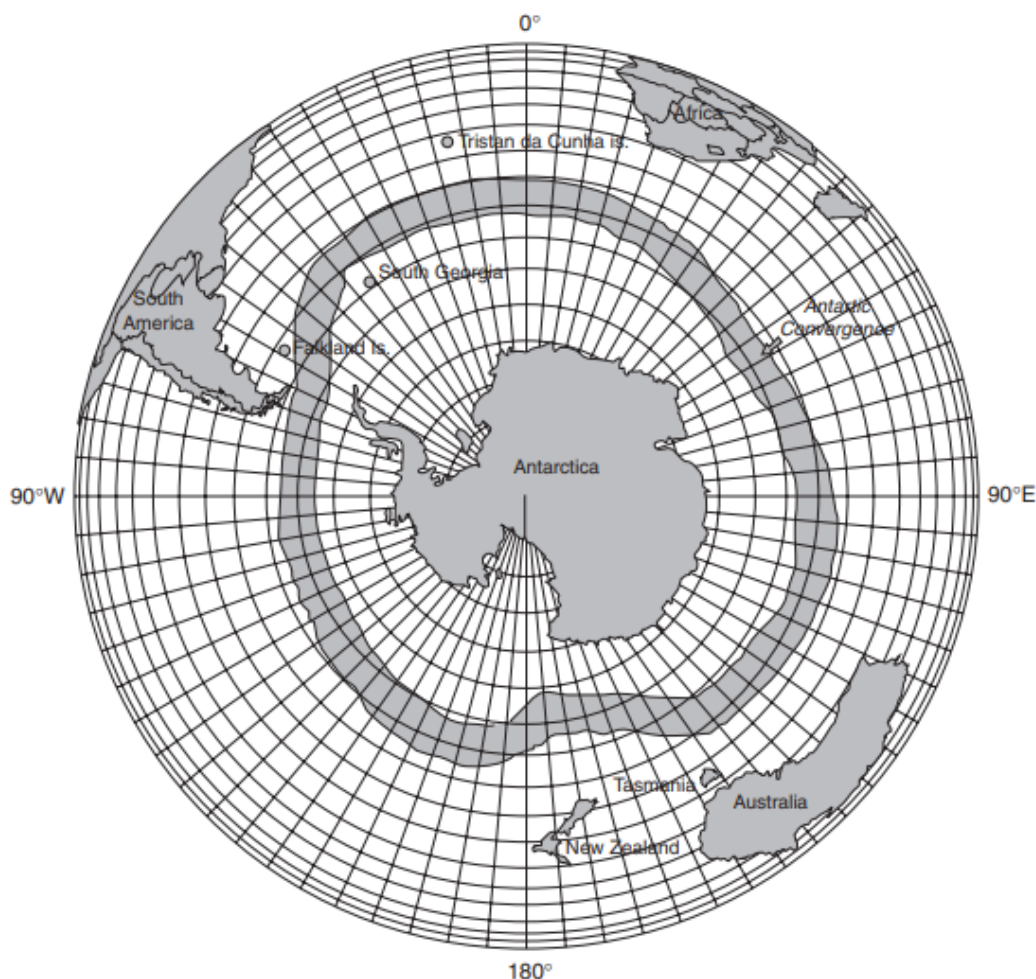
Nesta introdução são apresentados diferentes temas pertinentes ao estudo, divididos em seis partes. Na primeira parte é traçado um panorama sobre o continente Antártico, suas especificidades e regime; Na segunda parte são explanados detalhes sobre o local de estudo, aprofundado das Shetlands do Sul, à Ilha Rei George, e finalmente a Baía do Almirantado; Na terceira parte são apresentadas as espécies-alvo, ou seja, os cetáceos antárticos de interesse comercial durante o período baleeiro, cujos ossos são o objeto de estudo; Na quarta parte é apresentado um levantamento do período baleeiro na Antártica, sobretudo na Baía do Almirantado, e os impactos atuais dessas interações antrópicas com as espécies apresentadas; Na quinta parte, são apresentados os desafios na identificação dos vestígios do período baleeiro; Na sexta parte, é discutido o uso de ferramentas moleculares na identificação forense em amostras antigas e degradadas, apresentando o método SpInDel; E por fim, a sétima e última parte compreende a motivação e caracterização do problema, que levaram ao desenvolvimento do presente trabalho.

Um panorama sobre Antártica

A Antártica é o continente mais ao sul e isolado do planeta, conhecido por suas condições naturais extremas, incluindo o clima frio, seco e com ventos intensos, detento as temperaturas mais baixas já registradas em ambiente terrestre, -89°C próximo ao Pólo Sul (KRAUSE & FLOOD 1997; TURNER *et al.* 2021). Sua porção continental de cerca de 14 milhões de quilômetros quadrados, compreende cerca de 10% da superfície terrestre, aumentando durante o inverno com o congelamento do oceano austral e a formação de extensas plataformas de gelo (FOX *et al.* 1994). De toda a superfície Antártica, apenas 1-3% dessa área encontra-se livre de gelo (YERGEAU *et al.* 2007), de modo que a porção de água retida nas geleiras equivale a 70% de toda a água doce do planeta (FOX *et al.* 1994). Além da maior reserva de água doce do mundo, estima-se que a região seja rica em minérios de interesse comercial, como ouro, prata e níquel, além de petróleo, dada a sua origem geológica (VIEIRA 2006) quando, no passado, esteve unida a outros, formando o supercontinente Gondwana, possuindo uma origem similar à do continente africano, sulamericano, Índia e Austrália, onde esses recursos também são conhecidos (DE TREVISAN 2004).

O continente antártico é cercado pelo Oceano Austral. O Oceano Austral é a sub-região oceânica que marca a fronteira entre as águas frias polares e as águas temperadas mais ao norte. É delimitado pela plataforma continental costeira da própria Antártica e pela convergência antártica ou zona frontal polar sul, onde a temperatura da água pode variar em até 10°C em questão de apenas alguns quilômetros de distância. Essa variação de temperatura se deve ao encontro de diferentes massas de ar, frias e quentes, e é denominada frente polar. Os resultados desses limites de temperatura podem ser determinantes para a distribuição de algumas espécies, que toleram melhor ou se beneficiam dos recursos disponíveis em temperaturas mais baixas. É o que, por exemplo, define a distribuição da maioria dos mamíferos marinhos tropicais e temperados, incluindo suas rotas de migração anuais (BOYD 2009; Figura 1).

Figura 1 - Mapa do continente antártico e a zona de convergência antártica



Fonte: BOYD 2009

Os ricos e diversos serviços ecossistêmicos antárticos incluem a modulação do clima global, a proteção da biodiversidade nativa, migratória e do habitat, que fornece condições únicas de reprodução e sobrevivência para diversas espécies (PERTIERRA 2021). Sua superfície coberta de gelo atua no resfriamento do planeta, uma vez que sua grande área branca reflete a radiação solar, o que reduz a retenção de calor sobretudo no hemisfério sul (MAYEWSKI *et al.* 2009). A biodiversidade local é restrita e caracterizada pelas diferentes adaptações ao clima rigoroso e recursos de difícil acesso. Sendo majoritariamente criptogâmica, a flora nativa contém centenas de espécies endêmicas e cosmopolitas de musgos, hepáticas e líquens, enquanto abriga apenas duas espécies nativas de plantas com flor (OCHYRA *et al.* 2008; COLESIE *et al.* 2023). A fauna de vertebrados é característica e inclui aves marinhas

como pinguins e albatrozes, mamíferos marinhos como focas, elefantes-marinhos, lobos-marinhos, além de espécies de baleias e golfinhos (LOWEN 2011).

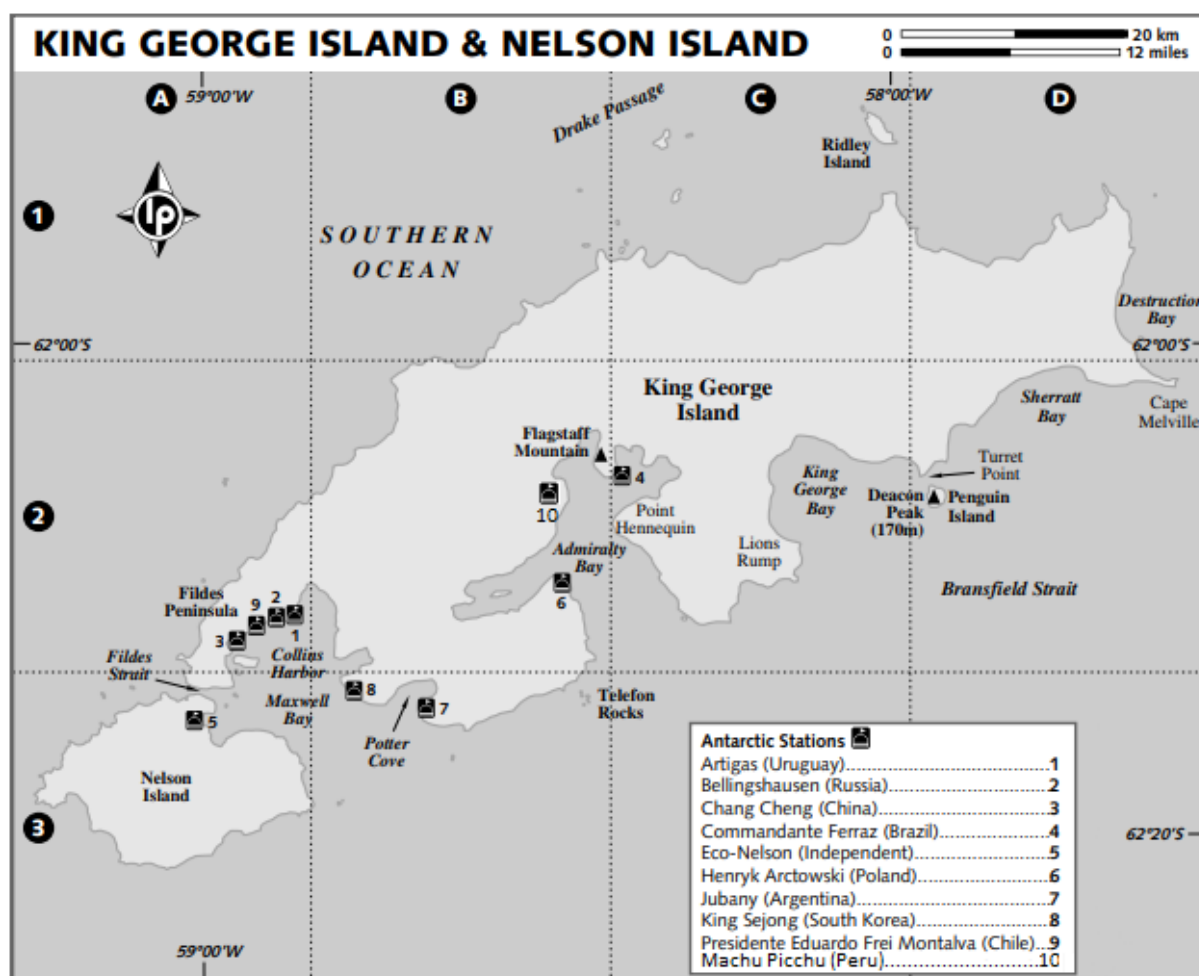
Ao longo do tempo, a Antártica despertou interesse de várias nações, envolvendo questões econômicas, políticas e ambientais (O'REILLY & SALAZAR 2017). A disputa pela região resultou em diversas reclamações territoriais e tentativas de ocupação, baseadas em diferentes teorias na tentativa de justificar a posse e acesso aos recursos do continente (SIMÕES 2017). A fim de resolver tais disputas territoriais e outras questões geopolíticas, o Tratado Antártico foi proposto durante o Ano Geofísico Internacional e assinado em 1959 (BULKELEY 2010). À luz do tratado, entende-se como Antártica tudo que se encontra ao sul do paralelo 60°S, incluindo o continente, os arquipélagos das Ilhas Balleny, Ilha Peter I, Ilha Scott, Ilhas Orkney do Sul e Ilhas Shetlands do Sul, além das plataformas de gelo. O tratado determina a Antártica como um território livre de reivindicações territoriais, regula as atividades desenvolvidas na região, e junto ao Protocolo de Madri/Protocolo de Preservação Ambiental, determina o status de "Reserva Natural Internacional dedicada à Ciência e à Paz" até 2048 (TIN *et al.* 2009; CÂMARA & MELO 2018). Desse modo, são vetadas quaisquer atividades de cunho militar ou extrativista, limitando o uso do território antártico para fins pacíficos, turísticos e principalmente científicos, almejando a cooperação internacional. Sob esse regime, para integrar o tratado como membro consultivo faz-se necessário que a nação desenvolva pesquisa científica na Antártica. Status que o Brasil atingiu em 1983, cumprindo as condições com a criação do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), junto aos outros 28 membros consultivos.

A Ilha Rei George e a Baía do Almirantado

Localizado ao norte da Península Antártica, as Ilhas Shetlands do Sul são um arquipélago de origem vulcânica composto por 12 ilhas maiores e numerosas ilhas menores, que juntas totalizam uma área de 3.687 km² (BARTON 1965). Ao Norte, faz fronteira na Passagem de Drake e ao sul separa-se da Península Antártica pelo Estreito de Bransfield. Desde sua descoberta em 1819, a região integra a rota mais abrigada para embarcações vindas da América do Sul, sendo um dos motivos de ser

uma das áreas mais visitadas da Antártica, e também utilizada por algumas espécies de mamíferos marinhos (BASSOI *et al.* 2020; BARTON 1965; RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1998; STEEL *et al.* 2017). O encontro desses dois elementos resultou na instalação de estações de caça e processamento de baleias e focas, que foram sediadas nas ilhas desse arquipélago nos anos de intensa exploração na Antártica (ISLAND 2001; KITTEL 2001). Atualmente o local comporta estações de pesquisa e abrigos de vários países, incluindo Argentina, Bulgária, Chile, China, Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos, Equador, Polônia, Rússia e Uruguai, além do Brasil, com a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), que assim como a maioria das outras, localiza-se na Ilha Rei George (ISLAND 2001) (Figura 2).

Figura 2 - Mapa da Ilha Rei George e suas estações, com destaque para a Baía do Almirantado e a Estação Antártica Comandante Ferraz



Fonte: Adaptado de South Shetland Islands (Lonelyplanet.com)

Sendo a maior do arquipélago ao qual pertence, a Ilha Rei George (61° 50' - 62° 15' S / 57°30' - 59° 00' O) chamou a atenção de diversas expedições ao longo do tempo (BARTON 1965; BIRKENMAJER 1980; RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1998). Apesar de mais de 90% da superfície da ilha ser coberta por gelo, foram as condições mais amenas em comparação às regiões mais próximas ao polo e sua área acessível, livre de gelo, que atraíram caça, pesquisa e turismo para a ilha (BIRKENMAJER 1980). Além disso, também pela proteção que suas enseadas fornecem, a região passou a ser considerada adequada para a instalação de bases científicas permanentes e como ponto de abrigo para embarcações, incluindo navios baleeiros no passado (BARTON 1965; KITTEL 2001). Desse modo, a região é marcada por forte atividade científica na atualidade, porém sua história foi marcada pela caça intensa às focas e baleias, o que é evidenciado pelos diversos tipos de artefatos arqueológicos oriundos do período baleeiro, que ainda hoje compõem as paisagens da ilha. Ossos de baleia, ruínas de embarcações naufragadas e diversos objetos datados do período baleeiro são encontrados dispersos pela costa da ilha, em especial em sua maior enseada, a Baía do Almirantado (BIRKENMAJER 1980; KITTEL 2001). Apesar disso, não há nenhum registro de instalação ou ruína de qualquer estação de processamento de focas, que foram caçadas até a extinção local, ou de baleias (RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1998).

Atraídos pela abundância de krill (RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1980), a região abriga colônias de espécies como pinguins (DANTAS *et al.* 2014), focas e elefantes marinhos (*Mirounga leonina*) (FUDALA & BIALIK 2020), além de baleias que podem ser avistadas durante o verão, quando algumas espécies se movem para latitudes mais altas em busca de alimento (RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1980; STEEL *et al.* 2017) e também no inverno (Figura 3).

Figura 3 - Cetáceos avistados na Baía do Almirantado durante a OPERAÇÃO ANTÁRTICA XLI, no verão de 2022-2023



Fonte: Rodrigo Goldenberg, 2023.

Três estações de pesquisa estão instaladas na Baía do Almirantado: a estação peruana Machu Picchu; a estação polonesa Arctowski; e a estação brasileira Comandante Ferraz (Figura 2). É nas proximidades delas que se concentra a maior quantidade de restos ósseos de baleias, além das outras numerosas peças ósseas espalhadas ao longo das praias rochosas da baía (KITTEL 2001). Por ser regularmente frequentada por diversos grupos de pesquisa, a geologia (BIRKENMAJER 1980), a história (KITTEL 2001; RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1998), os fatores abióticos (CATALDO *et al.* 2023) e a diversidade das comunidades biológicas (SICIŃSKI 2011; VICTORIA *et al.* 2013) do local são relativamente bem conhecidos e estudados. Apesar disso, lacunas no conhecimento sobre a Baía do Almirantado ainda persistem, como por exemplo a ausência de observações, relatórios ou comunicados formais, atuais ou pretéritos, sobre a presença de baleias na região, apesar de serem comumente observadas na região.

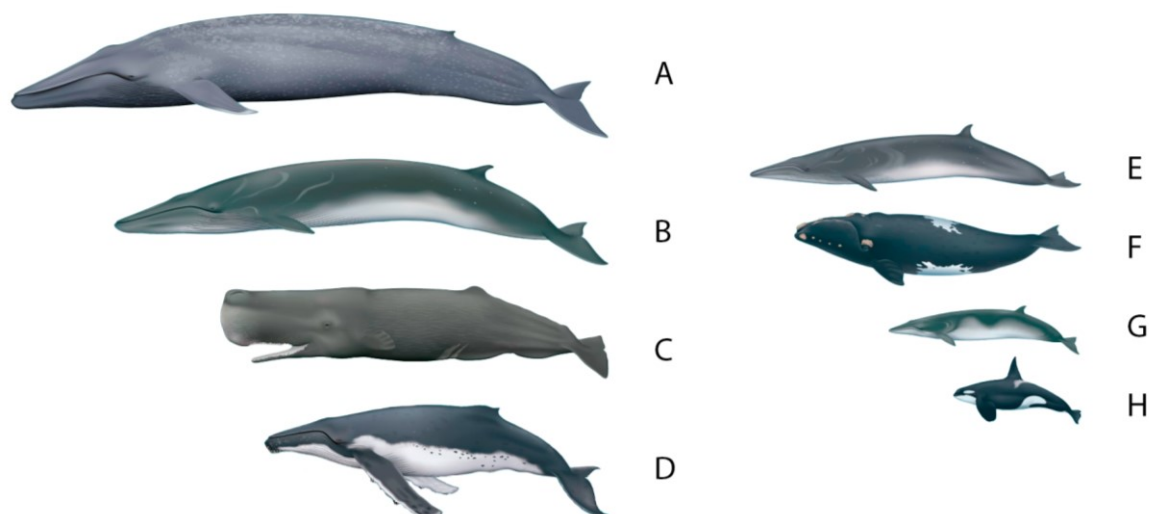
Cetáceos da Península Antártica

Cetacea é um grupo de mamíferos marinhos de vida exclusivamente aquática, ao contrário de pinípedes como focas e leões-marinhos, que são parcialmente terrestres (JEFFERSON *et al.* 2011; BERTA *et al.* 2015). Atualmente são conhecidas

mais de 90 espécies de baleias, golfinhos e botos espalhadas em todos os oceanos, incluindo a baleia-bicuda-de-Baird (*Berardius bairdii*) e a baleia-bicuda-de-Ramari (*Mesoplodon eueu*) as duas últimas espécies recém-descobertas (CARWADINE 2020; CARROLL *et al.* 2021). Para a sobrevivência em ambiente aquático, os cetáceos apresentam uma série de adaptações corporais que permitem a natação, isolamento térmico através de espessas camadas de gordura, e comunicação por sons de alta frequência, sendo utilizados também para ecolocalização (BERTA *et al.* 2015). Dois subgrupos são separados dentro da infra-ordem Cetacea, de acordo com os hábitos alimentares e seus aparelhos bucais: Mysticeti e Odontoceti. O grupo monofilético Mysticeti inclui as espécies conhecidas como baleias verdadeiras ou baleias de barbatana, assim chamadas devido ao seu aparelho bucal filtrador homônimo, utilizado para se alimentar de copépodes, krill e cardumes de peixe (CHURCHILL *et al.* 2011). Enquanto o grupo Odontoceti ou “baleias dentadas”, possui as baleias bicudas, baleias piloto, botos, toninhas, cachalotes, falsas orcas, golfinhos, orcas-pigmeus e cachalotes-pigmeus, cuja alimentação é baseada principalmente em moluscos e peixes, além das orcas (*Orcinus orca*), que possuem dieta mais diversa, incluindo aves, outros mamíferos marinhos, como focas, leões-marinhos e outras também outras baleias (BRUYN *et al.* 2013; CARWADINE 2020; PITMAN *et al.* 2011).

Das baleias verdadeiras ou de barbatana, duas famílias têm representantes na Península Antártica, sendo a maior parte das espécies pertencente à família Balaenopteridae, os rorquais, a qual inclui a baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), jubarte (*Megaptera novaeangliae*), fin (*Balaenoptera physalus*), sei (*Balaenoptera borealis*) e minke-antártica (*Balaenoptera bonaerensis*) e minke-anã (*Balaenoptera acutorostrata*). Enquanto da família Balaenidae, a única espécie encontrada na Antártica é a baleia franca do sul (*Eubalaena australis*) (LEAPER & MILLER 2011; Figura 4).

Figura 4 - Principais espécies de cetáceos encontrados na Península Antártica



Legenda: **A.** Baleia azul (*Balaenoptera musculus*); **B.** Baleia Fin (*Balaenoptera physalus*); **C.** Cachalote (*Physeter macrocephalus*); **D.** Jubarte (*Megaptera novaeangliae*); **E.** Baleia Sei (*Balaenoptera borealis*); **F.** Baleia Franca do Sul (*Eubalaena australis*); **G.** Minke (*Balaenoptera bonaerensis*); **H.** Orca (*Orcinus orca*).

Fonte: Adaptado de FRIEDLAENDER & MODEST 2018

Dentre os Odontocetos, poucas famílias são encontradas regularmente tão ao sul, incluindo Physeteridae, as cachalotes (*Physeter macrocephalus*); Ziphiidae, de difícil identificação devido à semelhança morfológica e raras aparições de baleias bicudas, como a baleia-nariz-de-garrafa-do-sul (*Hyperoodon planifrons*), a Baleia-bicuda-de-arnoux (*Berardius arnuxii*), a baleia-bicuda-de-cuvier (*Ziphius cavirostris*), a baleia-bicuda-de-layard (*Mesoplodon layardii*); e Delphinidae, que apesar de ser uma família muito diversa, no Oceano Antártico são encontrados apenas as orcas (*Orcinus orca*) e em ocasiões excepcionais, o golfinho-cruzado (*Lagenorhynchus cruciger*) (BOYD 2009; GARRIGUE *et al.* 2009; PITMAN & ENSOR 2003; PITMAN *et al.* 2011).

Boyd (2009) define como “baleias antárticas” as populações que habitam o Oceano Austral (sobretudo a frente polar) e dependem criticamente dele em parte de seu ciclo de vida, reprodução e alimentação. Algumas baleias que ocorrem na Península Antártica possuem hábitos migratórios, realizando ao longo do ano a maior migração sazonal de um mamífero (ROBBINS *et al.* 2011). Distribuindo-se ao longo do ano entre áreas de alimentação em altas latitudes envolvendo águas antárticas como rota e campos de alimentação durante o verão; e durante o inverno, movimentam-se para áreas de reprodução em baixas latitudes, onde se reproduzem

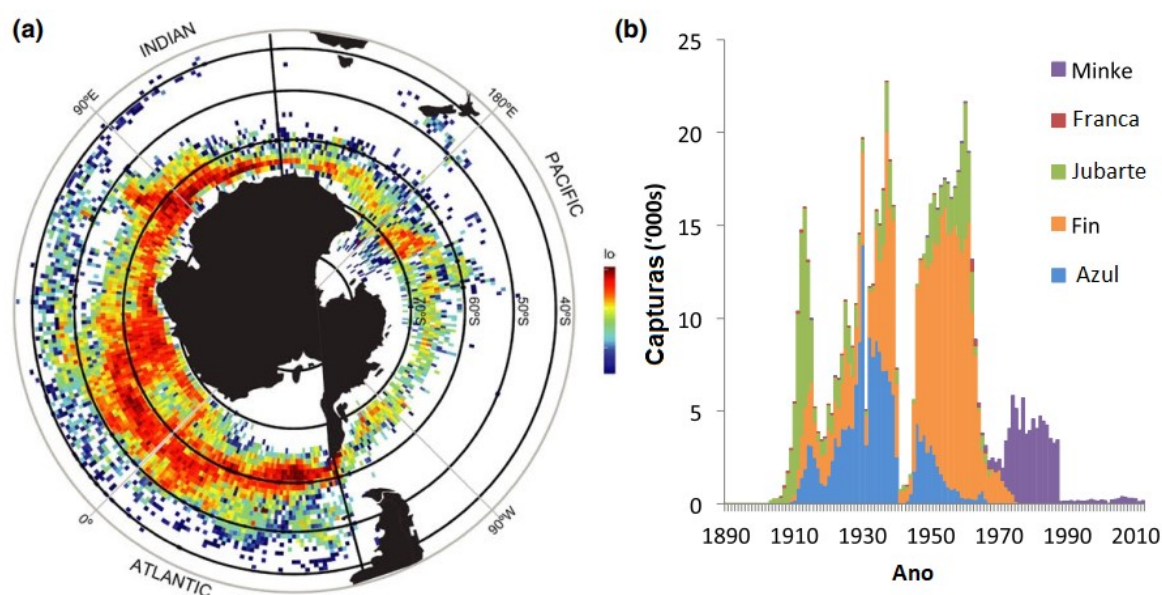
a temperaturas e condições de desenvolvimento mais amenas para os filhotes (BOYD 2009; CORKERON & CONNOR 1999). A variação da temperatura oceânica durante o ano é um fator determinante para a presença e migração de baleias para a Antártica, diretamente relacionado à disponibilidade da principal fonte de alimento na região, o krill antártico (*Euphausia superba*). O derretimento do gelo marinho durante o verão expõe grandes quantidades de krill que se acumularam abaixo das plataformas em mares congelados, liberando um estoque de alimento que compõe a base da cadeia alimentar antártica (FLORES *et al.* 2012; MCBRIDE *et al.* 2021).

