

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL TIBURÓN BALLENA
(*Rhincodon typus*) ESTIMADA A PARTIR DE ADN MITOCONDRIAL

Nicolle Alejandra Saavedra Valderrama

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

Sergio A. Marchant Rojas

Doctor en Ciencias Biológicas

Codirectora

Dalia C. Barragán Barrera

Doctora en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Biología

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, a mis padres y a mi hermano por el apoyo durante el desarrollo de mi carrera.

También agradezco a mis amigos y compañeros por las vivencias de estos inolvidables años de universidad, por la paciencia y por el apoyo que me brindaron hasta el final.

A mi director y co-directora de trabajo de grado, por dedicar su tiempo, experiencia y conocimiento en la guía de mi proyecto.

A los miembros del Laboratorio de Laboratorio de Fisiología, Genómica y Transcriptómica por su tiempo y valiosos aportes.

A la Fundación Malpelo y Otros Ecosistemas Marinos por las muestras suministradas para desarrollar este proyecto.

A Alejandra Duarte de la Fundación Malpelo y Otros Ecosistemas Marinos por el tiempo y el conocimiento brindado.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN.....	9
1. OBJETIVOS.....	13
1.1 Objetivo General.....	13
1.2 Objetivos Específicos.....	13
2. METODOLOGÍA.....	14
2.1 Área de estudio, extracción de ADN y secuenciación.....	14
2.1.1 Área de estudio y recolección de muestras.....	14
2.1.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación.....	15
2.1.3 Procesamiento bioinformático y alineamiento de secuencias.....	16
2.2 Análisis de datos.....	17
2.2.1 Caracterización de la estructura genética.....	17
2.2.2 Estimación de la diversidad genética.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1 Área de estudio, extracción de ADN y secuenciación.....	19
3.1.1 Área de estudio y recolección de muestras.....	19
3.1.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación.....	20
3.2 Análisis de datos.....	20
3.2.1 Caracterización de la estructura genética.....	21
4. DISCUSIÓN.....	29
4. CONCLUSIONES.....	33

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENETICA DE TIBURON BALLENA	4
6. RECOMENDACIONES (OPCIONAL)	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

Lista de Tablas

Tabla 1. Muestras colectadas en la Santuario	19
Tabla 2. Comparación de modelos de estructura	22
Tabla 3. Resultados de análisis Pairwise	24
Tabla 4. Medidas de diversidad genética.....	26
Tabla 5. Datos de diversidad genética	28

Lista de Figuras

Figura 1. Localidades (Puntos) de colecta	15
Figura 2. Mapa de localidades de donde	21
Figura 3. Red de haplotipos para el tiburón ballena.....	25

Resumen

Título: Diversidad y estructura genética de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) estimada a partir de ADNmt*

Autor: Nicolle Alejandra Saavedra Valderrama **

Palabras Clave: *Rhincodon typus*, ADNmt, Genética poblacional, Diversidad genética.

Descripción: Este trabajo de investigación constituye el primer estudio genético del tiburón ballena (*Rhincodon typus*) en Colombia, caracterizando su diversidad y estimando su estructura genética poblacional a nivel global mediante el análisis de la región control del ADNmt. A partir de muestras provenientes del Santuario de Fauna y Flora Malpelo (Pacífico Colombiano) y una base de datos global. Se identificó una estructura poblacional significativa que define cuatro unidades poblacionales genéticamente diferenciadas: Atlántico, Índico, Pacífico Occidental y Pacífico Oriental. Los individuos del SFFM fueron determinados como parte del Pacífico Oriental, indicando conectividad con poblaciones de Panamá y México. Los altos valores de diversidad haplotípica y la baja diversidad nucleotídica encontrados sugieren una expansión poblacional reciente. Estos resultados subrayan la importancia del Corredor Marino del Pacífico Este Tropical (CMAR) y la necesidad de estrategias de conservación regionales coordinadas para esta especie en peligro de extinción.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Sergio Andrés Marchant Rojas. Doctor en Ciencias Biológicas. Codirectora: Dalia Barragán Barrera. Doctora en Ciencias Biológicas.

