



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E
PLANTAS

FÁBIO LEAL VIANA BONES

**Estudo da diversidade vegetal da Baía do Almirantado (Ilha Rei George,
Antártica) com uso de metabarcoding (Next Generation Sequencing)**

Florianópolis

2022

FÁBIO LEAL VIANA BONES

**Estudo da diversidade vegetal da Baía do Almirantado (Ilha Rei George,
Antártica) com uso de metabarcoding (Next Generation Sequencing)**

Dissertação submetida ao Programa de Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bones, Fábio Leal Viana

Estudo da diversidade vegetal da Baía do Almirantado
(Ilha Rei George, Antártica) com uso de metabarcoding
(Next Generation Sequencing). / Fábio Leal Viana Bones ;
orientador, Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara, 2022.
59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas,
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Antártica,.
3. Diversidade. 4. Metabarcoding. I. Eduardo Aguiar
Saraiva Câmara, Paulo. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,
Algas e Plantas. III. Título.

Fábio Leal Viana Bones

Estudo da diversidade vegetal da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Antártica) com uso de metabarcoding (Next Generation Sequencing).

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a)

Pedro Fiaschi

Prof.(a)

Fabyano Alvares Cardo Lopes

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.



Documento assinado digitalmente
Fernanda Maria Cordeiro de Oliveira
Data: 28/11/2022 15:09:47-0300
CPF: ***.315.629-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr.(a) Fernanda Maria Cordeiro de Oliveira Coordenadora do Programa



Documento assinado digitalmente
PAULO EDUARDO AGUIAR SARAIVA CAMARU
Data: 06/01/2023 15:42:30-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr.(a) Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara Orientador

Florianópolis, 15 de agosto de 2022

Este trabalho é dedicado aos meus pais, que sempre me deram todo o apoio necessário, a meu orientador Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara, que me ensinou, ajudou, confiou dentro e fora da academia, e Fabyano Alvares Cardoso Lopes que teve a bondade de me ensinar tudo o que precisei para a realização das análises dos dados de DNA metabarcoding desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa que permitiu dois anos de formação acadêmica de qualidade e à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que permitiu estudar numa universidade pública, gratuita e de qualidade.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas e toda sua equipe de funcionários, alunos e professores pela oportunidade de fazer parte desse time, mesmo que remotamente.

Agradeço também ao Programa Antártico Brasileiro, que deu todo o suporte para a realização das coletas dos materiais aqui analisados, à Marinha do Brasil, que igualmente é essencial para a realização da pesquisa antártica, empregando seus recursos e pessoal no suporte direto as pesquisas, assim como ao Ministério de Ciências e Telecomunicações.

Agradeço ao meu orientador Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Programa Antártico Brasileiro, pela paciência e por todo conhecimento que compartilhou comigo, e mais ainda pela confiança depositada, que espero aqui retribuí-la.

Agradeço também aos amigos que sempre estiveram comigo durante essa jornada, Ícaro William Valler, Carlos Henrique Russi, Juarez Mendes Júnior e Morgana Montibeler, que contribuíram provavelmente mais do que podem imaginar de forma direta ou indireta para esse trabalho. E ao novo amigo Fabyano Alvares Cardoso Lopes, que como o grande professor que é, me mostrou os caminhos para que eu pudesse vencer o desafio ao qual me propus.

Por fim o agradecimento aos meus pais, que se provam a cada dia a como o maior alicerce da minha vida, onde posso voltar para chorar e para sorrir, que sabem quando devo refrear ou prosseguir, obrigado Dalva Evaldina Leal Viana Bones e Paulo Alencar Viana Bones.

“Uma joaninha deveria valer muito mais do que um diamante”

(Paulo Alencar Viana Bones, meu Pai)

“Ver um mundo em um grão de areia, e o paraíso em uma flor, ter o infinito na
palma da mão e a eternidade dentro de uma hora”

(William Blake)

RESUMO

Devido ao aquecimento global e ao conseqüente aumento de temperatura ao redor do planeta, os ecossistemas têm se transformado. Na Península Antártica, o aumento de temperatura registrado nos últimos 10 anos tem sido da ordem de 3° C, o que tem ocasionado diversas mudanças ao ambiente, como por exemplo, a maior disponibilidade de água líquida, chuva, áreas livres de gelo e temperaturas mais amenas. Esses fatores podem favorecer a colonização da região por novas espécies. O continente Antártico, por sua vez, já foi um lugar de difícil acesso para propágulos de espécies vindas de outras regiões do planeta, porém, devido ao aumento da presença humana no continente esse cenário tem mudado. Sendo assim, estudos que busquem detectar a chegada de novos organismos ao continente antártico se fazem necessários. Nesse estudo através da técnica de DNA *metabarcoding*, foram analisadas amostras de solo, neve e ar da baía do Almirantado, na Ilha Rei George, a fim de se obter a composição de espécies ali presente. Foram analisadas amostras com maior e menor nível de influência humana, com objetivo de inferir se o maior contato humano poderia influenciar as comunidades amostradas. Ao total foram detectados 82 táxons distribuídos em nove amostras: uma de ar, três de solo e cinco de neve. Os táxons encontrados pertencem a quatro reinos (Animalia, Chromista, Plantae e Protozoa) e 11 Filos (Arthropoda, Cercozoa, Chlorophyta, Chordata, Ciliophora, Cnidaria, Dinophyta, Mollusca, Percozoa, Porifera e Streptophyta). Somente 29% dos táxons puderam ser identificados ao nível de espécie. De todos os táxons, *Sanguina nivaloides* (Chlorophyta) foi a espécie mais abundante, além de estar presente em oito de nove amostras, seguida por outras Chlorophyta não identificadas e o gênero *Chlamydomonas*. Dos táxons identificados, 27 (22.14%) não possuem registro de ocorrência prévio para a Antártica. Não foi possível relacionar as diferenças entre comunidades com uma maior ou menor presença humana. Todos organismos encontrados não registrados para a região, foram organismos já adaptados a condições semelhantes à da Península Antártica.

Palavras-chave: Antártica. DNA *metabarcoding*. Diversidade. Mudanças climáticas. Antropização.

RESUMO EXPANDIDO

Introdução

Em razão do aumento da temperatura em decorrência do aquecimento global e seus efeitos no meio ambiente, os ecossistemas do planeta têm se transformado. Na região da Península Antártica no continente Antártico, nos últimos 10 anos tem sido registrado um aumento de temperatura na ordem de 3° C, e como consequência, diversas mudanças ao ambiente tem sido ser notadas, como uma maior disponibilidade de água líquida, aumento das chuvas, áreas livres de gelo e temperaturas mais amenas. Esses fatores que divergem das condições naturais da região podem favorecer a colonização da região por novas espécies que possam chegar ao continente. O continente Antártico, por sua vez, já foi um lugar de difícil acesso para propágulos de espécies vindas de outras regiões do planeta, porém, devido ao aumento da presença humana no continente esse cenário tem mudado, facilitando a colonização por espécies exóticas e até mesmo invasoras. Sendo assim, estudos que busquem detectar a chegada de novos organismos ao continente antártico se fazem necessários, porém, para isso ainda é necessário aumentar o conhecimento das espécies que já estão presentes na área.

Objetivos

Esse trabalho teve como objetivos inventariar as espécies de plantas terrestres presentes no ar, neve, e solo da Ilha Rei George, South Shetlands, Antarctica, encontradas através da tecnologia de DNA *metabarcoding* com ênfase em espécies crípticas, através da realização o primeiro inventário da região com o uso de ferramentas moleculares. Além disso buscou-se verificar se a presença humana tem afetado as comunidades de organismos terrestres em diferentes áreas da baía do Almirantado.

Metodologia

Através da técnica de DNA *metabarcoding*, foram analisadas nove amostras, três de solo, cinco de neve e uma de ar, de diferentes regiões da baía do Almirantado, na Ilha Rei George, Antártica, afim de se obter a uma lista da composição dos táxons ali presentes. As amostras foram também categorizadas em maior e menor nível de influência humana, com objetivo de inferir se o maior contato humano poderia

influenciar as comunidades amostradas.

Resultados e Discussão

Ao total foram detectados 82 táxons distribuídos nas nove amostras. Os táxons encontrados pertencem a quatro reinos (Animalia, Chromista, Plantae e Protozoa) e 11 Filos (Arthropoda, Cercozoa, Chlorophyta, Chordata, Ciliophora, Cnidaria, Dinophyta, Mollusca, Perclozoa, Porifera e Streptophyta). Somente 29% dos táxons puderam ser identificados ao nível de espécie. De todos os táxons, *Sanguina nivaloides* (Chlorophyta) foi a espécie mais abundante, além de estar presente em oito de nove amostras, seguida por outras Chlorophyta não identificadas e o gênero *Chlamydomonas*. Dos táxons identificados, 27 (22.14%) não possuem registro de ocorrência prévio para a Antártica. Devido à escassez de estudos utilizando a técnica de DNA em regiões antárticas, poucas comparações foram possíveis considerando os resultados encontrados nesse trabalho. Quanto ao impacto causado ou pela presença humana, não houve estatísticas que suportassem diferenças entre áreas antropizadas ou não, seja em índices de diversidade ou riqueza. A análise NMDS e PERMANOVA mostrou que não houve relação entre o nível de presença humana e a comunidade no local da amostra. Todos organismos encontrados não registrados para a região, foram organismos já adaptados a condições semelhantes à da Península Antártica. A presença de tais espécies na Península Antártica sugere que elas podem ser apenas espécies nativas antárticas até então desconhecidas. Das espécies registradas neste estudo, todas elas já estão associadas a ambientes já frios parecidos com o da Península antártica, de modo que não houve nenhuma espécie que, devido ao aumento contínuo da temperatura, possa se tornar mais capaz de colonizar e se espalhar, melhor do que elas já o fazem.

Considerações Finais

Este estudo gerou uma grande variedade de dados aumentando o conhecimento da biodiversidade antártica. Entretanto, é importante lembrar que a sequência de DNA encontrada não confirma a presença ou viabilidade de um determinado organismo, e estudos direcionados são recomendados para confirmar a presença dos táxons de interesse.

Embora conscientes de nosso esforço de amostragem não ideal, não pudemos observar nenhuma diferença estatística entre as áreas amostradas, e a avaliação do

impacto causado pela presença humana em diferentes locais e substratos mostrou que a antropização na baía, ainda não afetou significativamente as comunidades amostradas. Podemos também confirmar que o ar está sendo usado como meio de dispersão para uma grande variedade de táxons, e seu papel na colonização de áreas sem gelo precisa ser considerado.

Com relação à investigação de espécies que podem se beneficiar com o aumento da temperatura esperado, este estudo não foi capaz de observar nenhuma espécie em tais termos, mas recomendamos uma investigação mais aprofundada, com amostragem mais ampla, e se possível de forma periódica.

Devido ao resultado obtido, endossamos que o DNA *metabarcoding* é uma ferramenta viável para avaliar a diversidade e riqueza dos táxons presentes na neve, solo e ar de lugares tão difíceis como a Antártica. O grande número de sequências que não puderam ser classificadas em níveis mais específicos, pode servir como um lembrete de que ainda há a necessidade de continuar melhorando nossos banco de dados genômicos, e de que ainda há muito a se saber sobre a biodiversidade da Antártica.

Palavras-chave: Antártica. DNA *metabarcoding*. Diversidade. Mudanças climáticas. Antropização

ABSTRACT

Due to global warming and the consequent increase in temperature around the planet, ecosystems have been transformed. In the Antarctic Peninsula, the increase in temperature has been recorded at around 3°C in the last 10 years, which has caused several changes to the environment, such as greater availability of liquid water, rain, ice-free areas, and warmer temperatures. These factors may favor the colonization of the region by new species, whether invasive or not. The Antarctic continent was once a place of difficult access for the newcomers from other regions of the planet, but with the increase in human presence, this has changed. Therefore, a way to detect the arrival of new organisms is necessary, and for this purpose DNA metabarcoding has shown promise. In this study, soil, snow, and air samples from Admiralty Bay on King George Island were analyzed using such a technique, to obtain the composition of species present there. Samples with higher and lower levels of human influence were analyzed to infer whether the greater human contact could influence the sampled communities. In total, 82 taxa were detected, distributed in 9 samples, 1 of air, 3 of soil, and 5 of snow. The taxa found belonged to four kingdoms (Animalia, Chromista, Plantae, and Protozoa) and 11 phyla (Arthropoda, Cercozoa, Chlorophyta, Chordata, Ciliophora, Cnidaria, Dinophyta, Mollusca, Perclozoa, Porifera, Streptophyta). Only 29% of the taxa could be identified at the species level. Of all taxa, *Sanguina nivaloides* (Chlorophyta) was the most abundant and was present in all but one sample, followed by unidentified Chlorophyta and the genus *Chlamydomonas*. Of the taxa identified 27 (22.14%) have no previous record of occurrence for Antarctica. It was not possible to relate the differences between communities to a greater or lesser human presence. The organisms found that were not recorded for the region, were all organisms adapted to conditions like those of the Antarctic Peninsula, with the increase in temperature and its consequences having little impact on their ability to colonize the region.

Keywords: Antarctica. DNA metabarcoding. Diversity. Climate change. Anthropization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVOS	20
OBJETIVOS GERAIS	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
RESULTADOS	
CAPÍTULO 1: Exploring the non-Fungi environmental DNA diversity from Admiralty Bay on King George Island (Antarctica, South Shetland Islands) using metabarcoding with the ITS-2 marker	21
DISCUSSÃO GERAL	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO GERAL

O aquecimento global tem alterado a temperatura do planeta e produzido diversos efeitos negativos, como a retração de geleiras, aumento do nível dos oceanos, aumento na frequência e intensidade de eventos climáticos extremos, como furacões, cheias e secas (Farmer & Cook 2013). O aumento das temperaturas pode ser notado em escala global, no entanto, poucos locais têm apresentado um acréscimo tão rápido como a Península Antártica (PA) (Convey 2001, Turner *et al.* 2005). Com exceção de algumas regiões a leste onde a temperatura média tem diminuído nas últimas décadas, o continente antártico como um todo, tem registrado um aumento da temperatura geral nos últimos 50 anos (Farmer & Cook 2013, Turner *et al.* 2016a).

A Antártica corresponde à aproximadamente 14 milhões de km² e compreende o Oceano Austral e toda porção de terra localizada ao sul do paralelo 60° S (BRASIL 2014). O continente é o mais remoto do planeta e, por isso, é também um dos que menos sofreu com modificações antrópicas, por ter sido o último continente a ser descoberto somente na década de 1820, nunca teve população permanente, sendo descrito como um ambiente praticamente original (Pearce *et al.* 2016, Convey 2001). Ambiente de extremos, a Antártica apresenta temperaturas médias que variam entre -50°C a -2,8°C, e a precipitação oscila entre 20 e 40 mm anuais, sendo assim considerada um deserto frio (Convey 2001, Farmer & Cook 2013, BRASIL 2014).

Porém, a Península Antártica (PA) que fica localizada a oeste do continente Antártico e representa aproximadamente 1% da área terrestre do continente apresenta uma clima diferente (Union 2010). Na PA temperaturas acima de 0° no verão são constantemente registradas, sendo essa a única região Antártica onde se pode observar um real derretimento de gelo durante a estação mais quente do ano (Union 2010). Além disso, a precipitação de neve na PA chega a ser 80% maior do que em outras regiões do continente Antártico, onde praticamente não neva (van den Broeke *et al.* 2006).