Tendo como principal fonte de alimento enormes quantidades de Krill, baleias são bioacumuladoras e por isso, considerados sentinelas do ambiente marinho, desempenhando um papel importante na dispersão de nutrientes ao longo de seu processo migratório, e por isso, protegidos por lei (ONG 1998). Sendo o krill sua principal fonte de alimento, as mudanças climáticas globais influenciam as populações polares, com o derretimento de gelo marinho, acidificação da água e alteração da base alimentar e presas (TULLOCH *et al.* 2019). Além disso, a influência antrópica também oferece ameaças diretas a essas espécies (LEAPER & MILLER 2011; TIN *et al.* 2009). Na atualidade, as ameaças mais significativas são as colisões acidentais com embarcações e emaranhamento em redes de pesca (Bycatch), especialmente para espécies menores, como a baleia-minke (REEVES *et al.* 2013), apesar de não haver muitos registros de incidentes na Antártica (LEAPER & MILLER 2011). Há também a perturbação sonora de origem antrópica, gerando traumas auditivos e desorientação ao mascarar a vocalização, que podem resultar em estresse fisiológico e até mesmo encalhes (REEVES *et al.* 2014).

Nem sempre as perturbações acidentais foram as principais ameaças enfrentadas por essas espécies. Além da ação antrópica indireta e acidental, as atividades humanas já foram principal ameaça a essas populações, durante o período no qual a caça era permitida e mesmo após a proibição, com a caça ilegal (THOMAS *et al.* 2016). A partir do início da caça comercial de baleias, vários estoques antárticos passaram a estar sob estresse populacional, levando à quase extinção de diversas espécies de baleias (TRATHAN & REID 2009; TIN *et al.* 2009). Algumas populações têm mostrado sinais de recuperação desde o final do período de exploração baleeira, enquanto outras permanecem esgotadas, com números muito baixos e podem ser vulneráveis à extinção (CLAPHAM *et al.* 1999). Uma das espécies com maior sucesso na recuperação populacional é a baleia-jubarte do hemisfério sul, que têm

apresentado franca recuperação e atualmente são listadas pela IWC como espécie menos preocupante (REILLY *et al.* 2008; FLEMING & JACKSON 2011; STEEL *et al.* 2017; THOMAS *et al.* 2016). Ao passo que outras espécies apresentam uma recuperação bem mais lenta e conturbada, como a baleia-azul antártica (BRANCH 2004, 2007; LEAPER & MILLER 2011), a baleia-franca-do-sul (JACKSON *et al.* 2020) e a cachalote (WHITEHEAD & SHIN 2022) (Figura 5). Estas tiveram sua recuperação fortemente prejudicada pelas atividades ilegais desenvolvidas pela União Soviética, entre 1948 e 1972, que retraiu a recuperação destas espécies ao remover grande parte da população reprodutiva (TORMSOV *et al.* 1998; IVASHCHENKO & CLAPHAM 2014).

Figura 5 - Capturas históricas de baleias ao redor do continente Antártico



Legenda: (a) Mapa de capturas na região circumpolar com destaque para as áreas de intensa atividade baleeira (em vermelho); (b) Gráfico que relaciona o total de capturas por espécie ao longo do tempo, entre 1890 e 2015.

Fonte: Adaptado de TULLOCH *et al.* 2019.

Apesar de ser signatária da IWC para a regulamentação da caça à baleia em 1946, a ex-União Soviética conduziu uma campanha de 30 anos de operações baleeiras ilegais (IVASHCHENKO & CLAPHAM 2014). Os baleeiros da então União Soviética ignoraram as restrições e limites de captura, espécies protegidas, áreas operacionais e outras regras definidas em vários momentos pela Comissão. No mesmo ano de assinatura do regulamento, os baleeiros soviéticos expandiram suas

atividades até a Antártica, onde passaram a registrar quase 30% de todas as capturas realizadas na região, declarando apenas 18% (BULKELEY 2011; TØNNESSEN & JOHNSEN 1982; ALLISON 2011). Em 1972, um conjunto de observadores internacionais foi introduzido para regular as atividades baleeiras e com isso as capturas cessaram. Ainda assim, algumas falsificações dos dados de captura continuaram em algumas frotas soviéticas, omitindo e adulterando números dos espécimes capturados, ao incluir como cachalotes e jubartes machos de grande porte as capturas de múltiplas fêmeas pequenas (MIKHALEV *et al.* 2009; IVASHCHENKO *et al.* 2011). O total de capturas na Antártica foi de aproximadamente 338.336 baleias, das quais apenas 185.778 foram relatados (IVASHCHENKO *et al.* 2011). Os estoques antárticos mais prejudicados pelas atividades não declaradas foram as cachalotes, seguida pela baleia sei, jubarte, fin e minke (IVASHCHENKO & CLAPHAM 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 – Capturas totais estimadas das frotas baleeiras soviéticas na Antártica entre 1946 e 1986, por espécie de acordo com a contabilidade mais recente da IWC, de 21 de maio de 2012

Espécies	Capturas reportadas	Estimativa do número real de capturas	Relação entre capturas reportadas/estimativa do número real
Azul	3.651	13.035	3,57
Fin	52.931	44.960	-1,16
Cachalote	74.834	116.147	1,55
Jubarte	2.710	48.721	17,9
Sei	33.001	59.327	1,79
Minke	17.079	49.905	2,92
Bryde	19	1.468	77,2
Franca	4	3.368	842
Outras	1.539	1.405	-1,09
Total	185.768	338.336	1,82

Fonte: Adaptado de Ivashchenko & Clapham 2014

Atividade baleeira na Baía do Almirantado e vestígios na atualidade

As intensas atividades baleeiras no hemisfério sul rapidamente exauriram as populações de diferentes espécies de baleias, que ainda hoje se encontram em processo de recuperação (CLAPHAM *et al.* 1999). Sem qualquer regulamentação, as capturas eram limitadas apenas pela capacidade logística dos navios e pela distância das estações de processamento, conforme a abundância de animais na região (KITTEL 2001). Do início das atividades até o começo do século XX, as baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) eram as mais caçadas e foram as primeiras a terem suas populações exauridas (TRATHAN & REID 2009). Na segunda metade do século XIX, as baleias-francas também se tornaram escassas no hemisfério sul e a caça de rorquais (Balenopterídeos) começou a dominar o Oceano Austral (JACKSON *et al.* 2008). Com a implementação de avanços tecnológicos, a captura de animais maiores e mais velozes passou a ser possível. Assim, baleias-azuis (*Balaenoptera musculus*), fin (*Balaenoptera physalus*) e sei (*Balaenoptera borealis*) passaram a ser as espécies mais caçadas, uma vez que as jubarte apresentavam uma queda populacional brusca após anos de caça, além do fato de que animais maiores rendiam maior volume de óleo e carne por captura (TØNNESSEN & JOHNSEN 1982; CLAPHAM & BAKER 2018).

O surgimento e uso do motor a vapor nas embarcações foi um ponto determinante nessa transição, pois tornou possível acompanhar a velocidade dessas espécies que, combinado ao uso de arpões explosivos, passou a ser um método de abate eficaz para animais de porte grande como os rorquais. Além dos avanços tecnológicos da época, o refinamento de técnicas de caça em si também teve sua parte na mudança de espécies exploradas. Animais maiores apresentavam um arraste dispendioso até as unidades de processamento, com risco de perda da carcaça, uma vez que afundavam com o peso. Como solução, os baleeiros desenvolveram a técnica de injeção de ar comprimido na cabeça após o abate, a fim de evitar que afundassem e se perdessem (CAMPBELL 1992; TERESIŃSKI 1947). Contudo, a área de caça ainda era limitada pela distribuição dos animais, havendo a necessidade de uma estação de processamento próxima, em terra firme, nos polos baleeiros como as Ilhas Deception e Geórgia do Sul (DIBBERN 2010; JACKSON *et al.* 2020). A caça pelágica tornou-se possível a partir de 1912, após o surgimento dos

navios-fábrica em meados de 1905 (TØNNESSEN 1970), que suplantaram a necessidade de processamento longe da costa (TRATHAN & REID 2009).

Pouco se sabe sobre a presença de cetáceos na Baía do Almirantado durante o período baleeiro na Antártica. Apesar de não haver qualquer registro ou vestígio de instalações baleeiras no local, nem da região ser extensivamente frequentada por alguma espécie de baleia, a ocorrência dessas atividades é evidente diante da quantidade de remanescentes ósseos encontrados nas praias. Kittel (2001) discute a disposição de cerca de 175 fragmentos ósseos e das diversas relíquias arqueológicas encontradas na Baía do Almirantado, relacionando-as com atividades e técnicas de caça utilizadas durante os anos de caça comercial. As várias ossadas encontradas nas praias sugerem que os animais poderiam ter sido arrastados para a costa e lá processados, o que não seria possível sem instalações apropriadas para o processamento das carcaças (KITTEL 2001). Além disso, levando em consideração a posição de deposição dos crânios, que é mais comumente observada apoiada no lado dorsal e com sua parte traseira voltada para o mar, seria uma posição inadequada para o processamento em terra, já que o arraste era feito pelo pedúnculo caudal (KITTEL 2001).

Contudo, assim como o motor a vapor, o surgimento das primeiras fábricas flutuantes marcou o início das atividades na Baía do Almirantado, com a chegada do navio-fábrica norueguês, Admiralen, e outros navios baleeiros em 1905 (ADIE & BASBERG 2009; CAMPBELL 1992; HACQUEBORD 1992; RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1998; TØNNESSEN 1970) (Figura 6). A partir de então, a maior parte dos processamentos de baleias capturadas nas proximidades da Ilha Rei George passou a ser ligado à Baía do Almirantado (KITTEL 2000), até a imposição de proteção contra a caça durante a década de 1960, pela International Whaling Commission (IWC) (TØNNESSEN & JOHNSEN 1982; CLAPHAM & BAKER 2018). No entanto, não há dados informativos quanto às espécies de baleias processadas na região. Quando a Baía do Almirantado passou a ser um ponto importante para o processamento dos indivíduos abatidos, as baleias azuis já eram os alvos mais comuns, no entanto, não há qualquer registro de presença dessa espécie no presente ou passado nas enseadas locais. Por essa razão, os vestígios encontrados na região podem ser uma fonte única de informações históricas sobre o período baleeiro na Baía do Almirantado, e biológicas, como a diversidade de espécies local, padrões de migração e variação genética das populações de baleias do hemisfério sul pré e pós bottleneck

causado pela superexploração (JACKSON *et al.* 2008; LINDQVIST 2009). Nesse contexto, compreender quais espécies compõem a gama de ossadas encontrada na Baía do Almirantado seria de grande valor para entender sobre a história baleeira na região e o padrão de recuperação das espécies a ela relacionadas.

Figura 6 - Navio-fábrica Admiralen, aportado em Seattle



Fonte: Adie & Basberg, 2009.

Desafios na identificação dos vestígios de cetáceos

Os vestígios do período baleeiro encontram-se expostos às intempéries naturais desde o momento da sua deposição até a atualidade, fazendo com que a maior parte das peças ósseas tenham sido quebradas ou parcialmente soterradas. Além da degradação natural, os ossos de baleias eram manipulados e processados, sendo utilizados como combustível para fogueiras ou feitos de objetos diversos, como bancos ou degraus (VIEIRA 2020), assim como o próprio processo de obtenção do

óleo incluía a fervura dos ossos (TØNNESSEN & JOHNSEN 1982). Por essa razão, nem sempre é possível realizar a identificação morfológica de ossadas deformadas ou reduzidas a pequenos fragmentos. Porém, para realizar a identificação de espécies nesse tipo de material é possível recorrer às análises moleculares.

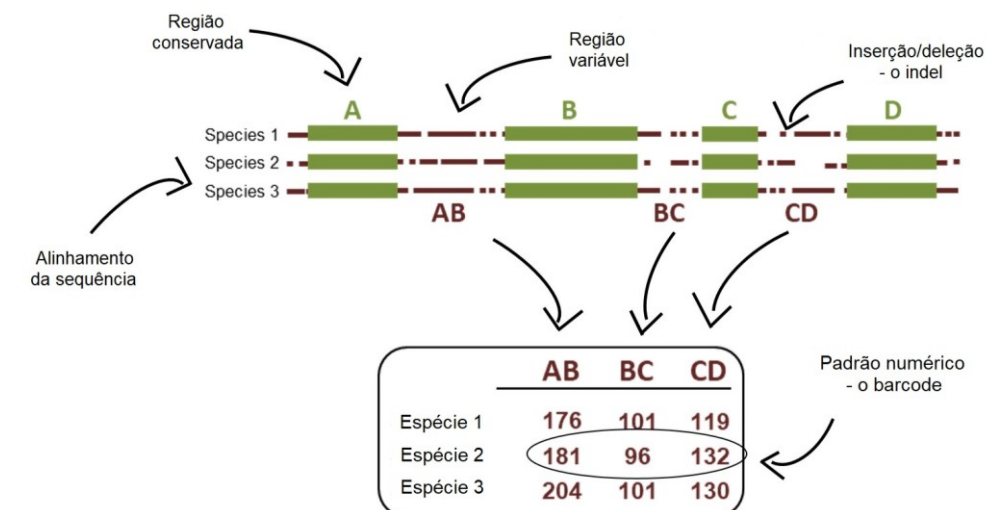
Trabalhos envolvendo extração e análises de DNA antigo (aDNA) têm se tornado cada vez mais comuns (WILLERSLEV & COOPER 2005; LINDQVIST *et al.* 2009; WELLMAN *et al.* 2017; ORLANDO *et al.* 2021; REN *et al.* 2022). Como moléculas orgânicas, uma vez fora do organismo não se espera que os ácidos nucleicos mantenham sua integridade por muito tempo, sendo rapidamente degradados em condições ambientais (WILLERSLEV *et al.* 2004). De modo que a integridade do aDNA está intimamente ligada ao tipo de ambiente de deposição das amostras e suas diversas condições. Ossos antigos e encharcados por longos períodos de tempo apresentam grandes desafios para análises moleculares, visto que quanto mais longo o tempo de submersão da peça óssea, maior a perda de compostos orgânicos (CARTOZZO *et al.* 2018). Entretanto, as moléculas de DNA apresentam um maior tempo de sobrevivência em ambientes frios como a Antártica, onde passam grande parte do tempo congeladas, permanecendo preservadas a baixas temperaturas (WILLERSLEV *et al.* 2004). Ainda assim, as taxas de sucesso na obtenção de DNA desse tipo de amostra são imprevisíveis, com um reduzido número de cópias, de integridade limitada a poucas centenas de pares de base após o período de exposição ambiental (BORGE *et al.* 2007; SMITH *et al.* 2001; LAMBERT *et al.* 2002; WILLERSLEV *et al.* 2004). Isso faz com que a ação de contaminantes torne-se ainda mais nociva à amostra durante todos os processos, sobretudo na etapa de extração, já que o DNA de microrganismos e até mesmo de quem manipula a amostra pode ser muito mais abundante que o da amostra, em caso de contaminação. Por essa razão, análises moleculares envolvendo material antigo exige rigor especial, desde a manipulação da amostra à escolha de ferramentas/técnicas moleculares a serem utilizadas (COURT 2021; POINAR & COOPER 2000).

Identificação molecular de cetáceos

Dentro das análises moleculares, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido amplamente utilizado para diversos fins. Seu número de cópias por célula é consideravelmente maior em comparação ao DNA nuclear, aumentando a chance de obter-se uma molécula viável de DNA em amostras degradadas/envelhecidas, através dos processos de extração (HANDT *et al.* 1994; WIESNER *et al.* 1992). Fitas leves e pesadas constituem a maior parte da molécula de mtDNA, de acordo com a distribuição de nucleotídeos em cada área, que consiste em 37 genes codificantes de RNAs ribossomais e transportadores relacionados à produção de adenosina trifosfato, citocromos, entre outros; e regiões não codificantes, como o D-loop (COURT 2021). Juntamente ao *cytB* e ao gene que codifica a subunidade I da citocromo c oxidase (COI), são as mais utilizadas como marcadores mitocondriais em estudos de diagnóstico molecular relacionados a cetáceos, seguidos pelo 16S-rRNA, utilizado principalmente na identificação de materiais esperadamente degradados (ALTER & PALUMBI 2009; DALEBOUT *et al.* 2004; LINDQVIST *et al.* 2009). Apesar de algumas espécies apresentarem dificuldades na identificação baseada apenas em regiões barcoding, quando utilizados corretamente, o uso de marcadores mitocondriais pode ser uma ferramenta molecular valiosa na identificação de cetáceos (HOOKER *et al.* 2019; SILVA *et al.* 2021).

Além do uso de marcadores mitocondriais na identificação de amostras degradadas, nas últimas décadas a técnica forense *SpInDel* tem sido utilizada para identificar espécies com base em polimorfismos de inserção e deleção (InDels) (ALVES *et al.* 2017; AMARAL *et al.* 2015, 2017; CARNEIRO *et al.* 2012; SKUZA *et al.* 2020). Esse tipo de análise permite identificar espécies com base no padrão numérico gerado a partir do comprimento de fragmentos contendo polimorfismos raros do tipo InDel, dentro de regiões hipervariáveis do DNA (PEREIRA *et al.* 2010) (Figura 7).

Figura 7 - Esquema das análises SpInDel, representando as regiões hipervariáveis e o comprimento das regiões considerando as variações associadas às inserções e deleções dentro dela



Legenda: Ilustração do alinhamento de sequência para três espécies hipotéticas. Quatro regiões conservadas (caixas verdes) definem três domínios hipervariáveis (linhas marrons pontilhadas). Cada espécie é identificada por um número perfil resultante da combinação de comprimentos em regiões hipervariáveis.

Fonte: adaptado de Pereira *et al.* 2010.

Seu uso em regiões maiores, em DNA mais íntegro, permite também realizar a identificação sem a necessidade de sequenciamento. Com o uso de primers em multiplex das regiões onde se localizam os InDels, a diferença do padrão de tamanhos das regiões é visivelmente distinguível num gel de agarose ou poliacrilamida, permitindo assim a identificação da espécie.

Motivação e caracterização do problema

Diante do grande número de ossos de baleia encontrados na Baía do Almirantado, sobretudo na Península Keller, a ausência de trabalhos de identificação de espécies deixa uma lacuna na compreensão da história e da ecologia do local. Se por um lado a identificação morfológica desse material pode ser inviável, métodos moleculares surgem como uma ferramenta para a identificação destes vestígios degradados. Mesmo assim, após o longo período de deposição, foram realizados trabalhos de inventário desses ossos (KITTEL 2001), porém nunca de identificação

molecular, como Lindqvist e colaboradores (2009) realizaram e na Geórgia do Sul, um dos epicentros da exploração baleeira.

Desse modo, o presente trabalho almeja realizar a primeira identificação molecular desses ossos do período baleeiro no século XX, comparando os resultados obtidos com a literatura sobre o histórico da caça na localidade, a fim de discutir a relação dessas atividades entre as espécies encontradas nas amostras e as que ainda são encontradas ainda hoje habitando a Baía do Almirantado e áreas próximas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Este projeto de pesquisa tem como objetivo geral investigar a possibilidade da utilização de técnicas moleculares para a identificação de fragmentos ósseos do período de exploração baleeira da Antártica, ainda encontrados depositados nas praias da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.

1.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, o presente trabalho contempla:

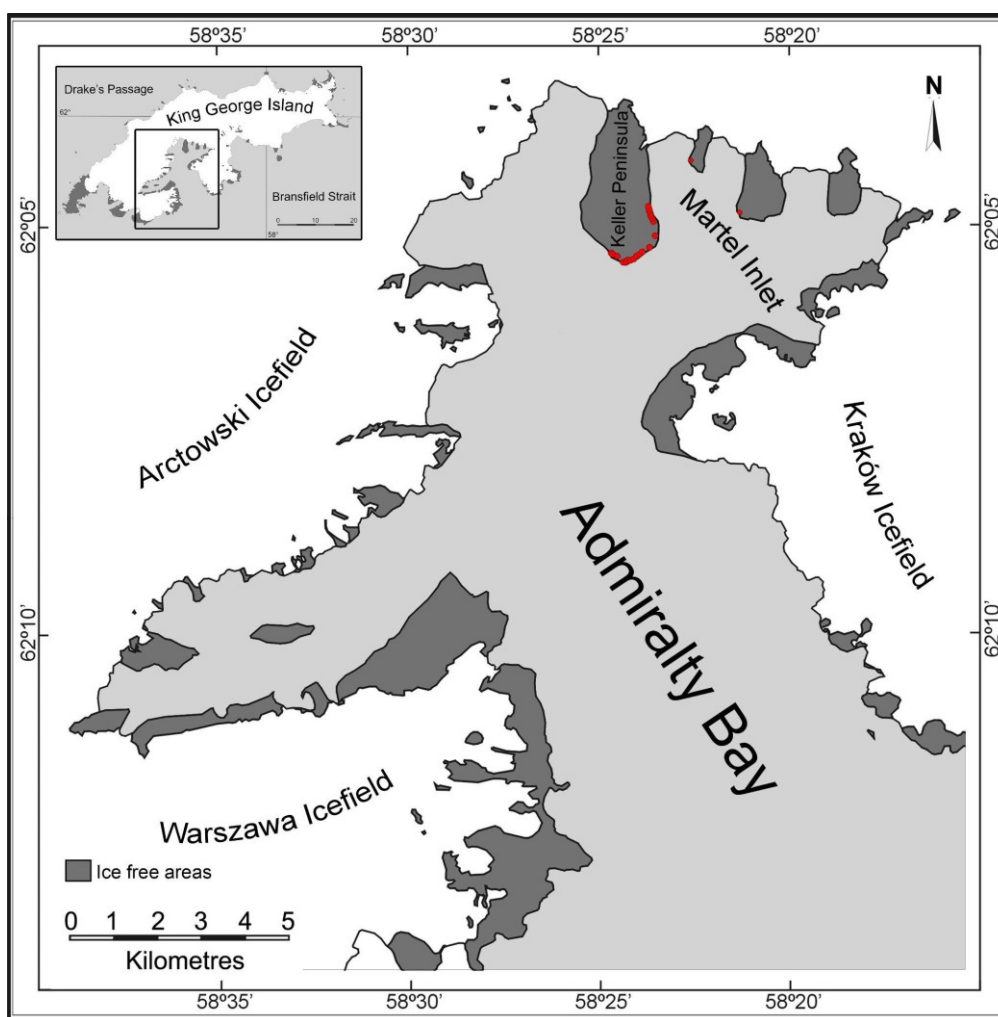
- a) Coletar amostras de fragmentos ósseos de cetáceos depositados na Península Keller, Baía do Almirantado, próximos à Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz;
- b) Realizar a extração de DNA, quantificação do material extraído e, quando possível, a identificação molecular do material baseado em técnicas de identificação molecular de espécies;
- c) Comparar os resultados obtidos com os dados históricos e registros do período baleeiro na região.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Durante o verão austral de 2021-2022, foram realizadas coletas ao longo da Península Keller, em Punta Ullman, Geleira Wanda e Ponta Stenhouse, na Ilha Rei George, Antártica, sob o apoio do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). A escolha dos sítios de deposição das ossadas seguiu o trabalho de Kittel (2001). Os locais de amostra são encontrados no mapa da Baía do Almirantado, confeccionado com o software QGIS 3.22.8 (Figura 8).

Figura 8 – Mapa da Baía do Almirantado, pontos de coleta plotados em vermelho



Fonte: autora, 2023.