Abstract

Title: Genetic structure and diversity of the whale shark (*Rhincodon typus*) estimated from mtDNA*

Author: Nicolle Alejandra Saavedra Valderrama**

Key Words: *Rhincodon typus*, mtDNA, Population genetics, Genetic diversity.

Description: This project constitutes the first genetic study of the whale shark (*Rhincodon typus*) in Colombia, not only characterizing the genetic structure for the species but also estimating their genetic diversity in a global scale analyzing the Control Region of the mtDNA. From samples collected in Malpelo Fauna and Flora Sanctuary (Colombian Pacific) and global data sets. We identified a significative population structure that defined four population units genetically differentiated: Atlantic, Indic, east Pacific and finally West Pacific. Individuals sampled from the MFFS, were determined to be part of the East Pacific group, indicating connectivity with populations from Mexico and Panama. The high haplotypic and nucleotidic diversity values suggest a recent population expansion for the species. The results found in this study highlight the importance of marine corridors like CMAR and the need to create and carry out strategies for the conservation of endangered species on a regional level.

* Degree Work

** Faculty of Science. Biology Mayor. Director: Sergio Andrés Marchant Rojas. Doctor in Biological Science.

Codirectora: Dalia Barragán Barrera. Doctor in Biological Science.

Introducción

El tiburón ballena (*Rhincodon typus*) es conocido como el pez más grande del mundo, con un tamaño máximo reportado de 18.8m (McClain et al., 2015) y registros que indican que puede alcanzar hasta 20 metros de longitud (Hsu et al., 2014). Pertenece a la familia Rhincodontidae y es el único representante del género *Rhincodon* (L. J. V Compagno, 1984). Se trata de una especie altamente migratoria (L. J. V Compagno, 1984; Eckert & Stewart, 2001; Rowat & Engelhardt, 2007), con un rango distribucional circunglobal (Martin, 2007; Rowat & Brooks, 2012) que se extiende a lo largo de mares cálidos en zonas tropicales (30° N a 35°S) (Compagno, 2001) en los océanos Atlántico, Índico y Pacífico. La especie tiende a formar agregaciones que pueden ser anuales o estar asociadas a factores estacionales como la disponibilidad de presas (Norman, 2004). No obstante, no se ha establecido un patrón en la composición de estas agregaciones, ya que pueden observarse agrupaciones de juveniles, o de adultos del mismo sexo (Compagno, 2001).

El tiburón ballena está catalogado como una especie en peligro por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés), con una disminución estimada del 50% en su población global durante los últimos 75 años (Pierce & Norman, 2016). Las principales amenazas para su supervivencia incluyen la captura incidental por pesquerías que operan en zonas de agregación, colisiones con embarcaciones, turismo no regulado y la creciente demanda de productos derivados de esta especie, como aletas, carne y aceite (Chen & Phipps, 2002; Ibarra-García et al., 2017). Además, debido al lento crecimiento y baja tasa de maduración, esta especie es

especialmente vulnerable a la sobreexplotación, lo que dificulta los esfuerzos para su conservación (Cortés, 2000; Vignaud et al., 2014).

A pesar de ser considerada una especie carismática, el conocimiento sobre la biología, ecología y comportamiento sigue siendo limitado. La literatura científica existente se centra principalmente en datos de distribución y morfometría a escala local, con escasas observaciones sobre su alimentación y reproducción (Compagno, 1984). En este contexto, los análisis genéticos poblacionales surgen como una herramienta fundamental para comprender la estructura y conectividad de sus poblaciones. Sin embargo, el estudio genético de especies marinas como el tiburón ballena enfrenta desafíos significativos, principalmente por la dificultad logística para localizar y muestrear individuos en el océano (Kelley et al., 2016); los primeros estudios genéticos de la especie se basaron en muestras obtenidas de individuos solitarios hallados incidentalmente o enredados en redes de pesca (Castro et al., 2007; Vignaud et al., 2014; Yagishita et al., 2020). Posteriormente, el descubrimiento de sitios de agregación predecibles en ciertas zonas costeras (Norman et al., 2017) permitió ampliar la escala de investigación y fortalecer los datos sobre su conectividad genética.