Em sua história a PA sofreu com vários períodos de glaciação e deglaciação, chegando a sua maior extensão a aproximadamente 19 mil anos atrás (Lorius *et al.* 1985). Atualmente a região se encontra em um período de deglaciação que teve início por volta de 10 mil anos atrás. Esse processo possibilitado a criação de áreas livres de gelos, formação de solos, lagos e ilhas pela PA (Braun & Gossmann 2002, Cook *et al.* 2005, Ochyra *et al.* 2008).

No arquipélago das Shetlands do Sul, localizado na PA, a Ilha Rei George é a

mais povoada da região. É nela que está instalada a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), estação de pesquisa brasileira inaugurada em fevereiro de 1984 sendo resultado da criação do programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) no ano de 1983. A ilha serve como base para estações de outros nove países (Argentina, China, Coreia do Sul, Equador, Estados Unidos, Uruguai, Peru, Polônia, e Rússia), além de receber entre 3000 e 5700 turistas todos os anos, e possuir um aeródromo (Brazil & Poland 2005). Essas características e sua proximidade com a América do Sul, fazem da ilha é um dos locais mais prováveis a receber novos diásporos de potenciais plantas colonizadoras, e seu clima mais ameno, propicia a colonização de novos organismos na região (Rückamp *et al.* 2011).

Tal propensão aliada ao acréscimo em 3°C na temperatura e suas consequências no ambiente a colonização por novas espécies para a região tem sido ainda mais favorecida (Convey 2001, Galera *et al.* 2018, Rückamp *et al.* 2011), e esses maior sucesso no estabelecimento de organismos, poderá aumentar consigo o risco de invasões biológicas, pondo em risco a flora nativa (Galera *et al.* 2018, Pearce *et al.* 2009).

A macro flora nativa Antártica é atualmente composta por briófitas, e apenas duas angiospermas *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) e *Deschampsia antarctica* E. Desv. (Poaceae), *Poa annua* L. (Poaceae) também presente na área, é considerada uma angiosperma invasora (Gonçalves *et al.* 2008, Olech & Chwedorzewska 2011). Além disso, é possível encontrar líquens e microrganismos como algas, fungos, bactérias e protozoários colonizando a região (Pearce *et al.* 2009). A flora da região é dominada maioritariamente por microrganismos e poucas espécies criptógamas, porém, a mais conspícua vegetação nas áreas não cobertas por gelo, são as briófitas com mais de 116 espécies, seguidas pelos líquens com aproximadamente 500 espécies (Câmara *et al.* 2019, Ellis *et al.* 2013, Ochyra *et al.* 2008, Sollman 2015).

Até o século passado, a Antártica ainda resistia a colonização de novas espécies, principalmente devido a difícil chegada de propágulos no continente, em razão da corrente circumpolar Antártica, que de isola o continente do resto do mundo (Convey & Peck 2019). Além disso, para os que ali conseguiam chegar, as condições climáticas extremas encontradas, representavam um grande desafio para a colonização (Pearce *et al.* 2016). Porém isso tem mudado, o aumento da presença humana na Antártica devido ao turismo e a instalação de novas bases de pesquisa, tem facilitado a chegada de microrganismos e propágulos de todo o mundo ao continente (Pearce *et al.* 2009). Junto das atividades humanas e aves migratórias, as correntes de ar também se destacam entre

as principais vias de entradas de propágulos na Antártica (Parnikoza *et al.* 2007, Chwedorzewska 2008, Marshall 1996).

Parte dos organismos presentes na Antártica são adaptados para se dispersar por meio de esporos, fragmentos, como propágulos vegetativos especializados, ou ainda inteiramente como é observado em organismos unicelulares, formando o que é conhecido como “chuva de diásporos” (Pearce *et al.* 2009, Sundberg 2013). Esse é um fenômeno que influencia de forma decisiva a diversidade dos ecossistemas, pois os diásporos presentes no ar podem vir a tornar-se parte do banco de diásporos do solo e, se ainda viáveis após o transporte aéreo, germinar (Sundberg 2013, Convey 2001, During 2001).

Estudando a variações genéticas de *Chorisodontium aciphyllum* Biersma *et al.* (2018) pôde confirmar as semelhanças genéticas das populações Sul Americanas e Antárticas, e através de modelagens de correntes de ar, sugerir que as populações da Antártica devem ter sido originadas a partir de diásporos oriundos da América do Sul, servindo com um lugar de depósito de material biológico via correntes de ar, e que o contrário teria pouca probabilidade de ocorrer. Analisando amostras de ar, neve e musgos através de microscopia, Kappen & Straka (1988) pode detectar a imigração de pólen de angiospermas, esporos de licófitas, samambaias e musgos. inclusive Smith (1991) encontrou invertebrados como *Collembola* sp. Lubbock (1869), e até fragmentos de insetos, como escamas de asas de Mariposas. Evidenciando a eficácia desse método de transporte, Kappen & Straka (1988) puderam encontrar até mesmo pólen de *Fagus* sp., gênero nativo do hemisfério norte que possivelmente chegou a antártica disperso pelo vento.

A dispersão por meio do vento tem se mostrado importante para a configuração dos padrões de biodiversidade (Womack *et al.* 2010), e é sabido que o transporte aéreo é uma importante ferramenta na colonizações de lugares remotos por organismos como visto em Pearce *et al.* (2010). Inclusive, como observado por Ochyra *et al.* (2008) a alta proporção de espécies cosmopolitas, bipolares ou de ampla distribuição na flora Antártica, traz indícios de uma efetiva dispersão a longa distância de tais espécies, dinâmica que pode vir a sofrer alterações devido influência das mudanças climáticas sobre a Antártica (Simoes *et al.* 2011).

Para entendermos como as mudanças ambientais decorrentes do aquecimento global podem afetar os organismos terrestres antárticos, é crucial termos primeiramente conhecimento da composição atual do mesmo, e para isso, uma extensa avaliação dessa

comunidade é necessária. No início das investigações buscando descobrir quais propágulos chegam ao continente Antártico, (Marshall 1996, Marshall & Chalmers 1997) investigaram a chegada de grandes quantidades de material biológico através das correntes de ar na ilha Signy (Orcadas do Sul), advindos da América do Sul. Porém, esses trabalhos foram focados unicamente na comunidade microbiológica, além disso, foram realizados antes do advento das mais sofisticadas técnicas moleculares.

Avaliações utilizando métodos tradicionais da diversidade da vegetação Antártica como apresentadas em Ochyra *et al.* (2008) vem sendo realizadas à alguns anos, e são as maiores contribuições para o conhecimento da biodiversidade atual, porém, tais métodos requerem perícia taxonômica específica, além de uma complexa logística. Com o avanço e popularização da tecnologia, ferramentas como DNA *barcoding* (Hebert *et al.* 2003, Hollingsworth *et al.* 2009) e DNA *metabarcoding* (Taberlet *et al.* 2012a), cada vez mais tem sido usadas para a identificação de material biológico. Essas novas abordagens apresentam oportunidades para a geração de grande quantidade de informações, e podem ser aplicadas para monitorar a distribuição das espécies e a composição das comunidades com maior nível de padronização (Taberlet *et al.* 2012^a).

O DNA *barcoding* difere de outros métodos de identificação molecular principalmente pelo uso de marcadores padronizados que permitem a sua aplicação para uma variedade de táxons. O marcador “coxI” por exemplo, é utilizado para metazoários (Hebert *et al.* 2003), ITS para fungos (Schoch *et al.* 2012) e a combinação de rbcL, matK ou outros para as plantas. Porém, para plantas ainda há grande controvérsia quanto os marcadores mais adequados, sendo recomendado o uso de diferentes marcadores para diferentes grupos como briófitas, gimnospermas, samambaias e etc. (Banchi *et al.* 2020, Hollingsworth *et al.* 2009).

O uso dessa técnica, permite a identificação de organismos em qualquer estágio de vida, e de até mesmo de amostras degradadas, o que tem facilitado inclusive o descobrimento de novas espécies (Savolainen *et al.* 2005). Estudos como Gonçalves *et al.* (2008), Biersma *et al.* (2017), Biersma *et al.* (2018) e da Matta Agostini *et al.* (2017) envolvendo os microrganismos e plantas antárticas, tem se utilizado de técnicas morfológicas e moleculares para identificação de propágulos, visando entender quais espécies chegam até o continente e se ainda estão ainda aptas colonizar a região.

Apesar de o DNA *barcoding* ter se mostrado uma ótima técnica para a identificação uma ampla gama de espécies e até análises ecológicas (Hollingsworth *et*

al. 2009, Neigel *et al.* 2007, Valentini *et al.* 2009), a mesma tem suas limitações (Taberlet *et al.* 2012^a). Isso porque a técnica é limitada a análise de somente uma amostra por vez, que necessita ser a mais pura possível para que se obtenha a correta interpretação dos dados (Hebert *et al.* 2003). Isso faz com que a técnica de DNA *barcoding* não seja a mais adequada para estudos que buscam identificar uma ampla gama de organismos (Ratnasingham & Hebert 2007).

Porém, com o surgimento da técnica de DNA *metabarcoding* novas possibilidades surgiram para análise de comunidades. Apesar de ambas técnicas utilizarem, identificação de espécies baseada em DNA, as tecnologias de sequenciamento possuem objetivos específicos (Comtet *et al.* 2015). O DNA *metabarcoding* difere do DNA *barcoding* nas tecnologias de sequenciamento e processamento de dados, mas a maior diferença, é que enquanto o DNA *barcoding* tem como objetivo identificar uma única espécie em uma amostra pura, o DNA *metabarcoding* busca a identificação de grandes conjuntos de espécies que estejam presentes em uma amostra de comunidade ou ambiental (Taberlet *et al.* 2012^a).

Apesar do DNA *metabarcoding* já ser usado a vários anos principalmente na microbiologia, só recentemente a técnica tem sido empregada em estudos com macro-organismos (Coissac *et al.* 2012). Nas amostras analisadas na técnica de DNA *metabarcoding*, é procurado o DNA ambiental (eDNA), que pode ser encontrado em amostras de sedimento, água e ar por exemplo, podendo ter origem do conteúdo de células ou até de organismos inteiros, que viveram ou ainda vivem ali (Ficetola *et al.* 2008).

Dessa forma, o também chamado de sequenciamento de alta performance (*High Throughput Sequencing – HTS*), tem tornado possível o acesso a biodiversidade a partir de amostras ambientais complexas ou até de comunidades inteiras (EPP *et al.* 2012, Taberlet *et al.* 2012^a). A técnica tem permitido a recuperação da diversidade total das amostras analisadas, inclusive possibilitando a análise de diversas amostras ao mesmo tempo (Parameswaran *et al.* 2007).

Através de amostras de eDNA tem sido possível realizar com sucesso monitoramentos biológicos mais abrangentes, e que causem menos impactos ambientais, além de ser possível detectar com mais facilidade espécies pequenas ou raras (Ruppert *et al.* 2019). Isso porque, o DNA *metabarcoding* tem a capacidade de amostrar uma maior diversidade de espécies, e aumentar a resolução taxonômica quando comparado com outras técnicas (Deiner *et al.* 2017).

A tecnologia de DNA *metabarcoding* tem sido usada para investigar diversidade dos micobiontes e fotobiontes de líquens (Fernández-Mendoza *et al.* 2017), inclusive através de amostras de ar (Banchi *et al.* 2018). Da mesma forma, a alta capacidade de identificação de espécies do DNA *metabarcoding* tem sido aplicado com sucesso na identificação de espécies invasoras (Comtet *et al.* 2015). Para as plantas em geral, podemos destacar os trabalhos de Kraaijeveld *et al.* (2015), Taberlet *et al.* (2012b), e YOCCOZ *et al.* (2012), que utilizaram a técnica de DNA *metabarcoding* para identificar espécies vegetais a partir de amostras de pólen e solo. Apesar disso, pouco se utilizou esta técnica para acessar a diversidade da flora de regiões polares (Czechowski *et al.* 2017, Rippin *et al.* 2018b). Novos estudos utilizando DNA *metabarcoding* para a análise de comunidades antárticas têm mostrado ótimos resultados, registrando novas ocorrências de espécies e expandindo o conhecimento sobre a diversidade do continente (Câmara *et al.* 2021^a, Carvalho-Silva *et al.* 2021, Rosa *et al.* 2020b).

Além desses importantes resultados que contribuem para a melhor compreensão da dispersão e estabelecimento de espécies vegetais de grande valor para a ciência, as pesquisas na Antártica têm grande valor estratégico para o Brasil (Câmara & Mattos 2020). Isso porque, com a entrada do Brasil em 1975 no Tratado antártico, o país ganhou poder para decidir em igualdade com as demais nações consultivas, o destino da maior reserva de água doce do mundo, reservas marítimas e continentais de petróleo, gás natural, recursos pesqueiros e mais 14 milhões de km² ainda pouco explorados.

Porém, o tratado Antártico prevê em seu artigo IX que os países que desejarem se tornar membros consultivos, ou seja, com direito a voto, devem realizar ali substancial pesquisa científica (Câmara & Mattos 2020, Câmara & Melo 2018, FERREIRA 2009). Atualmente, a Antártica é considerada como parte do entorno estratégico brasileiro (Câmara & Mattos 2020). Isso significa que este continente passou a fazer parte oficialmente da região do planeta onde o Brasil “quer irradiar sua influência e liderança diplomática, econômica e militar” (Fiori 2013). Além dos recursos naturais, o potencial biotecnológico inexplorado presente na Antártica pode ser de valor inestimável para a nação brasileira, assim como abundância dos recursos vivos, passíveis explorações, e existência de importantes minerais, no continente e na sua plataforma continental. Não podemos esquecer também do papel do continente antártico na manutenção do clima global (Farmer & Cook 2013), o que se alterado pode exercer grande influência nas condições meteorológicas do continente sul-americano, o que pode ter impactos diretos para a sociedade brasileira principalmente em setores da

economia como o agronegócio (Câmara & Mattos 2020).

Considerando esses fatores, buscamos trazer uma visão exploratória da diversidade de espécies que estão presentes na Antártica, contribuindo com primeiros registros de ocorrência para algumas espécies e trazendo informação que poderão ser utilizadas para posteriores análises dos efeitos das mudanças climática e conservação das espécies presentes na região. Esse trabalho se assemelha com os realizados por Câmara *et al.* (2020) e Carvalho-Silva *et al.* (2021), na ilha Deception, também na Península Antártica, porém explorando além do solo, a neve e o ar da baía do Almirantado na Ilha Rei George, trazendo inclusive a primeira análise de amostras de ar através de técnica de DNA *metabarcoding* para o continente Antártico.

Sendo assim a investigação da flora críptica da região com a tecnologia de DNA *metabarcoding* utilizando amostras do solo, ar e neve da baía do Almirantado na ilha Rei George, poderá responder questões como: quais espécies vegetais têm chegado à região; se ela está relacionada como a presença humana nas áreas; e com as esperadas mudanças climáticas, quais espécies podem vir a colonizar a região.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Inventariar as espécies de plantas terrestres presentes no ar, neve, e solo da Ilha Rei George, South Shetlands, Antarctica, encontradas através da tecnologia de DNA *metabarcoding* com ênfase em espécies crípticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se a presença humana tem afetado as comunidades de organismos terrestres em diferentes áreas da baía do Almirantado.

Realizar o primeiro inventário da região com o uso de ferramentas moleculares

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Exploring the non-Fungi environmental DNA diversity from Admiralty Bay on King George Island (Antarctica, South Shetland Islands) using metabarcoding with the ITS-2 marker

FÁBIO LEAL VIANA BONES¹, AND PAULO EDUADO AGUIAR
SARAIVA CÂMARA²

¹ Programa de Pós graduação em Fungos Algas e Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

² Departamento de Botânica, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil.

