



*Tesis para obtener el título de Magíster en Biología*

*Opción Ecología y Evolución*

**Cambios en la dieta de los pingüinos pigoscélidos como  
indicador de los impactos del cambio climático y las  
actividades humanas en los ecosistemas marinos  
de la Península Antártica**

---

Lic. Maryam Raslan

**Tutor:** Dr. Alvaro Soutullo

**Co-tutora:** Dra. Mariana Cosse

2025



## **Agradecimientos**

Hay muchas personas que nos ayudan en el camino, algunas con empujoncitos cuando parece que nos tropezamos, otras con manos salvadoras cuando parece que nos ahogamos. Todos ellos, igual de necesarios.

En esta ocasión de celebrarlos, quiero empezar por agradecer a mi familia: mi mamá Beatriz, mi hermana Tasnim, y mis abuelas Berta y Luisa; familia chiquita que me llevó siempre a perseguir los sueños sin dejarme dar vuelta a ver si me estaba equivocando. También quiero agradecer a mis amigos, algunos que me acompañan desde los años de liceo y otros que se fueron incorporando en el viaje que es transitar la Facultad. Entre ellos: Lucía, Juliana, Adrián, Mayte, Paula, y Selene. Por su hermandad, su enorme paciencia, su oído siempre dispuesto, y por celebrar conmigo los logros como si fueran suyos.

De la misma manera, quiero agradecer a quienes me acompañaron a diario en el trabajo, y en este sentido, reconocer a todos mis compañeros del laboratorio de Biodiversidad y Genética del IIBCE, por ayudarme siempre a destrabarme en el mundo de la genética, un universo casi siempre más apasionante que frustrante. A su vez, a todo el equipo Pingüinos (Anita, Alvaro, Nati, Noe, y Clau), por el tiempo compartido bajo nieve, la amistad, las enseñanzas, y el trabajo hombro con hombro. A mi jefa Daniela, mi compañero Héctor, y el grupo humano del bioterio de Roedores de Facultad de Ciencias, porque trabajar con ustedes fue un placer, porque me dieron siempre su apoyo y amistad, y me permitieron con su esfuerzo hacer locuras como pasar dos meses en la Antártida sin perder el trabajo en el intento.

A su vez, quiero hacer mención a las instituciones que hicieron esto posible, y a los miembros del tribunal, Iván, Noelia, y Mariana, por la rapidez y gran contribución de sus aportes, sin los cuales esta tesis no habría terminado a tiempo.

Y para terminar, quiero destacar especialmente a mis orientadores, Alvaro y Mariana, por su paciencia infinita, su dedicación, y su enorme capacidad de formación, porque aman lo que hacen y se nota. Con ustedes, una deuda enorme.

Infinitas gracias a todos.

## Tabla de contenidos

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1: La Antártida, el Océano Austral, y los pingüinos como centinelas del ecosistema.....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>16</b>
Trabajo de campo y área de estudio.....	16
Sexaje molecular.....	17
<b>CAPÍTULO 2: Análisis de la dieta de <i>P. papua</i> y <i>P. adeliae</i> utilizando la técnica de metabarcoding de ADN.....</b>	<b>19</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>19</b>
Objetivo.....	21
<b>Metodología.....</b>	<b>22</b>
Colecta de muestras y extracción de ADN.....	22
Preparación de muestras y amplificación.....	22
Preparación de librerías y secuenciación IonTorrent.....	24
Análisis de datos.....	25
<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>34</b>
Contaminación ambiental.....	37
Limitaciones y perspectivas.....	38
Conclusiones.....	40
<b>CAPÍTULO 3: Análisis de la dieta de <i>P. papua</i> utilizando la técnica de isótopos estables.....</b>	<b>41</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>41</b>
Objetivo.....	42
<b>Metodología.....</b>	<b>43</b>
Trabajo de campo y procesamiento de muestras.....	43
Análisis estadísticos.....	44
Análisis de datos.....	44
<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>50</b>
Conclusiones.....	52
<b>CAPÍTULO 4: Conclusiones generales.....</b>	<b>55</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>71</b>

## Resumen

La Antártida y el Océano Austral cumplen una variedad de servicios ecosistémicos, desempeñando un rol clave en la regulación del clima, el nivel del mar, y el balance de calor. Sin embargo, estos ecosistemas se encuentran fuertemente presionados por el impacto de las actividades humanas y el cambio climático, principalmente en la Península Antártica. El estudio de la ecología trófica y del movimiento de especies como los pingüinos permite entender y monitorear estos cambios. Los pingüinos son considerados especies centinelas de los ecosistemas marinos, ya que se alimentan en el mar, por lo que su supervivencia y éxito reproductivo dependen de la disponibilidad de alimento en él, y los hace sensibles a efectos *bottom-up* en las cadenas tróficas marinas. El objetivo de esta tesis es analizar la dieta de dos especies de pingüinos pigoscélidos, papúa y Adelia (*P. papua* y *P. adeliae*), mediante dos abordajes metodológicos diferentes. En particular, se pretendió caracterizar la composición de la dieta de ambas especies en sus colonias reproductivas de Isla Ardley (Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo), utilizando la técnica de metabarcoding para analizar sus fecas (mediante el análisis de regiones de los genes COI y 18S como marcadores). Se consideraron dos años (2019/20 vs. 2021/22) con diferente disponibilidad de krill (*Euphausia superba*), su presa principal, como forma de evaluar la plasticidad de estas especies frente a cambios en la disponibilidad de sus presas y los posibles efectos en la dinámica de sus poblaciones. Por otra parte, se buscó estudiar en detalle la dieta de *P. papua* mediante la técnica de isótopos estables, a lo largo de cinco temporadas (2019/20 a 2023/24) y poder compararla con la de su congénere *P. adeliae*, cuya dieta en el entorno de Isla Ardley ya ha sido estudiada mediante esta técnica. En total, se analizaron 24 muestras de ADN fecal de las dos especies. Se lograron detectar 7 familias en su dieta, donde la presa más representada fue el krill *E. superba*, en las dos temporadas analizadas. Ambas especies consumieron krill y gasterópodos; en papúa se observó también el consumo de cnidarios, a la vez que en Adelia se observó también el consumo de otras especies de crustáceos, poliquetos y peces, algunas de las cuales habían sido escasamente reportadas previamente en la dieta de estos depredadores para la región. COI demostró ser el marcador más eficiente para la detección de presas, y su rendimiento mejoró en gran medida al utilizarse en conjunto con un bloqueador de ADN de pingüino. Las presas identificadas mediante éste análisis se usaron como base para determinar presas potenciales de los pingüinos papúa para la caracterización de su dieta a partir del análisis de isótopos estables. Para ello, se elaboró un listado inicial de 18 presas, incluyendo crustáceos, peces, gasterópodos, cefalópodos, poliquetos, y cnidarios. Este modelo inicial fue luego filtrado, descartándose aquellas presas que presentaron valores extremos en el gráfico de espacio isotópico, y las que contribuyeron en menos de un 5% al modelo de mezcla. Finalmente, se mantuvieron 5

presas: el krill, los peces *C. gunnari*, *T. newnesi*, y *E. antarctica*, y el calamar *P. glacialis*. Se observó, en todos los casos, que el krill antártico *E. superba* fue el alimento principal, constituyendo para la mayoría de los años casi un 60% de la dieta. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los pingüinos fueron más bajos en los veranos de 2020/21 y 2021/22 (sugiriendo el uso de áreas más alejadas de la costa), y más altos en 2019/20 (sugiriendo el uso de áreas más costeras). La contribución de las demás presas a la dieta fue poco variable entre temporadas, de forma congruente con el comportamiento observado en los pingüinos Adelia. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante el desarrollo de esta tesis no apoyaron la hipótesis de que el éxito reproductivo y las tendencias poblacionales contrastantes entre las especies del género *Pygoscelis* se deben a una mayor plasticidad en la dieta de *P. papua*. En este contexto de ambiente cambiante, el monitoreo de las poblaciones de los depredadores marinos se vuelve esencial para informar medidas de conservación y gestión de recursos que aseguren la viabilidad de estas poblaciones. El uso combinado de las técnicas utilizadas en esta tesis permite tener una visión más completa de la dieta, y requiere un muy bajo esfuerzo para la obtención de las muestras, por lo que se resalta la viabilidad y potencialidad de incorporar este tipo de muestreo en los monitoreos a largo plazo que ya se realizan en la región, como el programa CEMP de CCAMLR.

**Palabras clave:** metabarcoding de ADN, análisis de isótopos estables, análisis de dieta, *Pygoscelis*, Isla Ardley

## Abstract

Antarctica and the Southern Ocean provide a variety of ecosystem services, playing a key role in climate regulation, sea level control, and heat balance. However, these ecosystems are under significant pressure due to human activities and climate change, especially in the Antarctic Peninsula. The study of trophic and movement ecology of species such as penguins allows us to understand and monitor these changes. Penguins are considered ecosystem sentinels of marine environments, as they feed at sea, meaning their survival and reproductive success depend on food availability there, making them sensitive to bottom-up effects in marine food chains. The aim of this thesis is to analyze the diet of two species of *Pygoscelis* penguins, gentoo and Adélie penguins (*P. papua* and *P. adeliae*), using two different methodological approaches. Specifically, we aimed to characterize the diet composition of both species in their breeding colonies on Ardley Island (King George Island/25 de Mayo Island) using DNA metabarcoding to analyze their feces (via the analysis of COI and 18S gene regions as markers). Two years (2019/20 vs. 2021/22) with different krill (*Euphausia superba*) availability, their main prey, were considered in order to evaluate the plasticity of these species in response to changes in prey availability and the possible effects on their population dynamics. Furthermore, we aimed to study the diet of *P. papua* in detail using the stable isotope analysis technique, through five summer seasons (2019/20 to 2023/24) and compare it with that of its congener *P. adeliae*, whose diet in the region had already been studied using this technique. In total, 24 fecal DNA samples from both species were analyzed. Seven families were detected in their diet, with the most represented prey being krill, *E. superba*, in both of the analyzed seasons. Both species consumed krill and gastropods; in gentoos, cnidarians were also consumed, while in Adélie penguins, other species of crustaceans, polychaetes, and fish were also observed, some of which had been scarcely reported in the diet of these predators for the region. COI proved to be the most efficient marker for prey detection, and its performance greatly improved when used in conjunction with a penguin DNA blocker. The prey items identified through this analysis were used as the basis for determining potential prey for *P. papua* in the stable isotope analysis. For this, an initial list of 18 potential prey species was compiled, including crustaceans, fish, gastropods, cephalopods, polychaetes, and cnidarians. This list was then filtered by discarding prey that had extreme values in the isotopic space plot and those contributing less than 5% to the mixing model. Finally, 5 prey species were retained: krill, fish species *C. gunnari*, *T. newnesi*, and *E. antarctica*, and squid *P. glacialis*. In all cases, the Antarctic krill *E. superba* was observed to be the main food source, constituting almost 60% of the diet in most years. The penguins'  $\delta^{13}\text{C}$  values were lowest in the summers of 2020/21 and 2021/22 (suggesting the use of areas further from the coast) and highest in 2019/20 (suggesting the

use of more coastal areas). The contribution of the other prey items to the diet showed little variation between seasons, consistent with the behavior observed in Adélie penguins. Therefore, the results obtained through the development of this thesis did not support the hypothesis that the contrasting reproductive success and population trends among species of the genus *Pygoscelis* are due to greater dietary plasticity in *P. papua*, which confers an advantage for the species. Instead, these advantages are more likely associated with its greater ability to adapt its phenology to environmental factors. In a context of environmental changes, monitoring marine predator populations becomes essential to inform conservation and resource management measures that ensure the viability of these populations. The combined use of the techniques applied in this thesis provides a more complete view of the diet and is associated with very low sample collection effort. This highlights both the feasibility and the potential of incorporating this type of sampling into the long-term monitoring currently being conducted in the region, such as CCAMLR's CEMP program.

**Keywords:** DNA metabarcoding, stable isotope analysis, diet analysis, *Pygoscelis*, Ardley Island.



## CAPÍTULO 1: La Antártida, el Océano Austral, y los pingüinos como centinelas del ecosistema

### Introducción

La Antártida y el Océano Austral cumplen una variedad de servicios ecosistémicos, desempeñando un rol clave en la regulación del clima, el nivel del mar, y el balance global de calor (Lee et al., 2022). Sin embargo, estos ecosistemas se encuentran fuertemente presionados por el impacto de las actividades humanas y el cambio climático (Lee et al., 2022; Wauchope et al., 2019), principalmente en la Península Antártica (PA; Hogg et al., 2020). El calentamiento de esta región durante las últimas décadas está relacionado tanto con cambios atmosféricos, como con el aumento del transporte de aguas profundas circumpolares cálidas hacia la plataforma (Henley et al., 2019). Esto se ve evidenciado por un aumento de temperatura observado de 3°C en el aire y de aproximadamente 1°C en la temperatura superficial del océano entre 1955 y 2004 (Moffat & Meredith, 2018). Además, la plataforma de hielo y los glaciares están retrocediendo drásticamente, a la vez que está disminuyendo la concentración y duración del hielo marino, especialmente en la PA Occidental (PAO), y en el sur del mar de Bellingshausen (Stammerjohn et al., 2008).

Esta disminución de hielo, asociada al aumento de la temperatura superficial del mar, tiene una profunda incidencia sobre las especies dependientes del hielo, como el krill antártico (*Euphausia superba*) (Atkinson et al., 2019), una especie clave en la red trófica antártica (Bestley et al., 2020); o en especies de peces que lo utilizan como hábitat de desove, como es el caso de *Pleuragramma antarcticum*. Esta especie constituye más del 90% de la biomasa de peces en las áreas costeras del Océano Austral, lo que lo hace una presa importante para depredadores como focas, aves marinas y otros peces, y sin embargo sus poblaciones parecen haber sufrido un colapso local en la PAO (Corso et al., 2022; Mintenbeck & Torres, 2017).

El krill es el principal objetivo de la pesquería en el Océano Austral, la cual actualmente se encuentra concentrada en el área 48 de la FAO (Fig. 1; Krüger et al., 2021). Esta actividad ha crecido en las últimas décadas, llegándose a capturar casi 400.000 toneladas de krill en 2019, de las cuales un 90% corresponden a la PA (Hogg et al., 2020). Este crecimiento ha ocurrido en respuesta a la elevada demanda por aceite y alimentos en base a krill (destinados como alimento para la acuicultura y animales domésticos, así como para suplementos; Trathan et al., 2022). La flota ha concentrado su actividad en áreas específicas de la PA, como el estrecho de Bransfield y el norte del estrecho de Gerlache en la PAO, al oeste de las Islas Orcadas del Sur y al noreste de las Islas Georgias del Sur



(subáreas 48.1, 48.2 y 48.3; Fig. 1), predominantemente en zonas costeras (Trathan et al., 2022; Watters et al., 2020). También se espera que esta pesquería se desplace hacia el sur en las próximas décadas como respuesta al cambio climático (Atkinson et al., 2019), acercando más buques a las zonas de alimentación de pingüinos y mamíferos marinos (Hogg et al., 2020; Trathan et al., 2022).



**Figura 1.** Subáreas y divisiones estadísticas definidas por la CCRVMA. Elaborado utilizando el software QGIS, con el paquete *Quantarctica* del Instituto Polar Noruego.

En este contexto, la Comisión para la Conservación de los Recursos Marinos Antárticos (CCRVMA o CCAMLR por sus siglas en inglés *Comission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources*) fue establecida en 1982 con el objetivo de conservar la fauna y flora marina antártica en respuesta al creciente interés en la explotación comercial de los recursos derivados del krill antártico y el historial de sobreexplotación de varios recursos marinos del Océano Austral. La CCRVMA adopta una estrategia de ordenación de

pesquerías centrada en el ecosistema que no excluye la recolección, en la medida en que ésta se realice de manera sostenible y se tomen en cuenta los efectos de la pesca sobre el resto de los componentes del ecosistema. Las regulaciones de la CCRVMA bajo las cuales se rigen las pesquerías en el Océano Austral se describen en documentos llamados medidas de conservación (CM, por sus siglas en inglés *Conservation Measures*). En la subárea 48.1 y 48.4 (Fig. 1), aplica la CM 51-01, que determina dos límites de captura, cada uno definiendo la cantidad de krill que la pesquería podría capturar en cada temporada de pesca de diciembre a noviembre. El límite más alto es llamado “límite de precaución”, y es de 5.61 millones de toneladas. Está definido bajo el supuesto de que una captura de éste número no reduciría la capacidad del krill para reemplazarse a sí mismo. Por otro lado, existe un límite menor, llamado “nivel de desencadenamiento” (*trigger level*) de 0.62 millones de toneladas (Hill et al., 2016). Este último fue adoptado dada la preocupación de que la captura excesiva en cualquier parte de la región podría tener efectos negativos para el ecosistema. Por ende, la captura no puede exceder el nivel de desencadenamiento hasta que la CCRVMA acepte distribuir la captura a lo largo de unidades de manejo de pequeña escala (SSMUs) (Watters & Hinke, 2022).

Adicionalmente, en 2009 la CCRVMA estableció la CM 51-07, la cual asignaba un porcentaje de captura que no podía ser superado en cada subárea, que correspondía al 25% para la subárea 48.1, 45% para las subáreas 48.2 y 48.3, y 15% para la 48.4. Sin embargo, debido a la falta de acuerdo en la reunión de la CCRVMA de 2024, la CM 51-07 expiró (Trathan et al., 2025), y las capturas en cualquiera de las subáreas ahora pueden aumentar entre 2 y 6 veces los valores máximos permitidos desde 2009. Esto podría tener un impacto significativo en las especies dependientes y asociadas de la región, especialmente si el esfuerzo pesquero se concentra en el tiempo y el espacio, como se ha observado recientemente (Watters & Hinke, 2022; Trathan et al., 2025).

Debido a que el esfuerzo pesquero ha aumentado en zonas muy específicas situadas cerca de colonias de cría de depredadores de krill, y que varios Estados miembro de la CCRVMA han expresado el interés en aumentar las capturas permitidas de este recurso (Watters & Hinke, 2022), se ha identificado la necesidad de avanzar hacia un marco de gestión adecuado. En particular, un marco que garantice una protección preventiva a las escalas utilizadas por los depredadores de krill y ahora por la pesquería (<50 a 100 km; Trathan et al., 2022; Watters et al., 2020). Esto se debe a que los límites de capturas establecidos para grandes zonas geográficas pueden aumentar los riesgos de impactos ecológicos a escalas más pequeñas, al afectar al propio stock de krill (especialmente en las zonas de desove) o a sus consumidores. Trathan et al. (2022) sugieren que, en años de baja biomasa de krill, la pesquería tiene el potencial de competir con las poblaciones de sus depredadores, como lo son los pingüinos pigoscélidos (*Pygoscelis adeliae*, *P. antarcticus*, *P.*

*papua*) y las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*). Esta escasez de presas durante la etapa reproductiva de los pingüinos puede resultar en una provisión irregular para estas especies, lo que lleva a una menor supervivencia de las crías (Trathan et al., 2022).

Por otro lado, desde 2002 la CCRVMA ha estado impulsando la creación de una red de Áreas Marinas Protegidas en el Océano Austral (Sylvester & Brooks, 2020). Actualmente existen propuestas para incluir tres áreas más. A su vez, diversos trabajos han señalado que, para minimizar los efectos negativos sobre los depredadores dependientes del krill, existe la necesidad de crear un marco de explotación del krill que garantice una protección precautoria a una escala más pequeña, como las denominadas “Small Scale Management Units” (SSMUs; Santa Cruz et al., 2018; Trathan et al., 2022; Watters & Hinke, 2022).

Debido a su lejanía, tamaño y condiciones extremas, la identificación de áreas ecológicamente relevantes en el Océano Austral depende de la extrapolación de información procedente de conjuntos de datos espacialmente dispersos (Hindell et al., 2020). En particular, los pingüinos han sido identificados como valiosos indicadores para la identificación de áreas de relevancia ecológica en el Océano Austral (Handley et al., 2021; Hays et al., 2019), a la vez que son considerados especies centinelas de los ecosistemas, ya que se alimentan en el mar, por lo que su supervivencia y éxito reproductivo dependen de la disponibilidad de alimento en él, y los hace sensibles a efectos *bottom-up* (Bestley et al., 2020; Sydeman et al., 2021). A su vez, el estudio de la ecología trófica de estas aves permite expandir el conocimiento de su rol ecosistémico, y provee información útil para la elaboración de planes de manejo y conservación (Tabassum et al., 2022). Diversas técnicas son utilizadas para éste tipo de estudios, como el análisis de contenido estomacal, la composición de ácidos grasos, el análisis de isótopos estables, y el análisis del ADN de fecas (Tabassum et al., 2022). Éste último ha sido útil para revelar un rango de presas que no habían sido previamente identificadas utilizando otros métodos (Zeng et al., 2022).

En la región de la PA, los pingüinos del género *Pygoscelis* han mostrado cambios significativos en sus tendencias poblacionales, como consecuencia de los procesos antes mencionados: rápido calentamiento, variabilidad interanual en el hielo marino, y disminución del krill antártico, así como a diferencias en su ecología, incluida su dependencia del hielo marino y plasticidad en la dieta (Miller et al., 2009). En general, las poblaciones de pingüinos Adelia (*P. adeliae*) y barbijo (*P. antarcticus*) han disminuido en esta región (Barbosa et al., 2012; Trivelpiece et al., 2011), mientras que las poblaciones del pingüino papúa (*P. papua*) son estables e incluso están aumentando (Herman et al., 2020).

Desde el año 2019, Uruguay monitorea las colonias de pingüinos Papúa y Adelia en Isla Ardley (Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur), que constituye una de las colonias más grandes de pingüinos papúa, y se trata de uno de los pocos sitios en que las tres especies del género *Pygoscelis* se reproducen en simpatria (Management Plan for Antarctic Specially Protected Area No. 150, 2009). A su vez, desde 2022, la Isla fue incorporada como sitio CEMP (CCAMLR Ecosystem Monitoring Program, o Programa de Monitoreo Ecosistémico de la CCRVMA; Soutullo et al., 2023). Este programa implica el monitoreo de depredadores, como de presas y del ambiente, con el fin de detectar cambios en el ecosistema e interpretar si los mismos están asociados a fenómenos naturales o a la explotación de los recursos vivos marinos (Agnew, 1997). A partir de este monitoreo se conoce que existen diferencias en los viajes de alimentación de los pingüinos durante años con alta y baja disponibilidad de krill, su presa principal. En el caso de los pingüinos Adelia, se ha observado que, bajo condiciones de baja disponibilidad de alimento, los pingüinos se vieron obligados a aumentar su esfuerzo de forrajeo, resultando en disminuciones en su masa corporal. En particular, las hembras extienden sus viajes de forrajeo, resultando en un gasto energético un 40% mayor en comparación con los años de alta disponibilidad de presas (Machado-Gaye et al., 2025a). Las menores reservas de grasa y el mayor gasto energético de las hembras durante la temporada reproductiva con baja disponibilidad de alimento pueden volverlas más vulnerables a las desafiantes condiciones de la estación invernal posterior a la época reproductiva, con posibles consecuencias negativas sobre sus tendencias poblacionales (Machado-Gaye et al., 2025a).