El Santuario de Fauna y Flora (SFF) Malpelo representa un sitio estratégico para el estudio de especies marinas. Esta área fue declarada SFF en 1995 por Parques Nacionales Naturales de Colombia, reconocida como Patrimonio Natural de la Humanidad por la UNESCO desde el 2006, más recientemente en 2020 añadida en la lista verde de la IUCN como área protegida modelo (IUCN, 2020). Malpelo forma parte, junto con otras islas como Galápagos (Ecuador), Coco (Costa Rica), Coiba (Panamá) y Gorgona (Colombia), el Corredor Marino del Pacífico Este Tropical (CMAR). A su vez, al

ser un punto de convergencia de corrientes marinas en mar abierto, ofrece condiciones favorables para la presencia de especies pelágicas, entre ellas túnidos, rayas y tiburones, incluyendo el tiburón ballena; sus aguas profundas albergan una alta diversidad de especies, lo que sugiere que esta área no solo funciona como sitio de alimentación, sino también como punto central dentro de las redes tróficas influenciadas por las corrientes oceánicas y la variabilidad climática (Soler et al., 2013). En consecuencia, se considera un sitio altamente productivo y estratégico para estudios de conectividad genética en especies migratorias.

En el caso particular del tiburón ballena, aunque se trata de una especie altamente migratoria (Hueter et al., 2013), los estudios genéticos han comenzado a revelar estructura entre cuencas. Si bien se han empleado marcadores moleculares como los microsatélites (Hardenstine et al., 2022; Schmidt et al., 2009; Vignaud et al., 2014) el análisis de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt) se ha consolidado como la principal herramienta para estos estudios, permitiendo comparaciones entre cuencas oceánicas (Castro et al., 2007; Guzman et al., 2022; Hardenstine et al., 2022; Meekan et al., 2017; Ramírez-Macías et al., 2012; Sigsgaard et al., 2016; Vignaud et al., 2014; Yagishita et al., 2020). A partir de estudios genéticos y de distribución, se han planteado tres hipótesis principales sobre su estructura poblacional: (1) una baja estructura poblacional con alta conectividad, diferenciando dos unidades poblacionales principales (Indo-Pacífico y Atlántico) sin descartar un posible flujo genético entre ellos, propuesta por Castro et al. (2007), respaldada por Schmidt et al. (2009), Vignaud et al. (2014), Hardenstine et al. (2022); (2) la existencia de una única metapoblación global con capacidad de desplazamiento ilimitado entre océanos, planteado por Sequeira et al.

(2013); y (3) una posible sub-estructuración entre las poblaciones del océano Índico y el Pacífico oriental, además de la estructura frente al océano Atlántico sugerida por Yagishita et al. (2020). Aunque la evidencia apunta a cierta diferenciación, ningún estudio descarta la posibilidad de flujo genético, dada la ausencia de barreras físicas que impidan el desplazamiento de individuos entre las cuencas oceánicas (Hueter et al., 2013). Por ello, la comunidad científica coincide en que es prioritario ampliar el número de muestras e incluir áreas geográficas poco exploradas para refinar el conocimiento actual.