As amostras consistiram em substrato contendo fragmentos ósseos relacionados a 38 peças craniais de cetáceos depositadas nas praias durante o período baleeiro, isto é, com cerca de 100 anos desde sua deposição (Figura 9). Além dos occipitais, material de costelas e vértebras também foi coletado, a fim de comparar a preservação do DNA em diferentes tipos de ossos. Para realizar as coletas, foram utilizadas pinça com ponta achatada, broca metálica e martelo geológico, higienizados em campo entre as coletas com hipoclorito 2% e álcool 70%. De cada peça foi coletado em triplicata, contendo material suficiente para preencher um tubo de 1,5μL

Figura 9 - Coletas na Península Keller



Legenda: a. Baleia de Jacques Cousteau, ainda congelada no início do verão; b. Coleta ao longo da Península Keller (amostra B25); c. Perfil do material fragmentado, coletado junto a solo; d. Amostra B13, côndilo occipital taxonomicamente indistinguível.

Fonte: Cesar Amaral, 2022.

2.2 Processamento inicial das amostras

O processamento inicial das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da EACF, desde o isolamento dos fragmentos, à extração e quantificação do DNA obtido. Os fragmentos ósseos foram isolados do sedimento e reduzidos, macerando ou perfurando os fragmentos para acessar as partes mais internas do osso (Figura 10). Para os processos de extração, alíquotas de 350 mg de cada amostra foram submetidas a dois métodos de extração: o kit de extração e purificação por coluna ExtractMe Total Kit DNA/RNA blirt®; e extração orgânica por fenol/clorofórmio.

Figura 10 - Amostra de sedimento contendo fragmentos ósseos

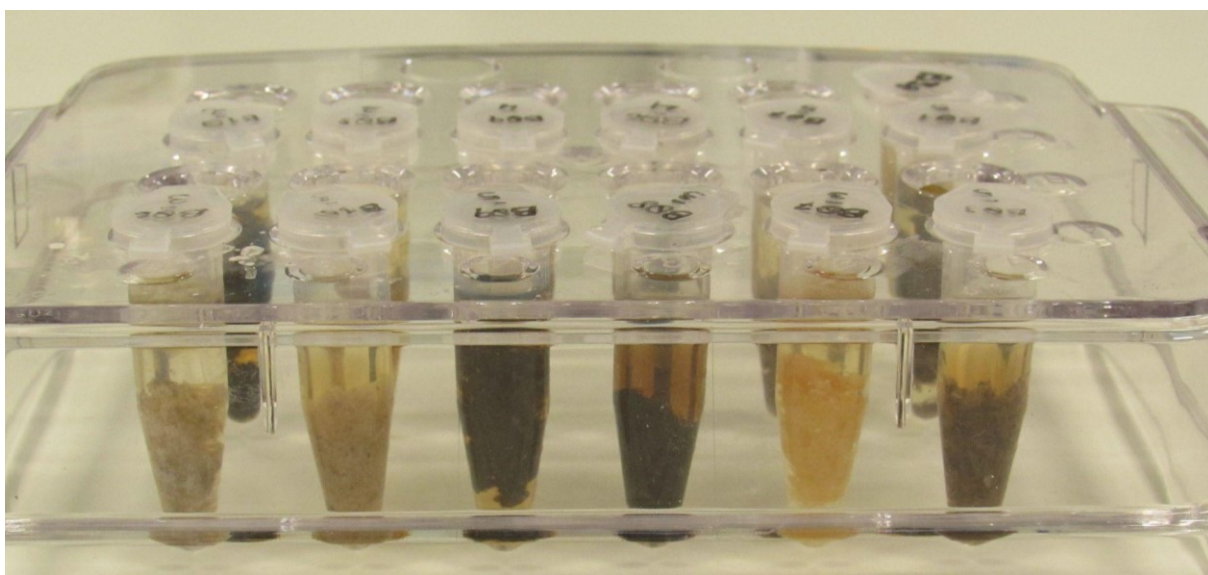


Legenda: Destacados em vermelho, fragmentos de osso alvejados para o isolamento.
Fonte: autora, 2022.

2.2.1 Extração e purificação com kit ExtractMe Total Kit DNA/RNA blirt®

No método de extração e purificação por coluna, as alíquotas das amostras foram submersas em 600 μ L de tampão de lise RLys Buffer e inicialmente vortexados por 1 min, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após alguns testes, foi optado por estender o tempo de incubação no tampão e manter a uma temperatura mais elevada, adequada para a ação de lise. Desse modo, a etapa inicial de digestão foi alterada, removendo a agitação no vórtex e mantendo a amostra no tampão ao longo da noite (overnight) à 56 °C, em mesa agitadora Eppendorf® ThermoMixer® C (Figura 11). Após isso, seguiu-se o protocolo sem alterações nas etapas posteriores.

Figura 11 - Amostras após o período de incubação



Fonte: autora, 2022.

O produto da lise foi então centrifugado e o sobrenadante, transferido para um novo tubo, onde seriam adicionados 600 μ L de etanol 70% e misturados. A mistura obtida foi transferida em duas rodadas para a coluna de purificação junto a um tubo coletor, esvaziado entre as centrifugações e trocado no final da segunda rodada. Com o material genético e os resíduos concentrados no filtro, duas etapas de limpeza foram realizadas: a primeira adicionando 700 μ L de tampão RW1, após a centrifugação o filtrado foi descartado e o tubo coletor foi reutilizado para a segunda etapa, na qual foram realizadas duas rodadas adicionando 500 μ L de tampão RW2. O tampão RW2

contém álcool, o que poderia reduzir a eficiência na eluição do DNA ao fim do processo de extração, portanto, foi realizada uma centrifugação sem adição de reagente para remover resíduos do tampão de lavagem. Por fim, a coluna de purificação foi encaixada num tubo de 1,5 mL e o DNA contido no filtro foi ressuspendido e eluído em 50 µL de tampão REB. O DNA obtido nesse processo foi quantificado em espectrofotômetro Multiskan SkyHigh Microplate®. Todos esses processos foram realizados em até 48h após a coleta, tendo as amostras permanecido congeladas até o início do processo de extração, no laboratório de biologia molecular da EACF.

2.2.2 Extração orgânica por Fenol/Clorofórmio

Além do kit descrito acima, foi testado o protocolo de extração de DNA através da extração orgânica com Fenol/Clorofórmio. Para tal, amostras foram selecionadas de acordo com os resultados obtidos através dos primeiros testes de extração com kit. Nesse processo, as alíquotas das amostras foram eluídas em mistura de 500 µL de tampão de lise, 15 µL de Proteinase K e 15 de DTT µL, e assim incubadas ao longo da noite, também em mesa agitadora à 56 °C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e, em capela, adicionados 450 µL de fenol-clorofórmio. As amostras foram vertidas para misturar o lisado e os reagentes. Após a centrifugação, das duas fases bem definidas e formadas, apenas a fase superior foi coletada (~450 µL) e transferida para um novo tubo de 1,5µL, descartando a fase restante. No novo tubo com o lisado, 800 µL de etanol absoluto e 60 µL de NaCl 5M foram adicionados e a mistura, mantida no congelador por 1 hora. Após outra centrifugação de 15 minutos, com a formação de um pellet no fundo, o sobrenadante era descartado, mantendo o tubo em descanso para a evaporação de resíduos de álcool e resíduos que poderiam interferir na pureza da amostra. Por fim, o pellet foi ressuspendido em 50 µL de água RNase free.

Esse segundo processo, por sua vez, foi realizado no Núcleo de Genética Molecular Ambiental e Astrobiologia (NGA - UERJ) e no Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD - UERJ), assim como as demais análises moleculares. O DNA obtido

através da extração orgânica foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific®).

2.3 Marcadores moleculares

Em estudos moleculares envolvendo cetáceos, diversos marcadores são comumente utilizados na distinção de espécies, tais como o COI, o 16S rRNA, o cytB e o D-Loop. Neste estudo, foram selecionados dois marcadores mitocondriais amplamente utilizados na identificação molecular de espécies de cetáceos: a região barcoding do gene COI (6475:7126), que compreende as primeiras 650 pares de base (pb) do gene que codifica a subunidade I da citocromo C oxidase; e o RNA ribossomal 16S (2974:3546).

As regiões alvo foram então amplificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers para o gene COI (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'/5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3') (WARD *et al.* 2005) e para 16S rRNA (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'/5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (MILINKOVITCH 1994; PALUMBI 1991, 1996). Além de fragmentos menores do 16S (~300 pb) para a SpInDel, utilizando os primers flanqueadores das regiões de interesse, confeccionados pela autora (Mais detalhes em 3.8).

2.4 Amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR)

As amostras extraídas foram aliquotadas e, quando necessário, diluídas para a concentração de trabalho a 5 ng/μL. Das alíquotas de trabalho, foram utilizados para a reação de PCR: 2 μL do DNA obtido, adicionado a um mix de 5 μL de Taq do PCR Master Mix Kit (Qiagen®), 1 μL de cada primer [10 μM] e 1 μL de água RNase free, tendo como volume final 10 μL por amostra.

A termociclagem foi realizada utilizando uma Eppendorf Mastercycler personal e uma GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®), no NGA - UERJ. O

protocolo de termociclagem para o 16S e o COI seguiu: 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 52°C e 1 minuto a 72°C, com uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos das reações de PCR foram corados com corante não mutagênico Safer (KASVI®) e separados por eletroforese em gel de agarose 2%, imerso em tampão Tris-Acetato-EDTA, sob tensão média de 110V por 30 minutos, para controle de qualidade e tipagem do multiplex. A visualização foi feita em transiluminador blueBox® Pro. Como controle positivo das amplificações foi utilizado tecido epitelial de baleia jubarte.

2.5 Purificação e sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados através da enzima ExoSAP-IT® (USB Corporation), em incubação por 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C, onde foram utilizados 5 µL do produto da amplificação e 2 µL da enzima.

Após a primeira etapa de purificação, foi realizado o sequenciamento Sanger das amostras para cada fita da dupla, senso e antisenso. A reação de sequenciamento utilizou 1 µL de BigDye® Terminator Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems), 1 µL de tampão BigDye, 1 µL do primer [10 µM] e 3,5 µL do produto purificado. A termociclagem da reação de sequenciamento seguiu 25 ciclos de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Após o sequenciamento, na segunda etapa de purificação para remover os nucleotídeos não utilizados e que poderiam influenciar na visualização da sequência, foi utilizada a resina Sephadex® G-50. Preparada com 750 µL de Sephadex® G-50 (solução de 10g em 150mL de água Milli-Q) aplicados em coluna de purificação acoplada em tubo de 1,5 mL e centrifugada a 8000 rpm por 90 segundos para desidratação (Centrífuga Centrimicro 242 – FANEM®). Após a centrifugação, o filtrado foi descartado e foi repetida a centrifugação, concluindo assim a etapa de formação da coluna. Então, a coluna formada foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL onde 10 µL do produto do sequenciamento seria adicionado bem no centro da mesma, sendo novamente centrifugadas a 8000 rpm por 180 segundos.

O produto final purificado de 6,5 µL foi adicionado a 10 µL de formamida (Hi-Di Formamide®, Applied Biosystems), para catalisar a reação, e estes foram aplicados

na placa de sequenciamento de 96 poços. A leitura foi realizada por eletroforese capilar em condições desnaturantes, utilizando o sequenciador automático ABI Prism 3500® (AppliedBiosystems), preenchido com polímero POP-7® (AppliedBiosystems).

2.6 Análises das sequências

Os resultados da eletroforese capilar foram analisados através do software Sequencing Analysis 3.7 (AppliedBiosystems) para a determinação da qualidade das sequências obtidas. As sequências foram editadas e alinhadas pelos parâmetros padrões de MUSCLE, no software GENEIOUS v6.1 (KEARSE *et al.* 2012; EDGAR 2004). Para a identificação preliminar, as sequências consenso foram alinhadas com as sequências referência de espécies relacionadas, recuperadas do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank, usando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997). Posteriormente, um banco de dados foi construído utilizando sequências obtidas do NCBI GenBank das espécies de cetáceos encontradas na Península Antártica (*Balaenoptera acutorostrata*, *Balaenoptera borealis*, *Balaenoptera musculus*, *Balaenoptera physalus*, *Eubalaena australis*, *Megaptera novaeangliae*, *Physeter macrocephalus* e *Orcinus orca*), juntamente às sequências geradas, que foram depositadas no mesmo banco de dados (Tabela 2).

Tabela 2 – Números de acesso das sequências publicadas anteriormente no Genbank e utilizadas nas análises

Espécie	Nº de acesso	Espécie	Nº de acesso
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	MT410935	<i>Balaenoptera physalus</i>	KV572860
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	AP006468	<i>Eubalaena australis</i>	OP205178
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	NC00527	<i>Eubalaena australis</i>	OP205179
<i>Balaenoptera borealis</i>	MF409248	<i>Eubalaena australis</i>	OP205180
<i>Balaenoptera borealis</i>	MF409249	<i>Eubalaena australis</i>	AP006473
<i>Balaenoptera borealis</i>	AP006470	<i>Megaptera novaeangliae</i>	U13117
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257891	<i>Megaptera novaeangliae</i>	MF409246

Espécie	Nº de acesso	Espécie	Nº de acesso
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	MT410935	<i>Balaenoptera physalus</i>	KV572860
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	AP006468	<i>Eubalaena australis</i>	OP205178
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257892	<i>Megaptera novaeangliae</i>	PP475430
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257894	<i>Megaptera novaeangliae</i>	AP006467
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257896	<i>Physeter macrocephalus</i>	KU891393
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257900	<i>Physeter macrocephalus</i>	KU891394
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257903	<i>Physeter macrocephalus</i>	MT410874
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257908	<i>Physeter macrocephalus</i>	U13119
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257909	<i>Physeter macrocephalus</i>	NC002503
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257910	<i>Orcinus orca</i>	GU187211
<i>Balaenoptera physalus</i>	U13103	<i>Orcinus orca</i>	GU187215
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572854	<i>Orcinus orca</i>	GU187217
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572857	<i>Orcinus orca</i>	GU187218
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572858	<i>Orcinus orca</i>	GU187219
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572859		

2.7 Identificação de espécies

As árvores filogenéticas foram construídas com base no banco de dados construído analisadas utilizando o software MEGA X 10.2.6 (KUMAR *et al.* 2018). O método de Neighbor-Joining foi empregado para inferir a identificação das espécies (SAITOU & NEI 1987). O suporte dos nós foi avaliado através da técnica de bootstrap (x 1000 réplicas) (FELSENSTEIN 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parameters (K2P - KIMURA 1980) e estão apresentadas em número de substituições de bases por local. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR *et al.* 2018).

A identificação molecular foi verificada utilizando o método de Máxima Verossimilhança e modelo de substituição nucleotídica General Time Reversible (GTR

- NEI & KUMAR 2000), realizada no MEGA X (KUMAR *et al.* 2018) utilizando o critério AKAIKE. O grau de suporte foi avaliado utilizando o teste bootstrap (x1000 réplicas)(FELSENSTEIN 1985) Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxas evolutivas entre locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,2930)). O modelo de variação da taxa permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 41,84% sítios) (GTR+G+I). Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas.

2.8 SpInDel

A maioria dos métodos de identificação molecular de espécies utiliza diferenças presentes nas sequências pareadas, ou seja, entre as sequências de consulta e de referência (DNA barcoding). O método de identificação de espécies por InDels permite a diferenciação pela determinação do comprimento de sequências hipervariáveis, contento múltiplas inserções e deleções. Essas regiões encontram-se intercaladas com regiões altamente conservadas, que apresentam nenhuma ou baixa variabilidade (PEREIRA *et al.* 2010). Com base nessas características, foram selecionadas regiões hipervariáveis de interesse, para a avaliação da possibilidade de identificação molecular das amostras através do método SpInDel, regiões conservadas, para o design de primers flanqueadores.

Para a análise SpInDel *in silicio*, foram selecionadas e testadas três regiões curtas, contendoras de polimorfismos tipo Indel, utilizando o software SpInDel WorkBench v3 (CARNEIRO *et al.* 2012). As regiões foram selecionadas no gene mitocondrial 16S rRNA, com perfis de InDel suficientemente diferentes a fim de distinguir as espécies de interesse (ANJOS *et al.* 2023a).

Para os testes com amostras, foi desenhado um trio de pares (B1, B2 e B3) para amplificação em multiplex, com base nas regiões anteriormente selecionadas nas análises *in silico*. Os primers produzidos foram testados nas amostras B13 (Kit), B23 (Fenol) e tendo como controle positivo, a amostra J1 (tecido de jubarte). O protocolo de amplificação seguido na reação multiplex foi o mesmo utilizado para o singleplex de 16S ar/br, assim como a visualização da qualidade de amplificação foi feita em gel de agarose 2%.

A confecção do kit de primers utilizados em multiplex na identificação de cetáceos antárticos, foi realizada com base nos alinhamentos de sequências de mtDNA das espécies alvo, obtidas do banco de dados GenBank. A designação das regiões flangeadoras foi feita de acordo com as análises *in silico* supracitadas, no SpInDel WorkBench v3. Para incluir a última região de InDel no amplicon do final do gene 16S, o início do tRNA-Leu foi utilizado como terminal. Desse modo, o multiplex compreendeu três regiões de ~300 pb do 16S e seu tRNA adjacente, que codifica o aminoácido Leucina. Os parâmetros dos primers foram analisados e ajustados utilizando a ferramenta OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), com os parâmetros ajustados para: conteúdo GC 40-60%; TmA 56°-64°C; tamanho 15-20 pb, evitando regiões com poli-A e poli-G.

3 RESULTADOS

3.1 Extração e Quantificação do DNA

O processo de extração utilizando o protocolo padrão do Kit ExtractMe Total DNA/RNA® falhou em obter DNA das amostras ósseas, com concentração de ácidos nucleicos baixa ou nula. Pelo fato de se tratarem de amostras consideradas desafiadoras, antigas e com longo tempo de exposição às duras condições ambientais antárticas, foram realizados novos testes. Após os resultados preliminares foi realizada a alteração da metodologia de extração, conforme descrito na Seção 3.2.1, através da qual, aumentando o período de digestão, manipulando a temperatura e agitação das amostras, foi possível obter quantidades aceitáveis de DNA para todas as amostras.

Foram observadas também as razões de pureza 260/280 e 260/230, às quais podem indicar a presença de compostos interferentes na leitura, como proteínas (comprimento de onda ~280 nm) e outros contaminantes como uréia e fenol (comprimento de onda ~230 nm). Os resultados de pureza obtidos nas análises de espectrofotometria para a razão 260/280 mostraram-se satisfatórios, com valores próximos à faixa aceitável de ~1.8 nm. Entretanto, foram observadas alterações nos valores para a razão 260/230, os quais foram majoritariamente abaixo da faixa considerada adequada, de 2.0~2.2 nm. A lista de amostras e os resultados obtidos pelas análises de espectrofotometria das amostras extraídas pelo kit encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Lista de amostras, concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos pela extração por coluna

	Quantidade ng/μL	260/230	260/280
WA1	14,2	0,0495	2,08
ULM1	62,7	0,64	1,81
ULM2	34,6	0,447	1,95
SNT1	66,9	0,517	1,76
B01_1	11,9	0,458	1,8
B01_3	51,4	0,323	1,52
B02	19,4	0,212	1,96
B03	59,2	0,666	1,97
B03_3	25,1	0,18	1,79
B04	17,6	0,171	2,06
B05	7,5	0,61	2,36
B06	21,8	0,488	1,75
B07	45,4	0,423	2,02
B08	77,4	0,969	1,95
B09	14,5	0,0898	1,96
B10	172	1,46	2,14
B11	5,58	0,119	2,9
B12	24,8	0,584	1,72
B13	7,88	0,0233	2,73
B14	108	1,02	2,17
B15	30,5	0,335	1,96
B16	13,2	0,0242	2,45
B17	76,1	0,381	1,94
B18	68,2	0,656	2,14
B19	16,4	0,0121	2,63
B20	29,9	0,0951	1,93
B21	51,3	0,052	2,24
B22	49,2	1,02	2,02
B23	10,8	0,119	1,78
B24	36,8	0,52	1,82
B25	65	0,445	1,58
B26	115	0,672	1,85
B27	4,23	0,162	0,936

B28	42,7	0,617	1,85
B29	57,7	0,268	1,76
B30	34,5	0,527	1,77
B31	100	1,23	2,26
B32	27,9	0,55	1,9
B33	3,56	0,0377	1,37
B34	15,4	0,0223	2,16
B35	29,1	0,223	1,74
B36	23,1	0,16	1,85
B37	21,3	0,0336	1,84
B38	350	1,33	2,18

De maneira geral, o DNA obtido pelo método de extração orgânica foi superior em quantidade, porém, inferior em qualidade em relação ao método de extração por coluna. Das amostras empregadas no teste de extração orgânica, apenas uma pôde ter seu DNA amplificado. A quantificação do DNA extraído das amostras por Fenol-clorofórmio encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Lista de amostras, concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos pela extração por Fenol-clorofórmio

Amostra	Quantidade ng/μL
B10-Fenol	129
B11-Fenol	1356
B14-Fenol	420
B23-Fenol	1252
B26-Fenol	559
B34-Fenol	1648

Além dos diferentes métodos de extração, foram analisadas possíveis diferenças entre os tipos de ossos que serviram de fonte de coleta do tecido. As peças testadas foram ossos cranianos ($48,17 \pm 57,95$), costelas ($29,38 \pm 19,37$) e vértebras ($19,92 \pm 18,04$), os quais não renderam diferença significativa na quantidade de DNA obtida dentre ossos diferentes de occipitais ($p < 0,05$). Desse modo, as peças cranianas não apenas apresentaram a vantagem de individualização das amostras, como asseguraram uma fonte de DNA com material genético de qualidade similar a outros ossos, porém em maior quantidade. A correlação de amostras com concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos de diferentes tipos de ossos podem ser encontrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Lista de amostras, concentração de DNA por amostra e razões de pureza obtidas em leitura por espectrofotometria dos resultados obtidos pela extração por coluna em costelas e vértebras

Amostra	Quantidade ng/ μ L	260/230	260/280
B01_5 (Costela)	7,02	0,0168	2,21
B03_1 (Costela)	58,2	0,634	1,86
B06_4 (Costela)	34,1	0,377	2,14
B07_3 (Costela)	13,6	0,0986	1,88
B08_3 (Costela)	46,2	0,605	1,83
B09_5 (Costela)	17,2	0,107	1,85
B10_2 (Costela)	56,4	0,394	1,55
B10_2 (Costela)	40,1	0,336	1,85
B03_5 (Vértebra)	14,2	0,444	1,68
B06_3 (Vértebra)	5,0	0,0503	1,96
B07_5 (Vértebra)	1,83	0,0490	1,36
B08_2 (Vértebra)	59,3	0,174	1,96
B09_4 (Vértebra)	27,3	0,397	1,55
B01_1 (Vértebra)	40,1	0,336	1,85

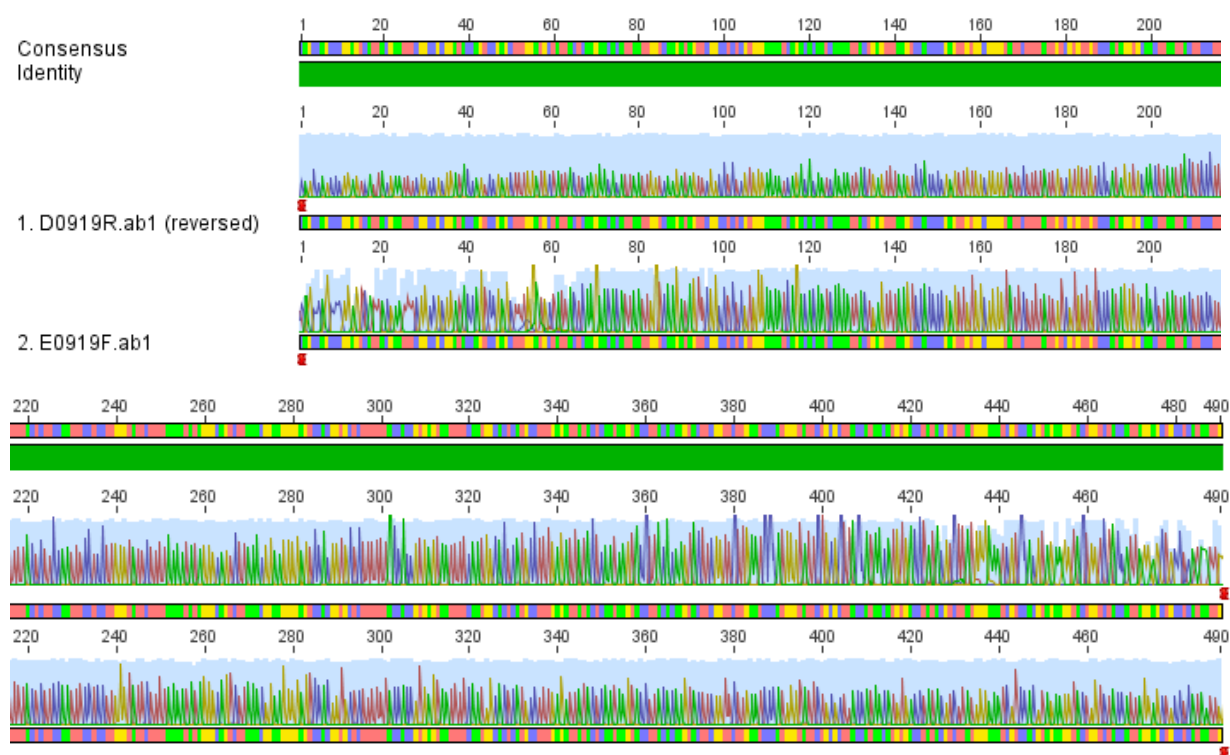
3.2 Identificação de espécies

3.2.1 DNA Barcoding

Os testes de identificação com o COI não foram bem-sucedidos, não sendo possível a amplificar o fragmento 650 pb. Com isso, testes com outros marcadores moleculares foram realizados, e o 16S rRNA foi escolhido para prosseguir com as análises, por ser eficiente na distinção das espécies-alvo.