Por otro lado, se conoce que los pingüinos Papúa de esta colonia también realizan, durante los años de baja disponibilidad de krill, viajes de forrajeo de mayor duración, recorriendo distancias máximas y distancias totales más grandes, en comparación con los años de alta disponibilidad de presas (Soutullo et al., 2024). Las condiciones climáticas al inicio de la temporada reproductiva, específicamente las temperaturas medias de octubre y la acumulación de nieve en los sitios de anidación, se han propuesto como factores relevantes que afectan el éxito reproductivo. En la Antártida del Este, se ha reportado que el pico de fracaso de los nidos de pingüinos Adelia ocurre en los primeros días después de la eclosión, ya que los polluelos aún no regulan completamente su temperatura corporal, siendo especialmente vulnerables a condiciones ambientales desfavorables (Machado-Gaye et al., 2025b; Olmastroni et al., 2004; Smiley & Emmerson, 2016). Por el contrario, para los pingüinos papúa se ha sugerido que su mayor capacidad para alterar su cronología reproductiva, retrasando la puesta de huevos bajo condiciones locales desfavorables o incluso reponiendo huevos después de fracasos tempranos en sus nidos, les permite amortiguar los impactos en su éxito reproductivo bajo condiciones cambiantes

(Hinke et al., 2012; Juárez et al., 2015; Lynch et al., 2009, 2012). La abundancia y calidad de las presas también pueden influir fuertemente en la cronología y el éxito reproductivo (e.g. Cimino et al., 2014; Lescroël et al., 2010), principalmente para los pingüinos papúa, ya que sus polluelos requieren una mayor cantidad de alimento en comparación con los polluelos de Adelia y presentan tasas de crecimiento más bajas, alcanzando la independencia en promedio después de 72 días, mientras que los polluelos de Adelia lo hacen después de 52 días (Trivelpiece et al., 1987).

En cuanto a su dieta, mediante análisis de isótopos estables Machado-Gaye et al. (2025a) encontraron que la dieta de los pingüinos Adelia de ambos sexos de la colonia de Isla Ardley estuvo dominada por krill, tanto en condiciones de escasez como de abundancia de esta presa. Asimismo, reportaron que, en los años de menor abundancia de krill, los pingüinos mostraron valores de  $\delta^{15}\text{N}$  más elevados, lo que indicaría un aporte secundario de otras presas, como peces o calamares. Sin embargo, no se registraron cambios significativos en su posición trófica entre años, lo que evidencia que, incluso bajo condiciones de escasez, estos pingüino no modificaron su nicho trófico, en parte quizás por la ausencia de otras presas potenciales (Machado-Gaye et al., 2025a; Zaldúa et al., 2024).

Otros estudios en la región describen hallazgos similares. Algunos trabajos tempranos en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo (Jablonski, 1985; Jazdzewski et al., 1981; Volkman et al., 1980) reportan, mediante la técnica de contenido estomacal, que las tres especies de pingüinos pigoscélidos consumieron principalmente krill, aunque los pingüinos papúa ingirieron significativamente más peces, particularmente *P. antarcticum*, a la vez que reportan menores proporciones de algunos otros crustáceos, como anfípodos. Trabajos más actuales en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo utilizan una variedad de técnicas para el estudio de la dieta de estas aves, como el análisis de isótopos estables (Juárez et al., 2016; Polito et al., 2016), el contenido estomacal (Juárez et al., 2016, 2017, 2025; Panasiuk et al., 2020; Wawrzynek-Borejko et al., 2022), y en menor medida, el análisis de fecas mediante metabarcoding (Zeng et al., 2022). En todos los casos, se reporta una transición a lo largo de los últimos años hacia una dieta más fuertemente dominada por krill, con pequeñas proporciones de otras presas como peces, principalmente para el caso de *P. papua*. En contraste con estudios previos, se describen mayores proporciones de krill en la dieta de los pingüinos papúa, y cambios en el porcentaje total de krill en la dieta con respecto al observado en la década de 1980. La similitud en las dietas de las tres especies sugiere que la disponibilidad de algunas presas, como los peces, podría estar cambiando, y promoviendo una mayor superposición dietaria entre congéneres (Wawrzynek-Borejko et al., 2022).

Cada una de las distintas técnicas para el estudio de dieta presenta tanto ventajas como desventajas. Los estudios de contenido estomacal, obtenido de individuos muertos o mediante la técnica de lavado gástrico (Gales, 1987; Wilson, 1984), son algunos de los métodos clásicos para el análisis de dieta. Originalmente, se trataba de una técnica cuyo trauma asociado podía causar el abandono de los huevos o de los polluelos, pero funcionaba como alternativa para el sacrificio del animal (Wilson, 1984). Con el desarrollo y mejora de los métodos de lavado, se logró disminuir el estrés y daño físico al animal, aunque continúa siendo una técnica invasiva, que en ocasiones no permite obtener el contenido completo del estómago a menos que se le realicen múltiples lavados al individuo. Su eficacia depende del tiempo transcurrido desde la última alimentación; y requiere personal experimentado para evitar lesiones (Gales, 1987). Estos métodos proporcionan una medida de los alimentos ingeridos recientemente, pero están limitados por el grado en que los ítems alimenticios en los estómagos pueden ser identificados (Tamelander et al., 2006). Una de las principales ventajas de este método es que permite una identificación precisa de presas, incluyendo especies y tamaños (Gales, 1987; Wilson, 1984).

Por otro lado, el análisis de isótopos estables sobre tejidos como la sangre, plumas, cáscaras de huevo, y hueso, se han utilizado en estudios de aves marinas desde la década de 1980, con aplicaciones en estudios de dieta, patrones de forrajeo y comportamiento migratorio (Emslie & Patterson, 2007). Permiten la identificación de las fuentes de energía asimiladas por los consumidores, promediadas durante el tiempo de recambio de la especie o del tejido estudiado (Post, 2002). Se trata de un método poco invasivo, que permite identificar las fuentes de alimento y los niveles tróficos de los consumidores, y hacer inferencias tróficas basadas en estimaciones integradas de lo asimilado (Emslie & Patterson, 2007; Hobson et al., 1994). Por otra parte, requiere de disponer de datos isotópicos de las presas locales, para calibrar correctamente los modelos (Tamelander et al., 2006). Como los diferentes tejidos tienen diferentes tasas de recambio, permiten realizar inferencias tróficas en diferentes ventanas temporales (desde semanas en tejidos como la sangre, a meses en tejidos como las plumas) (Post, 2002).

Por último, la técnica de metabarcoding permite la identificación taxonómica a partir de muestras complejas, utilizando secuencias cortas de ADN de una región particular del genoma (o barcodes) que permiten identificar especies de forma única (Hebert et al., 2003). Para que esto sea posible, se requiere por un lado de las tecnologías de secuenciación masiva, y por otro, de la existencia de bases de datos de referencia contra las cuales contrastar las secuencias obtenidas, involucrando un fuerte componente de procesamiento bioinformático (Coissac et al., 2012; Zinger et al., 2019). La técnica de metabarcoding posee numerosas aplicaciones, tales como la reconstrucción de ecosistemas antiguos, el análisis de dieta, la detección de especies invasoras, y el monitoreo de la calidad del aire, entre

otros (Ruppert et al., 2019). Para estudios de dieta, suelen utilizarse muestras de fecas, que tienen el beneficio de ser no invasivas y de obtención sencilla. A su vez, ésta técnica es útil para revelar rangos de presas que no han sido previamente identificadas utilizando otros métodos, debido a su menor proporción en la dieta del individuo (Zeng et al., 2022).

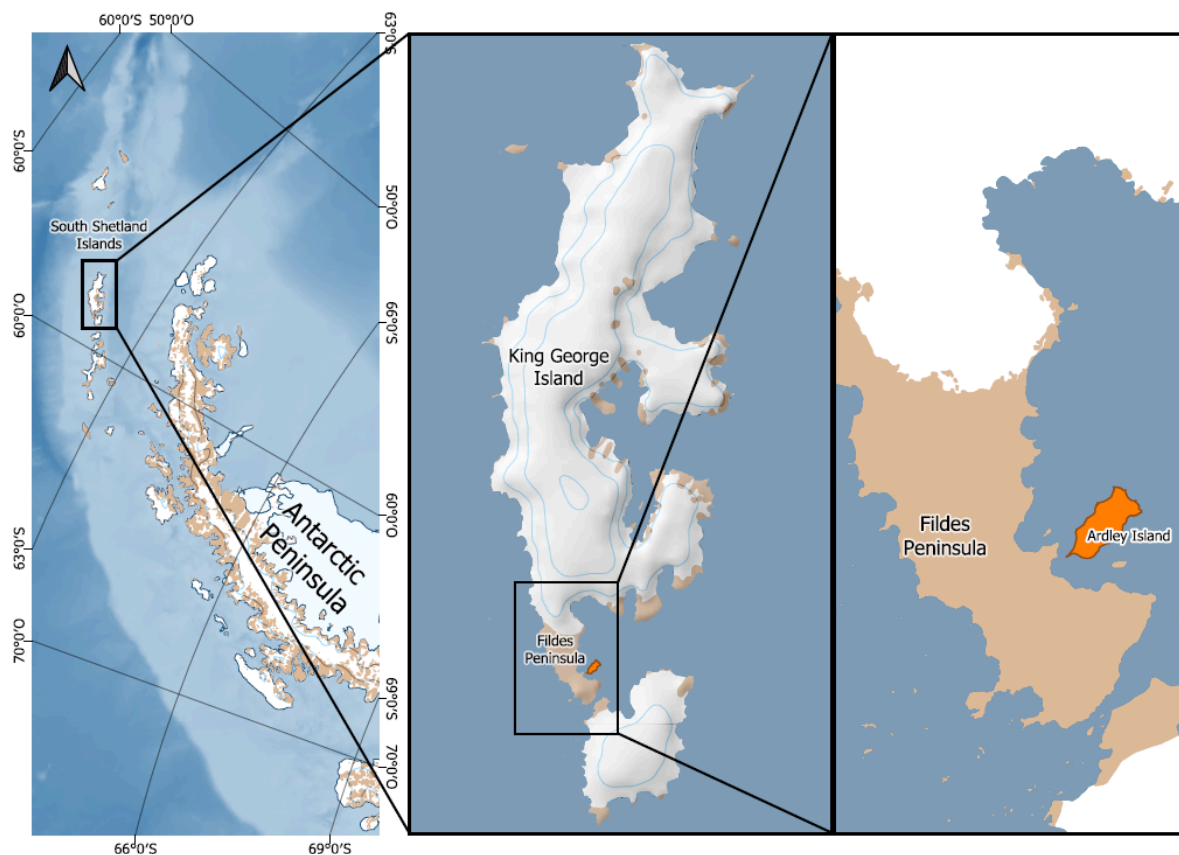
Teniendo en cuenta lo antes mencionado, el objetivo de esta tesis es analizar la dieta de dos especies de pingüinos pigoscélidos con diferentes grados de amplitud trófica y tendencias poblacionales contrastantes (*P. papua* y *P. adeliae*), mediante dos abordajes metodológicos diferentes: análisis de isótopos estables y metabarcoding de ADN. En particular, se pretende caracterizar la composición de la dieta de ambas especies en sus colonias reproductivas de la Península Fildes, utilizando la técnica de metabarcoding para analizar sus fecas. Se consideran dos años con abundancia contrastante de krill (los veranos de 2019/20 y 2021/22), como forma de evaluar la plasticidad de estas especies frente a cambios en la disponibilidad de sus presas y los posibles efectos en la dinámica de sus poblaciones. Por otra parte, se busca caracterizar en detalle la dieta de *P. papua* y su variabilidad interanual mediante la técnica de isótopos estables, a lo largo de cinco temporadas, y compararla con la de su congénere *P. adeliae*, cuya dieta en la región ya ha sido estudiada mediante esta técnica.



## Metodología

### Trabajo de campo y área de estudio

El trabajo de campo fue realizado en las colonias de pingüinos presentes en Isla Ardley ( $62^{\circ}13'00''$  S,  $58^{\circ}56'00''$  O), ubicada al este de la Península Fildes, que se conecta a Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo (archipiélago Islas Shetland del Sur) mediante un istmo que permanece sumergido durante la marea alta (Fig. 2). Se trata de una Zona Antártica Especialmente Protegida (ASPA No.150., por sus siglas en inglés *Antarctic Specially Protected Area*). Fue designada como tal dada la diversidad de especies de aves que se reproducen en ella, y se destaca por ser una de las pocas regiones de la Antártida en donde se reproducen en simpatria las tres especies de pingüinos del género *Pygoscelis* (Management Plan for Antarctic Specially Protected Area No. 150, 2009). En particular, es un área relevante para los pingüinos papúa (*P. papua*), ya que contiene una de las colonias reproductivas más grandes de esta especie (Management Plan for Antarctic Specially Protected Area No. 150, 2009).



**Figura 2.** Ubicación de la colonia de Isla Ardley (en naranja) en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur, Antártida.

Además de ser un ASPA, y un sitio CEMP, Isla Ardley también es un Área de Importancia para las Aves (IBA, por sus siglas en inglés *Important Bird Area*) que cumple con el criterio A4ii (BirdLife International, 2025). Estos son sitios donde se sabe o cree que se encuentran regularmente 1% o más de la población global de un ave marina congregatoria (aquellas que se reúnen en grandes números y en sitios particulares, durante momentos particulares de su ciclo de vida, como la alimentación, reproducción, descanso, o movimientos migratorios) u otras especies terrestres (Donald et al., 2019).

Los detalles del trabajo de campo realizado se describen en profundidad en la sección “metodología” de cada capítulo. A grandes rasgos, el trabajo de campo se realizó a lo largo de cinco campañas de verano (Noviembre a Enero) de 2019 a 2024 (2019/20, 2020/21, 2021/22, 2022/23, 2023/24), durante la época reproductiva de estas aves. Tal como se describe en el capítulo 2, para los estudios de metabarcoding se recolectaron muestras de fecas de pingüinos papúa (*P. papua*) y Adelia (*P. adeliae*). Se seleccionaron para el análisis las muestras correspondientes a los años 2019/20 y 2021/22 dado que se tratan de años con biomasa de krill (*E. superba*) contrastante, siendo el primero un año con alta disponibilidad de esta presa, y el segundo un año de baja disponibilidad de la misma (Machado-Gaye et al., 2024; Riaz et al., 2025; Salmerón et al., 2023). Por otro lado, para el estudio de isótopos estables, se capturaron un total de 95 individuos de *P. papua* en sus nidos. Se les extrajo sangre de la vena metatarsiana en el pie, la cual fue conservada en tubos eppendorff de 1.5mL con alcohol 90%, a su vez, fueron colectadas unas gotas de sangre utilizando tarjetas FTA® (Whatman International) para el posterior sexaje molecular de los individuos.

### *Sexaje molecular*

Para poder comparar entre sexos los valores de isótopos estables obtenidos, se realizó el sexaje molecular de los pingüinos papúa, método necesario dado que no presentan un dimorfismo sexual aparente. Para ello se realizó, en primer lugar, la extracción de ADN a partir de las muestras de sangre conservadas en FTA utilizando el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad de ADN extraído fue medida utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente, se siguió la metodología propuesta por Griffiths et al. (1998), que consiste en amplificar una región de dos genes CHD (Chromo Helicase DNA-binding genes, por sus siglas en inglés, o genes de la helicasa con cromodominio de unión a ADN), utilizando los primers P2 (al que se le incorporó un fluoróforo FAM) y P8 (Tabla 1). Estos genes están ubicados en los cromosomas sexuales, y presentan polimorfismos en su tamaño entre machos y hembras, por lo que en función del

tamaño de los fragmentos obtenidos se puede discernir si el ejemplar es macho o hembra. Se determinó el tamaño de los productos de PCR por electroforesis capilar, y finalmente, se designó el sexo utilizando el software GeneMarker 2.4.0 (Softgenetics LLC, State College, Pensilvania), identificando a los machos como homocigotos, con fragmentos de 370/370 pb y a las hembras como heterocigotos con fragmentos de 370/388 pb. Se obtuvieron un total de 42 machos, y 48 hembras, mientras que el sexo de 5 individuos quedó indeterminado.

**Tabla 1.** Secuencias de los primers utilizados (Griffiths et al., 1998) para el sexaje molecular de los pingüinos.

Dirección	Nombre del primer	Secuencia (5'- 3')	Referencia
<i>Forward</i>	P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	Griffiths et al. (1998)
<i>Reverse</i>	P8	CTCCCAAGGATGAGRAAYTG	

## **CAPÍTULO 2: Análisis de la dieta de *P. papua* y *P. adeliae* utilizando la técnica de metabarcoding de ADN**

### **Introducción**

La dieta se evaluó, para comenzar, mediante la metodología de metabarcoding de ADN, una herramienta molecular que permite identificar las especies presentes en una muestra compleja, y que se desarrolló en base al concepto de barcoding de ADN. El Barcoding refiere a un sistema de identificación de especies de forma única en base a una secuencia corta de ADN de una región particular del genoma (Hebert et al., 2003). Esta secuencia funciona de forma análoga a cómo un código de barras identifica de forma única a un producto en el supermercado, y se le denomina "barcode". Este concepto fue introducido por Hebert et al. (2003), y desde entonces ha ganado una gran aceptación y un amplio uso en la comunidad científica.

La región más utilizada para el barcoding es una región de 648 pares de bases del gen mitocondrial de la proteína citocromo c oxidasa 1, o "COI" (Hebert et al., 2003), una proteína transmembrana que participa de la cadena de transporte de electrones (Michel et al., 1998). El uso de esta región tiene varias ventajas, por ejemplo, que cuenta con primers robustos para su amplificación (Folmer et al., 1994), es suficientemente corta como para permitir su rápida y barata secuenciación (Hebert & Gregory, 2005), pero a la vez lo suficientemente larga como para permitir variación entre especies, dada su alta diversidad (Hebert et al., 2003). A su vez, este gen posee una gran cantidad de señales filogenéticas, con una gran incidencia de sustituciones de bases, lo que lleva a una tasa de evolución tan elevada que permite discriminar tanto entre especies muy emparentadas, como grupos dentro de una misma especie (Hebert et al., 2003). La metodología general de trabajo de barcoding involucra etapas de: (1) recolección de la muestra, con una preservación correcta y documentación fotográfica; (2) submuestreo de tejido para evitar su degradación; (3) extracción de ADN; (4) amplificación por PCR; y (5) secuenciación y análisis de datos (Weigt et al., 2012).

Cuando hablamos de metabarcoding, hacemos referencia a la técnica que, en base a los mismos principios, permite la identificación taxonómica a partir de muestras complejas, tales como muestras ambientales, de fecas, etc., y que suelen contener ADN degradado (Coissac et al., 2012). Su metodología de trabajo involucra etapas similares a las del barcoding, incluyendo la colecta y preservación de la muestra compleja, la extracción de ADN, la amplificación por PCR, y la secuenciación masiva utilizando tecnologías de nueva generación. El poder para la determinación de los taxa presentes en una muestra, depende fuertemente de la existencia de bases de datos de referencia completas contra las cuales

contrastar las secuencias obtenidas. La técnica posee numerosas aplicaciones, tales como la reconstrucción de ecosistemas antiguos, el análisis de dieta, la detección de especies invasoras, el monitoreo de la calidad del aire, entre otros (Ruppert et al., 2019). Para realizar análisis como la estimación de la riqueza de especies a partir de las secuencias obtenidas, generalmente las mismas son agrupadas en OTUs (Unidad Taxonómica Operacional, por sus siglas en inglés "Operational Taxonomic Unit"). Se trata de una forma de agrupar secuencias de ADN en unidades que pueden utilizarse como proxies de especies u otro nivel taxonómico cuando no se dispone de una identificación taxonómica formal, y se agrupan en una OTU cuando presentan una similitud mayor a cierto umbral determinado por el marcador genético y el nivel taxonómico representado (ej. similitud de secuencias COI interespecies mayor o igual a 0.97%; Schloss & Handelsman, 2005).

Diversos estudios se han realizado en la Antártida utilizando esta aproximación para el estudio de la dieta de depredadores como los pingüinos. El primer análisis de dieta basado en ADN para pingüinos Adelia se realizó en 2002 y se centró en identificar las especies de krill que consumían (Jarman et al., 2002). Desde entonces han habido numerosos avances técnicos que han mejorado los tipos de preguntas que pueden responderse, incrementado el número de muestras que pueden procesarse y reducido los costos de análisis (Jarman et al., 2002). Posteriormente, estudios como el de Jarman et al. (2013) y McInnes et al. (2016) realizaron análisis de la dieta de pingüinos Adelia a partir de fecas en la región de la Antártida del Este. En ellas encontraron una mayor diversidad de presas de las que anteriormente se habían descrito mediante análisis morfológicos; detectando krill, peces, copépodos, anfípodos, gasterópodos, así como otros grupos que no se consideraban comunes en la dieta, como cnidarios y ctenóforos. Tabassum et al. (2022) realizaron un estudio similar en el Mar de Ross (Antártida del Oeste), enfocado no sólo en describir la dieta de *P. adeliae*, sino centrándose en dar un análisis detallado de su consumo de peces, con primers específicamente diseñados para ello. De esta manera, hallaron que dos especies de krill (*E. superba* y *E. crystallorophias*) y peces nototénidos (familia Nototheniidae) fueron los más abundantes en la dieta. Entre estos últimos, *P. antarctica* y *Pagothenia borchgrevinki* fueron las dos especies más abundantes.

Para el caso de *P. papua*, el ADN en sus fecas fue analizado para colonias en la Isla Georgia del Sur, hallándose en su dieta crustáceos (krill y anfípodos), peces (de las familias Bathydraconidae y Nototheniidae), y cefalópodos (Xavier et al., 2018). Finalmente, Zeng et al. (2022) analizaron la dieta tanto de los pingüinos Adelia como papúa en su colonia reproductiva de Isla Ardley (Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, PA), utilizando los marcadores COI y 18S. Para ambas especies, el género *Euphausia* fue el más representado. A su vez, hallaron que mientras que los pingüinos Adelia mostraron una mayor abundancia de peces,

los pingüinos papúa presentaron un mayor porcentaje de krill en su dieta. Reportan que COI fue el marcador más adecuado para el análisis. Sin embargo, el trabajo tuvo algunas limitaciones; sólo un 1.26% de las secuencias correspondieron al phylum Chordata para las muestras correspondientes a *P. adeliae*, mientras que para *P. papua* fue sólo un 0.86%. Se reportó una gran cantidad de diversidad Eukaryota, pero mayoritariamente compuesta por ítems que no son considerados como parte de la dieta de los pingüinos, como hongos (e.g. Ascomycota, Basidiomycota), algas (e.g. Bacillariophyta, Chlorophyta) y taxa de animales como Apicomplexa, Nematoda, Platyhelminthes, y Tardigrada, entre otros.