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo determinar el grado de diferenciación genética y caracterizar la estructura genética entre poblaciones de tiburón ballena en el Pacífico Colombiano, a partir de muestras colectadas en el SFF Malpelo, comparándolas con otras poblaciones a nivel mundial. Para ello, se realizaron análisis comparativos de secuencias de la Región Control del ADNmt, obtenidas tanto de GenBank (provenientes de distintas regiones del mundo) como de las muestras colectadas localmente. Esta investigación busca aportar información novedosa sobre la conectividad de la especie en la región, generando bases científicas para el desarrollo de estrategias eficaces de gestión y conservación a nivel nacional y regional.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la diversidad y estructura genética del tiburón ballena (*Rhincodon typus*) a nivel global, determinando el posicionamiento de individuos del Santuario de Flora y Fauna Malpelo del Pacífico Colombiano en el contexto mundial, a partir del análisis secuencias de la región control del ADN mitocondrial.

1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la estructura genética poblacional del tiburón ballena (*R. typus*) en su rango de distribución.

- Estimar la diversidad genética presente en las poblaciones de tiburón ballena (*R. typus*) del Pacífico Colombiano respecto a otras poblaciones globales.

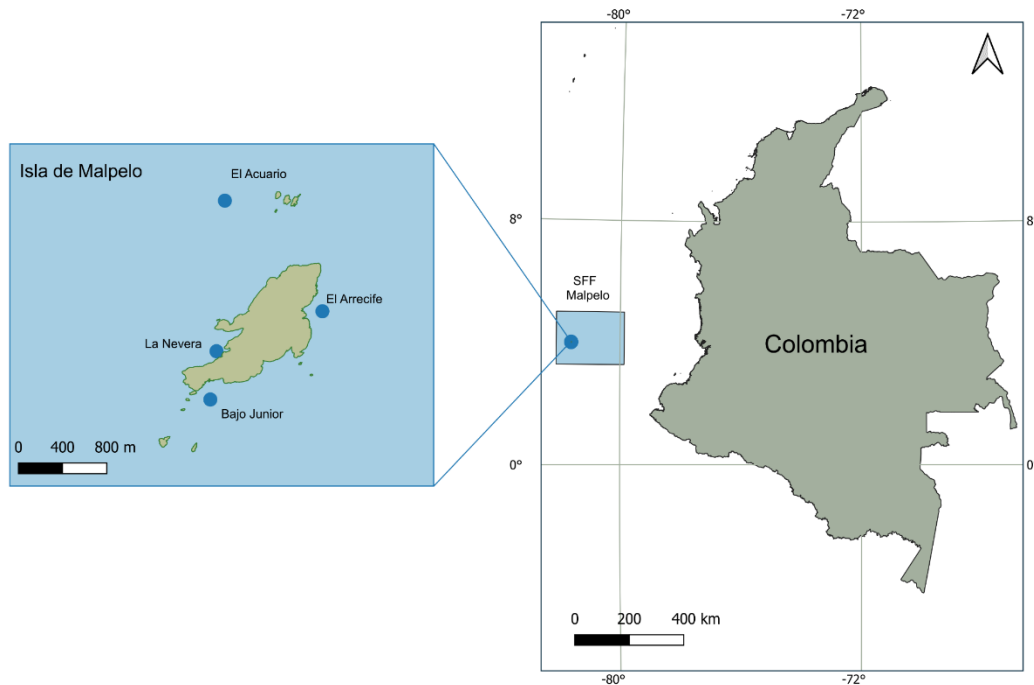
2. Metodología

2.1 Área de estudio, extracción de ADN y secuenciación.

2.1.1 Área de estudio y recolección de muestras.

Se obtuvieron muestras de tejido de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) en las inmediaciones del Santuario de Fauna y Flora Malpelo (Colombia, Pacífico Colombiano). La recolección fue realizada por la Fundación Malpelo y Otros Ecosistemas Marinos durante expediciones llevadas a cabo en el área protegida durante 2015, 2017, 2018 y 2019. El muestreo se concentró en cuatro sitios de buceo: El arrecife, La Nevera, El Bajo Junior y El Acuario (Figura 1). Las muestras fueron colectadas de individuos de nado libre en apnea o buceo. El sexo y estadio de vida fue identificado a través de observación directa en campo. Inmediatamente después de su obtención, las biopsias de tejido fueron preservadas en etanol al 70% y posteriormente refrigeradas.