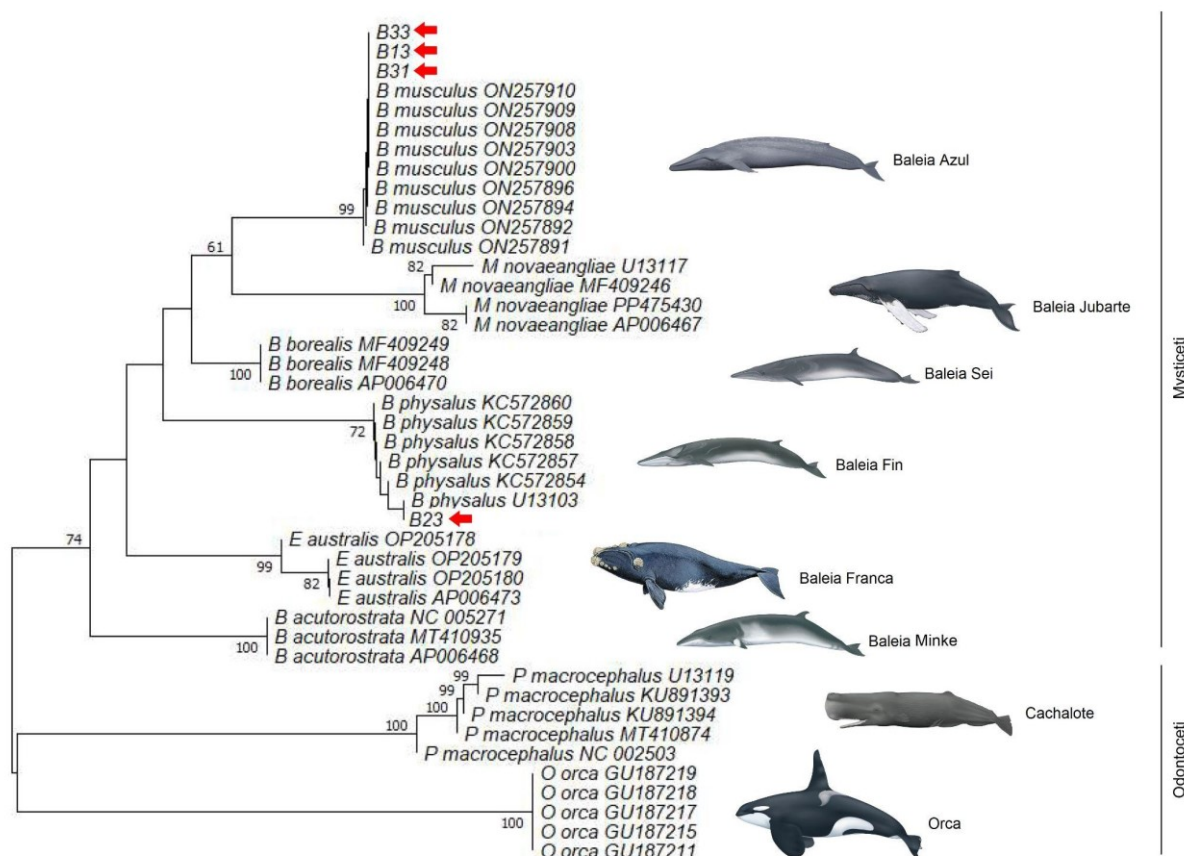
Dentre as 38 amostras originais, foi possível sequenciar e identificar com sucesso quatro dos indivíduos amostrados, a nível de espécie, através do sequenciamento parcial da região 16S rRNA. Os eletroferogramas obtidos foram corrigidos e analisados (Figura 12). Para a identificação inicial, as sequências consenso foram alinhadas com sequências similares obtidas do banco de dados do NCBI Genbank, utilizando o algoritmo de sequências biológicas primárias BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997). As amostras B13, B31, B33 foram identificadas como de baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), com alto grau de confiança (99-100%); e a amostra B23 foi identificada como uma como baleia-fin, com grau de certeza razoável (56-99%). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank e receberam os números de acesso PP790983 (B13), PP790984(B23), PP790985 (B31) e PP790986 (B33). As demais amostras não puderam ser amplificadas ou apresentaram contaminação por outros organismos. As análises pelos métodos de Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança envolveram as 43 sequências de nucleotídeos, havendo um total de 199 posições no conjunto de dados final. Em ambos os métodos, as sequências B13, B31 e B33 agruparam com as sequências de *Balaenoptera musculus*, obtidas do banco de dados, e a sequência B23 com as de *Balaenoptera physalus*, com alto grau de suporte (Figuras 13 e 14).

Figura 12 - Eletroferograma ilustrativo do sequenciamento da região 16S, da amostra B13, identificada como *Balaenoptera musculus*



Fonte: autora, 2022.

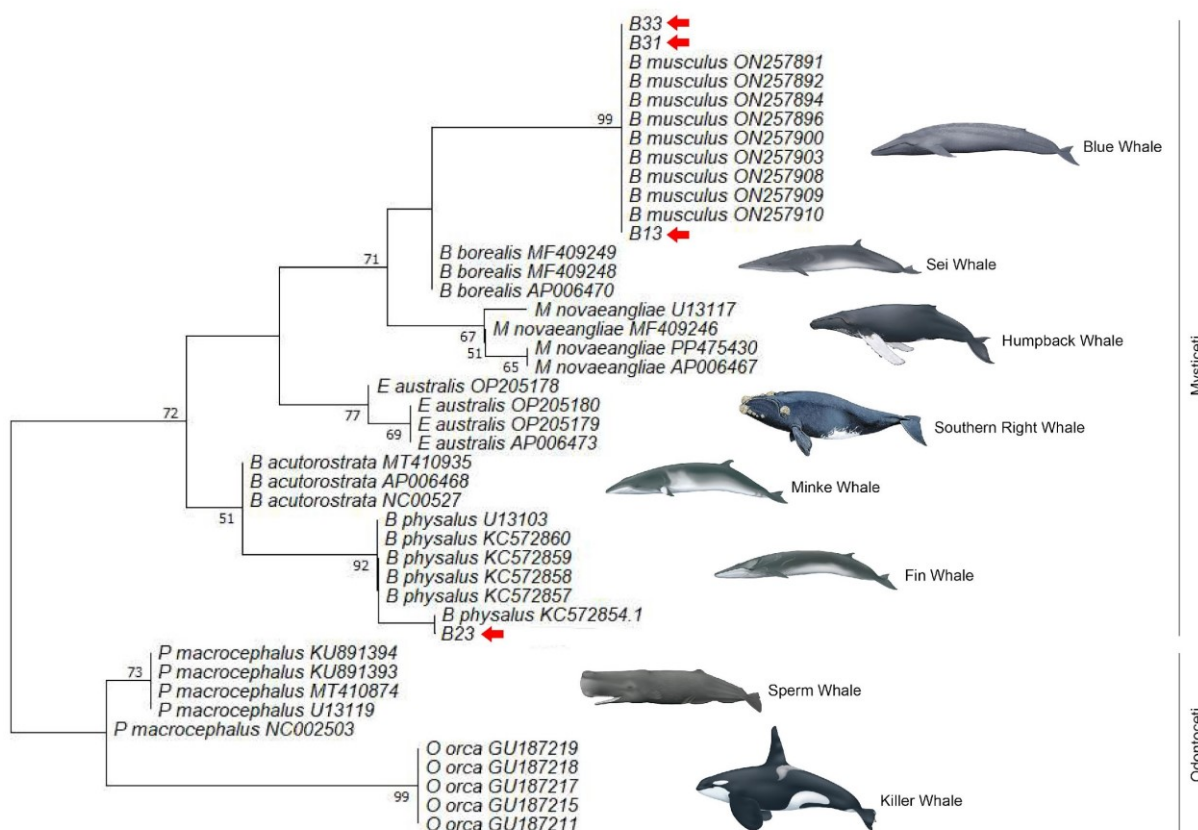
Figura 13 - Árvore de Neighbor-Joining (K2P) da região parcial 16S rRNA (bootstrap x1000) dos cetáceos Antárticos, com base nas sequências-referência do Genbank e sequências obtidas (B13, B31, B23 e B3)



Legenda: Análises incluindo as sequências obtidas do banco de dados e as quatro sequências geradas (indicadas pelas setas vermelhas). Os valores de suporte/bootstrap para os grupos estão representados nos nós internos.

Fonte: Cesar Amaral e Autora, 2024.

Figura 14 - Árvore de máxima verossimilhança (GTR+G+I) com base no 16S rRNA das espécies de baleias antárticas, mostrando a relação evolutiva e filogenia (LUDWIG *et al.* 2011)



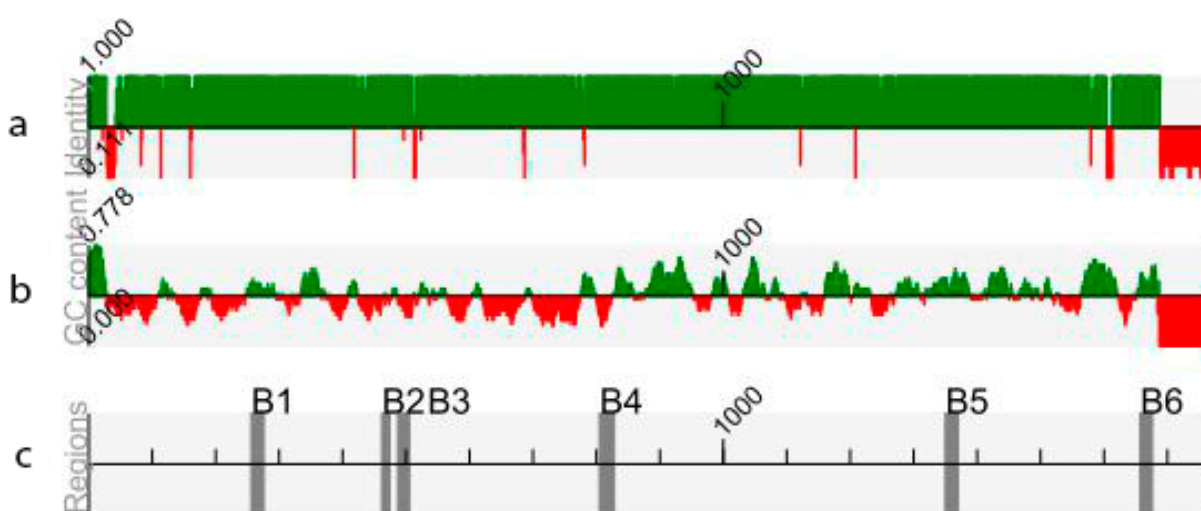
Legenda: Sequências geradas indicadas pelas setas vermelhas. Os valores de suporte/bootstrap para os grupos estão representados nos nós internos.
 Fonte: Cesar Amaral e Autora, 2024.

3.2.2 SpInDel

Para as análises SpInDel, foi traçado o perfil de InDels na região que compreende o 16S - tRNA^{Leu} e com base nele foram confeccionados os primers flanqueadores das regiões de inserção e deleção do 16S rRNA e o início do tRNA^{Leu}. As regiões selecionadas são ilustradas na Figura 15; o perfil de InDels traçado é descrito e relacionado na Tabela 6; detalhes sobre a região e tamanho do amplicon encontram-se listadas na Tabela 7. Os primers desenvolvidos para a SpInDel, com

base nas análises anteriores, foram testados e obtiveram sucesso na amplificação do DNA fragmentado presente nos ossos e na amostras de tecido (Figura 16). Com base nestes resultados, mostrou-se possível obter DNA mitocondrial a partir de fragmentos degradados de ossos de baleia utilizando uma técnica forense apropriada para análises moleculares, com métodos de extração simples.

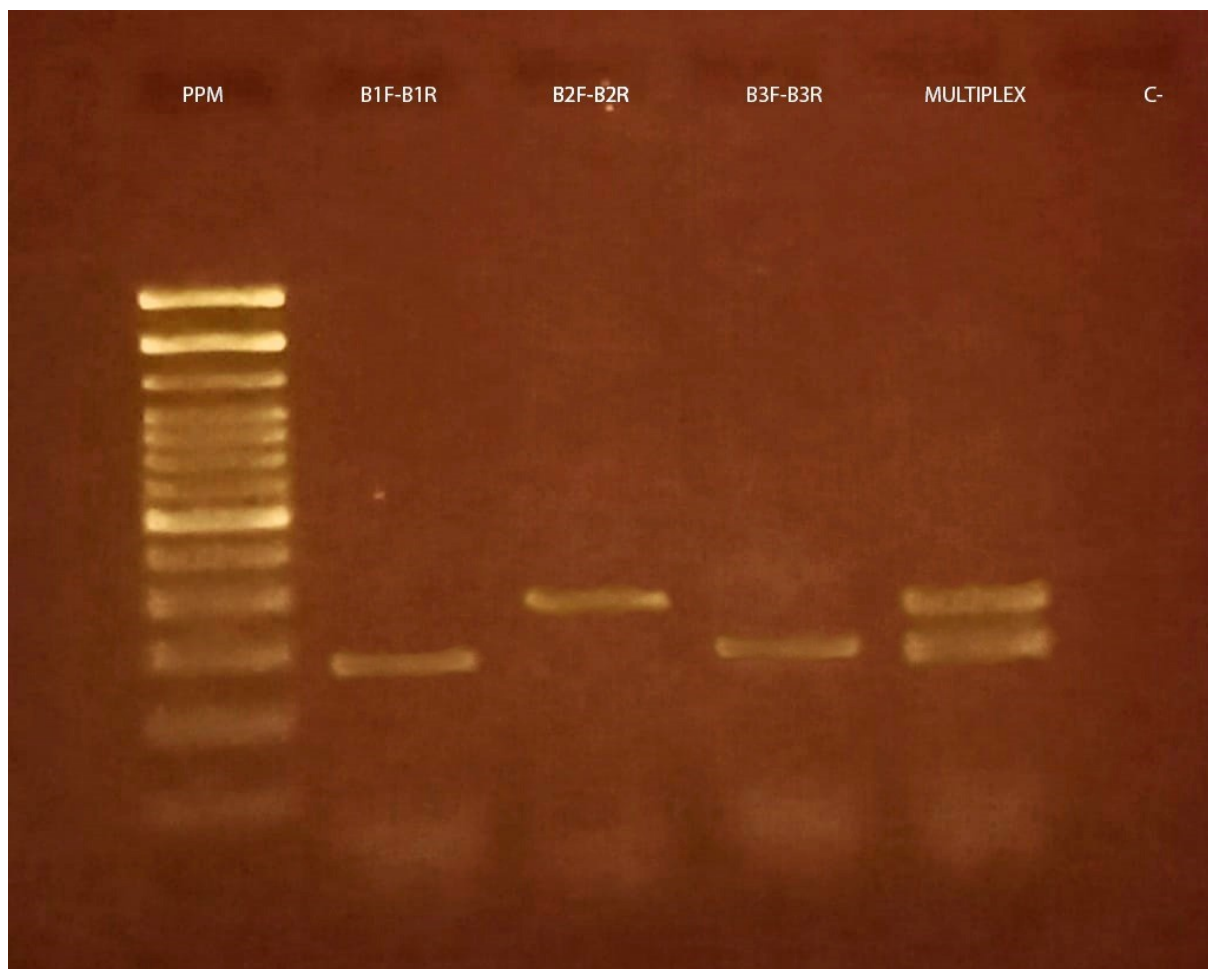
Figura 15 - Alinhamento do 16S e tRNA-Leu das sequências do banco de dados



Legenda: a. perfil de InDels do alinhamento das sequências de espécies antárticas obtidas do banco de dados, com regiões de InDel em vermelho e conservadas em verde; b. Perfil de conteúdo GC, com regiões com maior conteúdo GC em verde e menor em vermelho; c. Regiões selecionadas como flangeadoras, para os primers.

Fonte: ANJOS et al. 2023.

Figura 16 - Gel de agarose com a escala alélica, o resultado da amplificação da amostra B13 em singleplex de cada par de primer, em multiplex com os três pares de primers e o controle negativo



Legenda: PPM. Ladder; B1F-B1R. par de primers B1; B2F-B2R. par de primers B2; B3F-B3R. par de primers B3; Multiplex. Amplificação em em multiplex com B1, B2 e B3; C-. controle negativo da reação.

Fonte: autora, 2022.

Tabela 6 – Perfil SpinDel das mesmas regiões em 16 rRNA e tRNAs de cada espécie.

As diferenças fornecidas pelos polimorfismos de inserção e deleção representam o padrão de comprimento único (em pb).

Espécies	Perfil SpinDel		
	B1-B2	B3-B4	B5-B6
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	218	339	251
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	218	339	250
<i>Balaenoptera borealis</i>	218	340	250
<i>Balaenoptera musculus</i>	217	339	250
<i>Balaenoptera physalus</i>	218	338	250
<i>Eubalaena australis</i>	218	338	240
<i>Megaptera novaeangliae</i>	219	339	250
<i>Orcinus orca</i>	217	341	250
<i>Physeter macrocephalus</i>	217	344	251

Tabela 7 - Perfil dos primers incluindo alcance, sequência e tamanho do amplicon dos primers desenhados e utilizados no multiplex.

Primer	Alcance do primer	Sequência do primer 5'–3'	Tamanho do Amplicon
B1F	256 - 272	TACCCGAAACCAGACGAGCTA	316bp
B1R	553 - 572	CCRTHCTCTAAAAAGCTGTACC	
B2F	484 - 503	GGRTACAACCTTNACTAGAGAG	362bp
B2R	828 - 846	TTGTGTTTGCCGAGTTCCTTTTAC	
B3F	1350 - 1367	ACCTCGATGTTGGATCAGGAC	326bp
B3R	1659 - 1676	GGATTTGAACCYCTGRGT	

4 DISCUSSÃO

4.1 Recuperando DNA antigo dos ossos depositados nas praias da Península Keller, Ilha Rei George, Antártica

Obtivemos sucesso em recuperar DNA antigo dos ossos de baleias depositados na Baía do Almirantado, utilizando ambos os métodos de extração, provando que mesmo após décadas de exposição às condições ambientais antárticas, ainda é possível obter DNA viável desses remanescentes ósseos. Diante disso, diferentes quesitos foram observados a fim de selecionar um método mais viável e adequado para o tipo de processamento em questão. Foram levados em conta a taxa de sucesso observada durante os testes, as condições de trabalho e recursos empregados durante o processamento e a qualidade do material obtido, observada nas análises e etapas posteriores à extração.

O uso do ExtractMe Total Kit DNA/RNA blirt® mostrou-se apropriado na extração e purificação dos ácidos nucleicos presentes em amostras antigas e degradadas, como as da Baía do Almirantado, obtendo DNA em concentração e pureza razoáveis através de seu uso. Embora as relações 260/230 apresentadas nas leituras por espectrofotometria tenham apresentado valores abaixo do considerado aceitável, esses valores podem não representar de maneira confiável a pureza das amostras. Segundo o fabricante do kit, o reagente RW2 contém Guanidina-Isotiocianato, o qual é responsável por alterar as leituras na faixa de comprimento de onda de 230 nm, por absorver o mesmo comprimento que geralmente é absorvido por contaminantes indesejados, como o fenol (mais informações no boletim técnico T042 da Thermo Fisher Scientific sobre espectrofotômetros NanoDrop). Contudo, a absorbância na faixa de 280 nm, indicadora da presença de proteínas (ARMBRECHT 2013), permanece inalterada e sua razão em relação ao comprimento de 260 nm, faixa absorvida pelos ácidos nucleicos, pode ser utilizada de maneira confiável.

A extração orgânica, por sua vez, não promove alterações nas leituras para quantificação de DNA. O material obtido através desse método mostrou-se viável para as análises e sequenciamento de pelo menos uma das amostras testadas. Apesar disso, na escolha dentre os métodos testados, o uso de fenol-clorofórmio não

apresenta fatores suficientemente favoráveis para preterir o uso do kit devido ao custo e risco associado. O processo exige não apenas o uso de equipamentos de proteção pessoal, cabines de biossegurança e protocolos para evitar contaminação das amostras, mas também aparelhagem laboratorial específica, como uma capela de exaustão para o processamento com Fenol, e cuidados adicionais no descarte de todo o resíduo gerado, por se tratar de um agente carcinogênico. Por essa razão, apesar dos resultados positivos obtidos através da extração de DNA por fenol-clorofórmio, o método não foi selecionado como o mais adequado para este trabalho.

Sabe-se que ambientes frios/congelados como a Antártica oferecem condições específicas e favoráveis para a preservação de aDNA, de amostras ainda mais antigas que os ossos da Baía do Almirantado (SMITH *et al.* 2001). As baixas temperaturas durante todo o ano e o ciclo de congelamento durante o inverno, minimizam a degradação dos ácidos nucleicos encontrados nas amostras, de modo que é possível obter mtDNA de amostras tão antigas (WILLERSLEV *et al.* 2004). Apesar disso, a degradação do material genético fora do organismo de origem é inevitável, portanto, o manejo de qualquer material antigo exige uma abordagem específica e cuidadosa (CAVALCANTI *et al.* 2015, 2017). Desse modo, por se tratar um material antigo e exposto às intempéries ambientais, os efeitos de agentes degradantes sobre os vestígios ósseos analisados implica na dificuldade na identificação dos ossos. Efeitos práticos de agentes degradantes ambientais têm sido amplamente investigados, incluindo exposição a UV, elevados níveis de umidade, diferenças de temperaturas, soterramento e submersão em água (PERRY *et al.* 1988; SCHWARTZ *et al.* 1991; ALAEDDINI *et al.* 2010). Variações na abundância e qualidade do DNA presente em ossos podem ser observadas em amostras de acordo com o tipo de agente degradante, em especial, amostras enterradas e submersas em água (KRESTOFF *et al.* 2021).

Diferenças estruturais dos ossos podem também influenciar a preservação do material genético. Ossos enriquecidos em óleo, como é o caso o de mamíferos marinhos polares, apresentam uma preservação melhor do material genético (CARTOZZO *et al.* 2018). Assim como a espessura do osso também pode ter efeito sobre a degradação do material genético, havendo uma heterogeneidade no estado do DNA em diferentes profundidades de ossos expostos a condições ambientais. Alaeddini e colaboradores (2010) afirmam que peças maiores/mais espessas possuem um gradiente de degradação através da espessura, de modo que

quanto mais profundo, menos degradado. Desse modo, os resultados obtidos neste trabalho corroboram o estudo de Alaeddini e colaboradores (2010), como foi observado que amostras retiradas da parte rígida de occipitais renderam DNA em maior quantidade comparativamente a vértebras e costelas.

4.2 Identificação Molecular dos espécimes analisados

Com grande número de substituições na sua sequência, a evolução do gene COI é considerada rápida o suficiente para permitir a discriminação de espécies estreitamente relacionadas e de grupos filogeográficos intraespecíficos (HEBERT *et al.* 2003). Contudo, ainda há sobreposição entre a diversidade intra e interespecífica do COI em táxons muito próximos e de divergência recente, o que pode implicar em falhas na identificação de alguns grupos como, por exemplo, de cetáceos (VIRICEL & ROSEL 2012; SILVA *et al.* 2021). O mesmo se aplica para o *cytB*, um dos marcadores mais comumente utilizados em estudos moleculares e de identificação de baleias, porém, também insuficiente para distinguir algumas espécies de baleias (VIRICEL & ROSEL 2012). Para ambos os marcadores a identificação de *Eubalaena* pode ser um desafio, sobrepondo as espécies de *Eubalaena* entre si e a *Megaptera novaeangliae*. Para esses táxons, a identificação de espécies não é realizada de forma confiável usando os três fragmentos de mtDNA usados mais frequentemente (COI, *cytB*, e D-Loop) (VIRICEL & ROSEL 2012). A fim de assegurar a identificação correta, o uso desses marcadores é recomendado em conjunto com outros fragmentos de mtDNA, como em Ross *et al.* (2003).

A falha nos testes de amplificação do COI refletem o descompasso entre o tamanho da região-alvo e o comprimento do DNA, altamente fragmentado encontrado nos ossos antigos da Baía do Almirantado. Por essa razão, juntamente à baixa confiabilidade na identificação de algumas das espécies esperadas, o uso desse marcador foi descartado ao longo do estudo. Apesar de ser uma região menor (~400 pb) e considerada mais eficaz na identificação molecular de cetáceos, o *cytB* não foi escolhido durante a seleção de marcadores, por possuir desempenho similar ao do COI (VIRICEL & ROSEL 2012).