Introduction

Global warming has changed the temperature around the planet, and this has brought a lot of different negative impacts, such as glacier thawing, ocean level rising, and higher extreme climate events like hurricanes, floods, and droughts (Farmer & Cook 2013). The increase in temperatures has been recorded all over the world, but few places had showed such a fast-rising trend as the Antarctic Peninsula (AP) (Convey 2001, Turner *et al.* 2005, Turner *et al.* 2016b).

On the South Shetlands archipelago situated at the AP, King George Island (KGI) is the most populated island in the region, and there we can find the Brazilian research Antarctic Station Comandante Ferraz (EACF), inaugurated in February of 1984 as part of the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR).

Due to its proximity to South America, and its milder climate, KGI is one of the most likely places for non-native species colonization. The Island also houses bases for another 10 countries (Argentina, Chile, China, Ecuador, Peru, Poland, Russia, South Korea, United States of America and Uruguay), besides receiving between 3000 and 5700 tourists every year employing the Chilean aerodrome (Brazil & Poland 2005). This easiness to the arrival of diaspores brought by wind, sea birds, or even humans (Kappen & Straka 1988, Li *et al.* 2010, Pearce *et al.* 2010), makes the island one of the most favorable places for non-native potential colonist plants introduction (Rückamp *et al.* 2011).

Adding these facts to the increase in 3°C at the temperature recorded in the last 10 years, which has led to an increase in new available ice-free areas, increased liquid water availability, and rain frequency, new species colonization has been favored in this

region (Convey 2001, Pearce *et al.* 2009, Galera *et al.* 2018). So, the greater probability of success at the non-native organisms' establishment and its further dispersion, could raise alongside the threat of biological invasion, jeopardizing the native flora (Pearce *et al.* 2009, Galera *et al.* 2018).

The Antarctica native flora is composed of 116 species of bryophytes and only 2 native angiosperms, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) and *Deschampsia antarctica* E. Desv. (Poaceae). *Poa annua* L. (Poaceae) can also be found in the region and is an invasive angiosperm (Gonçalves *et al.* 2008, Olech & Chwedorzewska 2011). Besides those, lichens and many other microorganisms like algae, fungi, bacteria, and protozoans (Pearce *et al.* 2010) are found in the region.

Some organisms living in Antarctica are adapted to disperse it selves as spores, fragments, specialized vegetative propagules, or either as a whole as is the case of some unicellular organisms, compounding what is known as the “diaspores rain” (Pearce *et al.* 2009, Sundberg 2013). This is an event that can shape decisively the diversity of ecosystems because those diaspores found in the air may later become a component of the diaspore bank in the soil, and if still viable after the air transport, germinate (Convey 2001, During 2001, Sundberg 2013). Beyond the air, the arrival of organisms in Antarctica can be made through ocean currents, migratory animals, and most recently by the increasing number of human beings flowing towards the continent (Pearce *et al.* 2009).

The terrestrial flora of Antarctica has already been investigated through morphological analysis (Ochyra *et al.* 2008), but, species inventories made like these, demand a very specific taxonomic expertise, and complex associated logistics and may not be suitable for the detection of cryptic organisms or propagules. With the advancement of technologies, increasing availability and decreasing prices, more advanced tools such as DNA barcoding (Hebert *et al.* 2003, Hollingsworth *et al.* 2009) and DNA metabarcoding (Taberlet *et al.* 2012a) have proven to be good options for the identification of biological material. Those approaches to biological identification, allow many opportunities to generate a great amount of data and can be applied to the monitoring of the distribution of species and the community's composition with higher standards (Taberlet *et al.* 2012a).

With the advent of DNA metabarcoding, new opportunities for community analysis raised. Throughout eDNA (environmental DNA), has been possible to successfully achieve broader biological surveillances, causing less environmental

damage, besides being possible to easily detect small and rare species (Ruppert *et al.* 2019). DNA metabarcoding is capable of sampling a higher species diversity and reaching also a higher taxonomic resolution when compared with other techniques (Deiner *et al.* 2017, Fraser *et al.* 2018, Rippin *et al.* 2018a, 2018b).

With those tools, we will be able to get substantive data, contributing to a better understanding of how the dispersion and establishment of new species happen in Antarctica. Such knowledge will be of great value for science and future research in the world, but they have also special strategic importance for Brazil (Câmara & de Mattos 2020).

Considering these factors, the investigation of the cryptic flora of the region with the use of DNA metabarcoding technology utilizing snow, soil, and air samples from KGI, more specifically at Admiralty Bay, may help answer questions such as: which plant taxa have been arriving to the region; if it is associated to the human presence at the sites; and if the expected climate changes and temperature rise, which species may come to colonize the region.

Methods

Study sites

Admiralty Bay is the largest bay of King George Island (KGI), with an area of approximately 360 km², and belongs to ASMA No. 1 (Antarctic Specially Managed Area) (Fig. 1). The site located inside the KGI is mostly sheltered from high winds from the Antarctic ocean and the Bransfield strait, presenting distinct microclimate from the other parts of the island characterized by an average annual temperature of around 1.8°C (Brazil & Poland 2005). The Admiralty Bay is where the Brazilian Station Comandante Ferraz (EACF) is located beside it, four other countries have research stations in the bay: Poland, the United States, and Peru. In addition to numerous scientists, supporting personnel, and research expeditions, Admiralty Bay is visited by an increasing number of tourists, the latter mainly as organized tourist ship expeditions and private yachts. Tourists typically land at Poland or Brazilian stations for a tour of facilities, go for a walk along the coast, and sometimes make short cruises in Zodiac boats (Brazil & Poland 2005).

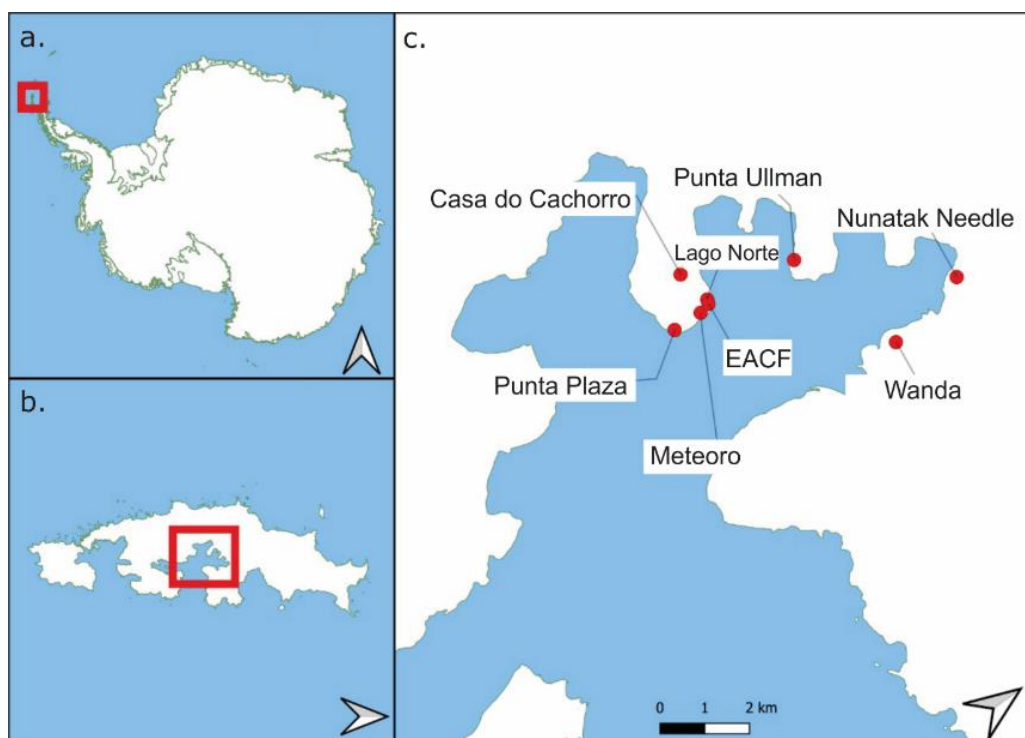


Fig. 1. Study area. (a) Location of King George Island on the Antarctic continent; (b) Location of the study site at Admiralty Bay on King George Island (c); location of the Comandante Ferraz Antarctic Station on King George Island (EACF) and sampling areas. Source: from the Authors.

Aiming to evaluate the impact of these anthropic activities in the studied area we categorize our samples based on their proximity or likelihood of being affected by the human presence. Samples marked as “+”, are the ones near the EACF, or from sites that are often visited by researchers, EACF crew members, and tourists while samples marked as “-” are from sites where human presence is scarcer.

Table IV. Human presence level for site sampled at the Admiralty Bay King George Island.

Sample	Human presence
Air Punta Plaza	+
Snow Casa do Cachorro	+
Snow Punta Ullman	-
Snow Wanda	-
Snow Lago Norte	+
Snow Meteoro	+
Soil Punta Plaza	+
Soil Punta Ullman	-
Soil Nunatak Needle	-

Soil sampling

During the austral summer of 2019/2020 soil samples from three of the sites at Admiralty Bay were collected (Table I). First, three soil samples (approximately 5 cm, ca. 250 g, and 50 cm apart each) were collected from two sites: Punta Plaza and Punta

Ullman. Also, one sample was collected from the site Nunatak Needle. The soil samples were collected using a sterile spatula, and collection in areas with visible vegetation was avoided. Samples were kept in sterile sealed plastic bags (Whirl Pack®/US) and frozen at -20°C until DNA extraction.

Snow sampling

During the austral summer of 2019/2020 samples from freshly deposited snow from 6 sites of the sites were collected (Table I): three snow samples (ca. 2 liters each) were collected from two sites, Casa do Cachorro and Punta Ullman, and one sample from each: Lago Norte, Wanda, and Meteoro. The snow samples were collected using sterilized shovels and buckets. The snow was melted at room temperature in the microbiology laboratory of the EACF and then filtered using Sterivex 0.22 µm filters, in conjunction with a chemical pump (Millipore, USA). All procedures were performed under sterile conditions within a laminar flow chamber.

Air sampling

During the austral summer of 2019/2020, four air samples were collected at the Punta Plaza site (Table I). The air samples were collected using a sterile polysulfone bottle filter with a 47 mm diameter opening (Nalgene, USA) fitted with sterile 0.22 µm (Millipore, USA) membranes in conjunction with a chemical pump (Millipore, USA). Previously the membranes were placed on sterile filters in a laminar flow chamber and kept there until they were installed at the experiment site. For five days, three identical systems ran in parallel, the sampling was performed for 20 days, totaling 12 membranes from December 2019 to January 2020. After every 5-day run, the filters with the membranes were taken in sterile bags immediately to the microbiology laboratory of the EACF, and inside the laminar flow chamber, the membranes were taken from the filters, and DNA extraction was performed. Before use, all equipment used such as tubes, slides, scalpel blades, and forceps were sterilized.

Table I. Sample kind x Number of samples obtained from the snow, soil, and air of Admiralty Bay on King George Island for each sampled site.

SAMPLE KIND	CASA DO CACHORRO	PUNTA ULLMAN	WANDA	LAGO NORTE	METEORO	PUNTA PLAZA	NUNATAK NEEDLE
Snow	3	2	1	1	1	-	-
Soil	-	3	-	-	-	3	1
Air	-	-	-	-	-	4	-

DNA extraction and ITS amplification

DNA from the soil was extracted using FastDNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals. To snow samples DNeasy PowerWater Sterivex Kit was used according to the manufacturer's instructions. To the air samples the DNA was extracted using a modified SDS extraction method (Goldenberger *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1996, Natarajan *et al.* 2016) where the membranes used as air filters, were cut into small strips, and added to plastic tubes, each containing 2 mL of SDS extraction buffer (0.1 M EDTA at pH 8 and 2% SDS) and incubated at 55°C for 16 h. Then, 330 µL of 5 M NaCl and 330 µL of pre-heated CTAB 10% (55°C) were added, and the solution was vortexed, spun down, and incubated at 55°C for 10 min. The solution was then transferred to a new tube and 600 µL of chloroform was added and vortexed at maximum speed for 1 min. The tubes were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min and the supernatant was transferred to a new tube. The extracted DNA was cleaned using the Genomic DNA purification Kit (QIAGEN, Carlsbad, USA), following the manufacturer's instructions. Extractions were carried out under strict sterile conditions to avoid contamination. DNA quality was analyzed using agarose gel electrophoresis (1% agarose in 1 × Trisborate-EDTA) and then quantified using the Quanti- iT™ Pico Green dsDNA Assay (Invitrogen). Extracted DNA was used as a template for generating PCR amplicons. The internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the nuclear ribosomal DNA was used as a DNA barcode for molecular species identification (Chen *et al.* 2010, Richardson *et al.* 2015, Rosa *et al.* 2020a, 2020b). The PCR-amplicons were generated using the universal primers ITS3 and ITS4 (White *et al.* 1990). The construction of the libraries and amplification of DNA and high-performance sequencing was performed in Illumina Miseq V3 (Illumina, Inc.) at Macrogen Inc. Company (South Korea), where fragments of approx. 600 bp (2x300) with high quality were obtained.

Data analysis

Three databases were used in the identification of the obtained sequences, the PLANiTS2 (Banchi *et al.* 2020), the UNITE eukaryotes ITS version 8.2 (Abarenkov *et al.* 2020), and the NCBI non-redundant nucleotide sequences (nt) database (August 2020). The raw fastq files were filtered and cleaned using BBDuk version 38.34 (BBMap - BUSHNELL B. - sourceforge.net/projects/bbmap/) where sequences with quality lower than 30 (Phred Score) and/or the number of base pairs less than 75 were

discarded. The remaining sequences were imported into the program QIIME2 version 2021.4 (<https://qiime2.org/>) for bioinformatics analysis (Bolyen *et al.* 2019). The qiime2-dada2 plugin is a complete pipeline that was used in additional replication filtering "paired-end" sequence joining and chimera removal (Callahan *et al.* 2016). Using the qiime2-feature-classifier command "amplicon sequence variants" (ASVs) were generated and these contrasted via the classify-sklearn command against the PLANITS2 database (Banchi *et al.* 2020), ASV's classified as unknown or at a level lower than the taxonomic family classification were filtered and contrasted against the UNITE ITS all eucaryotes version 8.2 database (Abarenkov *et al.* 2020). Finally, ASVs classified as unknown or at a level lower than the family taxonomic classification were filtered and contrasted against the NCBI non-redundant nucleotide sequences (nt) database (May 2021) using BLASTn software (Camacho *et al.* 2009) with the default parameter, and taxonomic assignment of the identified ASVs was done using the MEGAN6 software (Huson *et al.* 2016). The number of sequences for each taxon was used as a measure of abundance according to the method used by Deiner *et al.* (2017), Câmara *et al.* (2021) and Hering *et al.* (2018). Classification and systematics for kingdoms and phyla followed Ruggiero *et al.* (2015). For minor taxonomic classifications, Worms Editorial Board (Horton *et al.* 2022), Guiry & Guiry (2022), and Bánki *et al.* (2022) databases were checked, and for geographical distribution, Thompson *et al.* (2019), Guiry & Guiry (2022) and Tropicos (<http://www.tropicos.org>) data set were consulted. Rarefaction curves were calculated with the classified ASVs from each sample with the iNEXT package (iNterpolation and EXTrapolation) (Hsieh *et al.* 2016). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was used to visualize the relationship between samples, taxa composition, and human presence. Permutational multivariate ANOVA (PERMANOVA) test using the adonis2 function in Vegan (Oksanen *et al.* 2022) based on 999 permutations, was used to analyze the human presence influence on the taxa community and the samples. For the NMDS, Euclidean distance on Hellinger transformed data was used (Legendre & Gallagher 2001). We also performed a diversity *t*-test, for comparison of the Shannon and Simpson diversities between samples, sample sites, and sample kinds, and a Venn diagram for visualizing the shared taxa between samples kind (Heberle *et al.* 2015).