### *Objetivo*

El objetivo de este capítulo es caracterizar la composición de la dieta de *P. papua* y *P. adeliae* en su colonia reproductiva de Isla Ardley, utilizando la técnica de metabarcoding a partir de muestras de fecas. Se considerarán muestras correspondientes a dos años con disponibilidad contrastante de krill (alta disponibilidad en el verano de 2019/20 vs. baja en el de 2021/22), como forma de evaluar la plasticidad de estas especies frente a cambios en la disponibilidad de sus presas.

Para ello se establecieron cuatro objetivos específicos: (i) elaborar un listado de las presas de estas dos especies durante su época reproductiva, y evaluar si se encuentran presas que no aparecen con el uso de otras herramientas tradicionales de estudio de dieta; (ii) para enriquecer la metodología descrita por Zeng et al. (2022), se busca utilizar diferentes aproximaciones para el análisis de las muestras, como su análisis individualmente o en pooles, incluyendo nuevamente el uso de diferentes marcadores moleculares, e incorporando en algunos casos bloqueadores de ADN, con el fin de abarcar una mayor cantidad de grupos taxonómicos y mejorar la detección de presas; (iii) evaluar y comparar el desempeño para la identificación de OTUs de los marcadores seleccionados; y (iv) identificar las fortalezas y limitaciones de este abordaje para los estudios de dieta, así como proponer recomendaciones orientadas a optimizar el diseño experimental y la calidad de los resultados.

## Metodología

### *Colecta de muestras y extracción de ADN*

El trabajo de campo fue realizado en la colonia de pingüinos de Isla Ardley (62°13'00" S, 58°56'00"O), Islas Shetland del Sur (Fig. 2). Tal como se describió en el capítulo 1, se recolectaron muestras de fecas de pingüinos papúa (*P. papua*) y Adelia (*P. adeliae*), correspondientes a los veranos de 2019/20 y 2021/22 dado que se tratan de años con biomasa de krill (*E. superba*) contrastante, siendo el primero un año con alta disponibilidad de esta presa, y el segundo un año de baja disponibilidad de la misma (Riaz et al., 2025; Salmerón et al., 2023). Las muestras consistieron en fecas frescas colectadas en los nidos, por lo que contienen una mezcla de fecas tanto de los individuos parentales como de los pichones. Se colectaron durante los meses de diciembre y enero, que corresponde a la etapa de guarda de estas aves. Fueron colectadas en tubos Falcon de 50mL, y conservadas en freezer a -70°C grados. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit de QIAGEN®, siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad de ADN extraída fue medida utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### *Preparación de muestras y amplificación*

Se seleccionaron dos marcadores, COI y 18S, con el fin de obtener un espectro amplio de presas correspondientes a grupos zoológicos diferentes, como macroinvertebrados y peces. El primer marcador seleccionado fue el gen que codifica para la citocromo c oxidasa I (COI o COX1). COI es el marcador estándar para barcoding en animales, y particularmente bueno en invertebrados y macroinvertebrados (Elbrecht et al., 2016; Hebert et al., 2003). Los primers utilizados fueron BF2 (Elbrecht & Leese, 2017; Tabla 2) y mICOLintR (Leray et al., 2013; Tabla 2), para amplificar una región de 83 pb.

El segundo marcador que se eligió fue el gen ribosomal 18S, y se utilizó el par de primers 18S\_allshorts (Tabla 2), diseñado como par de primers universales para eucariotas, que amplifica un fragmento de 110 pb en la región V7 de este gen (Guardiola et al., 2015).

**Tabla 2.** Secuencias de los primers utilizados para las reacciones de PCR de cada uno de los tres marcadores seleccionados

Marcador	Dirección	Nombre del primer	Secuencia (5' – 3')	Referencia
COI	Forward	BF2	GCHCCHGAYATRGCHTTYCC	Elbrecht & Leese (2017)



	<i>Reverse</i>	mICOLintR	GGRGGRTASACSGTTCASCC SGTSCC	Leray et al. (2013)
18S	<i>Forward</i>	18S_allshorts	TTTGTCTGSTTAATTSCG	Guardiola et al. (2015)
	<i>Reverse</i>	18S_allshorts	TCACAGACCTGTTATTGC	Guardiola et al. (2015)

En total, se analizaron 24 muestras de ADN fecal, como se muestra en la Tabla 3. De la temporada 2019/20, se analizaron 12 muestras de pingüinos adelia, y 13 de papua, mientras que para 2021/22, se analizaron 1 y 5, respectivamente. De ellas, 7 muestras fueron amplificadas y secuenciadas de forma individual (3 de Adelia y 4 de papúa, de la temporada 2019/20). Dos de estas 7 se amplificaron a modo de prueba inicial para evaluar el funcionamiento correcto del par de primers seleccionado para COI (una correspondiente a *P. papua* y una a *P. adeliae*). Luego, 5 más fueron amplificadas, pero esta vez se utilizó un bloqueador para ADN de pingüinos (tres correspondientes a *P. papua*, y dos a *P. adeliae*) (Tabla 3).

Las 24 muestras restantes fueron preparadas en pools, agrupadas según especie y año, obteniéndose así 4 pools: Adelia de la temporada 2019/20 (A1920, n = 9), Papúa de 2019/20 (P1920, n = 9), Adelia de 2021/22 (A2122, n = 1), y Papúa de 2021/22 (P2122, n = 5). Estas fueron las muestras seleccionadas para el análisis con el marcador 18S (Tabla 3). Para la preparación de estos pools se tomaron 5uL de ADN de todas las muestras correspondientes a cada especie por temporada.

**Tabla 3.** Muestras utilizadas para el análisis de metabarcoding en ADN fecal, para los pingüinos Adelia y papúa de Isla Ardley. Se indica el código identificador de la muestra, a qué marcador corresponde, si se utilizó o no un bloqueador de ADN de pingüinos en cada una, así como a qué especie y qué temporada corresponden. n refiere al número de muestras agrupadas bajo cada código, sea muestras individuales (n =1) o pools.

Marcador	Muestra	n	¿Bloqueador?	Especie	Temporada
COI	Adelia_1 (BC74)	1	No	Adelia	2019/20
COI	Papua_1 (BC55)	1	No	Papúa	2019/20
COI	Papua_2 (BC54)	1	Sí	Papúa	2019/20
COI	Papua_3 (BC56)	1	Sí	Papúa	2019/20
COI	Papua_4 (BC96)	1	Sí	Papúa	2019/20
COI	Adelia_2 (BC73)	1	Sí	Adelia	2019/20
COI	Adelia_3 (BC88)	1	Sí	Adelia	2019/20

18S	Adelia_2019/20	9	No	Adelia	2019/20
18S	Papua_2019/20	9	No	Papúa	2019/20
18S	Adelia_2021/22	1	No	Adelia	2021/22
18S	Papua_2021/22	5	No	Papúa	2021/22

La reacción de PCR para el marcador COI fue realizada con un volumen final de 15 µl, constituidos por 7.5 µl de 1X buffer MangoMix (Meridian Bioscience), 0.05 µl de agua, 0.15 µl de BSA (10 Mg/ml), 0.3 µl de primer reverse (10 pM), 3 µl de primer forward (1 pM), 1 µl de ADN, y 3 µl de un bloqueador (10 pM) para ADN de pingüino, diseñado para evitar la amplificación del ADN correspondiente a las dos especies de estudio. Para este caso, se utilizó un programa de ciclado que consistió de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 3 min; luego, de una etapa 45 ciclos, con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 45 s, y una de melting a 56°C por 90 s. Por último, una etapa de elongación a 72°C por 25 min.

La reacción del marcador 18S fue realizada con un volumen final de 15 µl, constituidos por 7.5 µl de 1X buffer Platinum Multiplex (Thermo Fisher Scientific), 5.8 µl de agua, 0.15 µl de BSA (10 Mg/ml), 0.3 µl de primer reverse (10 pM), 0.3 µl de primer forward (1 pM), y 1 µl de ADN. El programa de ciclado en el termociclador consistió de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, luego 40 ciclos pasando por una etapa de desnaturalización 95°C por 5 s, una etapa de melting a 55° por 15 s, y una de elongación a 72°C por 15 s. Por último, una etapa a 72°C por 5 min. Ambas reacciones fueron realizadas utilizando un termociclador T5000 de Benchmark Scientific. A continuación, las muestras se corrieron por 45 minutos a 90 volt en un gel de agarosa al 1.5%, comprobándose la amplificación con el tamaño de banda deseado.

#### *Preparación de librerías y secuenciación IonTorrent*

Las muestras fueron secuenciadas utilizando la tecnología de nueva generación Ion Torrent-PGM ® (Life Technologies), mediante el equipo disponible en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay. Para ello, tanto los primers forward como reverse se adquirieron con la adición de las secuencias adaptadoras y un Tag para identificación de cada muestra para Ion Torrent-PGM ® (Life Technologies). Se realizaron diluciones para obtener en promedio un total de 60.000 *reads* (o lecturas) por muestra.

## *Análisis de datos*

Para el procesamiento de las secuencias obtenidas, en primer lugar se eliminaron la secuencia de los adaptadores y primers utilizados. Luego, mediante el software SEED2 (Větrovský et al., 2018) se eliminaron todas las secuencias menores a 50 pb, así como la secuencia de los adaptadores y primers utilizados.. También se eliminaron las secuencias por debajo del nivel de calidad del valor medio de la corrida, que fue Q28. A continuación, se armaron clusters utilizando el algoritmo “Vsearch / ClustersOtusSize”, con una identidad mayor al 97%, es decir, con un 3% de disimilitud. Se seleccionaron los clusters con más de 10 reads, y se obtuvo para ellos la secuencia consenso. Este archivo se contrastó contra el NCBI BLAST (BLAST®), y el listado de códigos de acceso (“Accession numbers”) se corrió en la opción “Identification / Taxonomy by accession” del programa. El resto del procesamiento de los datos se realizó en Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

Los análisis de diversidad taxonómica se realizaron a nivel de familia, ya que esta fue la resolución taxonómica alcanzada de manera consistente para la totalidad de las presas, mientras que sólo en algunos casos fue posible identificar hasta nivel de género o especie. Una vez obtenido este listado, se filtraron aquellas que, si bien aparecieron en la lista, no fueron consideradas como presas de las aves, sino que aparecieron debido a su recolección accidental al tomar la muestra, tales como algas (phyla Chlorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta), hongos (phyla Mucoromycota, Ascomycota, Basidiomycota), y ácaros, que se encuentran en el suelo por debajo o alrededor de las fecas. A su vez, se revisó que fuera coherente la presencia de las familias detectadas en el área de estudio, mediante una revisión bibliográfica (e.g. Schories & Kohlberg, 2016). Aquellas familias no reportadas para el área de estudio fueron asignadas a grupos taxonómicos emparentados, que posiblemente no se encuentren representados en las bases de secuencias públicas.

## Resultados

En total, se analizaron 24 muestras de fecas de ADN fecal proveniente de la colonia reproductiva de pingüinos papúa y Adelia en Isla Ardley, durante las campañas de verano 2019/20 y 2021/22. De ellas, 24 fueron preparadas en 4 pools, agrupadas según especie y año, y 7 muestras de la temporada 2019/20 se analizaron de forma individual (Tabla 3).

**Tabla 4.** Comparación de las lecturas obtenidas para las distintas muestras de ADN fecal analizadas. Se indica el marcador utilizado en cada caso, así como el tipo de muestra (individual o pool), el uso o no de bloqueador, y la temporada a la que corresponde.

Marcador	Muestra	Tipo	¿Bloqueador?	Temporada	Raw reads
COI	Adelia_1 (BC74)	Individual	No	2019/20	43756
COI	Papua_1 (BC55)	Individual	No	2019/20	12499
COI	Papua_2 (BC54)	Individual	Sí	2019/20	101694
COI	Papua_3 (BC56)	Individual	Sí	2019/20	140681
COI	Papua_4 (BC96)	Individual	Sí	2019/20	92630
COI	Adelia_2 (BC73)	Individual	Sí	2019/20	175101
COI	Adelia_3 (BC88)	Individual	Sí	2019/20	9527
18S	Adelia_2019/20	Pool (n = 9)	No	2019/20	23087
18S	Papua_2019/20	Pool (n = 9)	No	2019/20	18306
18S	Adelia_2021/22	Pool (n = 1)	No	2021/22	33902
18S	Papua_2021/22	Pool (n = 5)	No	2021/22	43622

Las lecturas obtenidas para cada temporada se muestran en la tabla 4. En promedio, se generaron 29729.3 lecturas crudas (raw reads) de cada pool de muestras (18S), mientras que las muestras individuales tuvieron un promedio de 82269.7 lecturas (COI). En total, se detectaron 38 familias con el marcador COI, y 31 con 18S, correspondientes a 11 y 6 Phyla respectivamente. De las 38 familias detectadas para COI, 29 fueron filtradas por corresponder a algas (phyla Chlorophyta, Rhodophyta, etc.), hongos (phyla Mucoromycota, Ascomycota, Basidiomycota), protozoos (phylum Ciliophora), entre otros, que no se consideran como presas de los pingüinos, sino posibles contaminaciones provenientes del ambiente. Para el caso de 18S, se descartaron 23 familias siguiendo el

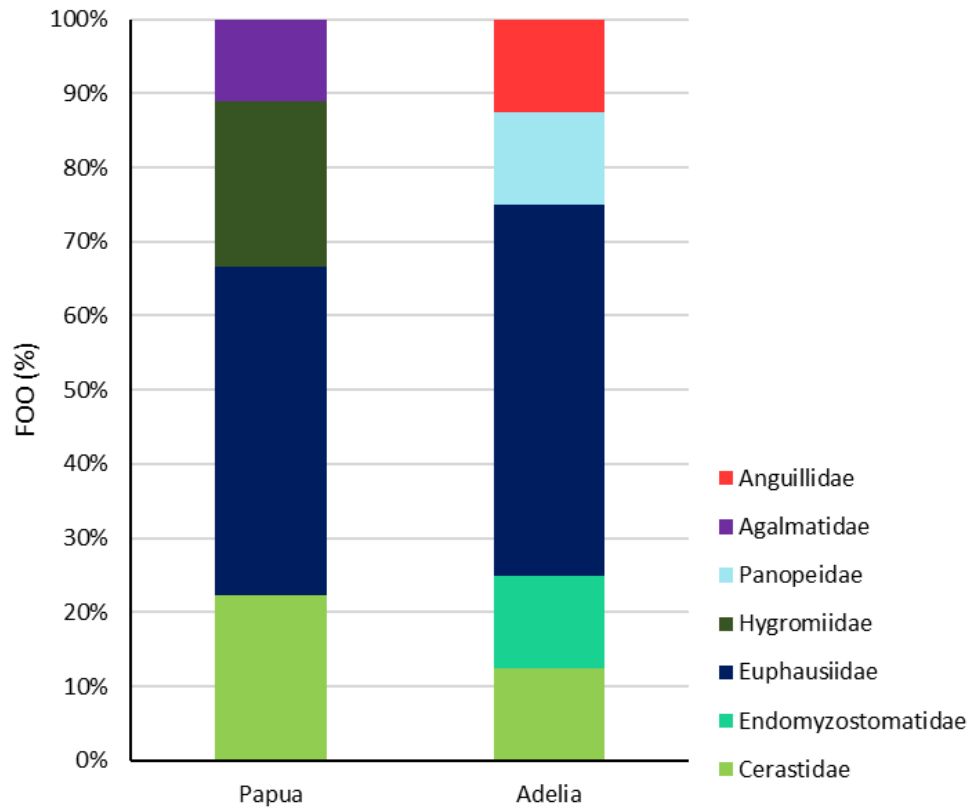
mismo criterio, y 5 porque correspondieron a la Clase Aves (correspondientes al 96% de los reads) y se consideraron una amplificación del ADN del propio pingüino.

Luego de haber realizado esta limpieza, se obtuvieron 6 familias para el marcador COI (Cerastidae, Endomyzostomatidae, Euphausiidae, Hygromiidae, Panopeidae, y Agalmatidae) y 2 para 18S (Anguillidae y Euphausiidae), que se presentan en la tabla 5. Para los casos en que la familia encontrada no se encuentra presente en Isla Ardley, o incluso en la Península Antártica, se presentan especies alternativas emparentadas, tanto reportadas como parte de la dieta de estos pingüinos en otras partes de su distribución, o al menos presentes en el área de estudio. A su vez, se reporta el porcentaje de identidad (“pident” en la tabla), que refiere al porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre la secuencia ingresada en el BLAST, y las secuencias de la base de datos; y la cobertura de la consulta o *query coverage* (“qcoverage”). Este segundo valor refiere al porcentaje de la secuencia ingresada en el BLAST que se incluye en la secuencia de la base de datos.

**Tabla 5.** Familias detectadas en la dieta de los pingüinos papúa (*P. papua*) y Adelia (*P. adeliae*), para las dos temporadas analizadas, discriminadas por marcador molecular mediante el cual fueron identificadas. Se presenta el número de acceso (“Accession”, un identificador único asignado al registro en la base de datos), el phylum y la familia obtenida al realizar el BLAST. Se reporta su porcentaje de identidad (“pident”), y la cobertura de la consulta o *query coverage* (“qcoverage”). A su vez, se indica si la misma está presente en Isla Rey Jorge/ Isla 25 de Mayo (“IRJ”). Aquellas familias no reportadas para IRJ fueron asignadas a grupos taxonómicos emparentados (“Alternativas”).

Accession	Phylum	Familia según BLAST	pident	qcoverage	¿Presente en IRJ?	Alternativas	Papúa	Adelia	Temporada	Marcador
DQ238193.1	Annelida	Endomyzostomatidae	92.5	100	Sí	-		X	2019/20	COI
LC022069.1	Arthropoda	Euphausiidae	100	100	Sí	-	X	X	2019/20, 2021/22	COI, 18S
MW446897.1	Arthropoda	Panopeidae	100	100	No	<i>Eurymera monticulosa</i> , <i>Eusirus tridentatus</i> , <i>Cheirimedon femoratus</i> , <i>Cyphocaris richardi</i> , <i>Hippomedon kergueleni</i> , <i>Cylopus lucasii</i> , <i>Hyperia macrocephala</i> , <i>Parathemisto gaudichaudii</i>		X	2019/20	COI
XR_010327889.1	Chordata	Anguillidae	97	98	No	<i>Electrona antarctica</i> , <i>Pleuragramma antarcticum</i> , <i>Notothenia coriiceps</i> , <i>Trematomus newnesi</i> , <i>Champscephalus gunnari</i>		X	2019/20	18S
GQ119945.1 / NC_080955.1	Cnidaria	Agalmatidae	92.7	100	No	<i>Diplulmaris antarctica</i>	X		2019/20	COI
MT812820.1	Mollusca	Cerastidae	100	100	No	<i>Nacella concinna</i>	X	X	2019/20	COI
HQ204481.1	Mollusca	Hygromiidae	96.9	100	No	<i>Nacella concinna</i>	X		2019/20	COI

En la figura 3 se muestra la frecuencia de ocurrencia (FOO) de las 7 familias encontradas, incluyendo ambos marcadores y ambas temporadas, discriminadas según especie de pingüino. El FOO de un ítem refleja el número de muestras que contienen un determinado alimento. (Deagle et al., 2018).



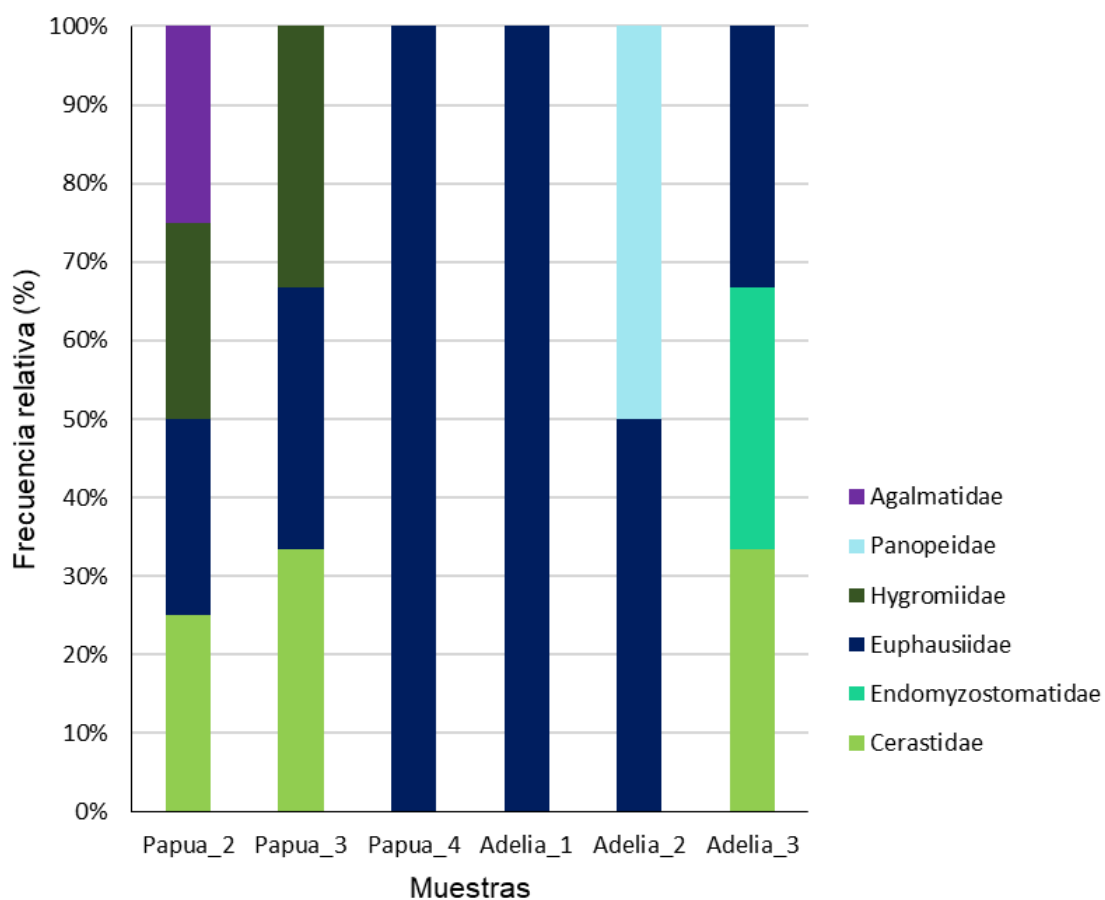
**Figura 3.** FOO de las familias de presas encontradas en la dieta de los pingüinos papúa (*P. papua*) y Adelia (*P. adeliae*). Se incluyen ambos marcadores y ambas temporadas estudiadas, discriminadas según especie de pingüino.