Genes mitocondriais como o 16S e o 12S rRNA, são pouco utilizados na identificação de espécies de cetáceos, sendo mais frequentemente usados para estudos filogenéticos. Seu uso para análises taxonômicas pode ser considerado limitado pela prevalência de InDels que complica o alinhamento de sequências (DOYLE e GAUT 2000). Para investigar novas possibilidades na identificação de cetáceos, com ênfase na tipagem de DNA altamente degradado, o 16S rRNA foi escolhido por se mostrar um marcador altamente eficaz para a identificação molecular de espécies (MITANI *et al.* 2009). Expandindo possibilidades dentro da investigação de vestígios oriundos de cetáceos, nossos resultados corroboram a eficácia do uso desse gene para realizar a identificação confiável das espécies de baleia presentes na Península Antártica (ANJOS *et al.* 2023a). Podendo ser usado para a identificação das espécies em questão e/ou complementar o uso de outros marcadores comumente utilizados (SARRI *et al.* 2014) para clados que apresentem sobreposição, como baleias-francas e jubarte. O mesmo não se aplica para algumas espécies de cetáceos, porém não incluídas neste estudo, como algumas espécies de Delphinidae e Phocoenidae, que apresentam dificuldades na identificação molecular relacionadas à sua recente diversificação e hibridização (ANJOS *et al.* 2023b).

Vários fatores podem ser relacionados com a baixa taxa de sucesso na amplificação do material extraído, embora o mais provável seja a degradação por agentes naturais. O tipo de processamento feito com os ossos das baleias caçadas diminui a possibilidade de encontrar DNA íntegro: ossos escaldados (TØNNESSEN & JOHNSEN 1982), quebrados e abandonados em condições ambientais pelos próximos cem anos até o momento da sua coleta. O conjunto de fatores reforça a baixa expectativa inicial de obter-se DNA do organismo (BAKER *et al.* 1996). Diante desse desafio, o presente estudo é o primeiro a se propor e obter sucesso ao identificar os ossos de baleia da Baía do Almirantado, reconhecendo duas diferentes espécies de baleia que se encontram entre eles.

4.3 SpInDel

Se por um lado os InDel presentes no 16S rRNA são considerados um problema na identificação de espécies (DOYLE e GAUT 2000), o uso da técnica de

identificação molecular através de regiões de Inserção e Deleção, com o SplnDel, permitiu a diferenciação das espécies através da análise desse mesmo tipo de polimorfismo presentes na região. Os resultados obtidos sugerem ser possível a identificação através desse gene, o que pode agregar ao arcabouço de ferramentas moleculares disponíveis para a identificação de aDNA para os cetáceos considerados neste estudo.

Apesar de não ser uma técnica tão difundida como o Barcoding, o SplnDel tem se mostrado preciso na identificação de espécies (ALVES *et al.* 2017; AMARAL *et al.* 2015, 2017; CARNEIRO *et al.* 2012; SKUZA *et al.* 2020). O baixo número de estudos utilizando o SplnDel como uma técnica confiável para identificação de espécies pode estar relacionado a fatores além da eficácia da técnica. A origem recente dessa técnica desenvolvida por pesquisadores portugueses, o uso pouco intuitivo da plataforma e o baixo esforço de difusão dentro do meio, são alguns dos fatores que podem justificar o seu uso ser raro em estudos de identificação.

O multiplex confeccionado (Patente BR1020220219257) com primers de tamanho reduzido (~600 pb) permite, conforme observado nas análises *in silico*, a identificação molecular das espécies de baleias antárticas com sucesso. Além disso, a amplificação do DNA no teste preliminar realizado com o multiplex desenvolvido mostrou-se também bem sucedido. O tamanho dos fragmentos de DNA disponíveis nas amostras degradadas tornava inviável a amplificação de uma região alvo completa com tamanho de 600-1000 pb (EICHMANN & PARSON 2008). Desse modo, a identificação de espécies baseada em regiões entre 100-300 pb de comprimento, localizados nas regiões de inserção e deleção do gene 16S rRNA apresenta-se como uma possibilidade viável para a identificação desse material degradado.

O uso prático do kit desenvolvido almeja a tipagem e visualização das diferenças de comprimento dos fragmentos de 16S rRNA das espécies alvo. Permitindo amplificar regiões muito menores do gene que, uma vez amplificadas, podem ser analisadas. Através das análises SplnDel, foram identificadas e utilizadas com sucesso regiões que abrangem polimorfismos suficientes para distinguir as espécies com base nas três regiões selecionadas, assim como já foi realizado para outros animais marinhos (ALVES *et al.* 2017; AMARAL *et al.* 2015, 2017). Além do emprego na identificação de amostras antigas, o mesmo apresenta grande potencial na identificação de amostras processadas e de difícil identificação, como produtos de baleia comercializados em mercado clandestino (BAKER e PALUMBI 1996).

Desse modo, os resultados do presente trabalho adicionam mais um degrau ao conhecimento de marcadores moleculares empregados na identificação de cetáceos, incluindo o 16S rRNA como uma das possíveis regiões a serem utilizadas. Assim como para o uso e aplicabilidade da técnica SplnDel.

4.4 Identificação molecular dos remanescentes ósseos e sua relação com o histórico da atividade baleeira na região da Baía do Almirantado

Ao realizar com sucesso a identificação molecular dos remanescentes ósseos dos cetáceos da Baía do Almirantado, foi possível inferir a presença de baleias no século passado e comparar os resultados obtidos com registros de observação atuais. Esse tipo de levantamento fomenta a compreensão sobre a distribuição de espécies, ao fornecer novos dados históricos da possível ocorrência dessas baleias nas adjacências da Baía do Almirantado. Comparando aos levantamentos de captura realizados durante os anos baleeiros na Antártica, é possível elucidar o real impacto dessas atividades sobre os estoques que frequentam ou frequentaram a região.

Os atuais restos ósseos analisados representam apenas uma parcela das baleias capturadas na região da Ilha Rei George, não havendo registro de estações baleeiras dentro da Baía do Almirantado, e diante do fato de que o processamento das carcaças de baleia inicialmente só era possível com instalações/estações costeiras. As baleias cujas carcaças são encontradas nas praias da baía são parte das capturas realizadas após a primeira operação de uma fábrica flutuante na região, com o navio-fábrica norueguês *Admiralen* (RAKUSA-SUSZCZEWSKI 1998; TØNNESSEN e JOHNSSEN 1982). Em especial, após o surgimento das tecnologias responsáveis por viabilizar a capturas de animais maiores, já que as duas espécies encontradas neste estudo são as maiores espécies da região, e consequentemente, mais velozes e difíceis de capturar. Assim, o avanço das tecnologias e técnicas de caça, como as máquinas a vapor e os arpões explosivos, estão intimamente relacionados com a presença dos ossos desses grandes rorquais na Baía do Almirantado. O desenvolvimento de técnicas para a manipulação das carcaças também pode estar relacionado à presença desses ossos no local. A partir do momento em que os baleeiros passaram a injetar ar comprimido após o abate, os

animais poderiam ser capturados a distâncias maiores das bases e navios de processamento, evitando a perda da carcaça durante seu transporte de longa distância para regiões mais abrigadas ou estações (KITTEL 2001). Além desse método, a decapitação das baleias antes da remoção de carne e óleo fazia com que o crânio ainda estivesse cheio de ar, e assim fosse arrastado para as praias com mais facilidade, ainda sim, muitas outras peças ainda devem ter se depositado no fundo do mar. Relacionando a deposição desses ossos à caça na Baía do Almirantado, e não apenas a morte natural ou encalhe, apesar de não haver esforços de monitoramento para levantar esse tipo de registro nesta área (BRANCH 2007a). Esses fatores implicam na possibilidade de essas espécies nunca terem frequentado a Baía, sendo apenas arrastados para o processamento em

As identificações realizadas são consistentes com a captura massiva de rorquais na Antártica durante o período baleeiro (a partir de 1904) até sua proibição em 1982, e durante o período de caça ilegal realizada pela ex-União Soviética (BRANCH 2007a; CLAPHAM 1999; THOMAS *et al.* 2016; TØNNESEN e JOHNSEN 1982). Estima-se que durante o século XX, mais de 360.000 baleias Azuis e 725.000 baleias-fin tenham sido capturadas no hemisfério sul, sobretudo na Antártica (CLAPHAM e BAKER 1999). Porém, pouco se sabe sobre a distribuição e abundância dessas espécies nas proximidades da Ilha Rei George. Com a ausência de levantamentos recentes, com esforços de detecção visual e acústica, formou-se uma lacuna na compreensão das populações recentes na região (BASSOI *et al.* 2020; BRANCH 2007a).

Considerando as baleias-azuis, não havendo registros de abundância, o que se pode inferir através dos dados de captura revela sua completa extinção na baía, entretanto, esses dados não são suficientemente precisos para determinar se estiveram ou não presentes no local durante os anos baleeiros. É possível que a espécie tenha frequentado a região no passado, tendo a baía como ponto de descanso/alimentação, e hoje já não mais; ou que os indivíduos fossem somente processadas da Baía do Almirantado, sendo retirados de outros pontos.

Apesar da falta de registros históricos de capturas realizadas na Baía do Almirantado, na atualidade também não há registros ou esforços para obtê-los/disponibilizá-los para se constatar a recuperação das populações nestas regiões. Mesmo diante da escassez de dados de observação desta espécie nas Shetland do Sul, a identificação da espécie dentre os remanescentes ósseos oriundos do período

baleeiro moderno reflete o impacto da exploração na sua abundância na localidade. Apesar destas baleias estarem protegidas (CIPRIANO e PALUMBI 1999), Branch (2004, 2007a, 2007b) estimou que a abundância atual da espécie ainda seja inferior a 1% da original, com cerca de 1.700 indivíduos (STACEY 2022). Já as baleias-fin, apesar de estarem entre as espécies mais exploradas, possuem população atual de cerca de 38.200 indivíduos (Stock presente na Antártica), sendo vistas e registradas sazonalmente na península Antártica (BURKHARDT e LANFREDI 2012; ŠIROVIĆ *et al.* 2004, 2009). Estas baleias cosmopolitas foram caçadas na região até que o nível de exploração excedeu em muito o rendimento sustentável das populações, resultando no colapso das próprias operações baleeiras.

Num esforço de monitoramento de espécies, Jackson *et al.* 2020 registra o retorno das espécies mais afetadas pela exploração baleeira na Geórgia do Sul, através da combinação de diversos esforços de detecção. Esse tipo de estudo é necessário para avaliar se há ou não um retorno das baleias azuis a este hotspot histórico. Atualmente, pode-se dizer que as baleias Jubarte e Minke podem ser avistadas na Baía do Almirantado durante o verão, porém, não há estudo formal ou levantamento dos registros feitos para monitorar as espécies da região. Do mesmo modo que não se sabe se as espécies que hoje são encontradas na baía retornaram ao local após o período baleeiro ou passaram a ocupar o local uma vez esvaziado das espécies que o visitavam no passado.

CONCLUSÕES

Amostras degradadas e envelhecidas sempre representam um desafio. No presente estudo, provamos que é possível obter DNA viável para análises moleculares e identificação de fragmentos ósseos dos anos baleeiros, com duas espécies inventariadas e quatro amostras identificadas com sucesso, baseadas no sequenciamento parcial da região 16S rRNA do mtDNA. Além disso, também foi verificada a possibilidade da realização da identificação molecular baseada em regiões de Inserção e Deleção através do método SplnDel. O kit de identificação desenvolvido utilizando essas regiões mostrou-se viável em ensaios *in silico*, resultando no depósito da patente BR1020220219257.

Ainda são necessários mais estudos para se entender a influência do ambiente antártico na preservação desse tipo de amostra, reunindo dados baseados em material degradado de distintas fontes. Estes esforços são necessários para fornecer uma percepção histórica e temporal do que aconteceu e ainda acontece com as populações de organismos antárticos.

A presença atual de baleias-azuis e fin na Baía do Almirantado ainda precisa de mais observações e estudos para ser conclusiva. No entanto, é evidente que a sua abundância e distribuição foi prejudicada em sua extensão devido à caça, e isto é apenas ilustrado pelo número de ossos destas espécies e de várias outras nas costas antárticas. Este estudo almeja representar não apenas um teste de método na identificação de espécies, mas também um passo a mais para compreender a história da caça às baleias na Antártica, em especial na Baía do Almirantado, área onde a presença brasileira no continente antártico é reforçada pelas atividades de pesquisa realizadas na Estação Antártica Comandante Ferraz, e também os impactos destas atividades antropogênicas nas espécies caçadas no passado e sua influência nas populações do presente.

REFERÊNCIAS

- ADIE, S.; BASBERG, B. L. The first Antarctic whaling season of Admiralen (1905–1906): the diary of Alexander Lange. *Polar Record*, v. 45, n. 3, p. 243-263, 2009.
- ALAEEDDINI, R.; WALSH, S.J.; ABBAS, A. Molecular studies of time-and environment-dependent effects on bone DNA survival. *Aust J Forensic Sci*, v. 42, n. 3, p. 211-220, 2010.
- ALLISON, C. International Whaling Committee summary database, version 5.2. Avail. from the International Whaling Commission, Cambridge, UK, 2011.
- ALTER, S. E.; PALUMBI, S. R. Comparing evolutionary patterns and variability in the mitochondrial control region and cytochrome b in three species of baleen whales. *J Mol Evol*, v. 68, p. 97-111, 2009.
- ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, C. *et al.* Species identification in forensic samples using the SPInDel approach: A GHEP-ISFG inter-laboratory collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet*, v. 28, p. 219-224, 2017.
- ARMBRECHT, M. Detection of contamination in DNA and protein samples by photometric measurements. Eppendorf AG , Hamburg, Germany. Application Note, n. 279, p. 1, 2013.
- ANJOS, D. A. A. *et al.* Probing the potential of InDel polymorphisms on the molecular identification of cetaceans. *Acad Biol*, v. 1, p. 1-3, 2023a.
- ANJOS, D. A. A.; DONATO, A.L.S.; BARBOSA, R.G.; CARVALHO, E.F.; AMARAL, C.R.L. Evaluation of insertion and deletion polymorphisms of Brazilian Odontoceti. *Academia Biology*, v. 1, p. 1-7, 2023.
- Lonely planet.com. South Shetlands, p. 208-211; acessado em 17 de janeiro de 2024.
- BAKER, C. S.; CIPRIANO, F.; PALUMBI, S. R. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular ecology*, v. 5, n. 5, p. 671-685, 1996.
- BARTON, C. M. The geology of the South Shetland Islands: III. The stratigraphy of King George Island. *British Antarctic Survey Report* n. 44, p. 1-33, 1965.
- BASBERG, B. L.; HACQUEBORD, L. Industrial Whaling in the Arctic and Antarctic. In: HOWKINS A, ROBERTS P, eds. *The Cambridge History of the Polar Regions*, c. 16, p. 378-406, 2023.
- BASSOI, M. *et al.* Cetacean distribution in relation to environmental parameters between Drake Passage and northern Antarctic Peninsula. *Polar Biol*, v. 43, p. 1-15, 2020.
- BERTA, A.; SUMICH, J. L.; KOVACS, K. M. *Marine Mammals Evolutionary biology*, Academic Press, ed. 3, 2015.

BIRKENMAJER, K. Geology of Admiralty Bay, King George Island (South Shetland Islands) - An outline. *P Polar Res*, v. 1, n. 1, p. 29-54, 1980.

BORGE, T.; BACHMANN, L.; BJØRNSTAD, G.; WIIG, Ø. Genetic variation in Holocene bowhead whales from Svalbard. *Mol Ecol*, v. 16, n. 11, p. 2223-2235, 2007.

BOYD, I. L. Antarctic marine mammals. In: *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, 2009. p. 42-46.

BRANCH, T. A.; MATSUOKA, K.; MIYASHITA, T. Evidence for increases in Antarctic blue whales based on Bayesian modelling. *Mar Mammal Sci*, v. 20, n. 4, p. 726-754, 2004.

BRANCH, T. A. Abundance of Antarctic blue whales south of 60 S from three complete circumpolar sets of surveys. 2007a.

BRANCH, T. A.; ALLISON, C.; MIKHALEV, Y. A.; TORMOSOV, D.; BROWNELL JR, R. L. Historical catch series for Antarctic and pygmy blue whales. Report (SC/60/SH9) to the Scientific Committee of the International Whaling Commission, available on request from the Secretariat, International Whaling Commission, The Red House, v. 135, p. 1-4, 2007b.

BULKELEY, R. The political origins of the Antarctic Treaty. *Polar Rec*, v. 46, n. 1, p. 9-11, 2010.

BULKELEY, R. Cold war whaling: Bellingshausen and the Slava flotilla. *Polar Rec*, v. 47, n. 2, p. 135-155, 2011.

BURKHARDT, E.; LANFREDI, C. Fall feeding aggregations of fin whales off Elephant Island (Antarctica). The International Whaling Commission's 64th, 2012.

CÂMARA, P.E.A.S.; MELO, R. B. Brasil na Antártica, nos próximos 30 anos. *Revista da Escola Superior de Guerra*, v. 33, n. 68, p. 64-81, 2018.

CARNEIRO, J.; PEREIRA, F.; AMORIM, A. SPInDel: a multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants. *Mol Ecol Res*, v. 12, n. 6, p. 1190-1195, 2012.

CARROLL, E. L. *et al.* Speciation in the deep: genomics and morphology reveal a new species of beaked whale *Mesoplodon eueu*. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 288, n. 1961, p. 20211213, 2021.

CARTOZZO, C.; SINGH, B.; BOONE, E.; SIMMONS, T. Evaluation of DNA extraction methods from waterlogged bones: a pilot study. *J Forensic Sci*, v. 63, n. 6, p. 1830-1835, 2018.

CARWARDINE, M. *Handbook of whales, dolphins and porpoises*. Bloomsbury Publishing, 2020.

CAVALCANTI, P.; FREITAS, H.; CARVALHO, E.F.; SILVA, D.A. Optimized DNA extraction method from skeletal remains using different typing methodologies in forensics. *Forensic Sci Int*, v. 5, p. e223-e224, 2015.

- CARTOZZO, C.; SINGH, B.; BOONE, E.; SIMMONS, T. 2018. Evaluation of DNA extraction methods from waterlogged bones: a pilot study. *J Forensic Sci*, v. 63, n. 6, p. 1830-1835, 2018.
- CAVALCANT, I P.; CARVALHO, F.; CARVALHO, E.F.; SILVA, D.A. A mini-primer set in a multiplex PCR fashion covering the MTDNA control region from submerged skeletal remains. *Forensic Sci Int*, v. 6, p. e469-e470, 2017.
- CIPRIANO, F.; PALUMBI, S. R. Genetic tracking of a protected whale. *Nature*, v. 397, n. 6717, p. 307-308, 1999.
- CLAPHAM, P.J.; BAKER, C. S. Modern whaling. In: *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, 2018. p. 1070-1074.
- CLAPHAM, P. J.; YOUNG, S. B.; BROWNELL JR, R. L. Baleen whales: conservation issues and the status of the most endangered populations. *Mammal Rev*, v. 29, n. 1, p. 37-62, 1999.
- COLESIE, C. *et al.* Antarctica's vegetation in a changing climate. *Wiley Interdiscip Rev Clim*, v. 14, n. 1, p. e810, 2023.
- CORKERON, P. J.; CONNOR, R. C. Why do baleen whales migrate? 1. *Mar Mammal Sci*, v. 15, n. 4, p. 1228-1245, 1999.
- COURT, D. S. Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerg Top Life Sci*, v. 5, n. 3, p. 415-426, 2021.
- DANTAS, G. P. M. *et al.* Demographic history of the gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) and the Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) on Admiralty Bay, king George Island, Antarctica. *Waterbirds*, v. 37, n. 4, p. 410-418, 2014.
- DALEBOUT, M. L.; BAKER, C. S.; MEAD, J. G.; COCKCROFT, V. G.; YAMADA, T. K. A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae. *J Hered*, v. 95, n. 6, p. 459-473, 2004.
- DE BRUYN, P. N.; TOSH, C. A.; TERAUDS, A. Killer whale ecotypes: is there a global model?. *Biol Rev*, v. 88, n. 1, p. 62-80, 2013.
- DE TREVISAN, M. C. El Ártico y la Antártida en las relaciones internacionales. UFRGS Editora, v.6, 2004.
- DIBBERN, J. S. Fur seals, whales and tourists: a commercial history of Deception Island, Antarctica. *Polar Rec*, v. 46, n. 3, p. 210-221, 2010.
- DOYLE, J. J.; GAUT, B. S. Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol Ev*, p. 1-23, 2000.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- EICHMANN, C.; & PARSON, W. 'Mitominis': multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. *Int J Legal Med*, v. 122, p. 385-388, 2008.

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol*, v. 39, p. 783-791, 1985.

FLEMING, A.; JACKSON, J. Global review of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). 2011.

FLORES, H. *et al.* The association of Antarctic krill *Euphausia superba* with the under-ice habitat. *PloS one*, v. 7, n. 2, p. e31775, 2012.

FOX, A. J.; PAUL, A.; COOPER, R. Measured properties of the Antarctic ice sheet derived from the SCAR Antarctic digital database. *Polar Record*, v. 30, n. 174, p. 201, 1994.

FRIEDLAENDER, A.; & MODEST, M. 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, p.1-25, 2018.

FUDALA, K.; BIALIK, R. J. Breeding colony dynamics of southern elephant seals at Patelnia Point, King George Island, Antarctica. *Remote Sens*, v. 12, n. 18, p. 2964, 2020.

GARRIGUE, C. *et al.* CETA: a new cetacean observation program in East Antarctica. *Int Whal Comm: SC62/SH3*, 2010.

HANDT, O. *et al.* Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Sci*, v. 264, n. 5166, p. 1775-1778, 1994.

HEBERT, P. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HOOKE, S. K. *et al.* Future directions in research on beaked whales. *Front Mar Sci*, v. 5, p. 514, 2019.

IVASHCHENKO, Y. V.; CLAPHAM, P. J.; BROWNELL JR, R. L. Soviet illegal whaling: the devil and the details. 2011.

IVASHCHENKO, Y. V.; CLAPHAM, P. J. Too much is never enough: the cautionary tale of Soviet illegal whaling. *Mar Fish Rev* v. 76, n. 1-2, p. 1-22, 2014.

JACKSON, J. A.; PINSKY, M. L.; BAKER, C. S. How few whales were there after whaling? Inference from contemporary mtDNA diversity. *Mol Ecol*, v. 18, n. 19, p. 4134-4135, 2009.

JACKSON, J. A. *et al.* Have whales returned to a historical hotspot of industrial whaling? The pattern of southern right whale *Eubalaena australis* recovery at South Georgia. *Endanger Species Res*, v. 43, p. 323-339, 2020.

JEFFERSON, T. A.; WEBBER, M. A.; PITMAN, R. L. Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification. Elsevier, 2011.

KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, v. 16, p. 111-120, 1980.
- KITTEL, P. Inventory of whaling objects on the Admiralty Bay shores (King George Island, South Shetland Islands) in the years 1996-1998. *P Polar Res*, v. 22, n. 1, p. 45-70, 2001.
- KRAUSE, P. F.; FLOOD, K. L. Weather and climate extremes. US Army Corps of Engineers, Topographic Engineering Center, Information Bulletin of the Soviet Antarctic Expedition (No. 105) - 5, p. 89, 1997.
- KRESTOFF, E.S.; CREECY, J.P.; LORD, W.D.; HAYNIE, M.L.; COYER, J.A.; SAMPSON, K. Mitochondrial DNA evaluation and species identification of Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) bones after a 3-year exposure to submerged marine and terrestrial environments. *Front Mar Sci*, v. 8, p. 646455, 2021.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, n. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LAMBERT, D. M.; RITCHIE, P. A.; MILLAR, C. D.; HOLLAND, B.; DRUMMOND, A. J.; BARONI, C. Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Sci*, v. 295, n. 5563, p. 2270-2273, 2002.
- LEAPER, R.; MILLER, C. Management of Antarctic baleen whales amid past exploitation, current threats and complex marine ecosystems. *Antarct Sci*, v. 23, n. 6, p. 503-529, 2011.
- LOWEN, J. Antarctic Wildlife: A Visitor's Guide. Princeton University Press, p. 160-230, 2011.
- LUDWIG, W.; GLOECKNER, F. O.; YILMAZ, P. The use of rRNA gene sequence data in the classification and identification of prokaryotes. In: *Methods in microbiology*. Academic Press, p. 349-384, 2011.
- MAYEWSKI, P. A. *et al.* State of the Antarctic and Southern Ocean climate system. *Reviews of Geophysics*, v. 47, n 1, p. 1-38, 2009.
- MCBRIDE, M. M. *et al.* Antarctic krill *Euphausia superba*: spatial distribution, abundance, and management of fisheries in a changing climate. *Mar Ecol Prog Ser*, v. 668, p. 185-214, 2021.
- MIKHALEV, Y. A.; SAVUSIN, V. P.; BUSHUEV, S. G. Falsification of Soviet whaling data after introduction of the International Observer Scheme. International Whaling Commission Paper SC/61/IA20. Available from the IWC, Cambridge, UK, 2009.
- MILINKOVITCH, M. C.; MEYER, A.; POWELL, J. R. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol Biol Evol*, v. 11, n. 6, p. 939-948, 1994.
- MITANI, T.; AKANE, A.; TOKIYASU, T.; YOSHIMURA, S.; OKII, Y.; YOSHIDA, M. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Leg Med*, v. 11, p. S449-S450, 2009.

- NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford university press, 2000.
- OCHYRA, R.; BEDNAREK-OCHYRA, H.; SMITH, R. I. L. Illustrated moss flora of Antarctica. Cambridge University Press, 2008.
- O'REILLY, J. ; SALAZAR, J. F. Inhabiting the Antarctic. The Polar J, v. 7, n. 1, p. 9-25, 2017.
- ONG, D. M. The Convention on International Trade in Endangered Species (Cites, 1973): Implications of Recent Developments in International and EC Environments Law J Env'tl L, v. 10, p. 291, 1998.
- ORLANDO, L. *et al.* Ancient DNA analysis. Nature reviews methods primers, v. 1, n. 1, p. 14, 2021.
- PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. The simple fool's guide to PCR, University of Hawaii, Honolulu, v. 2, p. 43, 1991.
- PALUMBI, S.R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: Hillis M, Moritz C & Mable Bk (Eds), Molecular Systematics, 2nd ed., Sinauer, p. 205–248, 1996.
- PEREIRA, F.; CARNEIRO, J.; MATTHIESEN, R.; VAN ASCH, B.; PINTO, N.; GUSMAO, L.; AMORIM, A. *et al.* Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. Nucleic Acids Res, v. 38, n. 22, p. e203-e203, 2010.
- PERTIERRA, L. R. *et al.* Ecosystem services in Antarctica: Global assessment of the current state, future challenges and managing opportunities. Ecosyst Serv, v. 49, p. 101299, 2021.
- PERRY, W.L.; BASS, W.M.; RIGGSBY, W.S.; SIROTKIN, K. The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. J Forensic Sci, v. 33, n. 1, p. 144-153, 1988.
- PITMAN, R. L.; ENSOR, P. Three forms of killer whales (*Orcinus orca*) in Antarctic waters. J Cetacean Res Manage, v. 5, n. 2, p. 131-139, 2003.
- PITMAN, R. L. *et al.* Observations of a distinctive morphotype of killer whale (*Orcinus orca*), type D, from subantarctic waters. Polar Biol, v. 34, p. 303-306, 2011.
- POINAR, H. N.; COOPER, A. Ancient DNA: do it right or not at all. Sci, v. 5482, n. 1139, p. 416, 2000.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Environmental conditions and the functioning of Admiralty Bay (South Shetland Islands). P Polar Res, p. 11-27, 1980.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. The past and present of King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). P Polar Res, p. 249-252, 1998.
- REEVES, R. R.; MCCLELLAN, K.; WERNER, T. B. Marine mammal bycatch in gillnet and other entangling net fisheries, 1990 to 2011. Endanger Species Res, v. 20, n. 1, p. 71-97, 2013.

- REEVES, R. R. *et al.* Distribution of endemic cetaceans in relation to hydrocarbon development and commercial shipping in a warming Arctic. *Mar Policy*, v. 44, p. 375-389, 2014.
- REILLY, S. B. *et al.* 2008a. *Megaptera novaeangliae*. IUCN 2012.IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em fevereiro de 2023.
- REN, X.; MA, X.; ALLEN, E.; FANG, Y.; WEN, S. DNA Barcoding Technology Used to Successfully Sub-Classify a Museum Whale Specimen as *Balaenoptera edeni edeni*. *Front Ecol Evol*, v. 10, p. 921106, 2022.
- ROBBINS, J. *et al.* Return movement of a humpback whale between the Antarctic Peninsula and American Samoa: a seasonal migration record. *Endanger Species Res*, v. 13, n. 2, p. 117-121, 2011.
- ROSS, H. A. *et al.* DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins, and porpoises. *J Hered*, v. 94, n. 2, p. 111-114, 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SARRI, C. *et al.* A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, v. 43, p. 35-41, 2014.
- SICIŃSKI, J. *et al.* Admiralty Bay benthos diversity—a census of a complex polar ecosystem. *Deep-Sea Res II: Top Stud Oceanogr*, v. 58, n. 1-2, p. 30-48, 2011.
- SILVA, V. S. *et al.* Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil. *Mammal Res*, v. 66, p. 349-369, 2021.
- SIMÕES, S. L. A questão territorial Antártica: uma análise das teorias de ocupação. *Revista de Iniciação Científica da FFC*, v. 14, n. 1, 2017.
- SKUZA, L. *et al.* SPInDel Analysis of the Non-Coding Regions of cpDNA as a More Useful Tool for the Identification of Rye (*Poaceae: Secale*) Species. *Int J Mol Sci*, v. 21, n. 24, p. 9421, 2020.
- SMITH, C. I. *et al.* Not just old but old and cold?. *Nat*, v. 410, n. 6830, p. 771-772, 2001.
- ŠIROVIĆ, A.; Hildebrand, J. A.; Wiggins, S. M.; McDonald, M. A.; Moore, S. E.; Thiele, D. Seasonality of blue and fin whale calls and the influence of sea ice in the Western Antarctic Peninsula. *Deep-Sea Res II: Top Stud Oceanogr*, v. 51, n. 17-19, p. 2327-2344, 2004.
- ŠIROVIĆ, A.; Hildebrand, J. A.; Wiggins, S. M.; Thiele, D. Blue and fin whale acoustic presence around Antarctica during 2003 and 2004. *Mar Mammal Sci*, v. 25, n. 1, p. 125-136, 2009.
- SNEATH, P.; SOKAL, R. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco. 1973.
- STACEY, E. Assessing the effects of whaling on the genetic diversity of North Atlantic blue whales (*Balaenoptera musculus*). 2022.

STEEL, D. *et al.* Migratory interchange of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) among breeding grounds of Oceania and connections to Antarctic feeding areas based on genotype matching. *Polar Biol*, v. 41, p. 653-662, 2017.

SCHWARTZ, T.R.; SCHWARTZ, E.A.; MIESZERSKI, L.; MCNALLY, L.; KOBILINSKY, L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci*, v. 36, n. 4, p. 979-990, 1991.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, n. 10, p. 512-526, 1993.

THOMAS, P. O.; REEVES, R.I R.; BROWNELL JR, R. L. Status of the world's baleen whales. *Mar Mammal Sci*, v. 32, n. 2, p. 682-734, 2016.

TIN, T. *et al.* Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarct Sci*, v. 21, n. 1, p. 3-33, 2009.

TØNNESSEN, J. N. Norwegian Antarctic whaling, 1905–68: an historical appraisal. *Polar Record*, v. 15, n. 96, p. 283-290, 1970.

TØNNESSEN, J. N.; JOHNSEN, A. O. The history of modern whaling. Univ of California Press, Berkeley, p. 1-798, 1982.

TORMOSOV, D. D. *et al.* Soviet catches of southern right whales *Eubalaena australis*, 1951–1971. Biological data and conservation implications. *Biol Conserv*, v. 86, n. 2, p. 185-197, 1998.

TRATHAN, P. N.; REID, K. Exploitation of the marine ecosystem in the sub-Antarctic: historical impacts and current consequences. In: *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*, v. 143, n. 1, p. 9-14, 2009.

TULLOCH, V. J.; PLAGÁNYI, É. E.; BROWN, C.; RICHARDSON, A. J.; MATEAR, R. Future recovery of baleen whales is imperiled by climate change. *Glob Change Biol*, v. 25, n. 4, p. 1263-1281, 2019.

TURNER, J.; LU, H.; KING, J.; MARSHALL, G. J.; PHILLIPS, T.; BANNISTER, D.; COLWELL, S. Extreme temperatures in the Antarctic. *J Clim*, v. 34, n. 7, p. 2653-2668, 2021.

VICTORIA, F. C. *et al.* Characterization and mapping of plant communities at Hennequin Point, King George Island, Antarctica. *Polar Res*, v. 32, n. 1, p. 19261, 2013.

VIEIRA, F. B. O Tratado da Antártica: perspectivas territorialista e internacionalista. *Cadernos Prolam/USP*, v. 5, n. 2, p. 49-82, 2006.

VIEIRA, L. V. *Pisando firme: Um estudo geoarqueológico na Antártica*. 2020. Monografia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VIRICEL, A.; ROSEL, P. E. Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Mar Mammal Sci*, v. 28, n. 1, 37-62, 2012.

WARD, R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WELLMAN, H. P.; RICK, T. C.; RODRIGUES, A. T.; YANG, D. Y. Evaluating ancient whale exploitation on the northern Oregon coast through ancient DNA and zooarchaeological analysis. *J Isl Coast Archaeol*, v. 12, n. 2, p. 255-275, 2017.

WHITEHEAD, H.; SHIN, M. Current global population size, post-whaling trend and historical trajectory of sperm whales. *Sc Rep*, v. 12, n. 1, p. 19468, 2022.

WIESNER, R. J.; RÜEGG, J. C.; MORANO, I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 183, n. 2, p. 553-559, 1992.

WILLERSLEV, E.; HANSEN, A. J.; POINAR, H. N. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol*, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2004.

WILLERSLEV, E.; COOPER, A. Ancient dna. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 272, n. 1558, p. 3-16, 2005.

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

APÊNDICE – Produção bibliográfica durante o período do Mestrado

A produção apresentada nas páginas seguintes é relacionada com o tema específico da presente dissertação, entre julho de 2022 e julho de 2024. Essa produção contempla nove artigos científicos publicados e duas patentes, relacionados com ciência Antártica, cetáceos e biodiversidade. Os temas incluídos são: identificação molecular de cetáceos, com ênfase no uso de metodologias forenses, incluindo os vestígios históricos da Baía do Almirantado; Aerobiologia e investigações sobre populações de pinguins e micro-organismos antárticos com o uso de DNA ambiental; mudanças climáticas globais e taxonomia de criptógamas, na Antártica; e Astrobiologia.

“Biologia Forense e Biodiversidade: Identificação molecular de remanescentes ósseos do período de exploração baleeira na Antártica.”

Artigo publicado - Anjos et al. 2022 - Evidência .

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

*Dafne Adriana Abreu dos Anjos, Anna Luiza 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 morfológicamente 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].

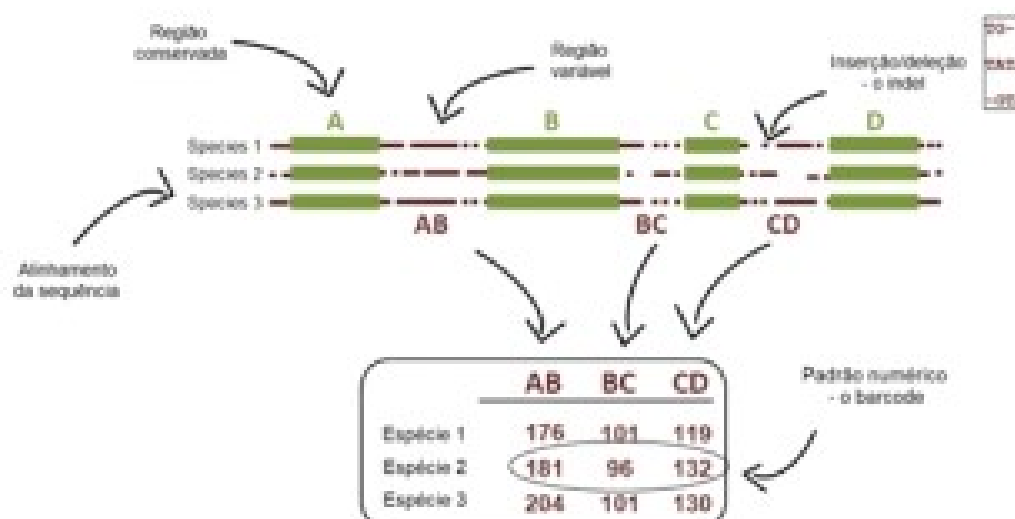


Figura 3. Esquema das análises SpInDel, representando as regiões hipervariáveis, o comprimento de regiões considerando as variações associadas às suas inserções e deleções (editado de Pereira et. al. 2010).

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.

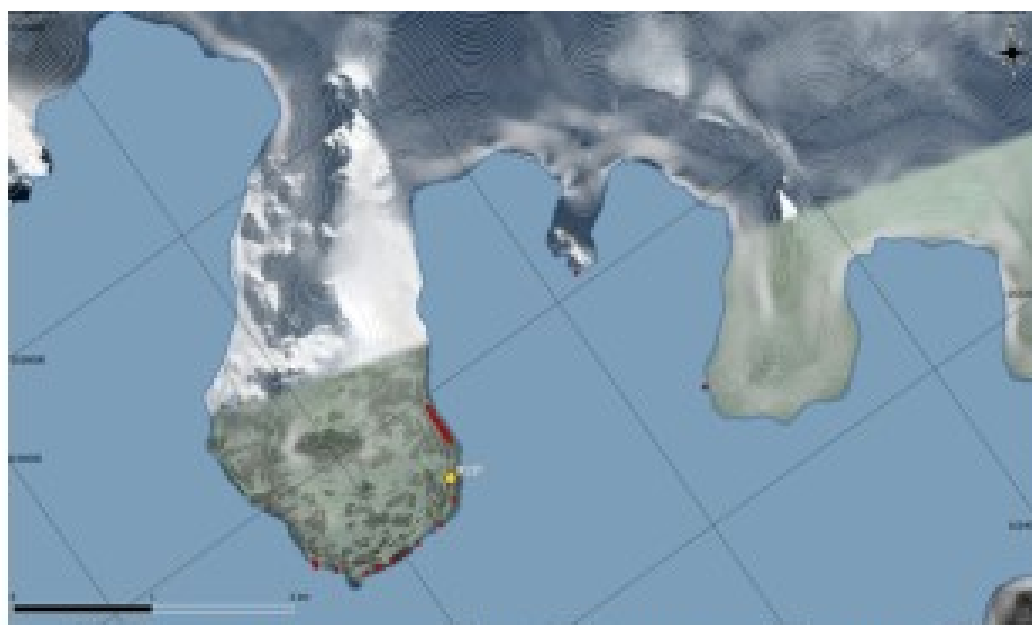


Figura 5. Mapa da distribuição dos fragmentos ósseos coletados na Península Keller, Ilha Rei George, Antártica

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.

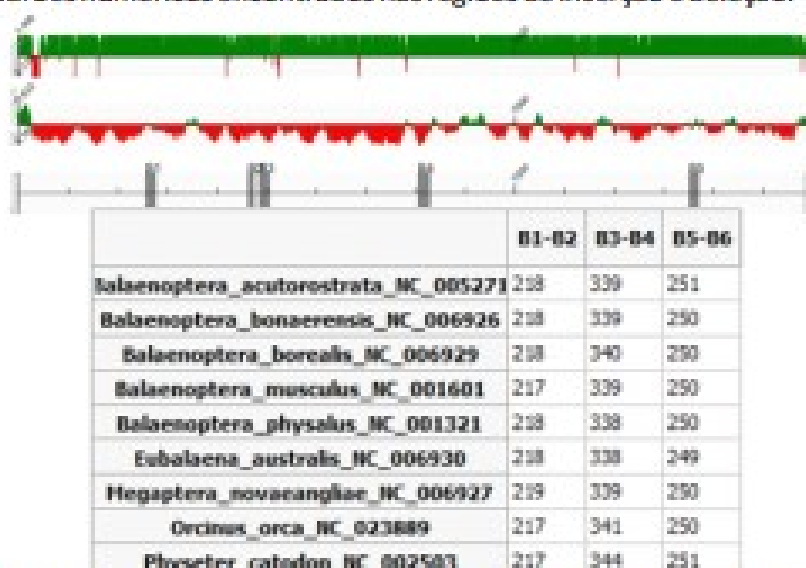


Figura 6. Regiões de inserção e deleção selecionadas para o desenvolvimento de primers para a análise de fragmentos e perfil SpinDel para cada uma das espécies de baleias que ocorrem nas águas do Oceano Austral.

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 multiples 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 Rogério 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 publicado - Anjos et al. 2023 - Academia Biology.



ACADEMIA
BIOLOGY

Communication

Published: 2023-04-19

<https://doi.org/10.20935/AcadBiol6032>

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

Dafne Adriana Abreu dos Anjos^{*,†}, Rodrigo Goldenberg Barbosa^{*,†}, Anna Luiza dos Santos Donato^{*,†}, Elizeu Fagundes de Carvalho^{*,†}, Cesar Rogerio Leal do Amaral[†]

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

^{*}Laboratório 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.

[†]Departamento 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.

[‡]Medicina 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.

[§]Laboratório 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.

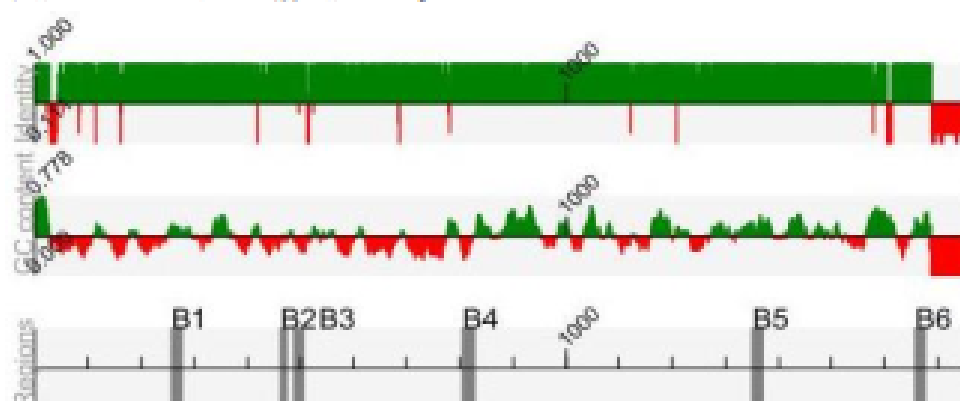


Figure 1 • Alignment performed by SpInDel WorkBench v3, with GC content profile, and the selected regions chosen to distinguish species (in gray).

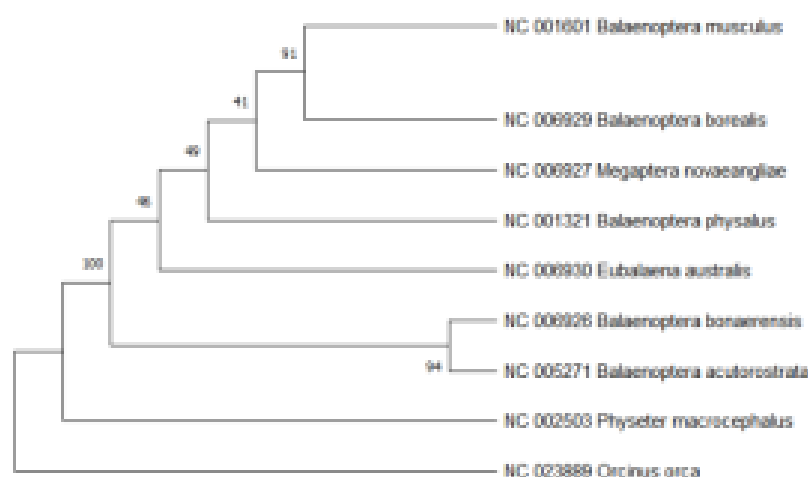


Figure 2 • UPGMA tree of included reference sequences with GenBank accession numbers showing the successful species identification based on the selected InDel regions. Bootstrap support values are represented at internal nodes.

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	228	336	317
NC_005271.1:1122-2699	228	336	318
NC_006927.1:1113-2703	229	336	317
NC_001321.1:1339-3112	228	328	317
NC_006936.1:1113-2688	228	328	316
NC_064558.1:1113-2692	227	328	326
NC_006929.1:1118-2696	228	327	317
NC_002503.2:1110-2697	227	341	318
NC_006601.1:1313-3109	227	326	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

1. 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.
2. Lindqvist C, Probst A, Martin AR, Wiig 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
3. Foote 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
4. Willerslev E, Hansen AJ, Poinar HN. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol*. 2004;19(14):7. doi: 10.1016/j.tree.2003.11.010
5. 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
6. Milinkovitch MC, Orti G, Meyer A. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature*. 1993;364(6410):346–8. doi: 10.1038/364346a0
7. 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.
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.
9. Macleod R, et al. DNA preserved in jetsam whale ambergris. *Biol Lett*. 2020;16:20190819. doi: 10.1098/rsbl.2019.0819
10. 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
11. 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.
12. 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.
13. Rodríguez D, Olsson P, Bastida R. Extracción y amplificación de ADN a partir de tejidos formalizados 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: 82–82.
14. 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
15. 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.
16. Teletchea F, Mandet C, Hänni C. Food and forensic molecular identification: Update and challenges. *Trends Biotechnol*. 2005;23:359–66.
17. 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.
18. Pereira F, et al. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res Spec Publ*. 2010;38(22):203.
19. Silva VS, et al. Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil. *Mammal Res*. 2021;66(2):349–60.
20. Amaral CRL, et al. The shark panel: An InDel multiplex for shark species identification. *J Forensic Sci Supplement Series*. 2015;5:430–2.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

“Evaluation of insertion and deletion polymorphisms of Brazilian Odontoceti”

Artigo publicado - Anjos et al. 2023 - Academia Biology.



ACADEMIA
BIOLOGY

Brief Communication

Published: 2023-07-26

<https://doi.org/10.20935/AcadBiol6105>

Evaluation of insertion and deletion polymorphisms of Brazilian Odontoceti

Dafne Adriana Abreu dos Anjos*, Anna Luiza dos Santos Donato*, Rodrigo Goldenberg-Barbosa*, Eliana Fagundes de Carvalho*, Cesar Rogerio Leal do Amaral*

Academic Editor(s): César Marcial Escobedo Bonilla, Andre J. van Wijnen

Abstract

Brazilian Odontoceti strandings provide substantial information about distribution, health, and genetics of this suborder. Moreover, molecular identification is required and studies in this area have been developed to clarify their distribution and phylogeny, since morphological identification may be infeasible in some degraded samples. In this study, we performed an *in silico* analysis of InDels in 16S rRNA from 27 species of toothed whales, dolphins, and porpoises present in Brazilian waters and recurrently found stranded in the region. We accomplished the species' identification based on the unique SpInDel profile for all Odontoceti species, except Phocoenidae, and for six species of delphinids.

Keywords: Odontoceti, cetaceans, Brazil, SpInDel, 16S rRNA, mtDNA

Citation: Anjos DAA, Goldenberg-Barbosa R, Donato ALS, Carvalho EF, and Amaral CRL. Evaluation of insertion and deletion polymorphisms of Brazilian Odontoceti. *Academia Biology* 2023;1. <https://doi.org/10.20935/AcadBiol6105>

1. Introduction

Odontoceti are widespread marine mammals present in all oceans, characterized by having teeth, using echolocation and social behavior. The group includes beaked whales, pilot whales, sperm whales, false killer whales, dolphins, killer whales, pygmy killer whales, porpoises, franciscana, and river dolphins. There are about 39 species, distributed in ten families that are known to exist in the Brazilian continental shelf, a rich and diverse area for cetaceans [1–7].

Strandings are the main source of information for some Odontoceti species, for which information on distribution and molecular resources is still missing [8–13]. For such samples, misidentification is a major problem, since morphological identification can be infeasible on bodies in deep stages of decomposition [14]. In these cases, genetic analysis can be performed to confirm or rectify the identification, although it has its own difficulties: DNA isolation from a degraded material with good enough quality to allow molecular assays can be problematic [12–15] and some Odontoceti groups appear to be too genetically similar for DNA barcoding [15, 16].

To bypass this kind of problem, Species Identification Based on Insertion/Deletion polymorphisms (SpInDel) could be a useful tool. This forensic gold-standard allows reliable identification of samples with degraded DNA, based on numeric profiles generated by InDels that influence the length of chosen regions in polymorphic short sequences [17, 18]. This method may enable

the identification of animal samples [17–19], such as those retrieved from stranded carcasses, without needing long fragments.

Using database sequences of 16S rRNA, we aimed to evaluate the potential of insertion and deletion polymorphisms in the molecular identification of Odontoceti species present in Brazilian waters. We intended to enable the identification of degraded samples with SpInDel with few regions as possible, allowing easier and low-cost alternatives to other powerful tools to identify individuals, such as DNA barcoding using COI or *cytb* [15, 16].