Results

As seen in Fig. 2, the rarefaction curve calculated for all the samples collected

reached the asymptote, indicating that the sampling effort was sufficient, and the analyzed sequences are a good representation of the sequence diversity present in the study areas.

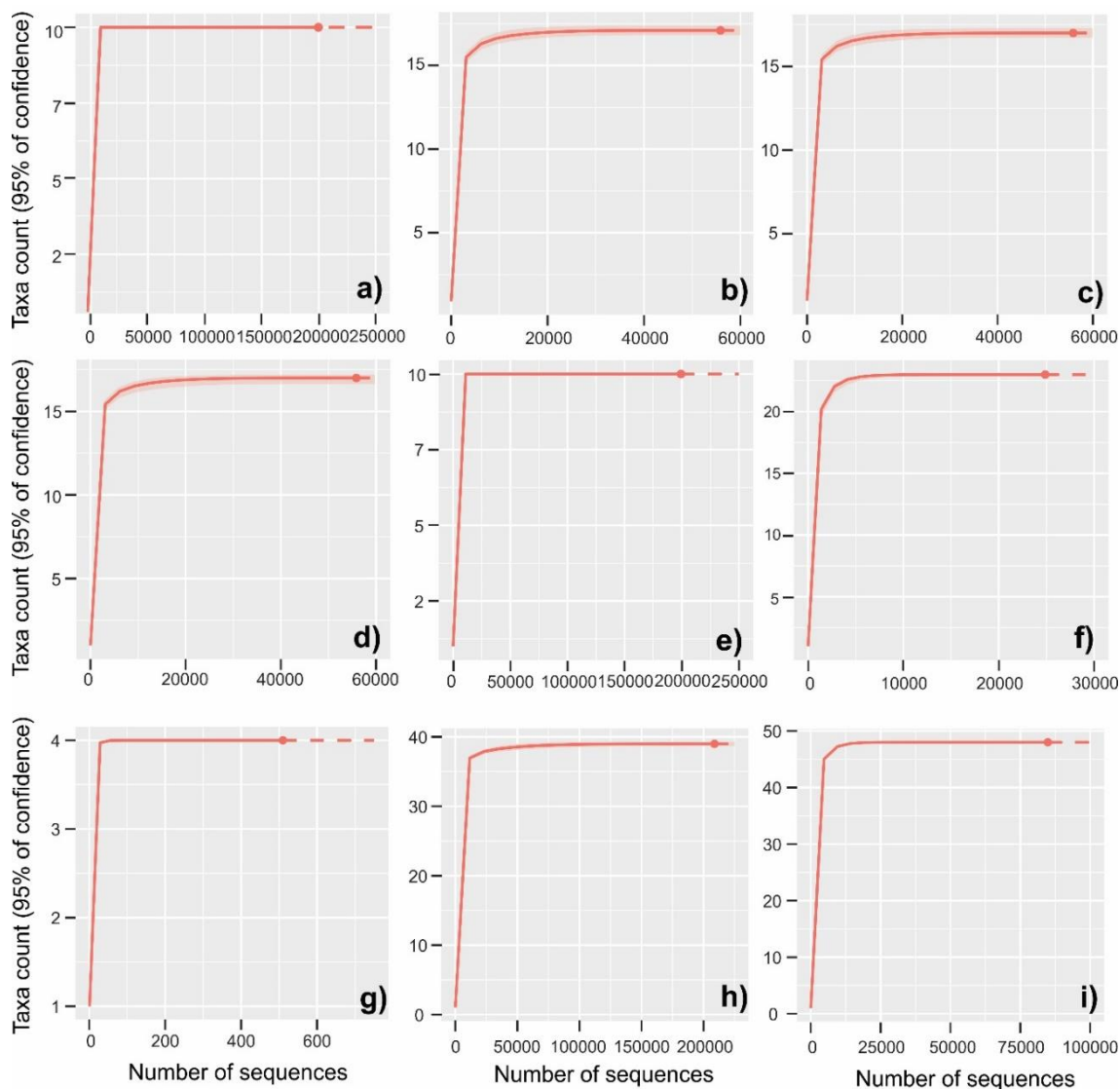


Fig. 2. Rarefaction curves obtained from samples collected on King George Island, Antarctica. a) Snow Casa do Cachorro b) Snow Wanda c) Snow Meteoro d) Snow Lago Norte e) Snow Punta Ullman f) Air g) Soil Nunatak Needle h) Soil Punta Ullman i) Soil Punta Plaza.

A total of 2,103,532 ITS2 paired-end DNA reads were generated during sequencing, after quality filters and cleaning of the raw data 1,669,117 sequences remained for taxonomic classification. After the taxonomic classification and discarding of the sequences identified as fungi, already discussed by Rosa *et al.* (2021, 2022) the remaining sequences 802,041 were classified into 82 taxa, and 367 sequences were classified as unknown (Table II, Fig. 3).

Table II. The number of sequences present in the samples obtained from Admiralty Bay on King George Island after applying the quality filters, and the number of sequences classified by each database.

SAMPLES	AIR	SNOW CACHORRO	SNOW ULLMAN	SNOW WANDA	SNOW LAGO NORTE	SNOW METEORO	SOIL PUNTA PLAZA	SOIL PUNTA ULLMAN	SOIL NUNATAK NEEDLE	TOTAL
Raw sequences	477837	328085	290298	92160	73868	84783	324006	299645	132850	2103532
Cleaned and Filtered seq	391149	254389	226712	74211	53426	66441	247758	242565	112466	1669117
Class. by PlanITS	10394	56866	21524	9142	4246	8443	26278	31278	354	168525
Class. by UNITE	0	3633	6	1418	0	827	492	11503	0	17879
Class. by Blast	14488	79782	178358	32287	39931	46587	58092	165956	156	615637
Unknown	0	0	0	325	0	0	0	42	0	367
Fungi UNITE	365762	108880	20498	22900	3253	9413	161545	31705	111926	835882
Fungi Blast	505	5228	6326	8139	5996	1171	1351	2081	30	30827

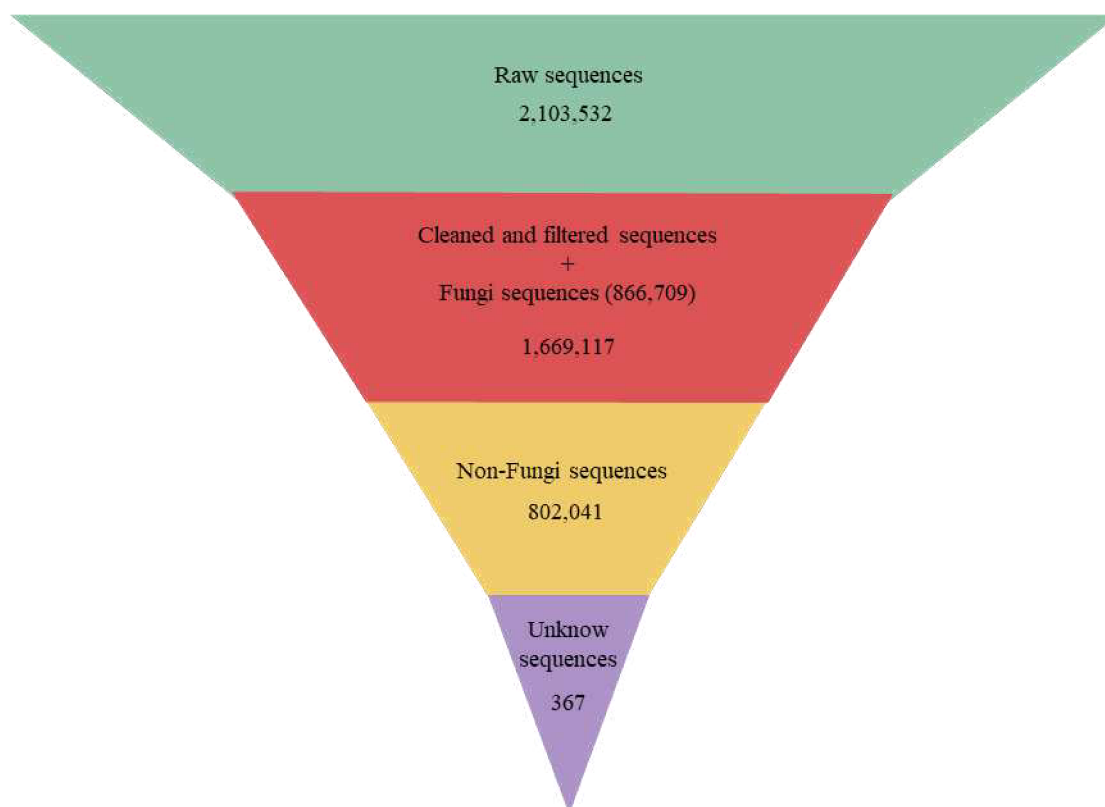


Fig. 3 Representation of the number of DNA sequences in each step of the classification of the snow, soil, and air samples obtained from Admiralty Bay on King George Island.

From all samples, the classified ASVs included four kingdoms (Animalia, Chromista, Plantae, and Protozoa) and 11 phyla (Arthropoda, Cercozoa, Chlorophyta, Chordata, Ciliophora, Cnidaria, Dinophyceae, Mollusca, Perclozoa, Porifera, Streptophyta). Of the 82 taxa identified 23 (29%) could be identified at the species level (Table III), and 27 (22%) have not been previously recorded of occurrence in Antarctica.

DNA sequences reads by samples									
TAXA	AIR	SNOW CACHORRO	SNOW ULLMAN	SNOW WANDA	SNOW LAGO NORTE	SNOW METEORO	SOIL PLAZA	SOIL ULLMAN	SOIL NUNATAK
<i>Monostroma</i> sp.	16	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Monostroma angicava</i>	8994	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Blidingia</i> sp. *	0	0	0	0	0	0	165	0	0
STREPTOPHYTA									
<i>Campylopus gracilis</i>	20	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sanionia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	124	0	0
Pottiaceae	0	0	0	0	0	0	124	0	0
PROTOZOA									
<i>Allovahlkampfia</i> sp.	0	0	0	0	0	5	0	195	0
EUKARYOTA UNKNOW	190	0	0	36	0	0	17492	2539	0
Opisthokonta	0	0	0	0	0	0	0	38	0
UNKNOW	0	0	0	325	0	0	0	42	0
TOTAL	24882	140281	199888	43172	44177	55857	84862	208779	510

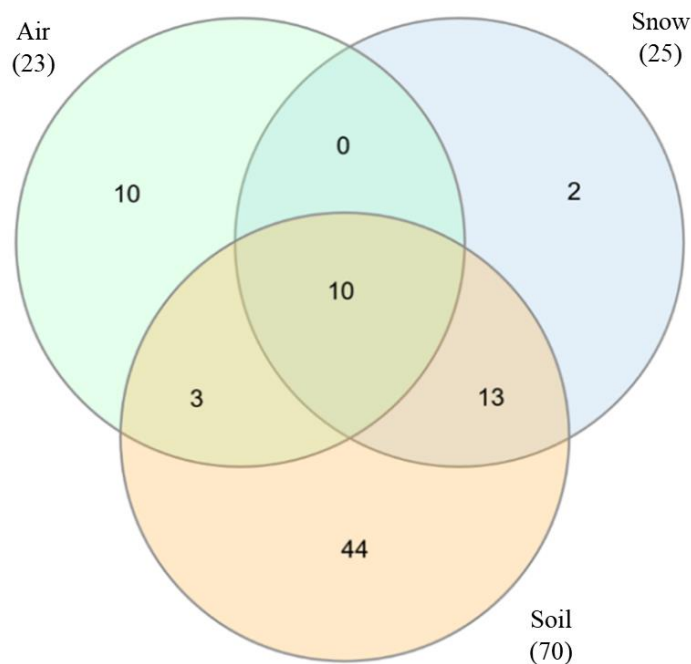


Fig. 4. Venn diagram showing the numbers of taxa found in each of the tree sample kinds (snow, air, and soil) collected on King George Island, Antarctica.

As for the unknown taxa, 367 reads couldn't be assigned to any taxa available at all three datasets consulted, unknown Eukaryota represented 2.51% of the sequences obtained (20,257 reads), and 38 reads were associated with the Opisthokonta clade,

which includes all animals and fungi.

The Viridiplantae was the richest and most abundant group found in the samples, as it accounted for around 90% of the total reads, with unknown Chlorophyta (green algae) alone representing 19.10% of the total sequences.

The taxa *Sanguina nivaloides* (Chlorophyta) was the most abundant, and was present in all samples, followed by unidentified Chlorophyta and the genus *Chlamydomonas*.

The soil from Punta Plaza was the richest and, according to the Simpson diversity test, the most diverse sample; on the other hand, the soil from Nunatak Needle was the poorest (Table IV), with only 4 species, and the less diverse sample was the snow from Wanda (Table IV).

The soil, air, and snow samples had 44, 10, and 2 exclusive taxa associated with them respectively (Fig. 4). Due to the not equivalent sampling effort, comparisons at the community level between sample kinds (air, snow, and soil) were only possible between snow and soil. The results of the t-test from both Simpson diversity and richness showed no difference between the communities of the snow and soil ($p > 0,05$) from Admiralty Bay on King George Island (KGI).

Table IV. Diversity indices of taxa presents in samples obtained at Admiralty Bat on King George Island.

Sample	taxa richness	Simpson	Fisher's α	Margalef
Air Punta Plaza	23	0.6714143	2.498	2.174
Snow Casa do Cachorro	20	0.7489595	1.773	1.603
Snow Punta Ullman	14	0.6341986	1.161	1.065
Snow Wanda	18	0.5243561	1.783	1.593
Snow Lago Norte	12	0.6551705	1.135	1.028
Snow Meteoro	17	0.8285242	1.628	1.464
Soil Punta Plaza	48	0.8810893	4.92	4.141
Soil Punta Ullman	38	0.7222638	3.451	3.021
Soil Nunatak Needle	4	0.7051134	0.5917	0.4812

As seen in Fig. 4 at the NMDS graph, the sample communities couldn't be distinguished by the level of human influence. The PERMANOVA analysis performed on the ASV's dataset resulted in an R^2 of 0.10 and a not significant p -value confirming that the level of anthropization had no effect on the sample community at the site.

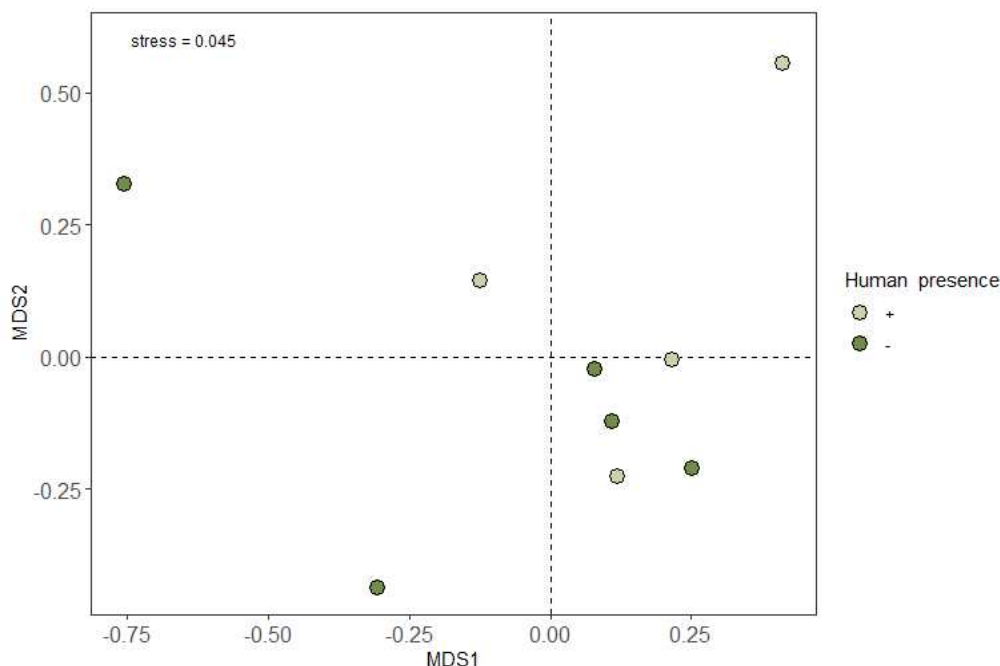


Fig. 4. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) based on the Euclidean distance of community composition from samples collected on King George Island, Antarctica. Composition based on molecular ASV's abundances. Relative abundance data were Hellinger-transformed. Samples are colored according to human presence at the site.