Nuestros resultados evidencian que ambas especies se alimentaron de krill y gasterópodos, a la vez que los pingüinos Adelia también se alimentaron de otros crustáceos, peces, y poliquetos (Tabla 5). De todas las familias encontradas, se detectaron 3 exclusivamente para los pingüinos Adelia (Endomyzostomatidae, Panopeidae, y Anguillidae), dos exclusivas en papúa (Agalmatidae e Hygromiidae), y dos compartidas entre ambas especies (Euphausiidae y Cerastidae).

Las familias de presas detectadas con el marcador COI se muestran en la figura 4, expresadas como la proporción de familias presentes por muestra. Se muestran gráficamente sólo las OTUs que corresponden a presas, descartándose grupos como ácaros e insectos. La muestra Papua\_1 no se encuentra representada debido a que las



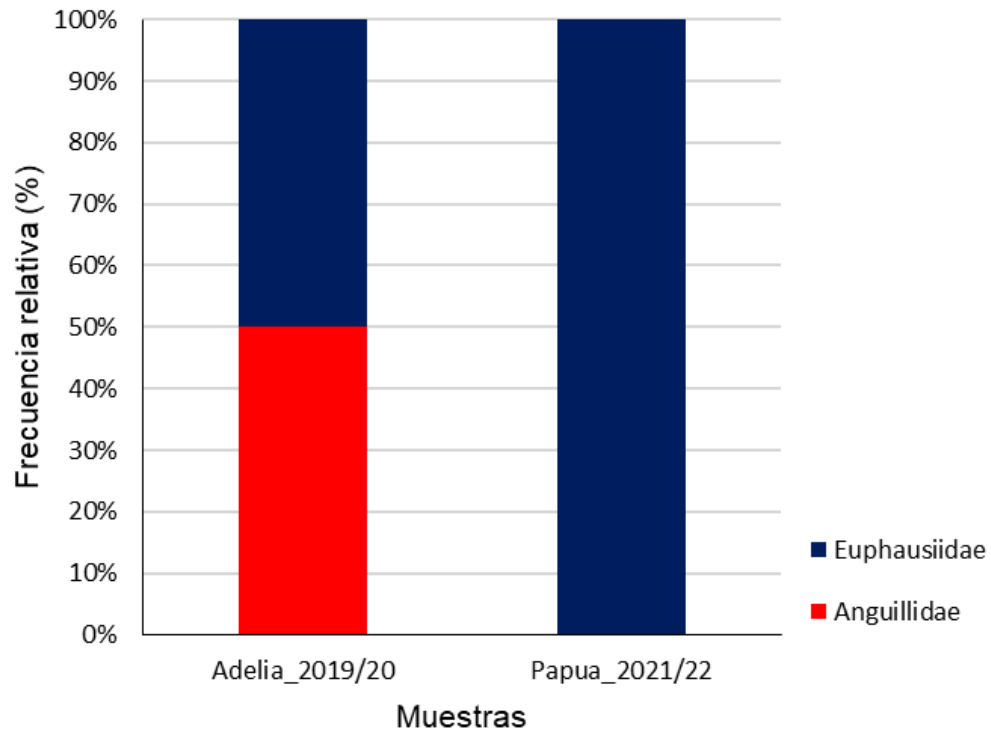
lecturas fueron asignadas principalmente a la familia Trebouxiophyceae, correspondientes a la presencia del alga verde *Prasiola crista*, y ninguna presa. Para este marcador, se observa en todas las muestras que la mayoría de las lecturas asociadas a presas corresponden al krill *Euphausia superba* (familia Euphausiidae, 52.5%). Además de krill, el otro grupo con mayor número de reads fue la familia de moluscos Cerastidae, con un 45.9%. El resto de las OTUs detectadas por el BLAST se repartieron en el 1.5% de lecturas, incluyendo a las familias de poliquetos Endomyzostomatidae (0.07%), de moluscos Hygromiidae (0.59%), de decápodos Panopeidae (0.84%), y de cnidarios Agalmatidae (0.06%), de los cuales solo Endomyzostomatidae e Hypsibiidae están presentes en la PA.



**Figura 4.** Familias de presas detectadas mediante el marcador COI, para muestras de pingüinos Adelia (*P. adeliae*) y papúa (*P. papua*) de la temporada 2019/20. Las familias se expresan en cuanto a su frecuencia relativa dentro de cada muestra.

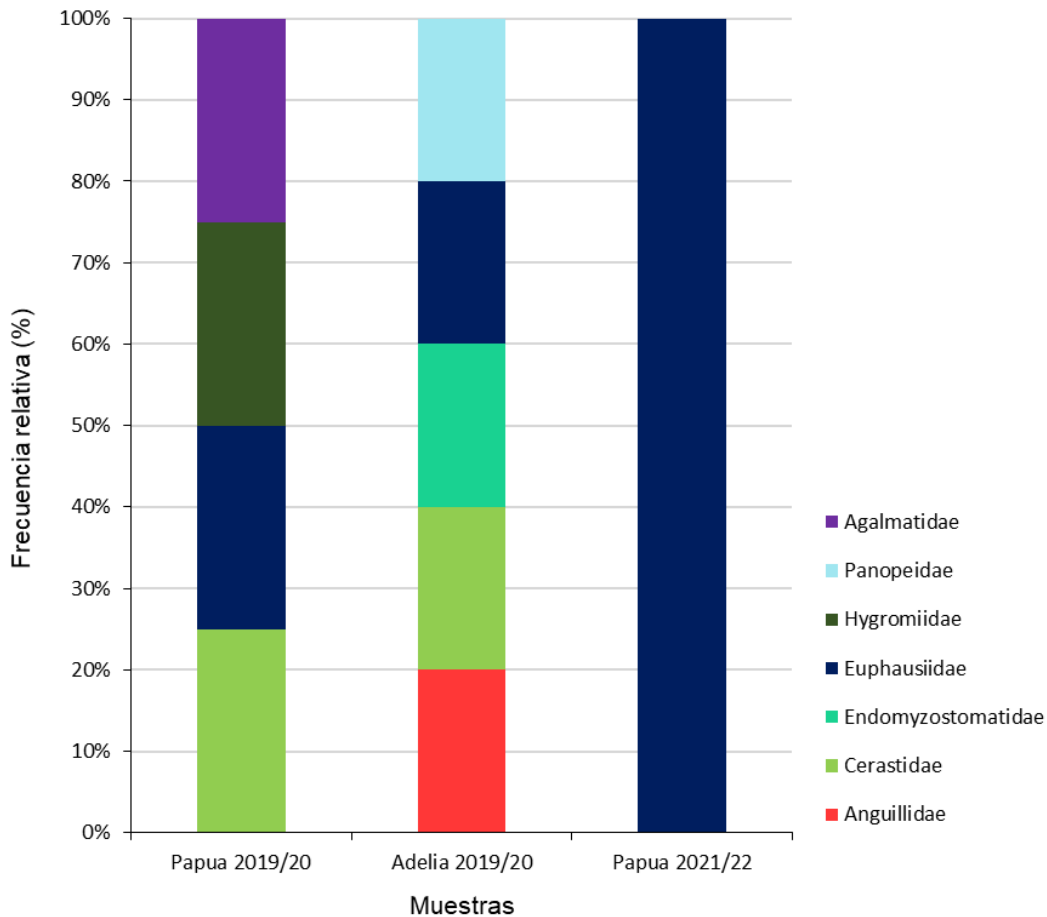
Las presas detectadas mediante el marcador 18S se muestran en la figura 5. Las muestras Papua\_2019/20, y Adelia\_2021/22 no se muestran representadas, ya que todas sus lecturas correspondieron a ADN de pingüino o a contaminación ambiental, sin encontrarse lecturas correspondientes a presas. Para el resto de las muestras, nuevamente la mayoría de las lecturas de presas correspondieron a la familia Euphausiidae (99.07%), seguida de la familia de peces Anguillidae (0.93%). Cabe destacar que estas proporciones

fueron obtenidas una vez se eliminaron las secuencias correspondientes a ADN de pingüino, que constituyeron un 96% de las secuencias originales, debido a la ausencia de un bloqueador.



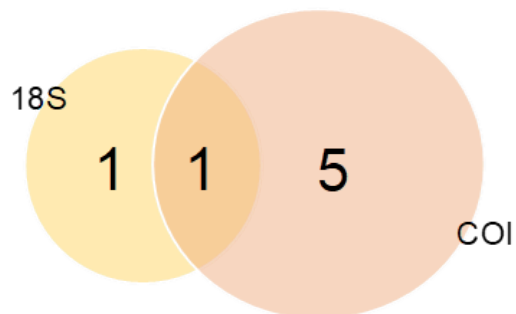
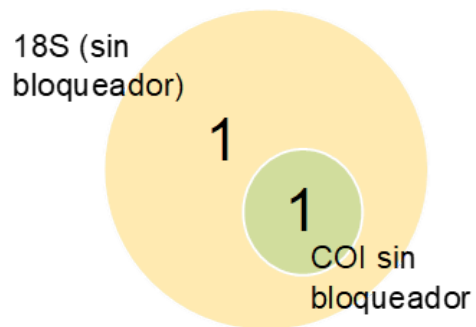
**Figura 5.** Familias de presas detectadas mediante el marcador 18S, para muestras de pingüinos Adelia (*P. adeliae*) de la temporada 2019/20, y papúa (*P. papua*) de la temporada 2021/22. Las familias se expresan en cuanto a su frecuencia relativa dentro de cada muestra.

Las diferencias en la dieta de los pingüinos entre ambas temporadas se muestran en la figura 6. Se observa que se obtuvieron más familias para las muestras de la temporada 2019/20, que para 2021/22, donde la única presa detectada fue el krill. Esto puede deberse a que los números muestrales fueron menores para la segunda. En la figura no se incluye la muestra de Adelia 2021/22, dado que en ella sólo se obtuvo ADN de *Pygoscelis*.



**Figura 6.** Comparación de las presas encontradas en las fecas de pingüinos Adelia (*P. adeliae*) y papúa (*P. papua*), correspondientes a las temporadas 2019/20 y 2021/22, incluyendo ambos marcadores (COI y 18S). Las familias se expresan en cuanto a su frecuencia relativa dentro de cada muestra.

En línea con el objetivo de comparar la efectividad de los dos marcadores utilizados, las OTUs de presas compartidas y únicas entre los marcadores se muestran en la figura 7, así como entre el uso o no de bloqueador de ADN pingüino. Para los experimentos de COI sin bloqueador, sólo la familia Euphausiidae fue detectada. De las 7 familias de presas detectadas en total, 6 fueron identificadas únicamente mediante COI, mientras que 1 familia fue detectada sólo mediante 18S (Anguillidae).



**Figura 7.** Diagramas de Venn mostrando las familias compartidas y únicas entre cada marcador (COI y 18S), así como para el uso de COI con y sin un bloqueador de ADN de pingüino.

## Discusión

Mediante el análisis de 24 fecas de pingüinos Adelia y papúa provenientes de sus colonias reproductivas en Isla Ardley, para las temporadas de verano 2019/20 y 2021/22, se identificaron 7 familias que constituyen parte de dieta de estas aves. Según estos resultados, la presa más representada fue el krill *E. superba*, en las dos temporadas analizadas. Este resultado es consistente con trabajos previos que muestran que, en las Islas Shetland del Sur, los pingüinos del género *Pygoscelis* se alimentan principalmente de *E. superba* (Juárez et al., 2016, 2017, 2025; Panasiuk et al., 2020; Polito et al., 2016; Wawrzynek-Borejko et al., 2022; Zeng et al., 2022). Aunque, a diferencia de estos trabajos, no se encontraron secuencias correspondientes a peces, a excepción de la detección de una familia en 2019/20 en una muestra correspondiente a *P. adeliae*. Si bien no se logró llegar a su identificación taxonómica, diversas especies de peces están reportadas en la dieta de estos pingüinos, como *Electrona antarctica*, *P. antarcticum*, *Notothenia coriiceps*, *Trematomus newnesi*, *Champscephalus gunnari*, entre otros (Juárez et al., 2016, 2017, 2025; Panasiuk et al., 2020; Polito et al., 2016; Tabassum et al., 2022; Wawrzynek-Borejko et al., 2022). Además del krill, otras presas fueron detectadas, como gasterópodos, poliquetos, y cnidarios. En síntesis, ambas especies se alimentaron de krill y de gasterópodos, mientras que en Adelia adicionalmente se detectaron otros crustáceos, peces, y poliquetos, y en papúa, también de un cnidario. Esto no significa directamente que los individuos de *P. papua* no se alimentaron de otra variedad de presas, sino que no se logró detectarlas por limitaciones en la colecta y preservación de muestras, los sesgos de los marcadores seleccionados, o limitantes asociadas a la secuenciación masiva de las muestras, que suele incluir algunos componentes estocásticos.

En cuanto al desempeño de los marcadores seleccionados, para el caso de COI, se observa en todas las muestras que la mayoría de los reads corresponden al krill *Euphausia superba*. Además del krill, se detectó otro crustáceo, *Rhithropanopeus harrisi*, de la familia Panopeidae (pident y qcoverage de 100%). Se trata de un cangrejo originario de la costa atlántica de América del Norte, que ha invadido exitosamente tanto otros océanos como mares y embalses de agua dulce, abarcando más de 45 grados de latitud, muy probablemente gracias a medios antropogénicos. Este decápodo, si bien típico de aguas salobres, tiene un amplio rango de tolerancia a varios factores ambientales que probablemente han facilitado su éxito como invasor (Fowler et al., 2013). Ha sido reportado en mares con baja temperatura superficial, y bajas temperaturas del aire en invierno, como el Mar Báltico y el Mar del Norte, y algunas de sus poblaciones pueden sobrevivir en temperaturas debajo de 1° C e incluso resistir quedar congeladas en el hielo durante un

corto período de tiempo (Fowler et al., 2013). Por ende, aunque no existen registros de esta especie en regiones antárticas o sub-antárticas, su presencia en la región no puede ser completamente descartada, y constituye un llamado a estar alerta ante la posible presencia de este invasor. Alternativamente, las secuencias identificadas como correspondientes a *R. harrissii* podrían pertenecer a otros crustáceos que han sido descritos como componentes de la dieta de los pingüinos pigoscélidos de Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, aunque se trata de trabajos antiguos, y de especies que no están tan reportadas en estudios más recientes en estas colonias. Entre ellos, se encuentran los anfípodos *Eurymera monticulosa*, *Eusirus tridentatus*, *Cheirimedon femoratus*, *Cyphocaris richardi*, *Hippomedon kergueleni*, *Cylopus lucasii*, *Hyperia macrocephala*, y *Parathemisto gaudichaudii* (Jażdżewski et al., 1981; Volkman et al., 1980).

Por otra parte, se observa la presencia de gasterópodos, que han sido reportados en algunos estudios realizados en contenidos estomacales, donde se encuentran fragmentos de las conchillas de los mismos (Juárez *com. pers.*). Hipotetizamos que posiblemente correspondan a la lapa *Nacella concinna*, un gasterópodo muy abundante en la región (Schories & Kohlberg, 2016). El consumo de moluscos gasterópodos ha sido reportado en otras especies, como el pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*), como potencial fuente de calcio para aportar a la rigidez de la cáscara de sus huevos (Boersma et al., 2004).

Los poliquetos detectados corresponden a la familia Endomyzostomatidae, que contiene a la especie *Endomyzostoma scotia*, la cual ha sido reportada en la Antártida (Summers et al., 2014). Otras especies de poliquetos descritas para la región, y particularmente presentes en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo son *Flabelligera mundata*, *Perkinsiana* sp., y las familias Spirorbidae, Terebellidae, Nereididae, y Polynoidae. Los poliquetos de la familia Nereididae han sido encontrados en la dieta de otras aves marinas de la Antártida, como los cormoranes *Phalacrocorax atriceps bransfieldensis* (Favero et al., 1998), pero no en pingüinos pigoscélidos.

Un hallazgo relevante es la detección, en una muestra correspondiente a *P. papua*, de la familia Agalmatidae, que se trata de un cnidario de la Clase Hydrozoa. Si bien no ha sido reportado para la PAO, en otras áreas de su distribución, los análisis de dieta mediante ADN revelaron que los pingüinos Adelia se alimentan regularmente de cnidarios, aun cuando otros tipos de presas también están disponibles (Jarman et al., 2013; McInnes et al., 2016), lo que sugiere que algunos cnidarios, como las medusas, son más que una fuente de alimento incidental (Thiebot et al., 2017). Dado que las medusas son ubicuas en la Antártida pero difíciles de detectar en los estudios tradicionales de dieta, por su alta digestibilidad, es posible que también sean consumidas por los pingüinos en la PAO, aunque permanezcan

sin ser detectadas. La especie *Diplulmaris antarctica* perteneciente a dicha Familia fue reportada en la dieta de Adelia por Thiebot et al. (2016, 2017) en la región de la Antártida del Este, mediante el uso de cámaras adheridas a los pingüinos. Las grabaciones muestran a los pingüinos dirigiéndose a las gónadas o brazos orales de organismos gelatinosos, lo que sugiere que estos tejidos pueden ofrecer beneficios específicos, ya sea un mayor contenido energético o componentes nutricionales únicos, tales como colágeno y aminoácidos (Thiebot et al. 2016, 2017).

Para el caso del marcador 18S, nuevamente se observa una dominancia de la familia Euphausiidae, asociada al krill *E. superba*, representando un 99% de las lecturas.

Por último, es relevante mencionar que únicamente para las muestras correspondientes a Adelia de la temporada 2019/20, se identificaron secuencias correspondientes a peces. Si bien seguramente no se trate de la familia Anguillidae, que no está reportada para el área de estudio, es posible que corresponda a alguna especie de pez antártico que no se encuentra disponible en la base de datos de referencia. Sin embargo, es un resultado relevante que mediante este marcador puedan amplificarse secuencias correspondientes a peces, como no fue el caso para COI.

Los resultados del análisis de metabarcoding realizado en las fecas de pingüino revelaron algunas diferencias en la efectividad de los marcadores 18S y COI utilizados para la detección de la diversidad taxonómica. Las lecturas sin procesar obtenidas fueron considerablemente mayores para el marcador COI, con un promedio de 82269.7 lecturas, en comparación con 29729.3 lecturas para el marcador 18S. Este resultado es acorde a la bibliografía, donde se reporta que el uso de primers que amplifican fragmentos cortos de COI (regiones de aproximadamente 150 pb) son ventajosos cuando se trabaja con muestras de ADN degradado, ya que con frecuencia aún pueden amplificar los fragmentos cortos de ADN que permanecen en la muestra (Vamos et al., 2017). A su vez, en cuanto a la contaminación con algas y hongos, los Phyla encontrados, como Ascomycota, Basidiomycota, entre otros, están presentes en los suelos antárticos (Cox et al., 2016; Zeng et al., 2022), por lo que su amplificación resulta natural y difícil de prevenir.

Mediante este análisis no se logró alcanzar el objetivo de comparar la dieta de ambas especies entre los dos años de interés, debido a que algunas muestras no se lograron amplificar para uno o ambos marcadores, o la totalidad de sus lecturas fue ocupada por secuencias no objetivo, como ADN del propio pingüino o contaminaciones a la feca. Sin embargo, se logró elaborar un listado de familias presentes en la dieta de los



pingüinos, incluyendo algunas presas poco descritas en la dieta, que sirvió para enriquecer el análisis de isótopos estables que se describe en el siguiente capítulo.

### *Contaminación ambiental*

Una gran proporción de las lecturas obtenidas correspondieron a familias que fueron asignadas como contaminación ambiental, por tratarse de especies propiamente contaminantes de la muestra, como hongos, o de especies no objetivo que fueron recolectadas junto a la muestra, como algas, ácaros, entre otros. Si bien no eran el objetivo de esta tesis, es relevante mencionar la capacidad de estos marcadores moleculares para la amplificación de estos grupos.

Por un lado, se detectaron hongos de los phyla Ascomycota, Basidiomycota, y Mucoromycota, y algas de los phyla Bacillariophyta (diatomeas), Rhodophyta (algas rojas), y Chlorophyta (algas verdes). Dentro de estas últimas, se destaca *P. crispera*, una especie polar de algas verdes, que suele encontrarse en hábitats sometidos a enriquecimiento en nitrógeno orgánico, como lo son los sitios de anidación de aves marinas (Zeng et al., 2022).

A su vez, se detectaron tres familias de tardigrados: Hypsibiidae, Ramazzottiidae, y Macrobiotidae, particularmente de los géneros *Acutuncus*, *Ramajendas*, y *Macrobiotus*, respectivamente, estando todos ellos reportados para la PA.

Algunos artrópodos detectados fueron los ácaros de las familias Crotoniidae y Ereynetidae. Algunos ácaros de la familia Crotoniidae, como el género *Crotonia* han sido reportados en regiones subantárticas. Mientras que los pertenecientes a la familia Ereynetidae no han sido reportado en la región, existen diversos trabajos que describen la presencia de ácaros en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, tales como *Alaskozetes antarcticus*, *Halozetes belgicae*, y *Hydrogamasellus racovitzai* (Gwiazdowicz et al., 2022; Zaini et al., 2024). En todos los casos, se trata de especies no-parásitas. En cuanto al ácaro *A. antarcticus*, sus hábitats típicos incluyen la parte inferior de rocas sueltas, grietas en las rocas, y al igual que *H. racovitzai*, la cercanía de nidos de aves (incluyendo pingüinos del género *Pygoscelis*, los petreles *Macronectes giganteus* y las skúas del género *Stercorarius*) que aportan plumas, guano y otros materiales orgánicos a las áreas circundantes, brindando condiciones propicias para su supervivencia (Gwiazdowicz et al., 2022; Strong, 1967). *H. belgicae* suele estar asociado a superficies cubiertas por líquenes, musgos, o algas del género *Prasiola* (Strong, 1967).

Otros artrópodos, de la clase Insecta, fueron detectados, aunque correspondientes a géneros de la clase Insecta no reportados en la Antártida. Alternativamente, podría ser una identificación errónea de algunos grupos de insectos sí presentes en la isla, como los dípteros *Parochlus steinenii*, y *Belgica antarctica* (Kovalenko et al., 2021; Shimada et al.,

1991), o de colémbolos como *Cryptopygus antarcticus*, *Tullbergia mixta*, y *Frisea* sp. (Greenslade, 2010; Gwiazdowicz et al., 2022).

A su vez, se detectaron platelmintos, de la familia Prosthiostomidae. La misma no está reportada para la Antártida, aunque sí lo están otros miembros de su mismo Orden, Polycladida (Schories & Kohlberg, 2016). Los nematodos detectados son pertenecientes a la familia Oncholaimidae, y corresponden al género *Viscosia*, que se trata de nematodos de vida libre reportados en la Antártida e islas sub-antárticas, aunque no existen registros concretos en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo (Ingels et al., 2014). Otros géneros de esta familia descritos en esa región son *Adoncholaimus*, *Metaparoncholaimus*, *Oncholaimellus*, *Pelagonema*, y *Pontonema*.