2. Material and methods

Sequences were obtained on the NCBI database-GenBank of 16S rRNA from 27 species of Odontoceti present in the Brazilian shore. The five excluded species (*Hyperoodon planifrons*, *Mesoplodon layardii*, *Lisodelphis peronii*, *Sotalia fluviatilis*, and *Sotalia guianensis*) have no available sequences of the target region in this database. The alignments were performed using the default parameters of MUSCLE found on the software Geneious v.4.8.2. InDel regions were determined, and phylogenetic trees were generated based on the InDel polymorphisms using default parameters of SpInDel WorkBench v3 [20]. Analyzed species and respective GenBank accession numbers of the retrieved sequences are given as follows:

*Laboratory of Radioecology and Global Changes, Nucleus of Environmental Molecular Genetics and Astrobiology, Department of Biophysics and Biometry, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*DNA Diagnostics Laboratory, Department of Ecology, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

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

Outside Delphinidae: *Isia geoffrensis* (NC_005276.1), *Kogia breviceps* (NC_005272.1), *Kogia sima* (NC_041303.1), *Mesoplodon densirostris* (NC_021974.2), *Mesoplodon grayi* (NC_023830.1), *Physeter macrocephalus* (NC_002503.2), *Phocoena spinipinnis* (NC_053750.1), *Phocoena dioptrica* (NC_053752.1), *Pontoporia blainvilliei* (NC_005277.1), and *Ziphius cavirostris* (NC_021435.1).

Delphinidae: *Cephalorhynchus commersonii* (NC_060610.1), *Delphinus delphis* (NC_036415.1), *Feresa attenuata* (NC_019588.1), *Globicephala macrorhynchus* (NC_019578.2), *Globicephala melas* (NC_019441.1), *Grampus griseus* (NC_012062.1), *Lagenodelphis hosei* (NC_037848.1), *Orcinus orca* (NC_064558.1), *Peponocephala electra* (NC_019589.1), *Pseudorca crassidens* (NC_019577.1), *Stenella attenuata* (NC_012051.1), *Stenella clymene* (NC_060611.1), *Stenella coeruleoalba* (NC_012053.1), *Stenella frontalis* (NC_060612.1), *Stenella longirostris* (NC_032301.1), *Steno bredanensis* (NC_042761.1), and *Tursiops truncatus* (NC_012059.1).

3. Results

Due to the number of species and the genetic similarities among them [15, 16], we separated Delphinidae from other Brazilian Odontoceti. In this way, we performed two separated alignments (one for Delphinidae and another for other Brazilian Odontoceti) to determine conserved and polymorphic regions of interest for SpInDel analysis and tracing the InDel profile for each species [20, 21].

Four polymorphic regions were selected which could be distinguished for all Odontoceti species out of Phocoenidae (Table 1). *Phocoena spinipinnis* and *Phocoena dioptrica* showed no difference in the InDel patterns of 16S rRNA, sharing the same profile. For Delphinidae, six species were successfully identified by the SpInDel profile, based on five polymorphic regions (Table 2): *Steno bredanensis*, *Pseudorca crassidens*, *Peponocephala electra*, *Orcinus orca*, *Feresa attenuata*, and *Cephalorhynchus commersonii*. *Delphinus delphis*, *Globicephala* spp., *Grampus griseus*,

Lagenodelphis hosei, *Stenella* spp., and *Tursiops truncatus* didn't yield sufficient heterogeneity in 16S rRNA InDels for distinguishing them from each other.

Table 1 • SpInDel profile for Odontoceti.

	O1–O2	O3–O4	O5–O6	O6–O7
<i>Isia geoffrensis</i> (NC_005276.1)	243	186	283	74
<i>Kogia breviceps</i> (NC_005272.1)	238	190	283	73
<i>Kogia sima</i> (NC_041303.1)	241	190	283	74
<i>Mesoplodon densirostris</i> (NC_021974.2)	243	187	282	76
<i>Mesoplodon grayi</i> (NC_023830.1)	243	287	282	73
<i>Physeter macrocephalus</i> (NC_002503.2)	247	189	282	76
<i>Phocoena spinipinnis</i> (NC_053750.1)	246	187	284	79
<i>Phocoena dioptrica</i> (NC_053752.1)	246	187	284	79
<i>Pontoporia blainvilliei</i> (NC_005277.1)	242	189	283	73
<i>Ziphius cavirostris</i> (NC_021435.1)	243	186	282	73

Table 2 • SpInDel profile for Delphinidae species.

	D1–D2	D3–D4	D4–D5	D5–D6	D7–D8
<i>Cephalorhynchus commersonii</i> (NC_060610.1)	71	145	294	120	90
<i>Delphinus delphis</i> (NC_036415.1)	71	144	294	120	90
<i>Feresa attenuata</i> (NC_019588.1)	74	145	294	120	90
<i>Globicephala macrorhynchus</i> (NC_019578.2)	71	145	294	120	91
<i>Globicephala melas</i> (NC_019441.1)	71	145	294	120	91
<i>Grampus griseus</i> (NC_012062.1)	71	144	294	120	90
<i>Lagenodelphis hosei</i> (NC_037848.1)	71	144	294	120	90
<i>Orcinus orca</i> (NC_064558.1)	74	145	294	120	89
<i>Peponocephala electra</i> (NC_019589.1)	71	145	294	121	90
<i>Pseudorca crassidens</i> (NC_019577.1)	71	146	294	120	90
<i>Stenella attenuata</i> (NC_012051.1)	71	144	294	120	90
<i>Stenella clymene</i> (NC_060611.1)	71	144	294	120	90

The phylogenetic trees derived from the InDel analysis showed significant differences from other phylogenetic reconstructions in recent studies [28]. *Kogia sima* and *K. brevicauda* are split into different groups, as if they were more related to *Pontoporia* and *Inia*, respectively (Figure 2). SpInDel was developed not only for the prediction of InDel profiles in the identification of species, but also for statistical and phylogenetic analyses [17–21]. Yet, in this analysis, we aimed only to perform species identification, prioritizing the use of as few sequences as possible and letting aside the phylogenetic relationship accuracy.

Considering this, this low-cost identification based on polymorphisms of insertion and deletion can be a suitable approach for the identification of Brazilian Odontoceti species on stranded animals and carcasses, except for some closely related Delphinidae species and Phocoenids. Further studies are still needed to obtain sequences of the five species that have no available sequences in public databases until now, and to better evaluate the effectiveness of SpInDel. Moreover, we developed and tested primers for the conserved regions, and also performed laboratory assays that apply this *in silico* approach in the identification of Odontoceti samples.

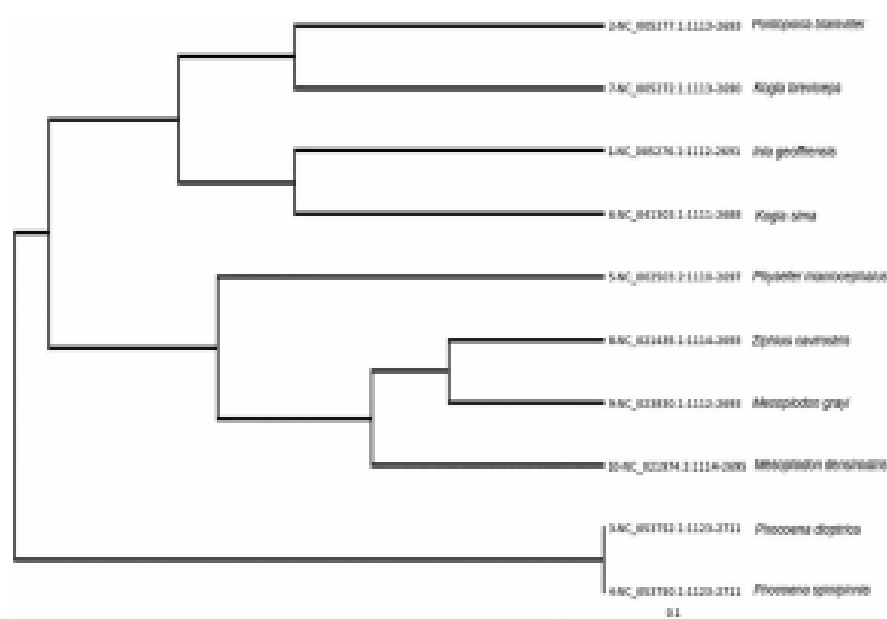


Figure 2 • UPGMA tree of included reference sequences obtained from GenBank, based on the selected InDel regions.

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 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support provided.

Funding

Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Author contributions

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

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

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

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

Additional information

Received: 2022-12-07

Accepted: 2023-05-16

Published: 2023-07-26

Academia Biology papers should be cited as *Academia Biology* 2023, ISSN2837-4010, <https://doi.org/10.20935/AcadBiol6105>. 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

1. Rocha-Campos CC, Címara IG. Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; 2011. 156p.
2. Jefferson TA, Webb MA, Pitman R. Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification. Elsevier; 2011. 74–300p.
3. Pinedo MC, Rosas FCW, Marmontel M. Cetáceos e Pinípedes do Brasil. Manaus: UNEP/FUA; 1992.
4. Pinedo MC, Lamardo M, Barreto AS. Review of *Ziphius cavirostris*, *Mesoplodon grayi* and *Lagenodelphis hosei* (Cetacea: Ziphiidae and Delphinidae) in Brazilian waters, with new records from southern Brazil. *Atlantica*. 2002; 23:67–76.
5. Pinedo MC, Barreto AS, Lammardo MP, Andrade ALN, Geracitano L. Northernmost records of the spectacled porpoise, Laysan's beaked whale, Commerson's dolphin and Peale's dolphin in the southwestern Atlantic Ocean. *Aquat Mamm*. 2002;28:32–7.
6. Zerbini NA, Secchi ER, Siciliano S, Simões-Lopes PC. A review of the occurrence and distribution of whales of the Genus *Balaenoptera* along the Brazilian coast. *Report Int Whaling Commis*. 1997;47:407–17.
7. Hrbek T, et al. A new species of river dolphin from Brazil or: how little do we know our biodiversity. *PLoS One* 2014;9:e83623. doi: 10.1371/journal.pone.0083623
8. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Listas de espécies ameaçadas do Brasil; 2022.
9. IUCN. The IUCN red list of threatened species. Version 2022-1. 2022. Available from: <http://www.iucnredlist.org>.
10. Pyenson ND. Carcasses on the coastline: measuring the ecological fidelity of the cetacean stranding record in the eastern North Pacific Ocean. *Paleobiology*. 2010;36:453–80. doi: 10.1666/09018.1
11. Vianna TDS, et al. Review of thirty-two years of toothed whale strandings in Santa Catarina, southern Brazil (Cetacea: Odontoceti). *Zoologia (Curitiba)*. 2016;33(5). e20160089.
12. Metredes ACO, et al. Cetacean strandings on the coast of Ceará, north-eastern Brazil (1992–2005). *J Mar Biol Assoc UK*. 2009;89:1083–90. doi: 10.1017/S0025315409000221
13. Sholl TGC, et al. Cytochrome b sequencing for the species identification of whale carcasses washed ashore in Brazil. *Marine Biodivers Records*. 2013;6. doi: 10.1017/S175526721200015
14. Dalebout ML, Van Helden A, Van Waerebeek K, Baker CS. Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Mol Ecol*. 1998;7:687–94. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00380.x
15. Alfonsi E, et al. The use of DNA barcoding to monitor the marine mammal biodiversity along the French Atlantic coast. *Zoology*. 2013;365:5–24. doi: 10.3897/zookey.365.5873
16. Silva VS, et al. Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil. *Mammal Res*. 2021;66(2):349–69.
17. Amaral CRL, et al. The shark panel: an InDel multiplex for shark species identification. *J Forensic Sci Suppl Ser*. 2015;5:430–2.
18. 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 Suppl Ser*. 2017;6:221–3.
19. Alves C, et al. Species identification in forensic samples using the SPInDel approach: a GHEP-ISFG inter-laboratory collaborative exercise. *Forensic Sci Int: Genet*. 2017;28: 219–24.
20. Pereira F, et al. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res Spec Publ*. 2010;38(22):203.
21. 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.
22. Sholl TGC, Nascimento FF, Leoncini O, Bonvicino CR, Siciliano S. Taxonomic identification of dolphin love charms commercialized in the Amazonian region through the analysis of cytochrome b DNA. *J Mar Biol Assoc UK*. 2008;88:1207–10. doi: 10.1017/S002531540800043X
23. Amaral ARM, Sequeira M, Coelho MM. A first approach to the usefulness of cytochrome c oxidase I barcodes in the identification of closely related delphinid cetacean species. *Mar Freshw Res*. 2007;58:505. doi: 10.1071/MF07050
24. Viriel A, Rosel PE. Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Marine Mammal Sci*. 2011;28:37–62. doi: 10.1111/j.1748-7692.2010.00460.x
25. Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol*. 1991;32: 128–44.

26. Rosel PE, Hargood MG, Perrin WF. Phylogenetic relationships among the true porpoises (Cetacea: Phocoenidae). *Mol Phylogen Evol.* 1995;4(4):463–74. doi: 10.1006/mpev.1995.1043
27. Pimper LE, Goodall RNP, Renis ML. First mitochondrial DNA analysis of the spectacled porpoise (*Phocoena dioptrica*) from Tierra del Fuego, Argentina. *Mamm Biol.* 2012;77:459–62. doi: 10.1016/j.mambio.2012.02.002
28. McGowen MR, et al. Phylogenomic resolution of the cetacean tree of life using target sequence capture. *Syst Biol.* 2020;69(3):479–501.

“Molecular identification of whales remains from the Keller Peninsula, Admiralty Bay, King George Island, Antarctica” - Artigo publicado - Anjos et al. 2024 - AABC



An Acad Bras Cienc (2024) 96(Suppl. 2): e20240502 DOI 10.1590/0001-3765202402040502
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

ANIMAL SCIENCE

Molecular identification of whales remains from the Keller Peninsula, Admiralty Bay, King George Island, Antarctica

DAFNE ANJOS, ANNA DONATO, RODRIGO GOLDENBERG-BARBOSA, ELIZEU FAGUNDES DE CARVALHO & CESAR R.L. AMARAL

Abstract: At the beginning of the 20th century, intense whaling activity took place in the South Shetland Islands, which is represented today in the form of ruins and numerous whale bones scattered along several Antarctic beaches. Despite being exposed to a harsh environment throughout the last decades, the present manuscript tried to answer if these bone remains still have viable DNA to allow species' identification using molecular methods. Several individuals were collected from the shores of Keller Peninsula, Admiralty Bay, Antarctica, and submitted to DNA extraction, amplification and Sanger sequencing. The challenging identification of these bone fragments proved to be still feasible. Mitochondrial DNA was successfully extracted, amplified and sequenced. A database with 43 sequences including previously published and newly determined sequences were built and enabled the precise identification to species level for some of the collected samples, therefore shedding light on the whales species that inhabited the region and how their overexploitation seems to have affected modern day presence of these species within the study area.

Key words: Antarctica, Whales, Identification, Molecular.

INTRODUCTION

Throughout the 19th and 20th centuries, whaling in the Southern Ocean led some cetacean populations to the brink of extinction, and these populations are today still in the process of recovery and returning to their grounds (Clapham et al. 1999, Thomas et al. 2016, Jackson et al. 2020). Hundreds of thousands of baleen whales were caught around the Antarctic Peninsula throughout the 'Modern Whaling' years (17th to 19th century), when advances of technology from Industrial revolution were applied in whaling (Clapham & Baker 2018, Vighi et al. 2020). The place was considered an ideal hunting hotspot, as it comprises feeding grounds for several cetaceans (Friedlaender & Modest 2018, Bierlich et al. 2022), due to the abundance

of planktonic organisms present in the diet of most of these marine mammals (Flores et al. 2012, McBride et al. 2021). In the early years of Antarctic whaling, Humpback whales were the first and main targets of whalers, but it changed from about 1914, with the implementation of more advanced hunting technologies, such as the steam engine and explosive harpoons, increased the capacity number and size of captures, making Blue whales and Fin whales became the most exploited species when whaling activities became possible in the Admiralty Bay (Tønnessen & Johnsen 1982, Kittel 2001, Clapham & Baker 2018).

Remains from this period can be found in the South Shetland Islands in the form of whaling stations' ruins, rusting ships, minor

objects of wood and metal; oil storage barrels and littered whale bone remains still deposited on several Antarctic shores (Hacquebord 1992, Kittel 2001). The Admiralty Bay, King George Island, is one of the most important areas for research about the whaling period in Antarctica (Kittel 2001). Kittel (2001), Rakusa-Suszczewski & Nedzarek (2002) counted 158 to 175 whale skulls still deposited in Admiralty Bay beaches, with variable disponibility due to eventual burying. Almost half of them, 89 skulls, are located in Keller Peninsula, near the 'Comandante Ferraz' Brazilian Antarctic Station (Kittel 2001, Rakusa-Suszczewski 1998). The abundance of these bone fragments is related to its sheltered waters, which provided an ideal base for floating factories (Tønnessen & Johnsen 1982), where the carcasses were flensed. In the present, these bones may be an unique source for retrieving genetic information that would aid in the study of historical whale populations prior to human exploitation in the Southern Ocean (Lindqvist *et al.* 2009). However, morphological species identification is not easy since most remains are found disarticulated and affected by severe weathering, some of them represented only as small bone fragments present in the soil (Kittel 2001, Szabo 2008), all extensively affected by the nearby marine environment.

In this sense, molecular methods may be a key tool and have been used in the identification of different marine mammals, including whale remains (Foote *et al.* 2012, Lindqvist *et al.* 2009, Solazzo *et al.* 2017, Speller *et al.* 2016). However, the process of DNA profiling bone samples is highly challenging due to several factors that can either facilitate or impede successful testing (Jakubowska *et al.* 2012, Campos *et al.* 2012, Andelinovic *et al.* 2005). Additionally, if these remains came from aquatic environments, the associated difficulties for DNA typing grow exponentially.

The exposure of bone specimens to fresh water has been demonstrated to be significantly damaging to the remaining DNA (Crainic *et al.* 2002, Courts & Madea 2011). The same is true for seawater and there is limited research on DNA profiling of remains submerged in seawater, particularly when only bone samples are available for analysis (Staiti *et al.* 2004, D'Errico *et al.* 1998, Kapinska & Szczerkowska 2004), and to date, there is no universal method for DNA profiling bone samples exposed to prolonged seawater immersion, prompting ongoing efforts to develop and enhance new methodologies.

The present study aimed to investigate if even after about a hundred years of exposure on a harsh marine environment, eventually submerged, eventually buried in sediments/snow, there is still available DNA to accomplish the first molecular identification of an old, degraded, and heavily weathered whale bone samples from Admiralty Bay, shedding light on the whales species that inhabit the region and the impact of their overexploitation along the modern whaling years in Antarctica.

MATERIALS AND METHODS

For molecular analyses, bone fragments were isolated from the remains deposited on the shores of Keller Peninsula, Admiralty Bay, King George Island, Antarctica (Figures 1 and 2). 38 samples were collected, a triplicate collection was carried from each skull bone, under the license MMA 02000.000277/2021-09 and IBAMA 02001.013446/2019-38. In this work, we chose to use only fragments related to skull remains as reference because vertebrae and ribs could be from the same individual. The collections were carried out during the Antarctic summer of 2021 and 2022. Although bone pieces can be moved along the time from their original deposition locations by the sea waves and anthropogenic

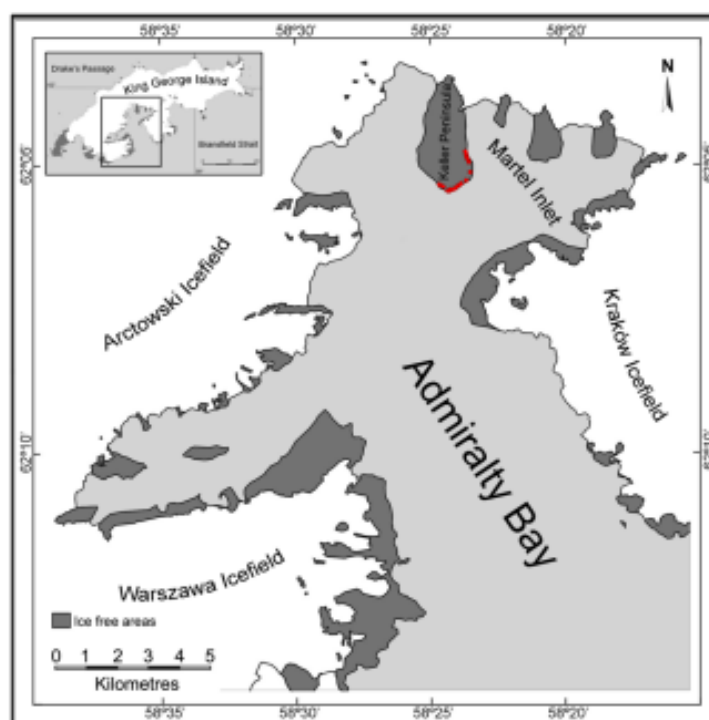


Figure 1. Samples localities (in red) on the shores of Keller Peninsula, Admiralty Bay, King George Island, Antarctica.

activity, the choice of the sites followed previous studies of whale bones distribution (Kittel 2001) and was limited by the available access at the beginning of the austral summer. All sample sites were plotted over the Admiralty Bay map using QGIS 3.22.8 software (QGIS Development Team, <http://qgis.osgeo.org>) (Figure 1).

DNA extractions were done using the ExtractMe RNA & DNA Kit (BLIRT S.A., Poland) following the manufacturer's protocol, with an additional time on the first step, where the samples were incubated with the Lysis Buffer overnight in an Eppendorf ThermoMixer C at 56°C, to increase the bone digestion (Arismendi et al., 2004). DNA quantification was estimated via spectrophotometry using a Multiskan SkyHigh Microplate and a Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) spectrophotometers.

After extraction and quantification, the PCR amplification step was made using the universal 16S_{ar} (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') and 16S_{br} (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAGT-3') primers (Milinkovitch et al. 1994, Palumbi et al. 1991, Palumbi 1996). The protocol followed was of 2 min at 95°C, 35 cycles of 30 sec at 94°C, 40 sec at 52°C, and 1 min at 72°C, with a final extension step for 10 min at 72°C. The PCR products were purified using the enzyme ExoSAP-IT® (USB Corporation) and Sanger sequencing method was performed in the Laboratory of Diagnosis by DNA (UERJ- RJ), using the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), with 25 cycles of 10 sec at 95°C, 5 sec at 50°C and 4 min at 60°C. Sequencing products were processed in an ABI 3500 capillary system (Applied Biosystems). The results of the capillary electrophoresis were visually checked, trimmed



Figure 2. Details about sampling in field (a) Whale bone remains densely covered by snow ice during the first months of the Antarctic winter; (b) Sampling sites at Keller Peninsula; (c and d) heavily weathered bone remains.

and analyzed using Geneious v4.8.2. (Drummond et al. 2010).

A database was built including 39 DNA sequences from Antarctic commonly

found whales were downloaded from GenBank and added to the four newly generated sequences and aligned in a single matrix using Muscle. The database included the Antarctic Peninsula occurring species of baleen whales and large odontocetes, such as: *Balaenoptera acutorostrata*, *Balaenoptera borealis*, *Balaenoptera musculus*, *Balaenoptera physalus*, *Eubalaena australis*, *Megaptera novaeangliae*, *Physeter macrocephalus*, and *Orcinus orca* (Table 1). All sequences were aligned using the default parameters of MUSCLE on the software Geneious v4.8.2 (Kearse et al. 2012, Edgar 2004).

The species identification was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (x 1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura 1980) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 43 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 199 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al. 2018).

Table 1. GenBank accession numbers for the previously published sequences used in our analyses.

Species	Accession	Species	Accession
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	MT410935	<i>Balaenoptera physalus</i>	KV572860
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	AP006468	<i>Eubalaena australis</i>	OP205178
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	NC00527	<i>Eubalaena australis</i>	OP205179
<i>Balaenoptera borealis</i>	MF409248	<i>Eubalaena australis</i>	OP205180
<i>Balaenoptera borealis</i>	MF409249	<i>Eubalaena australis</i>	AP006473
<i>Balaenoptera borealis</i>	AP006470	<i>Megaptera novaeangliae</i>	U13117
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257891	<i>Megaptera novaeangliae</i>	MF409246
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257892	<i>Megaptera novaeangliae</i>	PP475430
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257894	<i>Megaptera novaeangliae</i>	AP006467
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257896	<i>Physeter macrocephalus</i>	KU891393
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257900	<i>Physeter macrocephalus</i>	KU891394
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257903	<i>Physeter macrocephalus</i>	MT410874
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257908	<i>Physeter macrocephalus</i>	U13119
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257909	<i>Physeter macrocephalus</i>	NC002503
<i>Balaenoptera musculus</i>	ON257910	<i>Orcinus orca</i>	GU187211
<i>Balaenoptera physalus</i>	U13103	<i>Orcinus orca</i>	GU187215
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572854	<i>Orcinus orca</i>	GU187217
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572857	<i>Orcinus orca</i>	GU187218
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572858	<i>Orcinus orca</i>	GU187219
<i>Balaenoptera physalus</i>	KC572859		

The molecular identification was verified by using the Maximum Likelihood method and General Time Reversible model (Nei & Kumar 2000), chosen after the model selection carried out on MEGAX (Kumar et al. 2018) using the AKAIKE criterion. Support for nodes was evaluated using the Bootstrap test with 1000 replicates (Felsenstein 1985). The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL)

approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.2930)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 41.84% sites). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 199 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al. 2018).