Figura 1. Localidades (Puntos) de colecta de las muestras de tiburón ballena (*Rhicondon typus*) en el Santuario de Fauna y Flora Malpelo (Pacífico Colombiano).



2.1.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación.

La fase de laboratorio y el análisis de datos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Laboratorio de Fisiología, Genómica y Transcriptómica.

Se extrajo ADN genómico de las 16 muestras de tejido utilizando los kits comerciales DNeasy Blood and Tissue y DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. La extracción se confirmó cuantificando la concentración en NanoPhotometer™ NP80. Posteriormente se amplificó una secuencia parcial de la región control del ADNmt (CR-ADNmt) mediante PCR. Se utilizaron los cebadores WSCR1-F (5'-TTGGCTCCCAAAGCCAAGATTCTTC-3') y

WSCR2-R (5'-CTTAATATTTAT TGTTCTGGTTTCAGCC-3') diseñados por Castro et al. (2007).

La reacción se preparó en un volumen final de 20 μ L, compuesto por: 10 μ L de buffer 10x, 0,8 μ L de MgCl₂ (50mM), 1 μ L de dNTPs (4mM), 2 μ L de Taq polimerasa, 0,5 μ L de cada cebador y 2 μ L de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, seguida de 35 a 40 ciclos de: 95 °C durante 45 s, 50 °C por 60 s y 72 °C por 90 s; finalizando con una extensión a 72 °C por 10 min. El éxito de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Finalmente, la secuenciación se realizó en un equipo PromethION P2 utilizando el kit Rapid barcoding 96 (SQL-RBK 114.96).

2.1.3 Procesamiento bioinformático y alineamiento de secuencias.

Los datos crudos generados por el secuenciador PromethION P2 fueron procesados para la decodificación de bases (basecalling) utilizando el software Dorado (v.1.1.1). Posteriormente, las secuencias resultantes fueron demultiplexadas y asignadas a cada individuo mediante el flujo de trabajo wf-amplicon (v.1.1.4), disponible en el paquete EPI2ME Labs. Finalmente, para construir el conjunto de datos definitivo, las secuencias de cada muestra fueron alineadas con las secuencias de referencia obtenidas de GenBank, empleando el algoritmo ClustalW implementado en el software BioEdit (v.7.7.1).

2.2 Análisis de datos.

Con el propósito de responder a los objetivos planteados, se diseñó un análisis comparativo a partir de un conjunto de datos denominado global, que incorporó secuencias de la región control del ADNmt de *R. typus* disponibles en bases de datos públicas. Este conjunto incluyó registros procedentes de Panamá, Australia, la península de Yucatán y Baja California en México, el Golfo de Adén, India, Taiwán, Japón, Filipinas, Sudáfrica, además de las nuevas secuencias de Colombia.

2.2.1 Caracterización de la estructura genética.

Para caracterizar la estructura genética poblacional de *Rhincodon typus*, se evaluó la distribución jerárquica de la variación genética mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). El análisis de AMOVA se ejecutó en el software ARLEQUIN (v.3.5.1.2), descomponiendo la varianza genética total en componentes atribuibles a diferencias entre grupos de poblaciones, entre poblaciones dentro de los grupos y dentro de las poblaciones.

Con el fin de identificar la estructura biogeográfica más probable, se definieron y compararon cuatro hipótesis de agrupamiento a priori, basadas en estudios genéticos previos y las principales cuencas oceánicas: La primera hipótesis (Supuesto A) consideró una división en dos grupos: Océano Atlántico frente al Indo-Pacífico. La segunda (Supuesto B) planteó una separación en tres grupos correspondientes a las grandes cuencas: Atlántico, Índico y Pacífico. Una tercera hipótesis (Supuesto C) propuso una estructura de cuatro grupos, manteniendo al Atlántico y al Índico como unidades y subdividiendo al Pacífico en Oriental y Occidental. Finalmente, la cuarta (Supuesto D)

evaluó un escenario más detallado de seis grupos, separando Atlántico, Índico, Pacífico Occidental, Pacífico Oriental, un quinto grupo conformado por Arabia Saudita y Yibuti, y un sexto grupo para Qatar.