### *Limitaciones y perspectivas*

Es indudable que el metabarcoding es una técnica valiosa y poderosa para una gran diversidad de estudios, y que nos permitió identificar ítems de la dieta de pingüinos de forma acorde a estudios previos en las especies y la región. Entre sus fortalezas, se destaca la capacidad de caracterizar la dieta de los animales a partir de muestras no invasivas, la capacidad de detectar presas que rara vez pueden detectarse, como presas blandas o altamente digeribles, que normalmente no dejan restos duros detectables mediante otros métodos, como los lavados estomacales. A su vez, permite identificar ítems de dieta poco frecuentes o consumidos en bajas proporciones, que serían subestimados con otras metodologías, por lo que aporta información que se complementa con otros enfoques, como los análisis de isótopos estables, los de contenido estomacal, y las observaciones directas. En muchos casos, permite identificar presas a nivel de género o especie, y con mayor precisión que los análisis morfológicos. En ocasiones, principalmente debido a limitaciones en las bases de datos de referencia, sólo se logra alcanzar niveles taxonómicos más altos, como familia, aunque igualmente informativos para caracterizar la dieta de los animales.

Sin embargo, es relevante mencionar algunos de los desafíos y limitaciones de la técnica que hemos identificado, a tener en cuenta para perfeccionar el diseño experimental en futuros estudios. Por un lado, es esencial la selección de un marcador y cebadores apropiados, dado que algunos amplifican mejor ciertos grupos de presas que otros, lo que puede hacer que, mientras algunos grupos taxonómicos estén sobrerrepresentados, otros no aparezcan. A su vez, se debe tener en cuenta la resolución taxonómica a la que se pretende llegar, dado que dependiendo del marcador (COI, 18S, 12S, etc.), si bien ocasiones se logra llegar a la especie, en otras solo al género o familia. Al mismo tiempo, es relevante recordar que la presencia de ADN en la feca no necesariamente significa que el

organismo esté presente en la dieta del animal. Por ejemplo, las secuencias detectadas en la feca del pingüino podrían provenir de las presas consumidas por la propia presa del pingüino. Además, los números de reads no necesariamente indican la abundancia de un ítem en la dieta, por lo que se debe ser cuidadoso al sacar conclusiones en base a ellos

La selección de la muestra a analizar tampoco es menor. Al trabajar con muestras como las fecas se debe tener en cuenta que se trata de ADN degradado, parcialmente fragmentado por la digestión, lo que limita la detección de presas, y requiere de una selección de marcadores y primers más meticulosa. Por otra parte, al tratarse de muestras que se toman directamente del ambiente, ocurre una amplificación de muchas especies no objetivo, como algas y hongos, que limitan la detección de otras especies en la muestra. Tal es el caso de este trabajo, donde un gran porcentaje de las lecturas correspondieron al alga *P. crista*, problemática también reportada por Zeng et al. (2022) en el área de estudio. Por lo tanto, se resalta la necesidad de desarrollar estrategias de muestreo que reduzcan la contaminación ambiental, como la colecta de fecas lo más frescas posibles (por ejemplo, colectando las fecas cuando se ve al ave defecar), y su preservación en buffers adecuados.

Otra herramienta relevante a considerar es el uso de bloqueadores de ADN. Los bloqueadores son secuencias cortas diseñadas para unirse específicamente al ADN de una especie no deseada, por ejemplo del depredador en los estudios de dieta. Estos hibridan en el mismo sitio que el primer, pero presentan una modificación química en su extremo 3' (por ejemplo, una fosforilación), que evita la extensión por la polimerasa (Vestheim & Jarman, 2008). En esta tesis se utilizó un bloqueador para las reacciones para el marcador COI, pero no se llegó a desarrollar uno para 18S. Para este segundo marcador, se observó que el 96% de las lecturas correspondieron a pingüinos, lo cual afectó la capacidad de detección de otros taxa.

Por último, se destaca la gran dependencia de las bases de datos de referencia, ya que si las secuencias de ciertas presas no se encuentran en repositorios como en GenBank o BOLD Systems, no se pueden identificar con precisión. Creemos que en muchos casos, las identificaciones erróneas de las presas se deben a que las secuencias de la presa real no se encuentran disponibles en las bases de datos. Esto tiene sentido para regiones remotas como lo es la Antártida, donde las dificultades logísticas limitan la toma de muestras, principalmente de especies marinas, por lo que las bases se encuentran incompletas. Sin embargo, también abre la perspectiva y el gran potencial de realizar trabajos de barcoding, que permitan tener registro de la diversidad local en Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, y que enriquezcan el estudio de dieta de los depredadores en el

área, que se consideran en muchos casos especies centinelas de los ecosistemas (Bestley et al., 2020; Sydeman et al., 2021).

### *Conclusiones*

Mediante este análisis se lograron detectar 7 familias que componen la dieta de los individuos de *P. papua* y *P. adeliae* que se reproducen en Isla Ardley. De estas, se detectaron 3 familias de presas exclusivamente para los pingüinos Adelia (Endomyzostomatidae, Panopeidae, y Anguillidae), dos exclusivas en papúa (Agalmatidae e Hygromiidae), y dos compartidas entre ambas especies (Euphausiidae y Cerastidae).

No fue completamente posible la comparación entre temporadas con alta y baja disponibilidad de krill, debido a limitaciones en los números muestrales, y a fallos en la secuenciación. A pesar de esto, se lograron identificar tanto presas de acuerdo con la bibliografía para el área de estudio, como presas que no habían sido reportadas en esta región de la Antártida.

COI demostró ser el marcador más eficiente para la detección de presas, y su rendimiento mejoró en gran medida al utilizarse en conjunto con un bloqueador de ADN de pingüino. Por ende, consideramos que la mejor aproximación es el uso de diversos marcadores, para aprovechar la capacidad de detección de presas de cada uno de ellos, y el desarrollo e implementación de bloqueadores de ADN de pingüino, para maximizar la detección de secuencias objetivo. Para enriquecer este análisis, sería útil la incorporación de otros marcadores, como por ejemplo el gen mitocondrial 12S, que cuenta con primers diseñados para amplificar secuencias de vertebrados, por ejemplo, el par de primers 12S-V5 F y 12S-V5 R, diseñados por Riaz et al. (2011). De esta manera, se podría mejorar la detección de especies de peces en las fecas de los pingüinos, resultado esperable según lo descrito en la literatura mediante el uso de otros métodos de análisis de dieta. Esto sería relevante a la hora de reportar cambios en los hábitos tróficos (por ej. mayor proporción de peces en la dieta) como respuesta a cambios en la disponibilidad de sus presas principales.

A pesar de las limitaciones anteriormente descritas, la técnica de metabarcoding demostró ser de utilidad a la hora de detectar presas poco prevalentes en otros métodos, tales como cnidarios, poliquetos, gasterópodos, entre otros. La gran facilidad para la obtención de muestras asociadas a esta técnica la convierten en un buen método de monitoreo de estas poblaciones, lo cual cobra una mayor relevancia siendo que las mismas se encuentran en un sitio considerado ASPA, IBA, y sitio CEMP.

## CAPÍTULO 3: Análisis de la dieta de *P. papua* utilizando la técnica de isótopos estables

### Introducción

Los isótopos son átomos de un mismo elemento, que difieren en la cantidad de neutrones en su núcleo, por lo que existen para un mismo elemento atómico isótopos “livianos” y “pesados” (por ejemplo,  $\delta^{12}\text{C}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ); y serán estables aquellos que no presenten un decaimiento radiactivo en el tiempo (Fry, 2006). En ecología, estos isótopos son utilizados para estudiar la dinámica y estructura de las comunidades, a partir de análisis como las redes tróficas, posición trófica y el flujo de masa (Post, 2002). Para ello, son principalmente usados los isótopos de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) y de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Los isótopos de carbono permiten inferir la fuente de la materia orgánica, es decir, están asociados a los productores primarios. En ecosistemas terrestres, la proporción de isótopos de carbono se utiliza para diferenciar entre plantas con distintas vías fotosintéticas, como las C3 y C4, mientras que en ecosistemas marinos, permite diferenciar entre fuentes litorales o pelágicas (Post, 2002). Los isótopos de nitrógeno, por otra parte, suelen ser utilizados para inferir posición trófica, ya que el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  de un consumidor suele estar enriquecido en un 3-4‰ en relación a su dieta (Post, 2002). Esto se debe a que los distintos isótopos tienen una cinética diferente en las reacciones debido a sus diferencias de masa, de forma tal que, los isótopos livianos reaccionan más rápido, ya que es menos costoso energéticamente. De esta manera, los isótopos pesados tenderán a acumularse en el sustrato, y los livianos en los productos (Fry, 2006). A este comportamiento diferencial entre isótopos es a lo que se le denomina fraccionamiento; y provoca que los sustratos estén enriquecidos en los isótopos pesados (Fry, 2006).

Una de las herramientas más utilizadas en el análisis de datos de isótopos estables son los modelos de mezcla. Estos modelos son útiles para evaluar la contribución de distintas fuentes (por ej. presas) a una mezcla (por ej. un consumidor), y se utilizan para analizar variaciones entre poblaciones o consumidores individuales, amplitud de nicho, entre otras aplicaciones (Ward et al., 2010).

En la Antártida, existe una gran diversidad de estudios que utilizan esta técnica para el análisis de la dieta de los depredadores marinos. Para el caso de los pingüinos pigoscélidos, trabajos como el de Polito et al. (2011, 2016) y Juárez et al., (2016), reportan que la dieta de estas especies está fuertemente dominada por krill y algunos peces como *E. antarctica*, *Lepidonotothen squamifrons*, y *P. antarcticum*, aunque otras presas son poco consideradas en estos modelos. En Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, estudios como el de

Machado-Gaye et al. (2025a) se centran en la dieta de *P. adeliae*, donde describen que su dieta ha estado dominada por krill tanto en condiciones de escasez como de abundancia de esta presa. Asimismo, reportaron que, en los años de menor abundancia de krill, los pingüinos mostraron valores de  $\delta^{15}\text{N}$  levemente más elevados, lo que indicaría un aporte secundario de otras presas, como peces y calamares, o incluso de krill de tallas mayores (Juárez et al., 2017, 2025).

### *Objetivo*

El objetivo de este capítulo es analizar en detalle la dieta de *P. papua*, evaluar sus diferencias con la de su congénere *P. adeliae*, y evaluar si existen variaciones en la misma a lo largo de distintos años. Para ello, se pretende analizar mediante la técnica de isótopos estables, un conjunto de muestras de sangre de *P. papua*, recolectadas a lo largo de cinco veranos (2019/20 a 2023/24) en su colonia reproductiva en Isla Ardley. Particularmente, se busca identificar la contribución relativa de las principales presas a la dieta, así como comparar las distintas temporadas estudiadas y evaluar si esa contribución varía anualmente, potencialmente en relación a cambios en la abundancia de krill. De esta manera, se espera poder comparar esta información con los estudios ya existentes en la región para su congénere *P. adeliae*, y poder inferir si existieron variaciones en los años donde se sabe que existió una baja disponibilidad de su presa principal, el krill antártico *E. superba*.

## Metodología

### *Trabajo de campo y procesamiento de muestras*

El trabajo de campo se realizó a lo largo de cinco campañas de verano (Noviembre a Enero) de 2019 a 2024 (2019/20, 2020/21, 2021/22, 2022/23, 2023/24), durante la época de guarda de estas aves, en su colonia en Isla Ardley (Fig. 2). Se capturaron un total de 95 individuos de *P. papua* en sus nidos (sólo uno por nido), a mano o utilizando redes de mano. La sangre fue extraída de la vena metatarsiana en el pie, con agujas esterilizadas y tubos capilares heparinizados, y conservada en tubos eppendorff de 1.5mL con alcohol 90%. A su vez, unas gotas de sangre fueron colectadas utilizando tarjetas FTA® (Whatman International) para el posterior sexaje molecular de los individuos. Las mismas consisten de un papel filtro impregnado con químicos que promueven la lisis celular, permitiendo la liberación del ADN de la muestra y su preservación en la matriz del papel, a la vez que previenen el crecimiento de bacterias sobre la misma (da Cunha Santos, 2018).

Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología descrita por Machado-Gaye et al. (2025a). La sangre fue liofilizada durante 24 horas, y homogeneizada hasta obtener un polvo. Luego, se realizaron alícuotas entre 0.1 y 0.5 mg que fueron pesadas en cápsulas de estaño (8 × 5 mm, Elemental Microanalysis Ltd, Okehampton, Reino Unido) utilizando una balanza analítica. Los análisis isotópicos se realizaron en el laboratorio Littoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs), Universidad de La Rochelle, con un espectrómetro de masas (Delta V Plus con interfaz Conflo IV, Thermo Scientific, Bremen, Alemania) acoplado a un analizador elemental (Flash 2000, Thermo Scientific, Milán, Italia).

Los valores de isótopos estables fueron expresados convencionalmente como valores delta en ‰, utilizando la siguiente ecuación:  $\delta X = ([R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}}] - 1 \times 1000)$ , donde  $R_{\text{muestra}}$  es la razón entre el isótopo pesado y el isótopo ligero, ya sea  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , y  $R_{\text{estándar}}$  es la razón entre el isótopo pesado y el isótopo ligero para los estándares internacionales (Vienna PeeDee Belemnite para el carbono (VPDB) y nitrógeno atmosférico (Air-N<sub>2</sub>) para el nitrógeno). El control de calidad se realizó utilizando materiales de referencia USGS-61 y USGS-63 (U.S. Geological Survey, Reston, VA, EE.UU.) en base a sus valores asignados de isótopos delta de carbono y nitrógeno y sus incertidumbres estándar (es decir,  $-35.05 \pm 0.04$  ‰ y  $-1.17 \pm 0.04$  ‰ para carbono, respectivamente, y  $-2.87 \pm 0.04$  ‰ y  $+37.83 \pm 0.06$  ‰ para nitrógeno, respectivamente). La incertidumbre de los valores isotópicos reportados fue evaluada como la desviación estándar de mediciones repetidas (N = 8) de cada material de referencia (es decir, USGS-61

y USGS-63) dentro de un mismo grupo de análisis. La incertidumbre no excedió 0.06 ‰ para valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , ni 0.12 ‰ para valores de  $\delta^{15}\text{N}$ .

### *Análisis estadísticos*

Para evaluar diferencias en los valores isotópicos entre temporadas y sexos en las variables analizadas, utilizamos diferentes modelos estadísticos para tener en cuenta las diferencias en las variables de respuesta y sus efectos sobre los supuestos de los modelos. Para evaluar las diferencias tróficas entre sexos, utilizamos un ANOVA unidireccional. Para analizar estas diferencias entre temporadas, utilizamos un ANOVA pero aplicando un test de Tukey post hoc cuando se detectaron diferencias significativas.

### *Análisis de datos*

Se calcularon las medias para los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  obtenidos de la sangre de los pingüinos papúa (*P. papua*), discriminadas por sexo y por temporada (2019/20 a 2023/24). Para el estudio de la composición de su dieta, se utilizó el modelo de mezcla desarrollado por Zaldúa et al. (2025, prepublicación) utilizando el paquete *simmr* (Govan & Parnell, 2019) en R (v 4.3.0) (R Core Team, 2023). La entrada para los modelos de mezcla incluye, por un lado, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de las muestras de sangre de los pingüinos. Por otro, el factor de discriminación trófica definido por Stephens et al. (2023) para muestras de sangre de aves con dieta marina, que tiene un valor de  $0.5 \pm 0.3$  para  $\delta^{13}\text{C}$ , y de  $2.9 \pm 0.2$  para  $\delta^{15}\text{N}$ . Por último, los valores medios de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  con su desvío estándar de las potenciales presas identificadas en la bibliografía en trabajos de contenido estomacal e isótopos estables, así como las identificadas mediante la técnica de metabarcoding en la presente tesis. Preferiblemente, se tomaron valores provenientes de estudios cercanos a la colonia, cuando éstos estaban disponibles, y alternativamente, de estudios en otras regiones de la Antártida (Tabla S1). Las diferencias en la composición de la dieta fueron evaluadas agrupando los datos tanto por sexo como por año.

Se elaboró un listado inicial de 18 presas, incluyendo crustáceos (*E. superba* adulto y juvenil, *P. gaudichaudii*, y *Thysanoessa* sp.), peces (*P. antarcticum*, *L. squamifrons*, *E. antarctica*, *T. newnesi*, *Parachaenichthys charcoti*, *N. coriiceps*, *Protomyctophum choriodon*, y *C. gunnari*), moluscos gasterópodos (*N. concinna* grande y pequeña), cefalópodos (*Psychroteuthis glacialis*, y *Galiteuthis glacialis*), poliquetos (*Neanthes kerguelensis*, *Harmothoe spinosa*, y *Terebella ehlersi*), y cnidarios. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  utilizados para estas presas se muestran en la Tabla S1.

Además de los crustáceos y los peces, ampliamente mencionados en la bibliografía, se decidió incluir otras especies. Por un lado, a la lapa antártica *N. concinna*, como



representante de las lecturas correspondientes a gasterópodos identificadas mediante metabarcoding. Se seleccionaron valores de dos subpoblaciones de Bahía Maxwell (Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo) reportadas por Choy et al. (2011), donde se describe que algunas subpoblaciones habitan en la zona intermareal, y otras en la sublitoral. Se eligieron los correspondientes al intermareal, ya que estos individuos quedan expuestos durante las mareas bajas, y por ende son más accesibles para el consumo. Dentro de esta subpoblación, encuentran dos clases de tamaños, a las que denominan: “Intertidal B” (rango de tallas entre 23.2 y 43.6 mm de longitud de concha) denominada como *Nacella concinna\_B*, e “Intertidal S” (rango de tallas entre 10.7 y 19.0 mm de longitud de concha) denominada como *Nacella concinna\_S*.

Por otra parte, se eligió incluir dos especies de cefalópodos, ya que en el estudio de Juárez et al. (2025) se menciona la presencia de restos de calamares encontrados mediante análisis del contenido estomacal en pingüinos papúa, aunque no se logra identificar a qué especies corresponden. Por ende, se tomaron valores de dos de las especies más abundantes de calamares en la región, *P. glacialis* y *G. glacialis*.

Por último, se incluyen valores correspondientes a cnidarios, ya que fueron identificados en las fecas mediante el estudio de metabarcoding de esta tesis, resultado que está de acuerdo con la bibliografía (Thiebot et al., 2016, 2017). Para ello, dado que se desconoce exactamente cuál de las especies está siendo consumida en la región, utilizamos las firmas reportadas por Stowasser et al. (2012) para *Calycopsis borchgrevinkii*, *Diphyes* sp., *Atolla wyvillei* y *Periphylla periphylla* en el Mar de Scotia, y calculamos la media general ( $\bar{X}_{grand}$ ) como la media aritmética de las medias individuales ( $\bar{X}_i$ ), siguiendo la siguiente ecuación:  $\bar{X}_{grand} = \frac{1}{n} \times \sum X_i$ , donde  $n$  es el número de medias individuales.

La desviación estándar general ( $\sigma_{grand}$ ) se obtuvo como:  $\sigma_{grand} = \sqrt{\left(\frac{1}{n} \times \sum \sigma_i^2\right)}$ , donde  $\sigma_i$  representa la desviación estándar de cada media individual. Los valores se incluyen bajo la categoría “Medusas” en el modelo. De la misma manera, se siguió el mismo procedimiento para dar cuenta de la composición de poliquetos en la dieta, incluyendo los valores de tres especies reportadas para la región para las cuales existían valores de isótopos disponibles: *N. kerguelensis*, *H. spinosa*, y *T. ehlersi* (Dunton, 2001), y se presentan bajo la categoría general “Poliquetos”.

El listado de presas inicial fue refinado, removiendo los ítems que presentaron valores extremos en el gráfico de espacio isotópico (Figura S1), y los que contribuyeron en

menos de un 5% al modelo de mezcla (Figura S2). El modelo de mezcla final sólo incluyó las presas restantes.

## Resultados

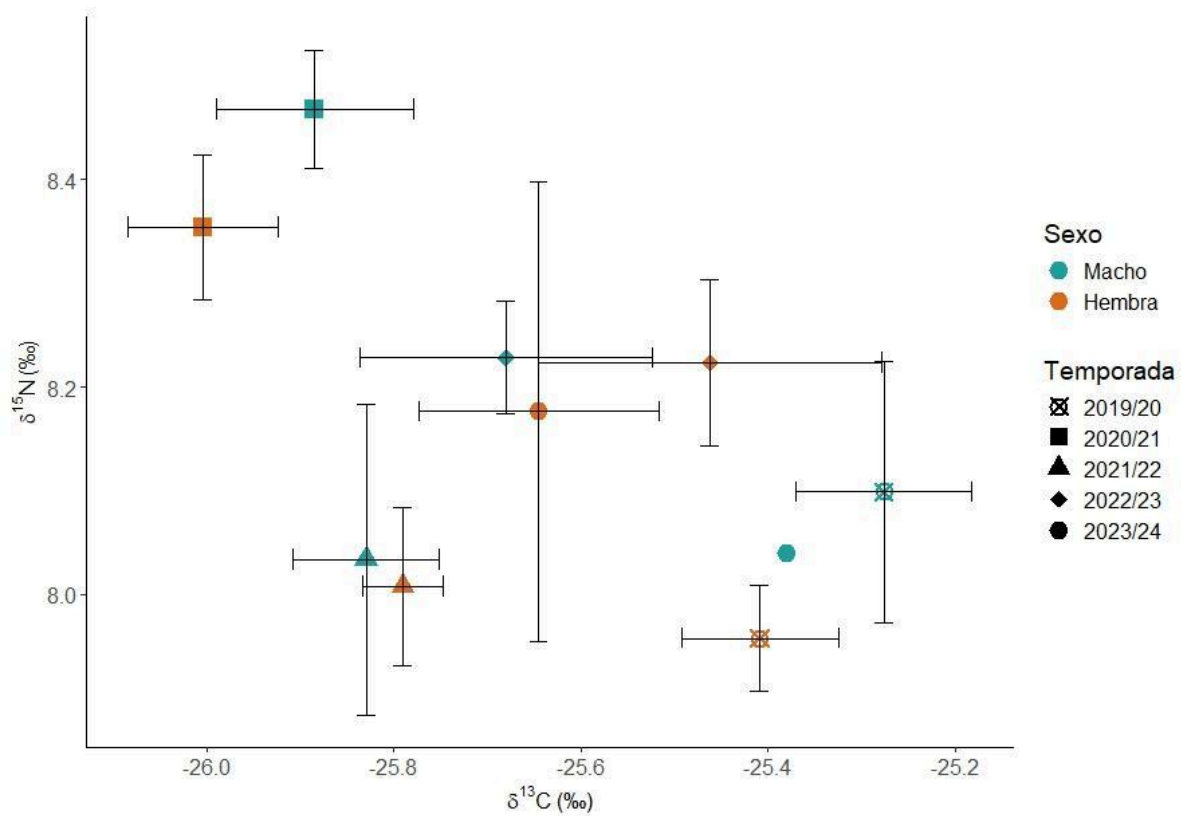
Los valores medios de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  obtenidos de la sangre de los pingüinos papúa (*P. papua*) se presentan en la tabla 5; y estos valores discriminados por sexo y por temporada (2019/20 a 2023/24), se muestran en la figura 8. Los valores máximos y mínimos obtenidos para  $\delta^{13}\text{C}$  se encontraron entre -26.87 y -24.63 ‰, y entre 7.630 y 9.690 ‰ para  $\delta^{15}\text{N}$ .