Maximum likelihood verification results are presented as Supplementary Material.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular Identification

The most usual approach for molecular species identification is by far the DNA Barcoding method (Hebert et al. 2003). Used for vertebrates, invertebrates, plants, fungi, the DNA Barcoding based on cytochrome C oxidase and alternatively using the cytochrome b for mammals, may lead to misidentification for some cetaceans species, including two target species of this study, *Eubalaena* spp. and *Megaptera novaeangliae* (Viricel & Rosel 2012, Silva et al. 2021). Anjos et al. (2023) recently suggested based on *in silico* data the 16S rRNA could be used as a reliable marker for the molecular identification of Antarctic cetaceans. However, although we opted for the use of 16S rRNA in the present manuscript mainly due to its mitochondrial inheritance and the ease of obtaining high quality sequences, a consensus on what molecular marker should be used for cetaceans identification is still under debate, with several studies use different molecular markers for cetaceans identification such as the COI, the D-Loop, the cytochrome b, and the 16S (Falcão et al. 2017, Silva et al. 2021, Dalebout et al. 1998, Kamal et al. 2021, Jayasankar 2020). Additionally, the high copy number that characterize the mitochondrial markers made them a first choice for degraded samples such as the bone fragments herein analyzed.

We successfully obtained genomic DNA from all bone fragments recovered and submitted to extraction with acceptable quantity values (Table S1). However, among the 34 samples obtained from Admiralty Bay, only four of them amplified the partial 16S rRNA region (samples B13, B23, B31, and B33) while all the remaining failed in amplification. Obtained sequences

were deposited in the GenBank database under the accession numbers PP790983 (B13), PP790984 (B23), PP790985 (B31), and PP790986 (B33). Among the new retrieved sequences we successfully identified three of them as *Balaenoptera musculus*, the Blue Whale (samples B13, B31, B33), and the remaining one as *Balaenoptera physalus*, the Fin Whale (sample B23) (Figure 3 and Figure S1), based on 16S rRNA.

All the material analyzed in the present manuscript had been exposed on the shores of Keller Peninsula for decades, since they may be related to whaling remains (Kittel 2001). Although the Antarctic environment provides specific conditions favorable for the conservation of these samples, considering the low temperatures during all the year and the thawing cycle during the winter, handling these samples still demands a specific and careful approach (Cavalcanti et al. 2015, 2017).

The recovery of DNA from bones submerged / partially submerged in saltwater presents a complex challenge due to potential modifications to the bone structure caused by environmental and biological factors (Bertolini et al. 2022). Salt ions absorbed during submersion can increase the bone's porosity, leading to the breakdown of collagen from the hydroxyapatite matrix. This increased porosity and collagen degradation can accelerate DNA degradation, as the nucleic acid loses protection and stability normally provided by the inorganic matrix (Bertolini et al. 2022). Additionally, microscopic marine organisms can contribute to bone structure alteration through marine microboring, which partially dissolves the mineral portion of the bone (Bertolini et al. 2022). It is common that research groups working with such challenging samples test several extraction protocols and kits, such as the QIAamp DNA Investigator Kit, based on the use of silica columns to remove PCR inhibitors and the purified DNA is then eluted with an

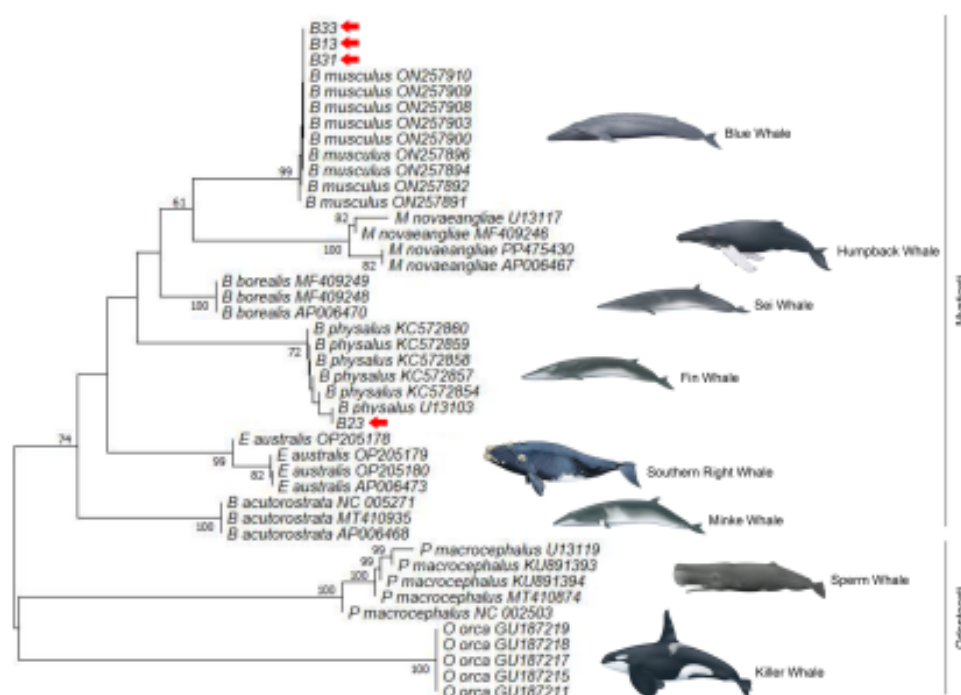


Figure 3. Neighbor-joining tree (K2P) of Antarctic occurring whales based on partial 16S rRNA (bootstrap x1000) and newly determined samples (red arrows).

elution buffer under alkaline conditions and low salt concentration. Modifications based on this protocol are also common but the obtained results are usually used for small fragment profiling such as STR methods rather than sequencing.

The exposure effects of bone remains to degrading environmental conditions have been investigated including different agents, such as UV exposition, high levels of humidity, temperature, and prolonged burial (Perry et al. 1988, Schwartz et al. 1991, Alaeddini et al. 2010). In addition, the difference in bone structure, such as those rich in oil, large rigid bones or waterlogged, may cause differences in DNA conservation state (Cartozzo et al. 2018, Alaeddini et al. 2010, Krestoff et al. 2021).

Although the cold climate in Antarctica may aid the conservation of DNA in old bones, the exposure to degrading agents could fragment the mitochondrial regions commonly used for species identification (cf. COI, 16S, 12S, and the cytochrome b gene) might not be simple to sequence (Hebert et al. 2003, Milinkovitch et al. 1994, Mitani et al. 2009, Speller et al. 2016, Willerslev et al. 2004, Vences et al. 2005). This seems to be the case for our challenging samples regarding the difficulty observed for amplification and sequencing.

Whaling activities in Admiralty Bay and its relation to the bone fragments found in Keller Peninsula

The present whale remains analyzed represent only a portion of whales caught near King George Island, given that there is no register

of whaling stations inside the Admiralty Bay and the processing of whales initially were only possible with facilities provided by shore stations. Until the first operation of a factory ship in the region, in 1906, with the *Admiralen* (Rakusa-Suszczewski 1998), availing that the bay provided ideal conditions for floating factories (Tønnessen & Johnsen 1982). The capture of large rorquals became possible with the advance of technologies and techniques of whaling, such as steam engines and explosive harpoons. These elements improved the capacity to catch larger and faster rorquals, allied with the refinement of whaling techniques, such as the injection of compressed air in the head to increase the carcasse buoyancy and avoid losing the hunt product sinking after death (Vighi *et al.* 2020). The air compression and the decapitation before flensing could be the enablers for big and heavy pieces being washed ashore, although many others must be in the seabed.

The obtained sample identifications are consistent with the massive capture of rorquals in Antarctica during the whaling period, from 1904, until its prohibition in 1982, and the Soviet illegal hunt, until 1972 (Branch 2007a, Clapham *et al.* 1999, Thomas *et al.* 2016, Tønnessen & Johnsen 1982). In addition, the absence of Humpback is also reasonable, since they were no longer the main targets when the whalers settled in Admiralty Bay (Tønnessen & Johnsen 1982, Kittel 2001, Clapham & Baker 2018). It is estimated that during the 20th century, a high number of rorquals were caught, with over 360.000 blue whales and 725.000 fin whales, in the southern hemisphere (Clapham & Baker 2001). These numbers may be underestimated, considering that a great number of catches was inefficient, ending on the whale being 'struck but lost', or severely injured, and these whales killed in failure capturings were not reported (Vighi *et al.* 2020).

Recent observation registers and acoustic detection of Antarctic Blue whales for the region are lacking, making its distribution and abundance poorly understood (Basso *et al.* 2019, Branch 2007a), still, the main feeding grounds known for Antarctic Blue whales are in the circumpolar belt (Rice 1998). The scarce observation of these giant animals near South Shetland Islands and its presence in samples probably reflects the impact of the exploitation on their abundance in the region. Despite these whales being under protection (Clapham *et al.* 1999, Ivashchenko & Clapham 2014), Branch (2004, 2007a, 2007b) estimated that the species' current abundance is still less than 1% of the original, with about 1700 individuals (Stacey 2022). However, studies to evaluate the return of Blue whales to this historical hotspot are still needed, such as it have been made for other species and locations (Jackson *et al.* 2020). Regardless of being one of the most exploited species, Fin whales' current abundance is about 38,200 individuals in Antarctica and they are commonly observed and registered seasonally in Antarctica peninsula (Burkhardt & Lanfredi 2012, Širović *et al.* 2004, 2009). These cosmopolitan whales were hunted in the region until the level of exploitation far exceeded the sustainable yield of the populations, resulting in the collapse of whaling operations.

CONCLUSIONS

Degraded and aged samples have always been a challenge for DNA typing. In the present manuscript we successfully extracted, amplified and sequenced DNA from bone fragments left on a nearby marine environment since the modern whaling period in Antarctica. The specific identification of two species of *Balaenoptera* (*B. musculus* and *B. physalus*) from heavily weathered fragments itself is remarkable

regarding the harsh environment faced by these bone remains along the last decades. The record of these species do also support the historical occurrence of them in the Admiralty Bay or nearby areas.

Blue and fin whales' current presence in Admiralty Bay still needs more observations and studies to be conclusive. However, it is clear that their abundance and distribution has reduced in the whole world due to whaling, and also within the Admiralty Bay, as illustrated in the number of bones in Antarctic shores and herein confirmed with the use of molecular techniques. Although the degraded samples represent an obstacle for DNA typing, methods using small fragments such as STR-CE or those using massive parallel sequencing (MPS) could be used to enhance recovery of DNA fragments from these samples.

Finally, this study represents one more step to understand the history of Antarctic whaling on Admiralty Bay, showing that we can still scientifically gather information from the biological remains of this period, showing how the impacts of these past anthropogenic activities over the hunted whales species still influence the present day distribution of these species in the study area.

Acknowledgments

We thank Salvatore Siciliano and an anonymous reviewer for the precious comments on the previous version of this paper. This work was supported by Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the Brazilian Navy and the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR) for the logistic support offered during the OPERANTAR XL. The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

ANDELINOVIC S ET AL. 2005. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 46(4): 530-539.

ALAEEDINI R, WALSH SJ & ABBAS A. 2010. Molecular studies of time and environment dependent effects on bone DNA survival. *Aust J Forensic Sci* 42: 211-220. doi: 10.1080/00450611003758264.

ANJOS DAA, GOLDENBERG-BARBOSA R, DONATO ALS, CARVALHO EF & AMARAL CRL. 2023. Probing the potential of InDel polymorphisms on the molecular identification of cetaceans. *Acad Biol* 1. doi: 10.20935/AcadBiol6032.

ARISMENDI JL, BAKER LE & MATTESON KJ. 2004. Effects of processing techniques on the forensic DNA analysis of human skeletal remains. *J Forensic Sci* 49(5): JFS2003314-5.

BASSOI M, ACEVEDO J, SECCHI ER, AGUAYO-LOBO A, ROSA LD, TORRES D, SANTOS MCO & AZEVEDO AS. 2019. Cetacean distribution in relation to environmental parameters between Drake Passage and Northern Antarctic Peninsula. *Polar Biol* 43, 1-15.

BERTOLINI E, GRIGNANI P, BERTOGLIO B, MARRUBINI G, MAZZARELLI D, LUCHESCHI S, BOSETTI A, FATTORINI P, CATTANEO C & PREVIDERÉ C. 2022. Dead migrants in the Mediterranean: genetic analysis of bone samples exposed to seawater. *Forensic Sci Int* 340: 111421. doi: 10.1016/j.forsciint.2022.111421.

BIERLICH KC ET AL. 2022. Seasonal gain in body condition of foraging humpback whales along the Western Antarctic Peninsula. *Front Mar Sci* 9: 1036860.

BRANCH TA, MATSUOKA K & MIYASHITA T. 2004. Evidence for increases in Antarctic blue whales based on Bayesian modelling. *Mar Mamm Sci* 20: 726-754.

BRANCH TA ET AL. 2007a. Past and present distribution, densities and movements of blue whales *Balaenoptera musculus* in the Southern Hemisphere and northern Indian Ocean. *Mamm Rev* 37.2: 116-175.

BRANCH TA, ALLISON C, MIKHALEV YA, TORMOSOV D & BROWNELL JR RL. 2007b. Historical catch series for Antarctic and pygmy blue whales. Report (SC/60/SH9) to the Scientific Committee of the International Whaling Commission, available on request from the Secretariat, International Whaling Commission, The Red House 135.

BURKHARDT E & LANFREDI C. 2012. Fall feeding aggregations of fin whales off Elephant Island (Antarctica). In Paper SC/64/SH9 presented at the Scientific Committee Meeting of the IWC. 1-6.

CAMPOS PF, CRAIG OE, TURNER-WALKER G, PEACOCK E, WILLERSLEV E, GILBERT MTP. 2012. DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat* 194: 7-16.

- CARTOZZO C, SINGH B, BOONE E & SIMMONS T. 2018. Evaluation of DNA extraction methods from waterlogged bones: a pilot study. *J Forensic Sci* 63(6): 1830-1835.
- CAVALCANTI P, CARVALHO F, CARVALHO EF & SILVA DA. 2017. A mini-primer set in a multiplex PCR fashion covering the MTDNA control region from submerged skeletal remains. *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series* 6: e469-e470.
- CAVALCANTI P, FREITAS H, CARVALHO EF & SILVA DA. 2015. Optimized DNA extraction method from skeletal remains using different typing methodologies in forensics. *J Forensic Sci Supplement Series* 5: 223-224.
- CLAPHAM PJ & BAKER CS. 2001. How many whales were killed in the Southern Hemisphere in the 20th century? Report of the International Whaling Commission 53: 3.
- CLAPHAM PJ & BAKER CS. 2018. Modern whaling. *Encyclopedia of marine mammals* 3th ed. p. 1328-1332.
- CLAPHAM PJ, YOUNG SB & BROWNELL RL JR. 1999. Baleen whales: conservation issues and the status of the most endangered populations. *Mamm Rev* 29(1): 37-62.
- COURTS C & MADEA B. 2011. Full STR profile of a 67-year-old bone found in a fresh water lake. *J Forensic Sci* 56: 172-175.
- CRAINIC K, PARAIRE F, LETERREUX M, DURIGON M & DE MAZANCOURT P. 2002. Skeletal remains presumed submerged in water for three years identified using PCR-STR analysis. *J Forensic Sci* 47(5): 1-3.
- DALEBOUT ML, VAN HELDEN A, VAN WAEREBEEK K & BAKER CS. 1998. Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Mol Ecol* 7: 687-694.
- D'ERRICO G, ZANON C, LAGO G, VECCHIO C & GAROFANO L. 1998. DNA analysis on skeletal remains after months of permanence in sea-water. In: Olaisen B, Brinkmann B, Lincoln PJ, editors. *Progress in Forensic Genetics* No. 7. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p. 106-108.
- DRUMMOND AJ ET AL. 2010. Geneious v4.8.2 <http://www.geneious.com> (last accessed in November 2013).
- EDGAR RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl Acids Res* 32: 1792-1797.
- FALCÃO LHO, CAMPOS AS, FREITAS JEP, FURTADO-NETO MAA & FARIA VV. 2017. Molecular identification of cetaceans from the West Atlantic using the E3-I5 region of COI. *Genet Mol Res Apr* 20 16(2). doi: 10.4238/gmr16029607. PMID: 28437554.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol* 39: 783-791.
- FLORES H, VAN FRANKEK JA, SIEGEL V, HARALDSSON M, STRASS V, MEESTERS EH, BATHMANN U & WILLEM JW. 2012. The Association of Antarctic Krill *Euphausia superba* with the Under-Ice Habitat. *PLOS ONE* 7(2): 31775.
- FOOTE AD, HOFREITER M, MORIN PA. 2012. Ancient DNA from marine mammals: Studying long-lived species over ecological and evolutionary timescales. *Ann Anat - Anatomischer Anzeiger* 194 (1): 112-120.
- FRIEDLAENDER A & MODEST M. 2018. 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.
- HACQUEBORD L. 1992. Hector station on Deception Island (South Shetlands Islands, Antarctica), an environmental assessment study of a whaling station. *Int J Circumpolar Health* 1-2(6): 72-97.
- HERBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL & DEWAARD JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc B* 270: 313-321.
- IVASHCHENKO YV. & CLAPHAM PJ. 2014. Too Much Is Never Enough: The Cautionary Tale of Soviet Illegal Whaling. *Mar Fish Rev* 76 (1-2) 1-21.
- JACKSON JA ET AL. 2020. Have whales returned to a historical hotspot of industrial whaling? The pattern of southern right whale *Eubalaena australis* recovery at South Georgia. *Endanger Species Res* 43: 323-339.
- JAKUBOWSKA J, MACIEJEWSKA A & PAWLOWSKI R. 2012. Comparison of three method of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *Int J Legal Med* 126: 173-178.
- JAYASANKAR P. 2020. Taxonomic identification of marine mammals - current research and approaches. *Mar Fish Infor Serv T & E Ser* 246.
- KAMAL MM, BUTET NA, RAHAYU ES & HAKIM AA. 2021. Molecular Characteristic Identification of Partial 16S rRNA Genes of Sperm Whales (*Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758). *Habitus Aquatica* 2(1): 21-28. doi: 10.29244/HAJ.2.1.21.
- KAPINSKA E & SZCZERKOWSKA Z. 2004. Personal identification based on nuclear DNA extracted from bones of deceased individuals. *Probl Forensic Sci LX*: 104-116.
- KEARSE M ET AL. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through

- comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- KITTEL P. 2001. Inventory of whaling objects on the Admiralty shores (King George Island, South Shetland Islands) in the years 1996-1998. *Pol Polar Res* 22: 45-70.
- KRESTOFF ES, CREECY JP, LORD WD, HAYNIE ML, COYER JA & SAMPSOM K. 2021. Mitochondrial DNA Evaluation and Species Identification of Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) Bones After a 3-Year Exposure to Submerged Marine and Terrestrial Environments. *Front Mar Sci* 742.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C & TAMURA K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547-1549.
- LINDQVIST C, PROBST A, MARTIN AR, WIIG Ø & BACHMANN L. 2009. Molecular species identification of historical whale remains from South Georgia. *Mar Mammal Sci* 25(1): 229-238.
- MCBRIDE M, STOKKE OS, RENNER AHH, KRAFFT BJ, BERGSTAD OA, BIJW M, LOWTHER AD & STIANSEN JE. 2021. Antarctic krill *Euphausia superba*: spatial distribution, abundance, and management of fisheries in a changing climate. *Mar Ecol Prog* 668: 185-214.
- MILINKOVITCH MC, MEYER A & POWELL JR. 1994. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol Biol Evol* 11(6): 939-948.
- MITANI T, AKANE A, TOKIYASU T, YOSHIDA S, OKII Y & YOSHIDA M. 2009. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Leg Med* 11: 449-450.
- NEI M & KUMAR S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- PALUMBI SR. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis M, Moritz C & Mable BK (Eds), *Molecular Systematics*, 2nd ed., Sinauer, p. 205-248.
- PALUMBI SR, MARTIN A, ROMANO S, MCMILLAN WO, STICE L & GRABOWSKI G. 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. University of Hawaii, Honolulu, p. 43.
- PERRY WL, BASS WM, RIGGSBY WS & SIROTKIN K. 1988. The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *J Forensic Sci* 33: 144-153.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI S. 1998. The past and present of King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Pol Polar Res* 19: 249-252.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI S & NĘDZAREK A. 2002. Whale bones and macroalgae as source of nutrients and cations in the nearshore geoecosystem of Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). *Pol J Ecol* 50:389-396.
- RICE D. 1998. Marine mammals of the world: systematics and distribution. Allen Press, Lawrence, KS.
- SAITOU N & NEI M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- SCHWARTZ TR, SCHWARTZ EA, MIESZERSKI L, MCNALLY L & KOBILINSKY L. 1991. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci* 36: 979-990.
- SILVA ET AL. 2021. Integrating morphology and DNA barcoding to assess cetacean diversity in Brazil. *Mammal Res* 66: 349-369.
- ŠIROVIĆ A, HILDEBRAND JA, WIGGINS SM, MCDONALD MA, MOORE SE & THIELE D. 2004. Seasonality of blue and fin whale calls and the influence of sea ice in the Western Antarctic Peninsula. *Deep-Sea Res II* 51: 2327-2344.
- ŠIROVIĆ A, HILDEBRAND JA & WIGGINS SM. 2009. Blue and fin whale acoustic presence around Antarctica during 2003 and 2004. *Mar Mamm Sci* 25 1: 125-136.
- SOLAZZO C, FITZHUGH W, KAPLAN S, POTTER C & DYER JM. 2017. Molecular markers in keratins from Mysticeti whales for species identification of baleen in museum and archaeological collections. *PLOS ONE* 12(8): e0183053.
- SPELLER C ET AL. 2016. Barcoding the largest animals on Earth: ongoing challenges and molecular solutions in the taxonomic identification of ancient cetaceans. *Phil Trans R Soc B* 371(1702): 20150332.
- STACEY E. 2022. Assessing the effects of whaling on the genetic diversity of north atlantic blue whales (*Balaenoptera musculus*). Saint Mary's University, Halifax, Nova Scotia, p. 4-7.
- STAITI N, DI MARTINO D & SARAVO L. 2004. A novel approach in personal identification from tissue samples undergone different processes through STR typing. *Forensic Sci Int* 146S:5171-3.
- SZABO VE. 2008. Monstrous fishes and the mead-dark sea: whaling in the medieval North Atlantic. Leiden, The Netherlands: Brill.
- TAMURA K & NEI M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.

THOMAS PO, REEVES RR & BROWNEL RL JR. 2016. Status of the world's baleen whales. *Mar Mamm Sci* 32: 682-734.

TØNNESSEN J & JOHNSEN O. 1982. The history of modern whaling. C. Hurst & Company, Australian National University, Press London-Canberra.

VENCES M, THOMAS M, VAN DER MEIJDEN A, CHIARI Y & VIEITES DR. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool* 2: 1-12.

VIGHI M, BORRELL A, JACKSON JA, CARROLL EL, PENNINO MG & AGUILAR A. 2020. The missing whales: relevance of "struck and lost" rates for the impact assessment of historical whaling in the southwestern Atlantic Ocean. *ICES J Marine Sci* 78(1): 14-24.

VIRICEL A & ROSEL PE. 2012. Evaluating the utility of *cox1* for cetacean species identification. *Mar Mamm Sci* 28(1): 37-62.

WILLERSLEV E, HANSEN AJ & POINAR HN. 2004. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol* 19:141-147.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1.
Table S1.

How to cite

ANJOS D, DONATO A, GOLDENBERG-BARBOSA R, CARVALHO EF & AMARAL CRL. 2024. Molecular identification of whales remains from the Keller Peninsula, Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *An Acad Bras Cienc* 96: e20240502. DOI 10.1590/0001-3765202420240502.

*Manuscript received on May 15, 2024;
accepted for publication on August 2, 2024*

DAFNE ANJOS¹

<https://orcid.org/0000-0002-0769-2279>

ANNA DONATO¹

<https://orcid.org/0000-0002-9286-8995>

RODRIGO GOLDENBERG-BARBOSA¹

<https://orcid.org/0000-0002-4072-8608>

ELIZEU FAGUNDES DE CARVALHO

<https://orcid.org/0000-0003-4620-7253>

CESAR R.L. AMARAL¹

<https://orcid.org/0000-0002-4314-3517>

¹Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biofísica e Biometria, Núcleo de Genética Molecular Ambiental e Astrobiologia. PHLC, Subsolo, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, 20550-013 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Ecologia, Laboratório de Diagnósticos por DNA, PHLC, Térreo, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, 20550-013 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, Pavilhão José Roberto Feresin Moraes, Policlínica Universitária Piquet Carneiro. Av. Marechal Rondon, 381, São Francisco Xavier, Maracanã, 20950-003 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Ecologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, PHLC, 2º Andar, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, 20550-013 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence to: **Cesar Amaral**

E-mail: cesarlamaral@gmail.com

Author contributions

DA - Designed the study, worked on sampling, laboratory assays, analysis of samples and results, and wrote a preliminary version of the manuscript. AD - collaborated in the laboratory assays, analysis of samples, writing the manuscript and reviewing. RGB - collaborated in the laboratory assays, analysis of samples, writing the manuscript and reviewing. EFC - collaborated in the laboratory assays, analysis of samples, writing the manuscript and reviewing. CA - designed the study, worked on sampling, data interpretation and wrote a final version of the manuscript.