Discussion

For the soil samples of the Admiralty Bay, few studies may be used for a fair community comparison, Carvalho-Silva *et al.* (2021) focused on streptophytes environmental DNA, had found 16 taxa on the soil of the nearby island of Deception, and at the same place, Câmara *et al.* (2021) registered 65 chlorophytes. Combined, both studies found 81 Viridiplantae taxa. At the soils of Admiralty Bay, we were able to find a total found of 43 Viridiplantae taxa, which indicates Admiralty Bay to be a less diverse environment, at least for plants, when compared to Deception Island. Although the reasons for these differences may be associated with a higher human presence at Deception Island due to it being a tourist destination and its higher chance to receive diaspores associated with human activity. Besides, hot springs can be found on Deception Island, which made slightly warmer zones and may contribute to a more diverse environment and possibly plant community (Smith 2005).

The soil at Punta Plaza had the highest richness and diversity, followed by Punta Ullman, and Nunatak Needle. The richness and diversity were higher in the more anthropized area (Punta Plaza) compared to those found in the less anthropized areas (Punta Ullman and Nunatak Needle). Besides, 36 species were exclusive to the Punta

Plaza sample, suggesting a difference in the community of the sites. Although the proximity to the EACF may increase the number of organisms around, Punta Plaza is also the closest site to the entrance of Admiralty Bay. The constant exposure to high winds and marine spray coming from the Bransfield Strait might be a more significant factor regarding the differences observed between the soil communities, evidence for this are the several marine taxa found in the Punta Plaza soil, such as *Thaumatomonas* sp., *Nassula labiata*, and *Rhabdostyla* sp., not found at Punta Ullman or Nunatak Needle. The exposure to these winds also resulted in the recording of all Ulvophyceae taxa in soil samples, although these been known for being marine organisms.

Among the snow samples, the sample from Casa do Cachorro was the richest of all, and the most diverse site was Meteor. The poorest site in the number of taxa was Lago Norte, and the less diverse was Wanda. Using the metabarcoding technique, but with the 16s marker Soto *et al.* (2020) found similar taxa during multicolored snow algae bloom at Fieldes peninsula, also on the KGI. Using the 16s and ITS marker in a broader approach, Davey *et al.* (2019) sampled the snow of Ryder Bay, on Adelaide Island, and the algae community found by them is related to the one found by us. Although both studies have found similar taxa to ours, this work found a greater diversity when compared.

For the air sample, 23 taxa were registered, these are the first airborne non-fungi organisms ever recorded via the metabarcoding technique in Antarctica. From Chromists to animals, organisms found in the air sample varied a lot been most of them green algae. As found by us, Marshall & Chalmers (1997) using traditional sample methodologies, were able to record a few species of algae and diatoms in air samples. According to Wynn-Williams (1990), green algae and cyanobacteria fulfill the role of the primary colonizer to fix carbon and provide essential molecules to further organisms. The bryophyte *Campylopus gracilis* was the only terrestrial organism detected in the air sample, never recorded on the Antarctic continent, its known distribution is concentrated to the northern hemisphere, with some records in the Andes. Although the genus *Campylopus* had been already recorded in Antarctica with four species, *C. gracilis* is a novelty, this being the first record of the specie for the continent (Ochyra *et al.* 2008). Although it may be an erroneous match, caused by the database's lack of resolution, it also can be related to diaspores from a close but unknown population, or even propagules coming from way further distances as already found by Kappen & Straka (1988). In both cases, with the newer ice-free areas emerging due to

the increase in the temperature, we may expect to see it expanding or taking its place as part of the Antarctic community.

In the air, also four Animalia taxa were detected. Entomobryomorpha is a relatively abundant taxa in Antarctica, known mainly by springtails usually found living in the vegetation, soil, or under rocks, it may seem odd to such terrestrial organisms to be found in an air sample, but aerial dispersal is an actual way of dispersion of the group Hawes *et al.* (2007). Other taxa like the Anthozoan and Bivalvia class and *Salpa thompsoni*, mostly aquatic organisms, already recorded to the continent, were also caught by the air sampler, possibly brought by the marine spray carried by the wind, since it was located very close to the sea at the *Punta Plaza* site.

Between types of samples, the soil of KGI was the richest and most diverse, with a mean of 30 species per sample, and the snow was the poorest with only 16,2 species per sample, the air was the least diverse sample. However, the two different substrates we were able to compare (snow and soil) were found to have no statistical difference in abundance or diversity.

The Viridiplantae kingdom was the richest and most abundant group found in all samples. From Viridiplantae most records came from the Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, and Ulvophyceae classes, those are composed of green algae species, found in diverse terrestrial and aquatic environments in the form of coccoid to ellipsoid unicells, filaments, blades, and colony-forming organisms (Muggia *et al.* 2018). In this study, the Trebouxiophyceae was responsible for 22 taxa, being the richest class of the phylum, the second Chlorophyceae with 14 taxa and most of the sequences, 59%, followed by the Ulvophyceae appearing to complete the core Chlorophyta phylum (Leliaert *et al.* 2012).

From the Chlorophyceae class, *Sanguina nivaloides* was the most abundant taxa of the study, present in all the samples, it has a cosmopolitan distribution, been found across the globe where perennial snows are present. The species is also known to be associated with blood snow phenomena (Procházková *et al.* 2019) together with some species of the genus *Chloromonas*, also found in abundance at the samples usually associated with animal nutrient input (Remias *et al.* 2013). From the same genus *Chloromonas*, new records to Antarctica like *C. hindakii*, *C. krienitzii*, and *C. nivalis* to the KGI were made. Some species of the very abundant genus *Chlamydomonas* (13.46% of the total reads) are well-known and widespread snow algae occurring in freshwater/terrestrial habitats (Stibal *et al.* 2007, Guiry & Guiry 2022). Other new

distributions of Chlorophyceae taxa recorded by this study were, *Chlorococcum oleofaciens* to Antarctica and the family Scenedesmaceae to the KGI.

The most abundant taxon in the class Trebouxiophyceae was *Prasiola* sp. typically found growing on substrates or in lichenized forms, *Prasiola crispa* is a very common sight in ice-free areas covering a great extension of ground in maritime Antarctica, from taxa with similar habits (Vinocur & Pizarro 1995, Vinocur & Pizarro 2000, Kovácik & Pereira 2001) and the genus been already detected by metabarcoding studies at the region (Fonseca *et al.* 2022, Câmara *et al.* 2021a). Several new records were made to the class, *Coccomyxa subellipsoidea*, *Pseudochlorella pringsheimii*, *Tritostichococcus coniocybes* to Antarctica, and *Desmococcus olivaceus*, and *Deuterostichococcus epilithicus* to the KGI. Trebouxiophyceae taxa found here included organisms such as the well-known genera *Chlorella* that have been broadly served as model organisms for pioneering plant physiological and biochemical studies and used in agriculture and biotechnology research (Huss *et al.* 1999), and others typically planktonic taxa as *Micractinium* and Koliellaceae the last being a new record to Antarctica.

At the Ulvophyceae class, the most marine class of the three, five taxa were found, the most abundant taxa *Monostroma angicava* is a macroalga and represents 1.1% of the total sequences found in the air sample. *M. angicava* is also reported from Japan, China, Korea, and Norway, species of the genus have an important role in Asia as food source and pharmaceutical uses (Kazłowski *et al.* 2012). From those samples, *Blidingia*, *Pseudoclonium*, and *Kornmannia leptoderma* were first recorded to the KGI.

The second most abundant phylum of Viridiplantae, Streptophyta was represented by three moss taxa, *Campylopus gracilis*, *Sanionia* sp., and one member of the family Pottiaceae, together they represent around 0.03% of the total of the reads. *Sanionia* is one of the most widespread genera in this region, being very abundant is the major component of the moss carpets found on the shores of the KGI (Câmara *et al.* 2021b). Pottiaceae is the second largest Antarctic moss family with 17 species, most of which are rare and inconspicuous, although, some taxa such as *Syntrichia* sp. for example, can be easily found around the KGI and is a widespread moss genus throughout almost the entire continent.

Chromista was the second most abundant and diverse kingdom, with almost 6% of the reads it was found in all samples except Nunatak Needle's soil. The bacteria feeding Ciliophora phylum, had its sequences assigned to some ciliates that are often

widespread and a few new taxa to Antarctica. The Oligohymenophorea class was the most abundant and the richest of the phylum followed by the Peniculida order. Next, the Sporadotrichida order (Spirotricheas class) was found in almost all samples. Two more Chromista phyla were detected by the DNA metabarcoding method, Myzozoa, and Cercozoa with just one taxon each.

The new Chromista records to the continent found in this work were *Nassula labiata* known for living in fresh and marine water, *Marituja* sp., which is associated with the tide zone, *Rhabdostyla* sp., which lives as epibiont usually in freshwater organisms, all widespread, and *Podophrya fixa*, also an epibiont organism recorded at the Arctic region. To the KGI we had the family Epistylidae, the marine flagellated genus *Thaumatomonas* sp., *Homalogastra setosa* epibiont sessile found both in fresh and marine water, *Trithigmotoma cucullulus* found usually at estuaries, *Amphorellopsis quinquealata*, a marine species and, a parasite species *Blastodinium contortum* (Harris 2006, Thompson *et al.* 2019).

The kingdom Animalia was the third most abundant and rich, ranging from the most basal seas sponges, Spongillida order, to the first chordates (*Salpa thompsoni*). In one snow sample from *Wanda*, most known for its flying insects, the Diptera order was detected, although there are only two native insects in Antarctica, the midges *Belgica antarctica* and *Parochlus steinenii*, studies have paid attention to the increase of alien species being found at anthropized places, such research stations (Chown & Convey 2016, Hughes *et al.* 2005), fortunately, *Wanda* is a relatively pristine site not much affected by human presence, hardly been its case.

The Spogillida order mainly known by its marine representants was curiously recorded in one soil sample, the proximity of the sampled site to the sea, and the constant marine spray carried by the high winds, might be a reasonable explanation for these records. At *Punta Plaza*, the ant genus *Myrmecia* was also recorded in the soil. As there are no native species of ants recorded in Antarctica, its appearance may be related to the proximity of the site to the Punta Plaza Brazilian refuge, that during the summer is also used as a research station (Chown & Convey 2016).

At last, the Protozoa made its entrance on the list with just one taxon *Allovahlkampfia* sp. found in soil and snow samples is already recorded in Antarctica (Tyml *et al.* 2016). Recent studies have shown that this amoeba may have environmental and clinical implications since it may act as a replicative host for several pathogenic bacteria (Mohamed & Huseein 2016).

In the matter of being affected or not by human presence, there weren't statistics that supported differences between anthropized or not areas, either in diversity or richness indices. The NMDS (Fig. 4) and PERMANOVA analysis showed that there was no relationship between the level of human presence and the community at the sample site. Although the many years of human presence at Admiralty Bay (Rakusa-Suszczewski 1998) and the visible transformation of the environment, the human presence doesn't seem to have affected the community of the region at the levels we were able to assess.

Regarding species that have just arrived in Antarctica but aren't able yet to develop themselves due to environmental reasons such as temperature, humidity, or available substrate, all newly recorded Viridiplanteae found in this study, have their original distribution also related to as cold environments. Although mainly in the northern hemisphere, their presence in the Antarctic Peninsula suggests that they may be just unknown Antarctic native species. Of the species recorded in this study, all of them are associated with already cold environments, so there was no species that due to the ongoing increase in temperature, may in the future become capable of colonizing and spreading itself, better than they already do.

In conclusion, this study generated a great array of data increasing the knowledge of the Antarctic biodiversity, enabling new insights into the subject, and providing a source of data for other studies. However, it is important to remember that the found DNA sequence does not confirm the presence or viability of a given organism, and targeted studies are recommended to confirm the presence of a species.

Although aware of our not ideal sampling effort, we could not observe any statistical difference between the sampled areas, and the evaluation of the impact caused by the human presence at different sites and substrates showed that the anthropization at the bay, has still not significantly affected the sampled communities. We could also confirm that air is being used as a means of dispersion for a great variety of taxa, and its role in further colonization of ice-free needs consideration. Concerning the investigation of species that may benefit from the incoming increase in temperature, this study was not able to observe any species in such terms, but further investigation with broader sampling might be recommended.

Due to the result obtained, we endorse that DNA metabarcoding is a viable tool to assess the diversity and richness of taxa present in the snow, soil, and air of even harsh places such as Antarctica. The great number of sequences not able to be classified

into more specific levels may serve as a reminder that there is still a need to keep improving our genomics database, and there is much to know about Antarctica biodiversity yet.

Acknowledgments

We thank the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), the Brazilian Navy, PROANTAR, MCTI, and for the received financial support, we thank congresswoman Jô Moraes, CNPq, and CAPES.

References

- ABARENKOV, K., ZIRK, A., PIIRMANN, T., PÖHÖNEN, R., IVANOV, F., NILSSON, R.H. & KÖLJALG, U. 2020. UNITE QIIME release for Fungi, 10.15156/BIO/786385.
- BANCHI, E., AMETRANO, C.G., GRECO, S., STANKOVIĆ, D., MUGGIA, L. & PALLAVICINI, A. 2020. PLANiTS: a curated sequence reference dataset for plant ITS DNA metabarcoding. *Database: the journal of biological databases and curation*, **2020**, 1–9, 10.1093/database/baz155.
- BANCHI, E., AMETRANO, C.G., STANKOVIĆ, D., VERARDO, P., MORETTI, O., GABRIELLI, F., LAZZARIN, S., et al. 2018. DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy. *PLoS ONE*, **13**, 1–20, 10.1371/journal.pone.0194489.
- BÁNKI, O., ROSKOV, Y., DÖRING, M., OWER, G., VANDEPITTE, L., HOBERN, D., REMSEN, D., et al. 2022. Catalogue of Life Checklist, 10.48580/dfpz.
- BIERSMA, E.M., JACKSON, J.A., BRACEGIRDLE, T.J., GRIFFITHS, H., LINSE, K. & CONVEY, P. 2018. Low genetic variation between South American and Antarctic populations of the bank-forming moss *Chorisodontium aciphyllum* (Dicranaceae). *Polar Biology*, **41**, 599–610, 10.1007/s00300-017-2221-1.
- BIERSMA, E.M., JACKSON, J.A., HYVÖNEN, J., KOSKINEN, S., LINSE, K., GRIFFITHS, H. & CONVEY, P. 2017. Global biogeographic patterns in bipolar moss species. *Royal Society Open Science*, **4**, 10.1098/rsos.170147.
- BOLYEN, E., RIDEOUT, J.R., DILLON, M.R., BOKULICH, N.A., ABNET, C.C., AL-GHALITH, G.A., ALEXANDER, H., et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, **37**, 852–857, 10.1038/s41587-019-0209-9.
- BRASIL. 2014. PROGRAMA ANTÁRTICO BRASILEIRO Available at: <https://www.marinha.mil.br/secirm/proantar#caracteristicas> [Accessed June 11, 2020].
- BRAUN, M. & GOSSMANN, H. 2002. Glacial Changes in the Areas of Admiralty Bay and Potter Cove, King George Island, Maritime Antarctica. **154**, 75–89,

10.1007/978-3-642-56318-8_6.