La significancia estadística de los índices de fijación (FCT, FSC, y FST) se evaluó mediante 1,000 permutaciones. Se seleccionó el modelo de agrupación que maximizará la variación entre grupos (mayor FCT significativo), que representaría la división poblacional más robusta. Una vez identificado el escenario de agrupación más probable, se cuantificó la diferenciación específica entre cada par de grupos genéticos mediante el cálculo de FST pareados (pairwise FST), implementado también en ARLEQUIN (v.3.5.1.2). Para evitar errores tipo I en comparaciones múltiples, se aplicó la corrección de Bonferroni, ajustando el nivel de significancia en los análisis de FST siguiendo la fórmula $\alpha_{\text{corr}} = \alpha/m$.

Finalmente, para explorar las relaciones entre los haplotipos y su distribución geográfica, se construyó una red de haplotipos utilizando el método de Median-Joining en el software PopART (v.1.7; Clement et al., 2000).

2.2.2 Estimación de la diversidad genética.

Con el objetivo de cuantificar la variabilidad genética, se estimaron los índices de diversidad estándar: número de haplotipos (Nh), diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π) y número de sitios segregantes (S). Los haplotipos fueron definidos en DnaSP v6 a partir de variaciones de sitios segregantes.

Estos cálculos se realizaron a dos niveles: (i) para cada una de las localidades de muestreo individuales y (ii) para los grupos poblacionales que resulten definidos por el

escenario de agrupación más robusto identificado en el AMOVA. Todos los índices de diversidad se calcularon en ARLEQUIN v.3.5.1.2.

3. Resultados

3.1 Área de estudio, extracción de ADN y secuenciación.

3.1.1 Área de estudio y recolección de muestras.

Un total de 16 muestras de *Rhincodon typus* fueron colectadas en las inmediaciones del Santuario de Fauna y Flora Malpelo (Figura 1). En campo se logró identificar el sexo de 13 especímenes: 11 hembras y 2 machos. En cuanto a la estructura etaria, se identificaron 6 juveniles y 5 adultos (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras colectadas en la Santuario de Fauna y Flora Malpelo (Pacífico Colombiano), indicando el punto de buceo donde fueron colectadas, el sexo, el tamaño y el estadio de desarrollo de cada individuo. El símbolo (-) señala los casos en los que no fue posible determinar alguno de estos datos.

Muestra	Lugar	Fecha muestreo	Tamaño(m)	Sexo	Estadio
1	Acuario	08/09/2015	8	M	Juvenil
2	Acuario	08/09/2015	8	F	Juvenil
3	Arrecife	09/09/2015	5	F	Juvenil
4	Nevera	09/09/2015	11	F	Adulto
5	Acuario	11/09/2015	10	M	Adulto
6	Acuario	12/09/2015	7	F	Juvenil
7	Acuario	14/09/2015	7	F	Juvenil
8	Nevera	12/06/2017	6	F	-
9	Nevera	13/06/2017	6	F	-

10	Acuario	13/06/2017	10	-	-
11	Junior	26/07/2018	6	F	-
12	Arrecife	26/07/2018	6	F	-
13	-	28/05/2019	-	F	Adulto
14	-	02/06/2019	-		Adulto
15	-	01/06/2019	-	-	Adulto
16	Arrecife	13/08/2019	4	F	Juvenil