**Tabla 6.** Valores medios de los isótopos  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los pingüinos papúa (*P. papua*) en su época reproductiva en Isla Ardley, correspondientes a las temporadas de verano de 2019/20 a 2023/24. Los valores se presentan como la media de la temporada de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N} \pm \text{SD}$  (‰). “Total” refiere al promedio de las medias de cada temporada.

Isótopo estable	Temporada					Total
	2019/20	2020/21	2021/22	2022/23	2023/24	
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-25.34 ±	-25.94 ±	-25.81 ±	-25.60 ±	-25.62 ±	-25.68 ±
	0.278	0.320	0.181	0.493	0.353	0.390
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	8.032 ±	8.413 ±	8.017 ±	8.226 ±	8.161 ±	8.175 ±
	0.308	0.217	0.333	0.180	0.588	0.346

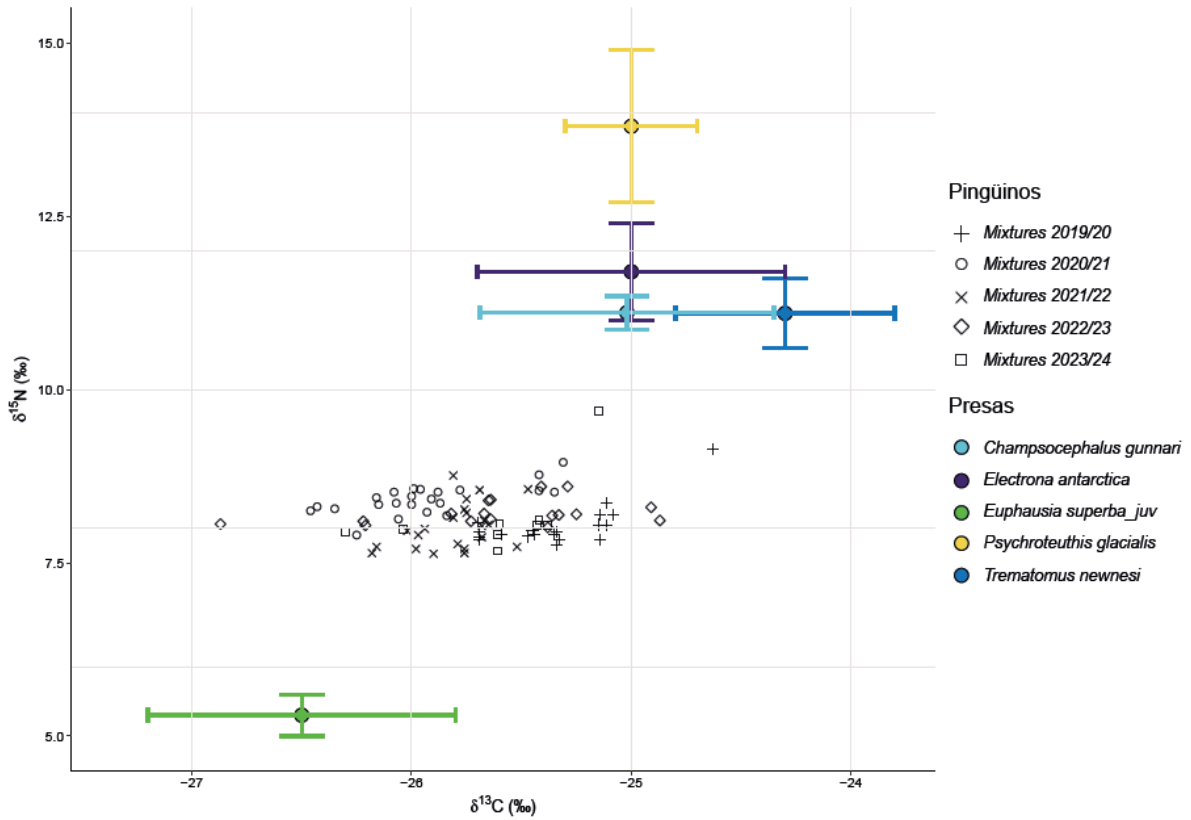
De un total de 90 individuos (2019/20 = 19, 2020/21 = 23, 2021/22 = 22, 2022/23 = 17, 2023/24 = 9), se obtuvieron 48 hembras, y 42 machos. Los valores medios de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  para las hembras (combinando las 5 temporadas) fueron de  $-25.70 \pm 0.350$  ‰ y  $8.133 \pm 0.352$  ‰, respectivamente; mientras que las firmas isotópicas de los machos en el período reproductivo fueron de  $-25.66 \pm 0.433$  ‰ y  $8.224 \pm 0.336$  ‰, respectivamente.

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los pingüinos no mostraron diferencias significativas entre sexos, ( $\delta^{15}\text{N}$ : p-value = 0.212 y  $\delta^{13}\text{C}$ : p-value = 0.6408), aunque sí se observaron diferencias significativas entre algunas temporadas. Mediante el análisis post hoc de Tukey se encontraron diferencias significativas en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre las temporadas 2019/20 y 2020/21 (p-value < 0.0001), y 2019/20 y 2021/22 (p-value = 0.0003). Para el caso de  $\delta^{15}\text{N}$ , solo se observaron entre 2019/20 y 2020/21 (p-value = 0.0016).

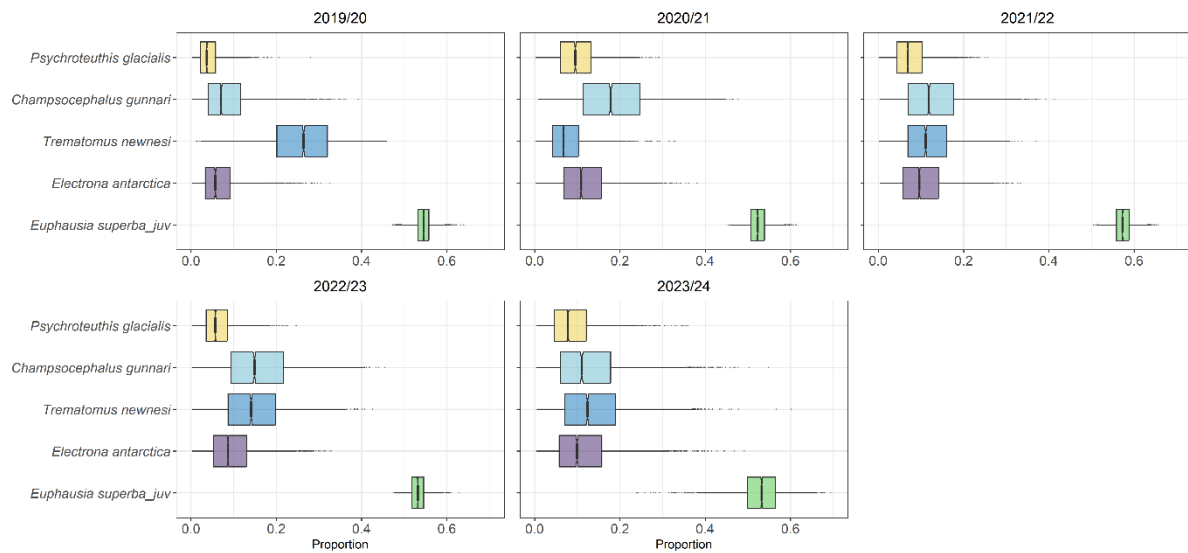


**Figura 8.** Firmas isotópicas de los pingüinos papúa (*P. papua*) en su época reproductiva en Isla Ardley, correspondientes a las temporadas de verano de 2019/20 a 2023/24. Los valores se presentan como la media de la temporada de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N} \pm \text{SD}$  (‰), desagregados por sexo.

En cuanto a la composición de su dieta, el espacio isotópico de los pingüinos y sus potenciales presas se muestran en la figura 9, y los resultados del modelo de mezcla en la figura 10. Del listado inicial de 18 presas (Tabla S1), se generó un modelo filtrado, descartándose aquellas presas que presentaron valores extremos en el gráfico de espacio isotópico (Fig. S1), y los que contribuyeron en menos de un 5% al modelo de mezcla (Fig. S2). Finalmente, se mantuvieron 5 presas: el krill (*E. superba*), los peces *C. gunnari*, *T. newnesi*, y *E. antarctica*, y el calamar *P. glacialis* (Fig. 9 y 10). El krill antártico *E. superba* fue el alimento principal, constituyendo para la mayoría de los años casi un 60% de la dieta. La contribución de las demás presas a la dieta fue poco variable entre temporadas.



**Figura 9.** Espacio isotópico de los pingüinos papúa (*P. papua*; “Mixtures”, en negro) para las cinco temporadas estudiadas, y de sus potenciales presas. Los valores están expresados como: media de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N} \pm \text{SD}$ , (‰).



**Figura 10.** Proporción de las presas potenciales de los pingüinos papúa (*P. papua*) de Isla Ardley entre las temporadas de verano de 2019/20 a 2023/24.

## Discusión

En línea con estudios previos (e.g. Juárez et al., 2025), encontramos que durante la temporada reproductiva los pingüinos papúa adultos de la colonia de la Isla Ardley consumieron principalmente krill y, en menor medida, peces y calamares. Este resultado es consistente con observaciones en otras colonias de la isla, donde se ha detectado una dieta dominada por krill durante la época reproductiva, aunque está precedida por una dieta mixta en la época pre-reproductiva (Juárez et al., 2016). Esto podría estar relacionado con la menor disponibilidad de krill al comienzo de la temporada de reproducción, y sin embargo, estos cambios no suelen ser evidentes para los pingüinos Adelia, los cuales exhiben una relativamente mayor proporción de krill en su dieta, que se mantiene constante a través de las distintas etapas (66% en Adelia vs. 51% en papúa durante la época pre-reproductiva, y 55% vs. 69% durante la reproducción; Juárez et al., 2016)

Con respecto al consumo de peces, encontramos que *T. newnesi*, *C. gunnari*, y *E. antarctica* fueron las especies que exhibieron una mayor proporción en la dieta de *P. papua*. Para las temporadas de 2019/20 y 2023/24 *T. newnesi* fue el pez aparentemente más consumido, mientras que en 2020/21, 2021/22, y 2022/23 fue *C. gunnari*. Las temporadas que exhibieron en general una mayor contribución de peces fueron 2019/20 y 2020/21, donde conformaron aprox. hasta un 20% de la dieta según el modelo. *T. newnesi* se trata de una especie de la familia Nototheniidae, abundante en aguas costeras poco profundas, en el rango de 20 a 50 m, principalmente en fondos rocosos cubiertos de macroalgas, aunque su distribución en profundidad puede alcanzar los 400 m (Piacentino & Barrera-Oro, 2009). Estudios en la región, como el de Novillo et al. (2025), reportan zonas cercanas a la colonia, como Península Potter, como sitios de desove de la especie, lo cual podría explicar su mayor disponibilidad para su consumo por parte de los pingüinos.

Por otra parte, el draco rayado *C. gunnari*, de la familia Channichthyidae, es una especie costera que se encuentra principalmente a profundidades de entre 100 y 350 m, y que realiza migraciones verticales diarias (Kock & Everson, 1997). Se trata de una especie que históricamente ha sido fuertemente explotada por las pesquerías. Su pesca comenzó en la Subárea 48.3 de CCAMLR a fines de la década de 1970, y las capturas alcanzaron su punto máximo en 1983, alcanzando 178.824 toneladas. Ante la preocupación por la disminución de las poblaciones de esta especie, CCAMLR cerró la pesquería a comienzos de la década de 1990. La pesquería fue reabierto en 1995, pero con un límite de captura altamente conservador, y se restringió al uso de redes de arrastre pelágicas para evitar impactos sobre especies no objetivo (CCAMLR Secretariat, 2023; Main et al., 2009).

Por último, *E. antarctica*, de la familia Myctophidae, es considerada una de las especies más abundantes en el Océano Austral (Greely et al., 1999). Se trata de una especie mesopelágica, que también realiza migraciones verticales diarias, encontrándose generalmente entre los 0-300 m durante la noche, y entre 650- 920 m durante el día (Greely et al., 1999).

El calamar *P. glacialis* es endémico de las aguas al sur del Frente Polar Antártico, y constituye una presa importante para una variedad de depredadores, como mamíferos marinos, peces, y aves marinas, habiéndose reportado en la dieta de los pingüinos Adelia en otras regiones de la Antártida (Lischka et al., 2023; Offredo et al., 1985). En Isla Rey Jorge/Isla 25 de Mayo, constituye uno de los componentes principales de la dieta de mamíferos marinos como *Mirounga leonina*, que los cazan en la plataforma continental, donde este calamar es abundante (Daneri et al., 2000). *Psychroteuthis glacialis* puede encontrarse a profundidades desde menos de 200m (los juveniles suelen concentrarse en los 100m de profundidad) hasta aproximadamente 900 m (Filippova & Pakhomov, 1994; Gröger et al., 2000). Se ha registrado que los pingüinos papúa realizan más inmersiones bentónicas que sus congéneres, y una mayor explotación de la columna de agua (Juárez 2013), lo que puede explicar la presencia de este tipo de presas en su dieta.

Si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, como patrón general, los valores para  $\delta^{15}\text{N}$  son ligeramente mayores en machos (fig. 8 y S3), lo cual puede ser indicativo de que se alimentan un poco más arriba en la cadena trófica, por ejemplo, incluyendo más peces en su dieta en comparación con las hembras, o ingerir krill de mayor tamaño. El verano de 2020/21 es en el que se observan, en general, valores más altos de éste isótopo, lo cual puede responder a la menor disponibilidad de krill que ha sido reportada para este año (Machado-Gaye et al., 2025b; Salmerón et al., 2023).

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los pingüinos durante el período reproductivo fueron más bajos en los veranos de 2020/21 y 2021/22, y más altos en 2019/20. Los valores más bajos (más negativos) sugieren el uso de áreas más alejadas de la costa, mientras que los más altos sugieren el uso de áreas más costeras (Cherel & Hobson, 2007). Esta variación observada en las firmas de  $\delta^{13}\text{C}$  es consistente con estudios de seguimiento realizados en pingüinos Adelia (*P. adeliae*), que indican que en esta colonia, la distancia de los viajes de forrajeo cambia a lo largo de las temporadas en relación con la disponibilidad de krill (Machado-Gaye et al., 2024, 2025a). Asimismo, para las temporadas donde se detectó una menor disponibilidad de krill, como 2020/21 y 2021/22 (Machado-Gaye et al., 2025b; Riaz et al., 2025; Salmerón et al., 2023), también se observó este comportamiento en individuos de

*P. papua* reproduciéndose en Isla Ardley, donde realizaron viajes de forrajeo de mayor duración, y recorrieron distancias máximas y distancias totales más grandes, en comparación con los años de alta disponibilidad de presas (Machado-Gaye et al., 2025b; Soutullo et al., 2024). De forma congruente con los resultados obtenidos en esta tesis, se destaca que incluso en aquellos años donde hubo poca abundancia de su presa principal, los pingüinos mantuvieron esencialmente la misma dieta, es decir, no respondieron haciendo cambios significativos hacia otros ítems, sino que únicamente ajustaron su comportamiento, por ejemplo, aumentando su esfuerzo de forrajeo (viajes de alimentación más largos, con mayores distancias recorridas, Machado-Gaye et al. 2025). Esto también puede estar reflejando que los otros posibles ítems en su dieta tampoco fueran tan abundantes como para suplir este recurso. Por lo tanto, estos pingüinos parecen estar restringidos a una oferta de alimento limitada, que se ve afectada esencialmente por la abundancia de krill, y que en momentos de escasez su única alternativa es hacer un mayor esfuerzo de forrajeo. De esta manera, se resalta la necesidad de evaluar con precisión los impactos potenciales de un aumento en la pesca de krill en el entorno de las colonias durante este periodo crítico, en especial en años con poco krill, ya que potencialmente podría estar interfiriendo con su éxito reproductivo y la dinámica de sus poblaciones.

### *Conclusiones*

Mediante este análisis se logró hacer una aproximación de la dieta de los pingüinos papúa que se reproducen en Isla Ardley. Se identificaron cinco presas que potencialmente contribuyen en mayor proporción a su dieta, incluyendo krill, calamares, y tres especies de peces. Si bien no se identificaron diferencias significativas entre sexos, sí se observaron diferencias en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre algunas de las temporadas estudiadas, en concordancia con resultados obtenidos mediante estudios de seguimiento reforzando la interpretación que en años con baja disponibilidad de krill, los pingüinos se alimentan en zonas más alejadas de la costa, realizando un mayor esfuerzo de forrajeo.

El análisis de los isótopos estables es una gran herramienta para estudios en ecología, permitiendo evaluar la contribución de distintas presas a la biomasa de los consumidores, fortalecido por otras herramientas como lo son los modelos de mezcla. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, el tejido analizado en este estudio corresponde a sangre, que tiene una alta tasa de recambio, por lo que proporciona sólo una imagen de aproximadamente una semana (Hobson & Clark, 1993). Sería relevante analizar otros tejidos, como las plumas, que al mudarse una única vez por año podrían reflejar los



orígenes de la biomasa de los pingüinos en otras épocas del año, y así poder comparar las dietas entre el verano (época reproductiva) e invierno.

Diversos autores manejan la hipótesis de que en años donde existe una menor disponibilidad de krill los pingüinos papúa explotan otros recursos, lo que contribuye a su aumento poblacional y mayor éxito reproductivo que sus congéneres (Miller et al., 2009). Sin embargo, esta interpretación no es apoyada por los resultados de este estudio. Los años donde hay una menor disponibilidad de presas para los pingüinos pueden ser identificados por distintos medios. Para algunos, existen monitoreos acústicos de krill (e.g. Salmerón et al., 2023), como 2019/20 y 2021/22, por lo que es sabido que el primero es un año de alta disponibilidad de krill, y el segundo, de baja. Sin embargo, para otros años donde no se cuenta con esta información, el comportamiento de forrajeo de los pingüinos funciona como proxy (por ej., duración de los viajes de forrajeo y distancias recorridas), así como a través del estado fisiológico de los pichones (Machado-Gaye et al., 2025b). Tal es el caso del verano de 2020/21, que según el trabajo recientemente publicado por Machado-Gaye et al. (2025b), fue un año de escasez de krill, que se vio reflejado en algunas de las masas más bajas en los polluelos de ambas especies, y algunos de los viajes más largos registrados en los 5 años estudiados (2019 a 2024). Para este año desfavorable, también se observa en los resultados de esta tesis que la contribución de los peces a la dieta fue levemente mayor (fig. 10), y los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  fueron los mayores de todas las temporadas analizadas (fig. 8), lo que también habla de un mayor consumo de presas distintas de krill. Sin embargo, estas diferencias no son drásticas, por lo que se concluye que incluso en años desfavorables, los pingüinos no responden alterando fuertemente la composición de su dieta, sino que están limitados por sus presas.

Sin duda, otros factores están contribuyendo al éxito de los pingüinos papúa. Entre ellos, se ha observado que la especie presenta una mayor plasticidad fenotípica, una mayor explotación de la columna de agua, una mejor adaptación en su fenología a las condiciones climáticas, la capacidad de hacer una nueva puesta en la época reproductiva en caso de que la primera se pierda, entre otros (Miller et al., 2009). Sumado a estos motivos comportamentales, otros factores, como las condiciones climatológicas, entran en juego. Las condiciones climáticas al inicio de la temporada reproductiva, específicamente las temperaturas medias de octubre y la acumulación de nieve en los sitios de anidación, se han propuesto como factores relevantes que afectan el éxito reproductivo. Salmerón et al. (2023) recientemente propuso que las condiciones climáticas de un invierno con baja cobertura de hielo marino, seguido de una primavera y verano con vientos más fuertes y menor productividad marina provocaron una menor disponibilidad de krill, y

consecuentemente, el esfuerzo de forrajeo de *P. antarcticus* fue mayor, y el éxito reproductivo menor. Por otra parte, en la Antártida del Este, se ha reportado que el pico de fracaso de los nidos de pingüinos Adelia ocurre en los primeros días después de la eclosión, ya que los polluelos aún no regulan completamente su temperatura corporal, siendo especialmente vulnerables a condiciones ambientales desfavorables (Olmastroni et al., 2004; Smiley & Emmerson, 2016).

Los resultados obtenidos resaltan la relevancia de trabajar con múltiples abordajes metodológicos para responder a preguntas complejas. De esta forma, la elaboración del listado de presas potenciales para los modelos de mezcla se enriquece de la información generada mediante los estudios de metabarcoding y contenido estomacal, mejorando la detección de presas. Conocer la disponibilidad de las presas de estas aves, así como las influencias oceanográficas y los requerimientos energéticos a lo largo de las diferentes etapas de vida es crucial para comprender la flexibilidad ecológica de los pingüinos, e informar estrategias de conservación. Por ejemplo, debería investigarse el efecto de las variaciones en la abundancia de otras especies de presas como calamares y medusas, y cómo estas se ven afectadas por el cambio climático y la pesca, para determinar si deberían ser consideradas al diseñar medidas de gestión o conservación.

## CAPÍTULO 4: Conclusiones generales

Mediante los análisis realizados en esta tesis, se logró caracterizar la dieta de las dos especies de pingüinos durante su época reproductiva, en Isla Ardley. Los dos abordajes metodológicos utilizados demostraron ser complementarios a la hora de reflejar distintos aspectos de la dieta, tanto las principales presas que contribuyen a la misma, como las presas poco descritas, hasta la variabilidad interanual que puede existir debido a factores ecosistémicos y variaciones en la disponibilidad de sus presas.

El uso combinado de estas técnicas permite tener una visión más completa de la dieta, y está asociado a un muy bajo esfuerzo para la obtención de las muestras, en algunos casos, ni siquiera involucra la manipulación de los individuos, como es el caso de la colecta de fecas. Este hecho es muy ventajoso, y resalta la viabilidad y potencialidad de incorporar este tipo de muestreo en los monitoreos a largo plazo que actualmente ya se realizan en la región.