- BRAZIL & POLAND. 2005. Review of the admiralty bay antarctic specially managed area management plan (ASMA No. 1). *In ATCM XXVIII, Stockholm*. 1–31.
- CALLAHAN, B.J., MCMURDIE, P.J., ROSEN, M.J., HAN, A.W., JOHNSON, A.J.A. & HOLMES, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, **13**, 581–583, 10.1038/nmeth.3869.
- CAMACHO, C., COULOURIS, G., AVAGYAN, V., MA, N., PAPADOPOULOS, J., BEALER, K. & MADDEN, T.L. 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, **10**, 1–9, 10.1186/1471-2105-10-421.
- CÂMARA, P.E.A.S., CARVALHO-SILVA, M., PINTO, O.H.B., AMORIM, E.T., HENRIQUES, D.K., DA SILVA, T.H., PELLIZZARI, F., CONVEY, P. & ROSA, L.H. 2021a. Diversity and Ecology of Chlorophyta (Viridiplantae) Assemblages in Protected and Non-protected Sites in Deception Island (Antarctica, South Shetland Islands) Assessed Using an NGS Approach. *Microbial Ecology*, **81**, 323–334, 10.1007/s00248-020-01584-9.
- CÂMARA, P.E.A.S., CONVEY, P., RANGEL, S.B., KONRATH, M., BARRETO, C.C., PINTO, O.H.B., SILVA, M.C., HENRIQUES, D.K., DE OLIVEIRA, H.C. & ROSA, L.H. 2021b. The largest moss carpet transplant in Antarctica and its bryosphere cryptic biodiversity. *Extremophiles*, **25**, 369–384, 10.1007/s00792-021-01235-y.
- CÂMARA, P.E.A.S. & DE MATTOS, L.F. 2020. A ciência como ferramenta geopolítica. *REVISTA MARÍTIMA BRASILEIRA*, **140**, 15–23.
- CÂMARA, P.E.A.S., SOARES, A.E.R., HENRIQUES, D.K., PERALTA, D.F., BORDIN, J., CARVALHO-SILVA, M. & STECH, M. 2019. New insights into the species diversity of *Bartramia* Hedw. (Bryophyta) in Antarctica. *Antarctic Science*, **31**, 208–215, 10.1017/S0954102019000257.
- CARVALHO-SILVA, M., ROSA, L.H., PINTO, O.H.B., DA SILVA, T.H., HENRIQUES, D.K., CONVEY, P. & CÂMARA, P.E.A.S. 2021. Exploring the plant environmental DNA diversity in soil from two sites on Deception Island (Antarctica, South Shetland Islands) using metabarcoding. *Antarctic Science*, **33**, 469–478, 10.1017/S0954102021000274.
- CHEN, S., YAO, H., HAN, J., LIU, C., SONG, J., SHI, L., ZHU, Y., et al. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, **5**, 1–8, 10.1371/journal.pone.0008613.
- CHOWN, S.L. & CONVEY, P. 2016. Antarctic Entomology. *Annual Review of Entomology*, **61**, 119–137, 10.1146/annurev-ento-010715-023537.
- CHWEDORZEWSKA, K.J. 2008. *Poa annua* L. in Antarctic: Searching for the source of introduction. *Polar Biology*, **31**, 263–268, 10.1007/s00300-007-0353-4.
- COISSAC, E., RIAZ, T. & PULLANDRE, N. 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals: BIOINFORMATIC FOR DNA METABARCODING. *Molecular Ecology*, **21**, 1834–1847, 10.1111/j.1365-

294X.2012.05550.x.

- COMTET, T., SANDIONIGI, A., VIARD, F. & CASIRAGHI, M. 2015. DNA (meta)barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. *Biological Invasions*, **17**, 905–922, 10.1007/s10530-015-0854-y.
- CONVEY, P. 2001. Terrestrial ecosystem responses to climate changes in the Antarctic. In *“Fingerprints” of Climate Change*. Boston, MA: Springer US, 17–42., 10.1007/978-1-4419-8692-4_2.
- CONVEY, P. & PECK, L.S. 2019. Antarctic environmental change and biological responses. *Science Advances*, **5**, eaaz0888, 10.1126/sciadv.aaz0888.
- COOK, A.J., FOX, A.J., VAUGHAN, D.G. & FERRIGNO, J.G. 2005. Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century. *Science*, **308**, 541–544, 10.1126/science.1104235.
- CZECHOWSKI, P., CLARKE, L.J., COOPER, A. & STEVENS, M.I. 2017. A primer to metabarcoding surveys of Antarctic terrestrial biodiversity. *Antarctic Science*, **29**, 3–15, 10.1017/S0954102016000389.
- DA MATTA AGOSTINI, K., DA COSTA RODRIGUES, L.A., DE ALENCAR, A.S., MENDONÇA, C.B.F. & GONÇALVES-ESTEVEZ, V. 2017. Analysis of exotic pollen grains and spores from thawing lakes of King George Island, Antarctic Peninsula. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **245**, 1–9, 10.1016/j.revpalbo.2017.05.006.
- DAVEY, M.P., NORMAN, L., STERK, P., HUETE-ORTEGA, M., BUNBURY, F., KIN, B., LOH, W., et al. 2019. Snow algae communities in Antarctica : metabolic and taxonomic composition, 10.1111/nph.15701.
- DEINER, K., BIK, H.M., MÄCHLER, E., SEYMOUR, M., LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A., ALTERMATT, F., CREER, S., et al. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, **26**, 5872–5895, 10.1111/mec.14350.
- DURING, H.J. 2001. Diaspore Banks. *The Bryologist*, **104**, 92–97, 10.1639/0007-2745(2001)104[0092:DB]2.0.CO;2.
- ELLIS, L.T., BEDNAREK-OCHYRA, H., OCHYRA, R., BENJUMEA, M.J., SAÏS, L.V., CAPARRÓS, R., LARA, F., et al. 2013. New national and regional bryophyte records, 35. *Journal of Bryology*, **35**, 129–139, 10.1179/1743282013Y.0000000049.
- EPP, L.S., BOESSENKOOL, S., BELLEMAIN, E.P., HAILE, J., ESPOSITO, A., RIAZ, T., ERSÉUS, C., et al. 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, **21**, 1821–1833, 10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x.
- FARMER, G.T. & COOK, J. 2013. Glaciers and the Latest Ice Age. In *Climate Change Science: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 284–287., 10.1007/978-94-007-5757-8.

- FERNÁNDEZ-MENDOZA, F., FLEISCHACKER, A., KOPUN, T., GRUBE, M. & MUGGIA, L. 2017. ITS1 metabarcoding highlights low specificity of lichen mycobiomes at a local scale. *Molecular Ecology*, **26**, 4811–4830, 10.1111/mec.14244.
- FICETOLA, G.F., MIAUD, C., POMPANON, F. & TABERLET, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**, 423–425, 10.1098/rsbl.2008.0118.
- FONSECA, B.M., CÂMARA, P.E.A.S., OGAKI, M.B., PINTO, O.H.B., LIRIO, J.M., CORIA, S.H., VIEIRA, R., et al. 2022. Green algae (Viridiplantae) in sediments from three lakes on Vega Island, Antarctica, assessed using DNA metabarcoding. *Molecular Biology Reports*, **49**, 179–188, 10.1007/s11033-021-06857-1.
- FRASER, C.I., CONNELL, L., LEE, C.K. & CARY, S.C. 2018. Evidence of plant and animal communities at exposed and subglacial (cave) geothermal sites in Antarctica. *Polar Biology*, **41**, 417–421, 10.1007/s00300-017-2198-9.
- GALERA, H., CHWEDORZEWSKA, K.J., KORCZAK-ABSHIRE, M. & WÓDKIEWICZ, M. 2018. What affects the probability of biological invasions in Antarctica? Using an expanded conceptual framework to anticipate the risk of alien species expansion. *Biodiversity and Conservation*, **27**, 1789–1809, 10.1007/s10531-018-1547-5.
- GOLDENBERGER, D., PERSCHIL, I., RITZLER, M. & ALTWEGG, M. 1995. A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *Genome Research*, **4**, 368–370, 10.1101/gr.4.6.368.
- GONÇALVES, P.N., CÉSAR, P. & TONIN, A. 2008. Morfologia dos grãos de pólen de angiospermas modernas da Ilha King George, Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica. *Gaea - Journal of Geoscience*, **4**, 24–31, 10.4013/5553.
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2022. AlgaeBase. *World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway* Available at: <http://www.algaebase.org> [Accessed September 14, 2022].
- HARRIS, J. 2006. Antarctic Marine Protists. Edited by Fiona J. Scott and Harvey J. Marchant. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **38**, 301–302, 10.1657/1523-0430(2006)38[301b:BR]2.0.CO;2.
- HAWES, T.C., WORLAND, M.R., CONVEY, P. & BALE, J.S. 2007. Aerial dispersal of springtails on the Antarctic Peninsula: Implications for local distribution and demography. *Antarctic Science*, **19**, 3–10, 10.1017/S0954102007000028.
- HEBERLE, H., MEIRELLES, V.G., DA SILVA, F.R., TELLES, G.P. & MINGHIM, R. 2015. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, **16**, 1–7, 10.1186/s12859-015-0611-3.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313–321, 10.1098/rspb.2002.2218.

- HERING, D., BORJA, A., JONES, J.I., PONT, D., BOETS, P., BOUCHEZ, A., BRUCE, K., et al. 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, **138**, 192–205, 10.1016/j.watres.2018.03.003.
- HOLLINGSWORTH, P.M., FORREST, L.L., SPOUGE, J.L., HAJIBABAEI, M., RATNASINGHAM, S., VAN DER BANK, M., CHASE, M.W., et al. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 12794–12797, 10.1073/pnas.0905845106.
- HORTON, T., KROH, A., AHYONG, S., BAILLY, N., BIELER, R., BOYKO, C.B., BRANDÃO, S.N., et al. 2022. World Register of Marine Species (WoRMS) Available at: <https://www.marinespecies.org>.
- HSIEH, T.C., MA, K.H. & CHAO, A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers) McInerny, G., ed. *Methods in Ecology and Evolution*, **7**, 1451–1456, 10.1111/2041-210X.12613.
- HUGHES, K.A., WALSH, S., CONVEY, P., RICHARDS, S. & BERGSTROM, D.M. 2005. Alien fly populations established at two Antarctic research stations. *Polar Biology*, **28**, 568–570, 10.1007/s00300-005-0720-y.
- HUSON, D.H., BEIER, S., FLADE, I., GÓRSKA, A., EL-HADIDI, M., MITRA, S., RUSCHEWEYH, H.J. & TAPPU, R. 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology*, **12**, 1–12, 10.1371/journal.pcbi.1004957.
- HUSS, V.A.R., FRANK, C., HARTMANN, E.C., HIRMER, M., KLOBOUCEK, A., SEIDEL, B.M., WENZELER, P. & KESSLER, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **35**, 587–598, 10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x.
- KAPPEN, L. & STRAKA, H. 1988. Pollen and spores transport into the Antarctic. *Polar Biology*, **8**, 173–180, 10.1007/BF00443450.
- KAZŁOWSKI, B., CHIU, Y.-H., KAZŁOWSKA, K., PAN, C.-L. & WU, C.-J. 2012. Prevention of Japanese encephalitis virus infections by low-degree-polymerisation sulfated saccharides from *Gracilaria* sp. and *Monostroma nitidum*. *Food Chemistry*, **133**, 866–874, 10.1016/j.foodchem.2012.01.106.
- KOVÁČIK, L. & PEREIRA, B. 2001. Green alga *Prasiola crispa* and its lichenized form *Mastodia tessellata* in Antarctic environment: General aspects. *Nova Hedwigia*, **123**, 465–478.
- KRAAIJEVELD, K., DE WEGER, L.A., VENTAYOL GARCÍA, M., BUERMANS, H., FRANK, J., HIEMSTRA, P.S. & DEN DUNNEN, J.T. 2015. Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources*, **15**, 8–16, 10.1111/1755-0998.12288.
- LEGENDRE, P. & GALLAGHER, E.D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, **129**, 271–280, 10.1007/s004420100716.

- LELIAERT, F., SMITH, D.R., MOREAU, H., HERRON, M.D., VERBRUGGEN, H., DELWICHE, C.F. & DE CLERCK, O. 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **31**, 1–46, 10.1080/07352689.2011.615705.
- LI, F., GINOX, P. & RAMASWAMY, V. 2010. Transport of Patagonian dust to Antarctica. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, **115**, 1–9, 10.1029/2009JD012356.
- LORIUS, C., JOUZEL, J., RITZ, C., MERLIVAT, L., BARKOV, N.I., KOROTKEVICH, Y.S. & KOTLYAKOV, V.M. 1985. A 150,000-year climatic record from Antarctic ice. *Nature*, **316**, 591–596, 10.1038/316591a0.
- MARSHALL, W.A. 1996. Biological particles over Antarctica. *Nature*, **383**, 680–680, 10.1038/383680a0.
- MARSHALL, W.A. & CHALMERS, M.O. 1997. Airborne dispersal of antarctic terrestrial algae and cyanobacteria. *Ecography*, **20**, 585–594, 10.1111/j.1600-0587.1997.tb00427.x.
- MOHAMED, M.E. & HUSEEIN, E.A. 2016. Allovahlkampfia spelaea is a Potential Environmental Host for Pathogenic Bacteria. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, **07**, 10.4172/2155-9597.1000255.
- MUGGIA, L., LEAVITT, S. & BARRENO, E. 2018. The hidden diversity of lichenised Trebouxiphyceae (Chlorophyta). *Phycologia*, **57**, 503–524, 10.2216/17-134.1.
- NATARAJAN, V.P., ZHANG, X., MORONO, Y., INAGAKI, F. & WANG, F. 2016. A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments. *Frontiers in Microbiology*, **7** Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00986> [Accessed September 21, 2022].
- NEIGEL, J., DOMINGO, A. & STAKE, J. 2007. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. *Coral Reefs*, **26**, 487–499, 10.1007/s00338-007-0248-4.
- OCHYRA, R., SMITH, R.I.L. & BEDNAREK-OCHYRA, H. 2008. *The Illustrated Moss Flora of Antarctica*. Cambridge university press.
- OKSANEN, J., SIMPSON, G.L., BLANCHET, F.G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., et al. 2022. *vegan: Community Ecology Package* Available at: <https://cran.r-project.org/package=vegan>.
- OLECH, M. & CHWEDORZEWSKA, K.J. 2011. The first appearance and establishment of an alien vascular plant in natural habitats on the forefield of a retreating glacier in Antarctica. *Antarctic Science*, **23**, 153–154, 10.1017/S0954102010000982.
- PARAMESWARAN, P., JALILI, R., TAO, L., SHOKRALLA, S., GHARIZADEH, B., RONAGHI, M. & FIRE, A.Z. 2007. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Research*, **35**, 1–9, 10.1093/nar/gkm760.

- PARNIKOZA, I.Y., MAIDANUK, D.N. & KOZERETSKA, J.A. 2007. Are *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. migratory relicts? *Cytology and Genetics*, **41**, 36–40, 10.3103/s0095452707040068.
- PEARCE, D.A., ALEKHINA, I.A., TERAUDS, A., WILMOTTE, A., QUESADA, A., EDWARDS, A., DOMMERGUE, A., et al. 2016. Aerobiology over antarctica - A new initiative for atmospheric ecology. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1–7, 10.3389/fmicb.2016.00016.
- PEARCE, D.A., BRIDGE, P.D., HUGHES, K.A., SATTLER, B., PSENNER, R. & RUSSELL, N.J. 2009. Microorganisms in the atmosphere over Antarctica: Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, **69**, 143–157, 10.1111/j.1574-6941.2009.00706.x.
- PEARCE, D.A., HUGHES, K.A., LACHLAN-COPE, T., HARANGOZO, S.A. & JONES, A.E. 2010. Biodiversity of air-borne microorganisms at Halley station, Antarctica. *Extremophiles*, **14**, 145–159, 10.1007/s00792-009-0293-8.
- PROCHÁZKOVÁ, L., LEYA, T., KRÍŽKOVÁ, H. & NEDBALOVÁ, L. 2019. *Sanguina nivaloides* and *Sanguina aurantia* gen. Et spp. Nov. (Chlorophyta): The taxonomy, phylogeny, biogeography and ecology of two newly recognised algae causing red and orange snow. *FEMS Microbiology Ecology*, **95**, 1–21, 10.1093/femsec/fiz064.
- RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. 1998. The past and present of King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Polish Polar Research*, **19**, 249–252.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, **7**, 355–364.
- REMIAS, D., WASTIAN, H., LÜTZ, C. & LEYA, T. 2013. Insights into the biology and phylogeny of *Chloromonas polyptera* (Chlorophyta), an alga causing orange snow in Maritime Antarctica. *Antarctic Science*, **25**, 648–656, 10.1017/S0954102013000060.
- RICHARDSON, R.T., LIN, C.-H., SPONSLER, D.B., QUIJIA, J.O., GOODELL, K. & JOHNSON, R.M. 2015. Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, **3**, 1400066, 10.3732/apps.1400066.
- RIPPIN, M., BORCHHARDT, N., WILLIAMS, L., COLESIE, C., JUNG, P., BÜDEL, B., KARSTEN, U. & BECKER, B. 2018a. Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches. *Polar Biology*, **41**, 909–923, 10.1007/s00300-018-2252-2.
- RIPPIN, M., LANGE, S., SAUSEN, N. & BECKER, B. 2018b. Biodiversity of biological soil crusts from the Polar Regions revealed by metabarcoding. *FEMS microbiology ecology*, **94**, 1–15, 10.1093/femsec/fiy036.
- ROSA, L.H., DA SILVA, T.H., OGAKI, M.B., PINTO, O.H.B., STECH, M., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C.A. & CÂMARA, P.E.A.S. 2020a. DNA

- metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. *Scientific Reports*, **10**, 1–9, 10.1038/s41598-020-78934-7.
- ROSA, L.H., DE MENEZES, G.C.A., PINTO, O.H.B., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., SIMÕES, J.C., ROSA, C.A. & CÂMARA, P.E.A.S. 2022. Fungal diversity in seasonal snow of Martel Inlet, King George Island, South Shetland Islands, assessed using DNA metabarcoding. *Polar Biology*, **45**, 627–636, 10.1007/s00300-022-03014-7.
- ROSA, L.H., PINTO, O.H.B., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C.A. & CÂMARA, P.E.A.S. 2021. DNA Metabarcoding to Assess the Diversity of Airborne Fungi Present over Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. *Microbial Ecology*, **82**, 165–172, 10.1007/s00248-020-01627-1.
- ROSA, L.H., PINTO, O.H.B., ŠANTL-TEMKIV, T., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C.A. & CÂMARA, P.E.A.S. 2020b. DNA metabarcoding of fungal diversity in air and snow of Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Scientific Reports*, **10**, 21793, 10.1038/s41598-020-78630-6.
- RÜCKAMP, M., BRAUN, M., SUCKRO, S. & BLINDOW, N. 2011. Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. *Global and Planetary Change*, **79**, 99–109, 10.1016/j.gloplacha.2011.06.009.
- RUGGIERO, M.A., GORDON, D.P., ORRELL, T.M., BAILLY, N., BOURGOIN, T., BRUSCA, R.C., CAVALIER-SMITH, T., GUIRY, M.D. & KIRK, P.M. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, **10**, 1–60, 10.1371/journal.pone.0119248.
- RUPPERT, K.M., KLINE, R.J. & RAHMAN, M.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, **17**, e00547, 10.1016/j.gecco.2019.e00547.
- SAVOLAINEN, V., COWAN, R.S., VOGLER, A.P., RODERICK, G.K. & LANE, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1805–1811, 10.1098/rstb.2005.1730.
- SCHOCH, C.L., SEIFERT, K.A., HUHDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J.L., LEVESQUE, C.A., CHEN, W., et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 6241–6246, 10.1073/pnas.1117018109.
- SIMOES, J., GARCIA, C., EVANGELISTA, H., CAMPOS, L., MATA, M. & BREMER, U. 2011. *Antártica e as Mudanças Globais: um desafio para a humanidade*.
- SMITH, R.I.L. 1991. Exotic sporomorphs as indicators of potential immigrant colonists in Antarctica. *Grana*, **30**, 313–324, 10.1080/00173139109431986.
- SMITH, R.I.L. 2005. The thermophilic bryoflora of Deception Island: unique plant

- communities as a criterion for designating an Antarctic Specially Protected Area. *Antarctic Science*, **17**, 17–27, 10.1017/S0954102005002385.
- SOLLMAN, P. 2015. The genus Bryoerythrophyllum (musci, pottiaceae) in Antarctica. *Polish Botanical Journal*, **60**, 19–25, 10.1515/pbj-2015-0004.
- SOTO, D.F., FUENTES, R., HUOVINEN, P. & GÓMEZ, I. 2020. Microbial composition and photosynthesis in Antarctic snow algae communities : Integrating metabarcoding and pulse amplitude modulation fluorometry. *Algal Research*, **45**, 101738, 10.1016/j.algal.2019.101738.
- STIBAL, M., ELSTER, J., ŠABACKÁ, M. & KAŠTOVSKÁ, K. 2007. Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**, 265–273, 10.1111/j.1574-6941.2006.00264.x.
- SUNDBERG, S. 2013. Spore rain in relation to regional sources and beyond. *Ecography*, **36**, 364–373, 10.1111/j.1600-0587.2012.07664.x.
- TABERLET, P., COISSAC, E., POMPANON, F., BROCHMANN, C. & WILLERSLEV, E. 2012a. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding: NEXT-GENERATION DNA METABARCODING. *Molecular Ecology*, **21**, 2045–2050, 10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x.
- TABERLET, P., PRUD'HOMME, S.M., CAMPIONE, E., ROY, J., MIQUEL, C., SHEHZAD, W., GIELLY, L., et al. 2012b. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies: EXTRACTION OF EXTRACELLULAR DNA FROM SOIL. *Molecular Ecology*, **21**, 1816–1820, 10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x.
- THOMPSON, A.R., POWELL, G.S. & ADAMS, B.J. 2019. Provisional checklist of terrestrial heterotrophic protists from Antarctica. *Antarctic Science*, **31**, 287–303, 10.1017/S0954102019000361.
- TURNER, J., COLWELL, S.R., MARSHALL, G.J., LACHLAN-COPE, T.A., CARLETON, A.M., JONES, P.D., LAGUN, V., REID, P.A. & IAGOVKINA, S. 2005. Antarctic climate change during the last 50 years. *International Journal of Climatology*, **25**, 279–294, 10.1002/joc.1130.
- TURNER, J., LU, H., WHITE, I., KING, J.C., PHILLIPS, T., HOSKING, J.S., BRACEGIRDLE, T.J., MARSHALL, G.J., MULVANEY, R. & DEB, P. 2016a. Absence of 21st century warming on Antarctic Peninsula consistent with natural variability. *Nature*, **535**, 411–415, 10.1038/nature18645.
- TURNER, J., LU, H., WHITE, I., KING, J.C., PHILLIPS, T., HOSKING, J.S., BRACEGIRDLE, T.J., MARSHALL, G.J., MULVANEY, R. & DEB, P. 2016b. Absence of 21st century warming on Antarctic Peninsula consistent with natural variability. *Nature*, **535**, 411–415, 10.1038/nature18645.
- UNION, A.G. 2010. Antarctic Climate Change and the Environment. *Chemistry International – Newsmagazine for IUPAC*, **32**, 10.1515/ci.2010.32.2.25.

- VALENTINI, A., POMPANON, F. & TABERLET, P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 110–117, 10.1016/j.tree.2008.09.011.
- VAN DEN BROEKE, M., VAN DE BERG, W.J. & VAN MEIJAARD, E. 2006. Snowfall in coastal West Antarctica much greater than previously assumed. *Geophysical Research Letters*, **33**, L02505, 10.1029/2005GL025239.
- VINOCUR, A. & PIZARRO, H. 2000. Microbial mats of twenty-six lakes from Potter Peninsula, King George Island, Antarctica. *Hydrobiologia*, **437**, 171–185, 10.1023/A:1026511125146.
- VINOCUR, A. & PIZARRO, H. 1995. Periphyton flora of some lotic and lentic environments of Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Polar Biology*, **15**, 401–414, 10.1007/BF00239716.
- WHITE, BRUNS, T.D., LEE, S.B. & TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. 315–322.
- WOMACK, A.M., BOHANNAN, B.J.M. & GREEN, J.L. 2010. Biodiversity and biogeography of the atmosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 3645–3653, 10.1098/rstb.2010.0283.
- WYNN-WILLIAMS, D.D. 1990. Microbial Colonization Processes I N Antarctic Fellfield Soils-an Experimental Overview. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol*, **3**, 164–178.
- YOCCOZ, N.G., BRÅTHEN, K.A., GIELLY, L., HAILE, J., EDWARDS, M.E., GOSLAR, T., VON STEDINGK, H., et al. 2012. DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology*, **21**, 3647–3655, 10.1111/j.1365-294X.2012.05545.x.
- ZHOU, J., BRUNS, M.A. & TIEDJE, J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 316–322, 10.1128/aem.62.2.316-322.1996.

DISCUSSÃO GERAL

Devido à escassez de estudos utilizando a técnica de DNA em regiões antárticas, poucas comparações foram possíveis considerando os resultados encontrados nesse trabalho. Na Baía do Almirantado, foram detectadas um total de 43 táxons do Reino Viridiplantae. Em estudos semelhantes como os de Câmara *et al.* (2020) e Carvalho-Silva *et al.* (2021), foram registradas cerca de 65 táxons de clorófitas e 16 táxons de estreptófitas, em amostras de solo da ilha vizinha chamada Deception, totalizando 81 táxons pertencentes ao Reino Viridiplantae. Sendo assim, é possível notar uma menor diversidade nos ambientes da Baía do Almirantado, quando comparados aos ambientes observados na ilha Deception. Fatores que aumentem a dispersão de diásporos podem estar relacionados ao aumento da diversidade de organismos em ilhas, como é o caso da ilha Deception que sofre com atividades humanas em alguns períodos do ano. Além disso, as fontes termais que podem ser encontradas em Deception, criam zonas mais quentes e podem contribuir para um ambiente mais diversificado e possivelmente mais favorável para as espécies de plantas que ali chegam.

Das amostras de neve, usando a técnica de DNA metabarcoding, mas com o marcador de 16s Soto *et al.* (2020) encontraram táxons semelhantes durante a floração de algas de neve multicoloridas na península de Fildes também na IRG. Usando o marcador 16s e ITS em uma abordagem mais ampla Davey *et al.* (2019), com amostras de neve da baía de Ryder, na ilha de Adelaide, obtiveram uma comunidade de algas relacionada com a encontrada neste estudo.

Para a amostra de ar, estudos anteriores usando metodologias de amostragem tradicionais como Marshall & Chalmers (1997) foram capazes de registrar algumas espécies de algas e diatomáceas em amostras de ar também, de acordo com Wynn-Williams (1990) algas verdes e cianobactérias são organismos que preenchem o papel do colonizador primário para fixar carbono e fornecer moléculas essenciais a outros organismos. Em nossas amostras foram registrados 23 táxons, estes são os primeiros organismos não-fungi aéreos já registrados através da técnica de DNA metabarcoding na Antártica.

O solo de *Punta Plaza* teve a maior riqueza e diversidade, seguido por *Punta Ullman*, e *Nunatak Needle*. Embora a proximidade com a EACF possa aumentar o número de organismos nas proximidades, *Punta Plaza* é também o local mais próximo da entrada da Baía do Almirantado. A constante exposição aos ventos fortes e o “spray”

marinho vindo do estreito de Bransfield pode ser um fator mais significativo em relação às diferenças observadas entre as comunidades do solo.

Um fato que foi observado em nosso estudo, foi a presença de táxons do reino Animalia em amostras de ar. Dentre os táxons detectados, destacasse Entomobryomorpha que é relativamente abundante na Antártica, conhecido principalmente por espécies de colêmbolas que geralmente são encontrados vivendo na vegetação, solo ou sob rochas. Apesar de parecer estranho encontrar organismos terrestres em amostras de ar, a aerocoria é uma forma conhecida de dispersão do grupo (Hawes *et al.* 2007). Outros táxons como *Salpa thompsoni* e pertencentes as classes Antozoa, Bivalvia em sua maioria organismos aquáticos, já registrados no continente, também foram capturados pelo amostrador de ar, possivelmente sob influência do spray marinho transportado pelo vento, já que estava localizado muito próximo ao mar no local do *Punta Plaza*.

Viridiplantae foi o grupo não-fungi mais rico e abundante encontrado nas amostras e no total, o táxon mais registrado foi *Sanguina nivaloides* (Chlorophyceae), encontrada em todas as amostras. *Sanguina nivaloides* é uma espécie cosmopolita, e é encontrada em todo o mundo onde neves perenes estão presentes, a espécie também é conhecida por estar associada aos fenômenos de neve de sangue, onde grandes floração da espécie formam grandes manchas geralmente vermelhas sobre a neve (Procházková *et al.* 2019).

Chromista foi o segundo reino mais abundante e diversificado, com quase 6% dos sequências, o filo Ciliophora conhecido por se alimentar de bactérias, teve suas sequências atribuídas a alguns ciliados que são amplamente difundidos pelo mundo e alguns novos táxons para a Antártica.

O reino Animalia foi o terceiro mais abundante e rico, variando desde as mais basais esponjas marinhas pertencentes a ordem Spongillida, até os primeiros cordados (*Salpa thompsoni*). Finalmente, o reino Protozoa fez sua entrada na lista com apenas um táxon *Allovahlkampfia* sp. encontrado em amostras de solo e neve já foi registrado na Antártica (Tyml *et al.* 2016).

Quanto ao impacto causado ou pela presença humana, não houve estatísticas que suportassem diferenças entre áreas antropizadas ou não, seja em índices de diversidade ou riqueza. A análise NMDS e PERMANOVA mostrou que não houve relação entre o nível de presença humana e a comunidade no local da amostra. Embora os muitos anos de presença humana na Baía do Almirantado (Rakusa-Suszczewski 1998) e a visível transformação do ambiente, a presença humana não parece ter afetado a comunidade da

região nos níveis que fomos capazes de avaliar.