Mediante el análisis de la dieta de estas especies se identificó que ambos se alimentaron de krill y de gasterópodos, mientras que en Adelia adicionalmente se detectaron otros crustáceos, peces, cnidarios, y poliquetos. Esto no necesariamente es indicativo de que tenga una dieta más variada que papúa, sino que es posible que distintas limitantes impidieran la detección de otras presas en las muestras correspondientes a esta otra especie. Asimismo, mediante el análisis detallado de la dieta de *P. papua* realizado mediante el análisis de isótopos estables, y enriquecido con estos resultados previos de metabarcoding, se detectó que además del krill, algunas especies de peces y calamares también están contribuyendo a su dieta.

Por otro lado, se destaca que incluso en aquellos años donde hubo poca abundancia de su presa principal, los pingüinos mantuvieron esencialmente la misma dieta, es decir, no respondieron haciendo cambios significativos hacia otros ítems, sino que únicamente ajustaron su comportamiento, por ejemplo, aumentando su esfuerzo de forrajeo. Esto parece ser indicativo de que los pingüinos están restringidos a una oferta de alimento limitada, y que en momentos de escasez de krill su única alternativa es hacer un mayor esfuerzo de forrajeo.

Con respecto a la técnica de metabarcoding de ADN, se resaltan sus fortalezas, como su capacidad de detectar presas que rara vez pueden detectarse mediante otros métodos, como presas blandas o altamente digeribles, y su idoneidad para detectar ítems de la dieta poco frecuentes. Gracias a este análisis se logró elaborar un listado de familias presentes en la dieta de ambas especies, a la vez que se detectaron especies no observadas en trabajos previos en la Isla, como los cnidarios, gasterópodos, y poliquetos. Para poder

maximizar su eficiencia, requiere de mejorar el diseño experimental, desde la colecta de muestras, hasta la selección de marcadores. La colecta de fecas lo más frescas posibles, y su preservación en buffers adecuados puede contribuir a disminuir la contaminación por hongos y algas, a la vez que puede ayudar a preservar el ADN. A su vez, el uso de bloqueadores de ADN de las aves resulta esencial, para maximizar la amplificación de presas. Por último, si bien tanto en esta tesis como en otros trabajos se ha resaltado la idoneidad del gen COI como marcador a utilizarse (en parte por ser el más ampliamente utilizado, y el que cuenta con una mayor base de referencias), es enriquecedor el uso de una diversidad de marcadores y de primers diseñados para mejorar la amplificación de ciertos grupos, de forma de obtener una imagen más amplia de la dieta, y evitar sesgos.

Con respecto al análisis de isótopos estables, fue gracias a esta técnica que se alcanzó el objetivo de comparar la dieta de los pingüinos papua entre temporadas con características contrastantes. Se observó, en todos los casos, que el krill antártico *E. superba* es el alimento principal, constituyendo para la mayoría de los años casi un 60% de la dieta. La contribución de las demás presas a la dieta es poco variable entre temporadas, de forma congruente con el comportamiento observado en los pingüinos Adelia. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante el desarrollo de esta tesis no apoyan la hipótesis de que el éxito reproductivo y las tendencias poblacionales contrastantes entre las especies del género *Pygoscelis* se deben a una mayor plasticidad en la dieta de *P. papua* que le confiere una ventaja. En cambio, es más probable que estas ventajas estén más asociadas a su mayor capacidad de adaptar su fenología a los factores ambientales, en línea con lo propuesto por Machado-Gaye et al. (2025b).

Las proyecciones climáticas actuales para la Península Antártica predicen una continuación de la tendencia hacia condiciones más cálidas, lo que podría reducir los recursos alimenticios y afectar las condiciones meteorológicas durante la temporada reproductiva, influyendo directamente en el éxito reproductivo y las tendencias poblacionales de los pingüinos *Pygoscelis* (Machado-Gaye et al., 2025b). Además, otros factores como las condiciones invernales a las que se enfrentan juveniles y adultos pueden afectar su supervivencia, con consecuencias para el reclutamiento y para las condiciones bajo las cuales los potenciales reproductores inician la siguiente temporada de cría. En este contexto de ambiente cambiante, el monitoreo de las poblaciones de los depredadores marinos se vuelve esencial para informar medidas de conservación y gestión de recursos que aseguren la viabilidad de estas poblaciones.

## Bibliografía

- Agnew, D. J. (1997). The CCAMLR ecosystem monitoring programme. *Antarctic Science*, 9(3), 235-242.
- Barbosa, A., Benzal, J., De León, A., & Moreno, J. (2012). Population decline of chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) on deception island, South Shetlands, Antarctica. *Polar Biology*, 35, 1453-1457.
- Bestley, S., Ropert-Coudert, Y., Bengtson Nash, S., Brooks, C. M., Cotté, C., Dewar, M., ... & Wienecke, B. (2020). Marine ecosystem assessment for the Southern Ocean: birds and marine mammals in a changing climate. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 566936.
- BirdLife International. (2025). 2025, febrero 04, de BirdLife International Data Zone. Sitio web: <http://datazone.birdlife.org/>
- Boersma, P. D., Rebstock, G. A., & Stokes, D. L. (2004). Why penguin eggshells are thick. *The Auk*, 121(1), 148-155.
- CCAMLR Secretariat (2023, Abril 12). *Fishery Report 2022: Champsocephalus gunnari in Subarea 48.3*. CCAMLR. <https://www.ccamlr.org/>
- Cherel, Y., & Hobson, K. A. (2007). Geographical variation in carbon stable isotope signatures of marine predators: a tool to investigate their foraging areas in the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 329, 281-287.
- Choy, E. J., Park, H., Kim, J. H., Ahn, I. Y., & Kang, C. K. (2011). Isotopic shift for defining habitat exploitation by the Antarctic limpet *Nacella concinna* from rocky coastal habitats (Marian Cove, King George Island). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(3), 339-346.
- Cimino, M. A., Fraser, W. R., Patterson-Fraser, D. L., Saba, V. S., & Oliver, M. J. (2014). Large-scale climate and local weather drive interannual variability in Adélie penguin chick fledging mass. *Marine Ecology Progress Series*, 513, 253-268.
- Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, 21(8), 1834-1847.

- Corso, A. D., Steinberg, D. K., Stammerjohn, S. E., & Hilton, E. J. (2022). Climate drives long-term change in Antarctic Silverfish along the western Antarctic Peninsula. *Communications Biology*, 5, 104.
- Cox, F., Newsham, K. K., Bol, R., Dungait, J. A., & Robinson, C. H. (2016). Not poles apart: Antarctic soil fungal communities show similarities to those of the distant Arctic. *Ecology letters*, 19(5), 528-536.
- da Cunha Santos, G. (2018). FTA cards for preservation of nucleic acids for molecular assays: a review on the use of cytologic/tissue samples. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142(3), 308-312.
- Daneri, G. A., Carlini, A. R., & Rodhouse, P. G. K. (2000). Cephalopod diet of the southern elephant seal, *Mirounga leonina*, at King George Island, South Shetland Islands. *Antarctic Science*, 12(1), 16-19.
- Deagle, B. E., Thomas, A. C., McInnes, J. C., Clarke, L. J., Vesterinen, E. J., Clare, E. L., ... & Eveson, J. P. (2018). Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data?. *Molecular Ecology*, 28(2), 391-406.
- Donald, P. F., Fishpool, L. D., Ajagbe, A., Bennun, L. A., Bunting, G., Burfield, I. J., ... & Wege, D. C. (2019). Important Bird and Biodiversity Areas (IBAs): the development and characteristics of a global inventory of key sites for biodiversity. *Bird Conservation International*, 29(2), 177-198.
- Dunton, K. H. (2001).  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  measurements of Antarctic Peninsula fauna: trophic relationships and assimilation of benthic seaweeds. *American Zoologist*, 41(1), 99-112.
- Elbrecht, V., Taberlet, P., Dejean, T., Valentini, A., Usseglio-Polatera, P., Beisel, J. N., ... & Leese, F. (2016). Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, 4, e1966.
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 11.

- Emslie, S. D., & Patterson, W. P. (2007). Abrupt recent shift in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values in Adélie penguin eggshell in Antarctica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(28), 11666-11669.
- Favero, M., Casaux, R., Silva, P., Barrera-Oro, E., & Coria, N. (1998). The diet of the Antarctic shag during summer at Nelson Island, Antarctica. *The Condor*, *100*(1), 112-118.
- Filippova, J. A., & Pakhomov, E. A. (1994). Young squid in the plankton of Prydz Bay, Antarctica. *Antarctic Science*, *6*(2), 171-173.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *3*(5), pp. 294-299.
- Fowler, A. E., Forsström, T., von Numers, M., & Vesakoski, O. (2013). The North American mud crab *Rhithropanopeus harrisi* (Gould, 1841) in newly colonized Northern Baltic Sea: distribution and ecology. *Aquatic Invasions*, *8*(1), 89-96.
- Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology* (Vol. 521, p. 318). New York: Springer.
- Gales, R. P. (1987). Validation of the stomach-flushing technique for obtaining stomach contents of penguins. *Ibis*, *129*(2), 335-343.
- Govan, E., & Parnell, A. (2019). simmr: A Stable Isotope Mixing Model. R package version 0.5.1.216, <https://CRAN.R-project.org/package=simmr>.
- Greenslade, P. (2010). Collembola fauna of the South Shetland Islands revisited. *Antarctic Science*, *22*(3), 233-242.
- Greely, T. M., Gartner Jr, J. V., & Torres, J. J. (1999). Age and growth of *Electrona antarctica* (Pisces: Myctophidae), the dominant mesopelagic fish of the Southern Ocean. *Marine Biology*, *133*(1), 145-158.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., & Dawson, R. J. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular ecology*, *7*(8), 1071-1075.
- Gröger, J., Piatkowski, U., & Heinemann, H. (2000). Beak length analysis of the Southern Ocean squid *Psychroteuthis glacialis* (Cephalopoda: Psychroteuthidae) and its use for size and biomass estimation. *Polar Biology*, *23*(1), 70-74.

- Guardiola, M., Uriz, M. J., Taberlet, P., Coissac, E., Wangensteen, O. S., & Turon, X. (2015). Deep-sea, deep-sequencing: metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PloS one*, *10*(10), e0139633.
- Gwiazdowicz, D. J., Niedbała, W., Skarżyński, D., & Zawieja, B. (2022). Occurrence of mites (Acari) and springtails (Collembola) in bird nests on King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Polar Biology*, *45*(6), 1035-1044.
- Handley, J., Rouyer, M. M., Pearmain, E. J., Warwick-Evans, V., Teschke, K., Hinke, J. T., ... & Dias, M. P. (2021). Marine important bird and biodiversity areas for penguins in Antarctica, targets for conservation action. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 602972.
- Hays, G. C., Bailey, H., Bograd, S. J., Bowen, W. D., Campagna, C., Carmichael, R. H., ... & Sequeira, A. M. (2019). Translating marine animal tracking data into conservation policy and management. *Trends in Ecology & Evolution*, *34*(5), 459-473.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, *54*(5), 852-859.
- Henley, S. F., Schofield, O. M., Hendry, K. R., Schloss, I. R., Steinberg, D. K., Moffat, C., ... & Meredith, M. P. (2019). Variability and change in the west Antarctic Peninsula marine system: research priorities and opportunities. *Progress in Oceanography*, *173*, 208-237.
- Herman, R., Borowicz, A., Lynch, M., Trathan, P., Hart, T., & Lynch, H. (2020). Update on the global abundance and distribution of breeding Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*). *Polar Biology*, *43*, 1947-1956.
- Hindell, M. A., Reisinger, R. R., Ropert-Coudert, Y., Hückstädt, L. A., Trathan, P. N., Bornemann, H., ... & Raymond, B. (2020). Tracking of marine predators to protect Southern Ocean ecosystems. *Nature*, *580*(7801), 87-92.
- Hinke, J. T., Polito, M. J., Reiss, C. S., Trivelpiece, S. G., & Trivelpiece, W. Z. (2012). Flexible reproductive timing can buffer reproductive success of *Pygoscelis* spp. penguins in the Antarctic Peninsula region. *Marine Ecology Progress Series*, *454*, 91-104.



- Hobson, K. A., & Clark, R. G. (1993). Turnover of  $^{13}\text{C}$  in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *The Auk*, *110*(3), 638-641.
- Hobson, K. A., Piatt, J. F., & Pitocchelli, J. (1994). Using stable isotopes to determine seabird trophic relationships. *Journal of animal ecology*, 786-798.
- Hogg, C.J., Lea, M.A., Gual Soler, M., Vasquez, V.N., Payo-Payo, A., Parrott, M.L., Santos, M., Shaw, C., Brooks, C.M. (2020). Protect the Antarctic Peninsula—before it's too late. *Nature* 586(7830):496–499
- Ingels, J., Hauquier, F., Raes, M., & Vanreusel, A. (2014). Antarctic free-living marine nematodes. En B. Broyer, C., Koubbi, P., Griffiths, H.J., Raymond, B., Udekem d'Acoz, C. d', Van de Putte, A.P., Danis, B., David, B., Grant, S., Gutt, J., Held, C., Hosie, G., Huettmann, F., Post, A., Ropert-Coudert, Y. (Eds.), *Biogeographic Atlas of the Southern Ocean* (pp. 83-87). SCAR, Cambridge.
- Jablonski, B. (1985). The diet of penguins on King George Island, South Shetland Islands. *Acta Zoologica Cracoviensia*, *29*(1 (1-12)).
- Jarman, S. N., Gales, N. J., Tierney, M., Gill, P. C., & Elliott, N. G. (2002). A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Molecular Ecology*, *11*(12), 2679-2690.
- Jarman S.N., McInnes J.C., Faux P.A.M., Marthick J., Deagle B.E., Southwell C. and Emmerson L. (2013). Adélie Penguin Population Diet Monitoring by Analysis of Food DNA in Scats. *PLoS ONE* 8(12):e82227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082227>
- Jażdźewski, K. (1981). Amphipod crustaceans in the diet of pygoscelid penguins of the King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Polish Polar Research*, 133-144.
- Juárez, M. A. (2013). *Biología reproductiva y ecología trófica de dos especies simpátricas del género Pygoscelis en las Islas Shetland del Sur, Antártida [Breeding biology and trophic ecology of two sympatric species of the genus Pygoscelis at the South Shetland Islands, Antarctica]* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata). <http://hdl.handle.net/10915/27166>

- Juárez, M. A., Santos, M., Negrete, J., Mennucci, J. A., Perchivale, P. J., Casaux, R., & Coria, N. R. (2015). Adélie penguin population changes at Stranger Point: 19 years of monitoring. *Antarctic Science*, 27(5), 455-461.
- Juárez, M. A., Santos, M., Mennucci, J. A., Coria, N. R., & Mariano-Jelicich, R. (2016). Diet composition and foraging habitats of Adélie and gentoo penguins in three different stages of their annual cycle. *Marine Biology*, 163(5), 105.
- Juárez, M. A., Casaux, R., Corbalán, A., Blanco, G., Pereira, G. A., Perchivale, P. J., ... & Santos, M. M. (2017). Diet of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) at stranger point (25 de Mayo/King George Island, Antarctica) over a 13-year period (2003–2015). *Polar Biology*, 41(2), 303-311.
- Juárez, M. A., Santos, M. M., Perchivale, P. J., Rozas Sia, M. G., Sandler, R., Pereira, A., ... & Libertelli, M. (2025). The importance of Antarctic krill in the non-breeding and breeding diet of gentoo penguins at a colony of the South Shetland Islands. *Polar Biology*, 48(3), 83.
- Kock, K. H., & Everson, I. (1997). Biology and ecology of mackerel icefish, *Champsocephalus gunnari*: an Antarctic fish lacking hemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(4), 1067-1077.
- Kovalenko, P., Trokhymets, V., Parnikoza, I., Protsenko, Y., Salganskiy, O., Dzhulai, A., ... & Gorobchyshyn, V. (2021). Current status of *Belgica antarctica* Jacobs, 1900 (Diptera: Chironomidae) distribution by the data of Ukrainian Antarctic Expeditions. *Ukrainian Antarctic Journal*, (2), 76-93.
- Krüger, L., Huerta, M. F., Santa Cruz, F., & Cárdenas, C. A. (2021). Antarctic krill fishery effects over penguin populations under adverse climate conditions: Implications for the management of fishing practices. *Ambio*, 50(3), 560-571.
- Lee, J. R., Terauds, A., Carwardine, J., Shaw, J. D., Fuller, R. A., Possingham, H. P., ... & Chadès, I. (2022). Threat management priorities for conserving Antarctic biodiversity. *PLoS Biology*, 20(12), e3001921.
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., ... & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10, 1-14.

- Lescroël, A., Ballard, G., Toniolo, V., Barton, K. J., Wilson, P. R., Lyver, P. O. B., & Ainley, D. G. (2010). Working less to gain more: when breeding quality relates to foraging efficiency. *Ecology*, *91*(7), 2044-2055.
- Lischka, A., Braid, H. E., Gaw, S., & Bolstad, K. S. R. (2023). First reports of trace element bioaccumulation in the Antarctic deep-sea squid *Psychroteuthis glacialis*. *Marine Biology*, *170*(12), 163.
- Lynch, H. J., Fagan, W. F., Naveen, R., Trivelpiece, S. G., & Trivelpiece, W. Z. (2009). Timing of clutch initiation in *Pygoscelis* penguins on the Antarctic Peninsula: towards an improved understanding of off-peak census correction factors. *CCAMLR Science*, *16*, 149-165.
- Lynch, H. J., Naveen, R., Trathan, P. N., & Fagan, W. F. (2012). Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology*, *93*(6), 1367-1377.
- Machado-Gaye, A. L., Kato, A., Chimienti, M., Gobel, N., Ropert-Coudert, Y., Barbosa, A., & Soutullo, A. (2024). Using latent behavior analysis to identify key foraging areas for Adélie penguins in a declining colony in West Antarctic Peninsula. *Marine Biology*, *171*(3), 69.
- Machado-Gaye, A. L., Chimienti, M., Kato, A., Ropert-Coudert, Y., Barbosa, A., Bustamante, P., Cosse, M., Menéndez-Blázquez, J., Zaldúa, N., & Soutullo, A. (2025a). Energy expenditure of Adélie penguins during the breeding season: females pay the cost in years of low food availability. *Animal Behaviour*, *222*, 123144.
- Machado-Gaye, A. L., Manta, G., Braun, C., Menéndez-Blázquez, J., Raslan, M., Zaldúa, N., & Soutullo, A. (2025b). Divergent responses of *Pygoscelis* penguins to unfavourable weather conditions in the South Shetland Islands. *Antarctic Science*, 1-11.
- Main, C. E., Collins, M. A., Mitchell, R., & Belchier, M. (2009). Identifying patterns in the diet of mackerel icefish (*Champscephalus gunnari*) at South Georgia using bootstrapped confidence intervals of a dietary index. *Polar Biology*, *32*(4), 569-581.
- Management Plan for Antarctic Specially Protected Area No. 150. (2009). [archivo PDF] Recuperado de [https://documents.ats.aq/recatt/att427\\_e.pdf](https://documents.ats.aq/recatt/att427_e.pdf)

- McInnes, J. C., Emmerson, L., Southwell, C., Faux, C., & Jarman, S. N. (2016). Simultaneous DNA-based diet analysis of breeding, non-breeding and chick Adélie penguins. *Royal Society Open Science*, 3(1), 150443.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., & Kannt, A. (1998). Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27(1), 329-356.
- Miller, A. K., Karnovsky, N. J., & Trivelpiece, W. Z. (2009). Flexible foraging strategies of gentoo penguins *Pygoscelis papua* over 5 years in the South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Biology*, 156, 2527-2537.
- Mintenbeck, K., & Torres, J. J. (2017). Impact of climate change on the Antarctic silverfish and its consequences for the Antarctic ecosystem. In M. Vacchi, E. Pisano, & L. Ghigliotti (Eds.), *The Antarctic silverfish: A keystone species in a changing ecosystem* (pp. 253–286). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55893-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55893-6_12)
- Moffat, C., & Meredith, M. (2018). Shelf–ocean exchange and hydrography west of the Antarctic Peninsula: a review. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376(2122), 20170164.
- Moreira, E., Novillo, M., Mintenbeck, K., Barrera-Oro, E., & De Troch, M. (2019). Feeding ecology of the two sympatric fish species *Notothenia rossii* and *N. coriiceps* from western Antarctic Peninsula: a fatty acids and stable isotopes approach (CCAMLR WG-FSA-2019/26). *CCAMLR Working Group on Fish Stock Assessment, Hobart, Australia*. Retrieved from <https://meetings.ccamlr.org/en/wg-fsa-2019/26>
- Novillo, M., Moreira, E., Elisio, M., Macchi, G., Barrera-Oro, E., & La Mesa, M. (2025). A comprehensive study of the life history traits of *Trematomus newnesi* (Pisces, Notothenioidae) off the South Shetland Islands. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 312, 109040.
- Offredo, C., Ridoux, V., & Clarke, M. R. (1985). Cephalopods in the diets of Emperor and Adélie penguins in Adélie Land, Antarctica. *Marine Biology*, 86(2), 199-202.
- Olmastroni, S., Pezzo, F., Volpi, V., & Focardi, S. (2004). Effects of weather and sea-ice on the reproductive performance of the Adélie penguin at Edmonson Point, Ross Sea. *CCAMLR Sci*, 11, 99-109.

- Panasiuk, A., Wawrzynek-Borejko, J., Musiał, A., & Korczak-Abshire, M. (2020). Pygoscelis penguin diets on King George Island, South Shetland Islands, with a special focus on the krill *Euphausia superba*. *Antarctic Science*, 32(1), 21-28.
- Piacentino, G. L., & Barrera-Oro, E. (2009). Phenotypic plasticity in the Antarctic fish *Trematomus newnesi* (Nototheniidae) from the South Shetland Islands. *Polar Biology*, 32(10), 1407-1413.
- Polito, M. J., Lynch, H. J., Naveen, R., & Emslie, S. D. (2011). Stable isotopes reveal regional heterogeneity in the pre-breeding distribution and diets of sympatrically breeding *Pygoscelis* spp. penguins. *Marine Ecology Progress Series*, 421, 265-277.
- Polito, M. J., Reiss, C. S., Trivelpiece, W. Z., Patterson, W. P., & Emslie, S. D. (2013). Stable isotopes identify an ontogenetic niche expansion in Antarctic krill (*Euphausia superba*) from the South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Biology*, 160(6), 1311-1323.
- Polito, M. J., Brasso, R. L., Trivelpiece, W. Z., Karnovsky, N., Patterson, W. P., & Emslie, S. D. (2016). Differing foraging strategies influence mercury (Hg) exposure in an Antarctic penguin community. *Environmental Pollution*, 218, 196-206.
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703-718.
- R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. <https://www.R-project.org/>.
- Riaz, J., Machado-Gaye, A. L., Chimienti, M., Kato, A., Ropert-Coudert, Y., Alegria, N., ... & Soutullo, A. (2025). Bout time for krill: contrasting Adélie penguin foraging behaviour during years of high and low krill availability. *Animal Behaviour*, 123260.
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic acids research*, 39(21), e145-e145.
- 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.