Em relação às espécies que chegam à Antártica, mas que ainda não conseguem se desenvolver devido a razões ambientais como temperatura, umidade ou substrato disponível, todas as Viridiplanteae encontradas neste estudo, têm sua distribuição original também relacionada a ambientes frios, principalmente no hemisfério norte. A presença de tais espécies na Península Antártica sugere que elas podem ser apenas espécies nativas antárticas até então desconhecidas. Das espécies registradas neste estudo, todas elas já estão associadas a ambientes já frios parecidos com o da Península antártica, de modo que não houve nenhuma espécie que, devido ao aumento contínuo da temperatura, possa se tornar mais capaz de colonizar e se espalhar, melhor do que elas já o fazem.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo gerou uma grande variedade de dados aumentando o conhecimento da biodiversidade antártica, possibilitando novos dados referentes a biodiversidade do local e fornecendo uma fonte de dados para outros estudos. Entretanto, é importante lembrar que a sequência de DNA encontrada não confirma a presença ou viabilidade de um determinado organismo, e estudos direcionados são recomendados para confirmar a presença dos táxons de interesse.

Embora conscientes de nosso esforço de amostragem não ideal, não pudemos observar nenhuma diferença estatística entre as áreas amostradas, e a avaliação do impacto causado pela presença humana em diferentes locais e substratos mostrou que a antropização na baía, ainda não afetou significativamente as comunidades amostradas. Podemos também confirmar que o ar está sendo usado como meio de dispersão para uma grande variedade de táxons, e seu papel na colonização de áreas sem gelo precisa ser considerado.

Com relação à investigação de espécies que podem se beneficiar com o aumento da temperatura esperado, este estudo não foi capaz de observar nenhuma espécie em tais termos, mas recomendamos uma investigação mais aprofundada, com amostragem mais ampla, e se possível de forma periódica.

Devido ao resultado obtido, endossamos que o DNA *metabarcoding* é uma ferramenta viável para avaliar a diversidade e riqueza dos táxons presentes na neve, solo e ar de lugares tão difíceis como a Antártica. O grande número de sequências que não puderam ser classificadas em níveis mais específicos, pode servir como um lembrete de

que ainda há a necessidade de continuar melhorando nosso banco de dados genômicos, e de que ainda há muito a se saber sobre a biodiversidade da Antártica.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K., ZIRK, A., PIIRMANN, T., PÖHÖNEN, R., IVANOV, F., NILSSON, R.H. & KÖLJALG, U. 2020. UNITE QIIME release for Fungi, 10.15156/BIO/786385.
- BANCHI, E., AMETRANO, C.G., GRECO, S., STANKOVIĆ, D., MUGGIA, L. & PALLAVICINI, A. 2020. PLANiTS: a curated sequence reference dataset for plant ITS DNA metabarcoding. *Database : the journal of biological databases and curation*, **2020**, 1–9, 10.1093/database/baz155.
- BÁNKI, O., ROSKOV, Y., DÖRING, M., OWER, G., VANDEPITTE, L., HOBERN, D., REMSEN, D., et al. 2022. Catalogue of Life Checklist, 10.48580/dfpz.
- BOLYEN, E., RIDEOUT, J.R., DILLON, M.R., BOKULICH, N.A., ABNET, C.C., AL-GHALITH, G.A., ALEXANDER, H., et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, **37**, 852–857, 10.1038/s41587-019-0209-9.
- BRAZIL & POLAND. 2005. Review of the admiralty bay antarctic specially managed area management plan (ASMA No. 1). In *ATCM XXVIII, Stockholm*. 1–31.
- CAMACHO, C., COULOURIS, G., AVAGYAN, V., MA, N., PAPADOPOULOS, J., BEALER, K. & MADDEN, T.L. 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, **10**, 1–9, 10.1186/1471-2105-10-421.
- CÂMARA, P.E.A.S., CARVALHO-SILVA, M., PINTO, O.H.B., AMORIM, E.T., HENRIQUES, D.K., DA SILVA, T.H., PELLIZZARI, F., CONVEY, P. & ROSA, L.H. 2020. Diversity and Ecology of Chlorophyta (Viridiplantae) Assemblages in Protected and Non-protected Sites in Deception Island (Antarctica, South Shetland Islands) Assessed Using an NGS Approach. *Microbial Ecology*, 10.1007/s00248-020-01584-9.
- CÂMARA, PAULO EDUARDO AGUIAR SARAIVA, CONVEY, P., RANGEL, S.B., KONRATH, M., BARRETO, C.C., PINTO, O.H.B., SILVA, M.C., HENRIQUES, D.K., DE OLIVEIRA, H.C. & ROSA, L.H. 2021. The largest moss carpet transplant in Antarctica and its bryosphere cryptic biodiversity. *Extremophiles*, **25**, 369–384, 10.1007/s00792-021-01235-y.
- CÂMARA, PAULO E.A.S., DE SOUZA, L.M.D., PINTO, O.H.B., CONVEY, P., AMORIM,

- E.T., CARVALHO-SILVA, M. & ROSA, L.H. 2021. Periphyton diversity in two different Antarctic lakes assessed using metabarcoding. *Antarctic Science*, **33**, 596–604, 10.1017/S0954102021000316.
- CÂMARA, P.E.A.S. & MATTOS, L.F. DE. 2020. A ciência como ferramenta geopolítica. *REVISTA MARÍTIMA BRASILEIRA*, **140**, 15–23.
- CARVALHO-SILVA, M., ROSA, L.H., PINTO, O.H.B., DA SILVA, T.H., HENRIQUES, D.K., CONVEY, P. & CÂMARA, P.E.A.S. 2021. Exploring the plant environmental DNA diversity in soil from two sites on Deception Island (Antarctica, South Shetland Islands) using metabarcoding. *Antarctic Science*, **33**, 469–478, 10.1017/S0954102021000274.
- CHEN, S., YAO, H., HAN, J., LIU, C., SONG, J., SHI, L., ZHU, Y., et al. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, **5**, 1–8, 10.1371/journal.pone.0008613.
- CHOWN, S.L. & CONVEY, P. 2016. Antarctic Entomology. *Annual Review of Entomology*, **61**, 119–137, 10.1146/annurev-ento-010715-023537.
- DAVEY, M.P., NORMAN, L., STERK, P., HUETE-ORTEGA, M., BUNBURY, F., KIN, B., LOH, W., et al. 2019. Snow algae communities in Antarctica: metabolic and taxonomic composition, 10.1111/nph.15701.
- DEINER, K., BIK, H.M., MÄCHLER, E., SEYMOUR, M., LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A., ALTERMATT, F., CREER, S., et al. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, **26**, 5872–5895, 10.1111/mec.14350.
- FONSECA, B.M., CÂMARA, P.E.A.S., OGAKI, M.B., PINTO, O.H.B., LIRIO, J.M., CORIA, S.H., VIEIRA, R., et al. 2022. Green algae (Viridiplantae) in sediments from three lakes on Vega Island, Antarctica, assessed using DNA metabarcoding. *Molecular Biology Reports*, **49**, 179–188, 10.1007/s11033-021-06857-1.
- FRASER, C.I., CONNELL, L., LEE, C.K. & CARY, S.C. 2018. Evidence of plant and animal communities at exposed and subglacial (cave) geothermal sites in Antarctica. *Polar Biology*, **41**, 417–421, 10.1007/s00300-017-2198-9.
- GUIRY MD IN GUIRY MD, G.G. 2022. AlgaeBase. *World-wide electronic publication* Available at: <http://www.algaebase.org>.

- HARRIS, J. 2006. Antarctic Marine Protists. Edited by Fiona J. Scott and Harvey J. Marchant. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **38**, 301–302, 10.1657/1523-0430(2006)38[301b:BR]2.0.CO;2.
- HAWES, T.C., WORLAND, M.R., CONVEY, P. & BALE, J.S. 2007. Aerial dispersal of springtails on the Antarctic Peninsula: Implications for local distribution and demography. *Antarctic Science*, **19**, 3–10, 10.1017/S0954102007000028.
- HEBERLE, H., MEIRELLES, V.G., DA SILVA, F.R., TELLES, G.P. & MINGHIM, R. 2015. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, **16**, 1–7, 10.1186/s12859-015-0611-3.
- HERING, D., BORJA, A., JONES, J.I., PONT, D., BOETS, P., BOUCHEZ, A., BRUCE, K., et al. 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, **138**, 192–205, 10.1016/j.watres.2018.03.003.
- HORTON, T., KROH, A., AHYONG, S., BAILLY, N., BIELER, R., BOYKO, C.B., BRANDÃO, S.N., et al. 2022. World Register of Marine Species (WoRMS) Available at: <https://www.marinespecies.org>.
- HUGHES, K.A., WALSH, S., CONVEY, P., RICHARDS, S. & BERGSTROM, D.M. 2005. Alien fly populations established at two Antarctic research stations. *Polar Biology*, **28**, 568–570, 10.1007/s00300-005-0720-y.
- HUSON, D.H., BEIER, S., FLADE, I., GÓRSKA, A., EL-HADIDI, M., MITRA, S., RUSCHEWEYH, H.J. & TAPPU, R. 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology*, **12**, 1–12, 10.1371/journal.pcbi.1004957.
- HUSS, V.A.R., FRANK, C., HARTMANN, E.C., HIRMER, M., KLOBOUCEK, A., SEIDEL, B.M., WENZELER, P. & KESSLER, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **35**, 587–598, 10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x.
- KAPPEN, L. & STRAKA, H. 1988. Pollen and spores transport into the Antarctic. *Polar Biology*, **8**, 173–180, 10.1007/BF00443450.
- KAZŁOWSKI, B., CHIU, Y.H., KAZŁOWSKA, K., PAN, C.L. & WU, C.J. 2012. Prevention of Japanese encephalitis virus infections by low-degree-polymerisation sulfated

- saccharides from *Gracilaria* sp. and *Monostroma nitidum*. *Food Chemistry*, **133**, 866–874, 10.1016/j.foodchem.2012.01.106.
- KOVÁČIK, L. & PEREIRA, B. 2001. Green alga *Prasiola crispa* and its lichenized form *Mastodia tessellata* in Antarctic environment: General aspects. *Nova Hedwigia*, **123**, 465–478.
- LEGENDRE, P. & GALLAGHER, E.D. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, **129**, 271–280, 10.1007/s004420100716.
- LELIAERT, F., SMITH, D.R., MOREAU, H., HERRON, M.D., VERBRUGGEN, H., DELWICHE, C.F. & DE CLERCK, O. 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **31**, 1–46, 10.1080/07352689.2011.615705.
- LI, F., GINOUX, P. & RAMASWAMY, V. 2010. Transport of Patagonian dust to Antarctica. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, **115**, 1–9, 10.1029/2009JD012356.
- MARSHALL, W.A. & CHALMERS, M.O. 1997. Airborne dispersal of antarctic terrestrial algae and cyanobacteria. *Ecography*, **20**, 585–594, 10.1111/j.1600-0587.1997.tb00427.x.
- MOHAMED, M.E. & HUSEEIN, E.A. 2016. *Allovahlkampfia spelaea* is a Potential Environmental Host for Pathogenic Bacteria. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, **07**, 10.4172/2155-9597.1000255.
- MUGGIA, L., LEAVITT, S. & BARRENO, E. 2018. The hidden diversity of lichenised Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *Phycologia*, **57**, 503–524, 10.2216/17-134.1.
- OCHYRA, R., LEWIS, S. & BEDNAREK-OCHYRA, H. 2008. *The illustrated moss flora of Antarctica*. Cambridge university press.
- OKSANEN, J., SIMPSON, G.L., BLANCHET, F.G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., et al. 2022. vegan: Community Ecology Package Available at: <https://cran.r-project.org/package=vegan>.
- PEARCE, D.A., HUGHES, K.A., LACHLAN-COPE, T., HARANGOZO, S.A. & JONES, A.E. 2010. Biodiversity of air-borne microorganisms at Halley station, Antarctica. *Extremophiles*, **14**, 145–159, 10.1007/s00792-009-0293-8.
- PROCHÁZKOVÁ, L., LEYA, T., KRÍŽKOVÁ, H. & NEDBALOVÁ, L. 2019. *Sanguina*

- nivaloides and *Sanguina aurantia* gen. Et spp. Nov. (Chlorophyta): The taxonomy, phylogeny, biogeography and ecology of two newly recognised algae causing red and orange snow. *FEMS Microbiology Ecology*, **95**, 1–21, 10.1093/femsec/fiz064.
- REMIAS, D., WASTIAN, H., LÜTZ, C. & LEYA, T. 2013. Insights into the biology and phylogeny of *Chloromonas polyptera* (Chlorophyta), an alga causing orange snow in Maritime Antarctica. *Antarctic Science*, **25**, 648–656, 10.1017/S0954102013000060.
- RICHARDSON, R.T., LIN, C.-H., SPONSLER, D.B., QUIJIA, J.O., GOODELL, K. & JOHNSON, R.M. 2015. Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, **3**, 1400066, 10.3732/apps.1400066.
- RIPPIN, M., LANGE, S., SAUSEN, N. & BECKER, B. 2018. Biodiversity of biological soil crusts from the Polar Regions revealed by metabarcoding. *FEMS microbiology ecology*, **94**, 1–15, 10.1093/femsec/fiy036.
- ROSA, L.H., DA SILVA, T.H., OGAKI, M.B., PINTO, O.H.B., STECH, M., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C.A. & CÂMARA, P.E.A.S. 2020. DNA metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. *Scientific Reports*, **10**, 1–9, 10.1038/s41598-020-78934-7.
- ROSA, L.H., PINTO, O.H.B., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C.A. & CÂMARA, P.E.A.S. 2021. DNA Metabarcoding to Assess the Diversity of Airborne Fungi Present over Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. *Microbial Ecology*, **82**, 165–172, 10.1007/s00248-020-01627-1.
- RUGGIERO, M.A., GORDON, D.P., ORRELL, T.M., BAILLY, N., BOURGOIN, T., BRUSCA, R.C., CAVALIER-SMITH, T., GUIRY, M.D. & KIRK, P.M. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, **10**, 1–60, 10.1371/journal.pone.0119248.
- RUPPERT, K.M., KLINE, R.J. & RAHMAN, M.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, **17**, e00547, 10.1016/j.gecco.2019.e00547.

- SOTO, D.F., FUENTES, R., HUOVINEN, P. & GÓMEZ, I. 2020. Microbial composition and photosynthesis in Antarctic snow algae communities : Integrating metabarcoding and pulse amplitude modulation fluorometry. *Algal Research*, **45**, 101738, 10.1016/j.algal.2019.101738.
- STIBAL, M., ELSTER, J., ŠABACKÁ, M. & KAŠTOVSKÁ, K. 2007. Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**, 265–273, 10.1111/j.1574-6941.2006.00264.x.
- THOMPSON, A.R., POWELL, G.S. & ADAMS, B.J. 2019. Provisional checklist of terrestrial heterotrophic protists from Antarctica. *Antarctic Science*, **31**, 287–303, 10.1017/S0954102019000361.
- TYML, T., SKULINOVÁ, K., KAVAN, J., DITRICH, O., KOSTKA, M. & DYKOVÁ, I. 2016. Heterolobosean amoebae from Arctic and Antarctic extremes: 18 novel strains of *Allovalkampa*, *Vahlkampfi* and *Naegleria*. *European Journal of Protistology*, **56**, 119–133, 10.1016/j.ejop.2016.08.003.
- VINOCUR, A. & PIZARRO, H. 2000. Microbial mats of twenty-six lakes from Potter Peninsula, King George Island, Antarctica. *Hydrobiologia*, **437**, 171–185, 10.1023/A:1026511125146.
- VINOCUR, A. & PIZARRO, H. 1995. Periphyton flora of some lotic and lentic environments of Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Polar Biology*, **15**, 401–414, 10.1007/BF00239716.
- WYNN-WILLIAMS, D.D. 1990. Microbial Colonization Processes IN Antarctic Fellfield Soils-an Experimental Overview. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol*, **3**, 164–178.