- Rutschmann, S., Matschiner, M., Damerau, M., Muschick, M., Lehmann, M. F., Hanel, R., & Salzburger, W. (2011). Parallel ecological diversification in Antarctic notothenioid fishes as evidence for adaptive radiation. *Molecular Ecology*, 20(22), 4707-4721.
- Salmerón, N., Belle, S., Cruz, F. S., Alegria, N., Finger, J. V. G., Corá, D. H., ... & Krüger, L. (2023). Contrasting environmental conditions precluded lower availability of Antarctic krill affecting breeding chinstrap penguins in the Antarctic Peninsula. *Scientific Reports*, 13(1), 5265.
- Santa Cruz, F., Ernst, B., Arata, J.A., Parada, C. (2018). Spatial and temporal dynamics of the Antarctic krill fishery in fishing hotspots in the Bransfield Strait and South Shetland Islands. *Fisheries Research*, 208, 157-166.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1501-1506.
- Schories, D., & Kohlberg, G. (Eds.). (2016). *Marine Wildlife, King George Island, Antarctica*. Dirk Schories Publications.
- Shimada, K., Ohyama, Y., & Pan, C. X. (1991). Cold-hardiness of the Antarctic winged midge *Parochlus steinenii* during the active season at King George Island. *Polar Biology*, 11(5), 311-314.
- Smiley, K. M., & Emmerson, L. M. (2016). A matter of timing: Adélie penguin reproductive success in a seasonally varying environment. *Marine Ecology Progress Series*, 542, 235-249.
- Soutullo A., Machado-Gaye A.L., & Zaldúa N. (2023). Tracking ecosystem changes in Western Antarctic Peninsula to inform CCAMLR decision-making: insights from the ongoing ecosystem monitoring programme in Ardley Island's CEMP site. *WG - EMM - CCAMLR*.
- Soutullo, A., Raslan, M., & Machado-Gaye, A. L. (2024). From spatial prioritization to conservation management in the Southern Ocean using the marine IBAs approach. *Biological Conservation*, 296, 110721.
- Stammerjohn, S. E., Martinson, D. G., Smith, R. C., & Iannuzzi, R. A. (2008). Sea ice in the western Antarctic Peninsula region: Spatio-temporal variability from ecological and

- climate change perspectives. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 55(18-19), 2041-2058.
- Stephens, R. B., Shipley, O. N., & Moll, R. J. (2023). Meta-analysis and critical review of trophic discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ): Importance of tissue, trophic level and diet source. *Functional Ecology*, 37(9), 2535-2548.
- Stowasser, G., Atkinson, A., McGill, R. A. R., Phillips, R. A., Collins, M. A., & Pond, D. W. (2012). Food web dynamics in the Scotia Sea in summer: a stable isotope study. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 59, 208-221.
- Strong, J. (1967). Ecology of terrestrial arthropods at Palmer station, Antarctic Peninsula. *Entomology of Antarctica*, 10, 357-371.
- Summers, M. M., Al-Hakim, I. I., & Rouse, G. W. (2014). Turbo-taxonomy: 21 new species of Myzostomida (Annelida). *Zootaxa*, 3873(4), 301-344.
- Sydeman, W. J., Schoeman, D. S., Thompson, S. A., Hoover, B. A., García-Reyes, M., Daunt, F., Agnew, P., Anker-Nilssen, T., Barbraud, C., Barrett, R., Becker, P. H., Bell, E. A., Boersma, P. D., Bouwhuis, S., Cannell, B., Crawford, J. R. M., Dann, P., Delord, K., Elliott, G., ... Watanuki, Y. (2021). *Hemispheric asymmetry in ocean change and the productivity of ecosystem sentinels*. *Science*, 372(6545), 980–983. <https://doi.org/10.1126/science.abf1772>
- Sylvester, Z. T., & Brooks, C. M. (2020). Protecting Antarctica through co-production of actionable science: Lessons from the CCAMLR marine protected area process. *Marine Policy*, 111, 103720.
- Tabassum, N., Lee, J. H., Lee, S. R., Kim, J. U., Park, H., Kim, H. W., & Kim, J. H. (2022). Molecular diet analysis of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) in the Ross Sea using fecal DNA. *Biology*, 11(2), 182.
- Tamelander, T., Renaud, P. E., Hop, H., Carroll, M. L., Ambrose Jr, W. G., & Hobson, K. A. (2006). Trophic relationships and pelagic–benthic coupling during summer in the Barents Sea Marginal Ice Zone, revealed by stable carbon and nitrogen isotope measurements. *Marine Ecology Progress Series*, 310, 33-46.
- Thiebot, J. B., Ito, K., Raclot, T., Poupart, T., Kato, A., Ropert-Coudert, Y., & Takahashi, A. (2016). On the significance of Antarctic jellyfish as food for Adélie penguins, as revealed by video loggers. *Marine Biology*, 163(5), 108.

- Thiebot, J. B., Arnould, J. P., Gómez-Laich, A., Ito, K., Kato, A., Mattern, T., ... & Takahashi, A. (2017). Jellyfish and other gelata as food for four penguin species—insights from predator-borne videos. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *15*(8), 437-441.
- Trathan, P. N., Warwick-Evans, V., Young, E. F., Friedlaender, A., Kim, J. H., & Kokubun, N. (2022). The ecosystem approach to management of the Antarctic krill fishery—the ‘devils are in the detail’ at small spatial and temporal scales. *Journal of Marine Systems*, *225*, 103598.
- Trathan, P., Friedlaender, A., Johnson, C., & Reisinger, R. (2025). The fishery for Antarctic krill—Conflicts between industrial production, protection of biodiversity, and legal governance. *Marine Policy*, *180*, 106787.
- Trivelpiece, W. Z., Trivelpiece, S. G., & Volkman, N. J. (1987). Ecological segregation of Adélie, gentoo, and chinstrap penguins at King George Island, Antarctica. *Ecology*, *68*(2), 351-361.
- Trivelpiece, W. Z., Hinke, J. T., Miller, A. K., Reiss, C. S., Trivelpiece, S. G., & Watters, G. M. (2011). Variability in krill biomass links harvesting and climate warming to penguin population changes in Antarctica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(18), 7625-7628.
- Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, *1*, e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>
- Vestheim, H., & Jarman, S. N. (2008). Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples—a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in zoology*, *5*(1), 12.
- Větrovský, T., Baldrian, P., & Morais, D. (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, *34*(13), 2292-2294.
- Volkman, N. J., Presler, P., & Trivelpiece, W. (1980). Diets of pygoscelid penguins at King George Island, Antarctica. *The Condor*, *82*(4), 373-378.
- Ward, E. J., Semmens, B. X., & Schindler, D. E. (2010). Including source uncertainty and prior information in the analysis of stable isotope mixing models. *Environmental science & technology*, *44*(12), 4645-4650.



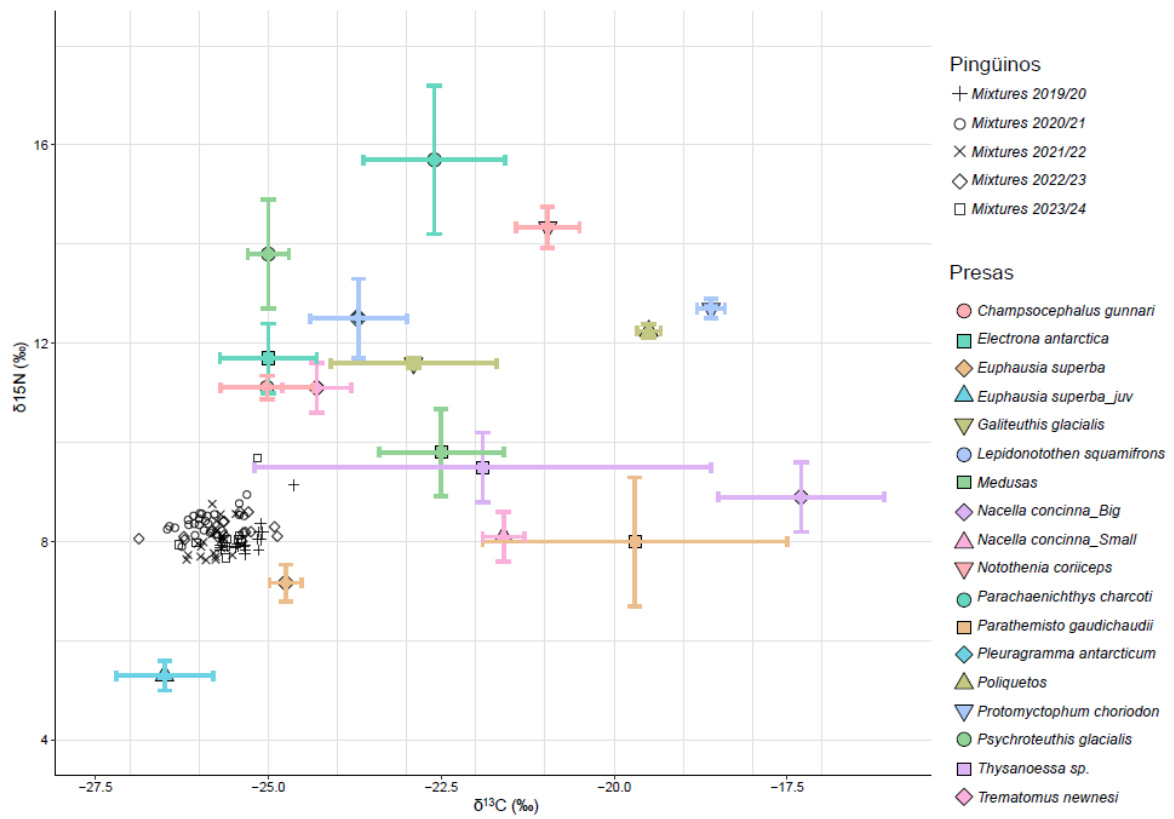
- Watters, G. M., Hinke, J. T., & Reiss, C. S. (2020). Long-term observations from Antarctica demonstrate that mismatched scales of fisheries management and predator-prey interaction lead to erroneous conclusions about precaution. *Scientific Reports*, *10*(1), 2314.
- Watters, G. M., & Hinke, J. T. (2022). Conservation in the Scotia Sea in light of expiring regulations and disrupted negotiations. *Conservation Biology*, *36*(5).
- Wauchope, H. S., Shaw, J. D., & Terauds, A. (2019). A snapshot of biodiversity protection in Antarctica. *Nature Communications*, *10*(1), 946.
- Wawrzynek-Borejko, J., Panasiuk, A., Hinke, J.T., & Korczak-Abshire, M. (2022). Are the diets of sympatric Pygoscelid penguins more similar than previously thought? *Polar Biology*, *45*, 1559 - 1569.
- Wilson, R. P. (1984). An improved stomach pump for penquins and other seabirds. *Journal of field ornithology*, *55*(1), 109-112.
- Xavier, J. C., Cherel, Y., Medeiros, R., Velez, N., Dewar, M., Ratcliffe, N., ... & Trathan, P. N. (2018). Conventional and molecular analysis of the diet of gentoo penguins: contributions to assess scats for non-invasive penguin diet monitoring. *Polar Biology*, *41*(11), 2275-2287.
- Zaini, N. A., Low, V. L., Gebrelassie, S. S., Ismail, S. S., Mahmud, M. H., Houssaini, J., ... & Heo, C. C. (2024). Arthropods, nematodes, fungi, and bacteria associated with penguin carrion in Barton Peninsula, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, *47*(1), 41-52.
- Zaldúa, N., Zajková, Z., Machado-Gaye, A. L., Franco-Trecu, V., Cosse, M., Ropert-Coudert, Y., ... & Soutullo, A. (2024). Changing the focus: The need for cross-scale dynamic management in the Southern Ocean and implications for holistic conservation of Antarctic marine living resources. *Marine Policy*, *170*, 106361.
- Zaldúa, N., Franco-Trecu, V., Machado-Gaye, A. L., Raslan, M., Gobel, N., Zajková, Z., & Soutullo, A. (2025). Adélie Penguin Trophic Strategies in the Western Antarctic Peninsula: A Generalist Approach with Temporal and Sexual Variability [Preprint]. SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5382464>

- Zeng, Y. X., Li, H. R., Han, W., & Luo, W. (2022). Molecular dietary analysis of Adélie (*Pygoscelis adeliae*) and Gentoo (*Pygoscelis papua*) penguins breeding sympatrically on Antarctic Ardley Island using fecal DNA. *Polar Biology*, 45(6), 999-1011.
- Zinger, L., Bonin, A., Alsos, I. G., Bálint, M., Bik, H., Boyer, F., ... & Taberlet, P. (2019). DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology*, 28(8), 1857-1862.

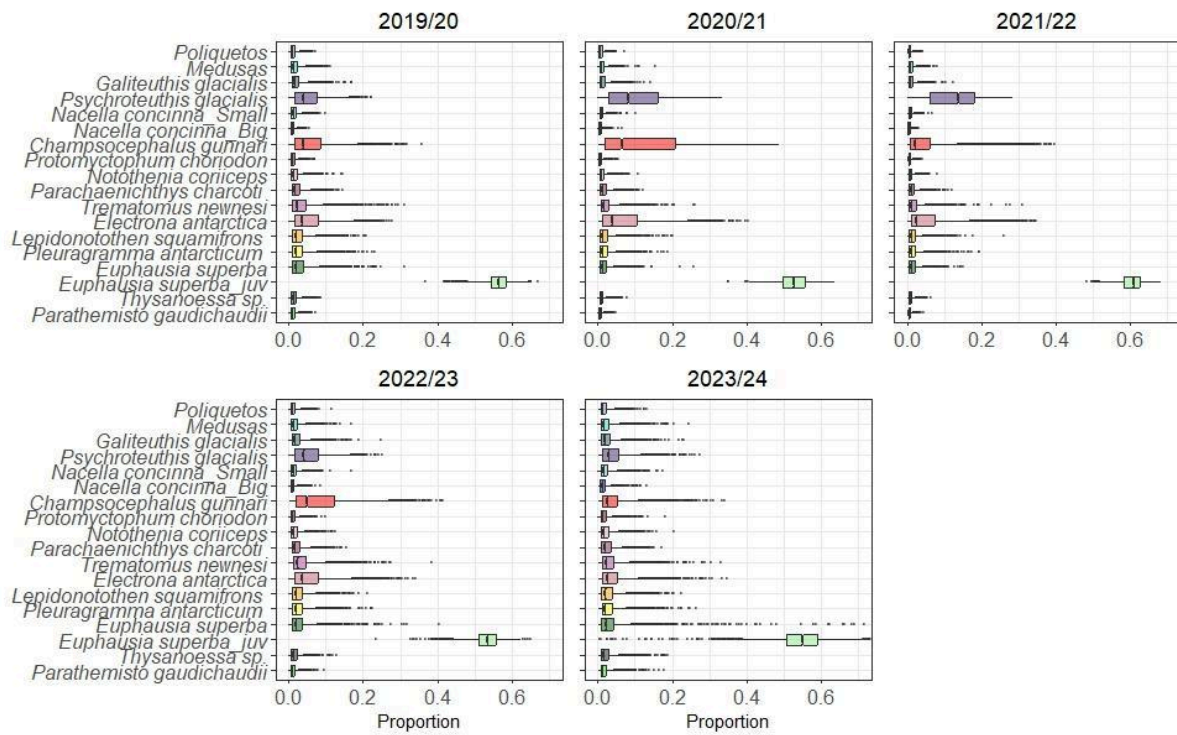
## Anexo

**Tabla S1.** Firmas isotópicas de las presas de pingüinos (*P. papua* y *P. adeliae*) consideradas para el modelo de mezcla, y sus referencias.

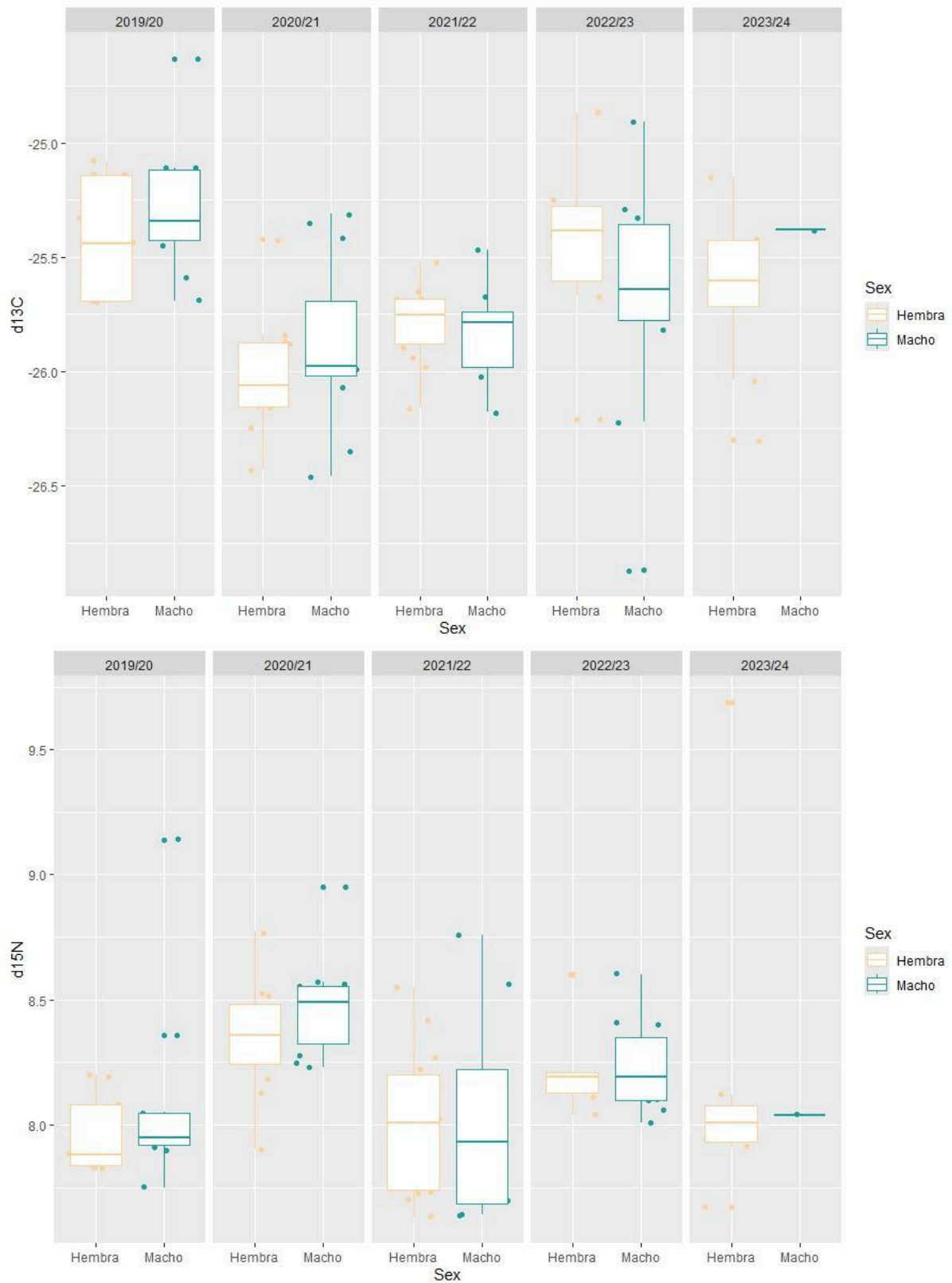
<b>Presa</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>	<b><math>\delta^{15}\text{N}</math></b>	<b>Referencia</b>
<i>Euphausia superba</i> (adulto)	-24.86 ± 0.8	4.4 ± 0.43	Zaldúa et al. (2025, prepublicación)
<i>Euphausia superba</i> (juvenil)	-27.0 ± 0.7	2.4 ± 0.3	Polito et al. (2013)
<i>Parathemisto gaudichaudii</i>	-20.2 ± 2.0	5.1 ± 1.3	Stowasser et al. (2012)
<i>Nacella concinna_B</i> (Grande)	-17.8 ± 1.2	6.0 ± 0.7	Choy et al. (2011)
<i>Nacella concinna_S</i> (Pequeña)	-22.1 ± 0.6	5.2 ± 0.5	Choy et al. (2011)
<i>Psychroteuthis glacialis</i>	-25.5 ± 0.3	10.9 ± 1.1	Cherel & Hobson (2005)
<i>Galiteuthis glacialis</i>	-23.4 ± 1.2	8.7 ± 0.1	Stowasser et al. (2012)
Medusas	-23.0 ± 0.9	6.9 ± 0.88	Stowasser et al. (2012)
<i>Pleuragramma antarcticum</i>	-24.7 ± 0.4	9.4 ± 0.5	Polito et al. (2011)
<i>Lepidonotothen squamifrons</i>	-24.2 ± 0.7	9.6 ± 0.8	Polito et al. (2011)
<i>Electrona antarctica</i>	-25.5 ± 0.7	8.8 ± 0.7	Polito et al. (2011)
<i>Trematomus newnesi</i>	-24.8 ± 0.5	8.2 ± 0.5	Polito et al. (2011)
<i>Parachaenichthys charcoti</i>	-23.12 ± 1.0	12.7 ± 1.45	Rutschmann et al. (2011)
<i>Thysanoessa</i> sp.	-22.4 ± 3.3	6.6 ± 0.7	Stowasser et al. (2012)
<i>Notothenia coriiceps</i>	-21.5 ± 0.46	11.4 ± 0.42	Moreira et al. (2019)
<i>Protomyctophum choriodon</i>	-19.1 ± 0.2	9.8 ± 0.2	Stowasser et al. (2012)
<i>Champsocephalus gunnari</i>	-25.4 ± 0.67	8.21 ± 0,24	Rutschmann et al. (2011)
Poliquetos	-20.0 ± 0.17	9.35 ± 0.13	Dunton (2001)



**Fig S1.** Espacio isotópico de los pingüinos papúa (*P. papua*; “Mixtures”, en negro) para las cinco temporadas estudiadas, y de las potenciales presas incluidas en el modelo inicial. Los valores están expresados como: media de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N} \pm \text{SD}$ , ‰).



**Fig S2.** Modelo inicial conteniendo la proporción de las presas potenciales de los pingüinos papúa (*P. papua*) de Isla Ardley entre las temporadas de verano de 2019/20 a 2023/24.



**Figura S3.** Diferencias en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (arriba) y  $\delta^{15}\text{N}$  (abajo) entre temporadas, y discriminados por sexo, correspondientes a muestras de pingüinos papúa (*P. papua*) de Isla Ardley entre las temporadas 2019/20 y 2023/24. Los valores están expresados en ‰.