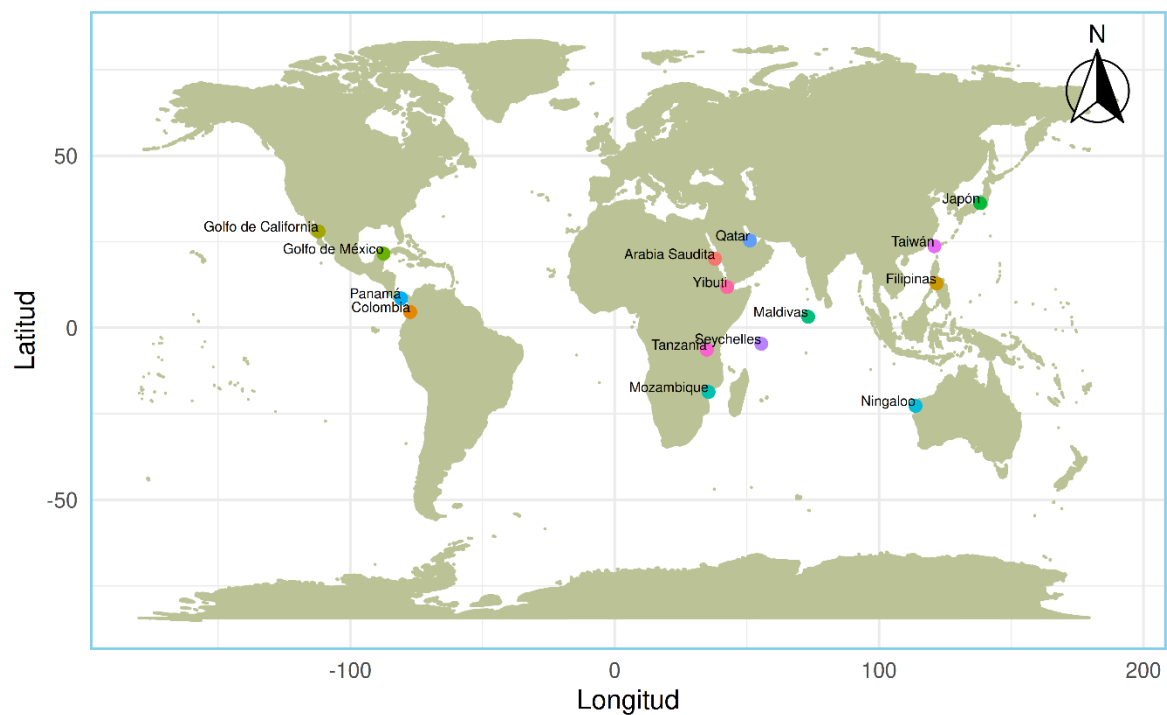
3.1.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación.

Se extrajo ADN de las 16 muestras enviadas por la Fundación Malpelo y Otros Ecosistemas Marinos, con concentraciones de ADN que van de los 1.25 ng a los 28.2 ng. De estas, 12 muestras fueron exitosamente amplificadas mediante PCR y posteriormente secuenciadas, recuperando fragmentos parciales de la región control del ADNmt de entre 409-509 pb.

3.2 Análisis de datos.

En total se descargaron 836 secuencias de GenBank, provenientes de distintas partes del mundo. A ellas se sumaron 12 secuencias parciales de la región control provenientes del Pacífico Colombiano (Figura 2).

Figura 2. Mapa de localidades de donde provienen las muestras de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) usadas en este estudio.



Con el propósito de responder a los objetivos planteados, se diseñó un análisis comparativo a partir de un conjunto de datos denominado global, que incorporó secuencias de la región control del ADNmt de *R. typus* disponibles en bases de datos públicas. Este conjunto incluyó registros procedentes de Panamá, Australia, la península de Yucatán y Baja California en México, el Golfo de Adén, India, Taiwán, Japón, Filipinas, Sudáfrica, además de las nuevas secuencias de Colombia.

3.2.1 Caracterización de la estructura genética.

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) reveló una estructura genética global fuerte y estadísticamente significativa ($F_{ST} = 0.175$, $p < 0.0001$). Al comparar las cuatro hipótesis de agrupación propuestas, el modelo que mejor explicó la distribución de la

varianza genética fue el Supuesto C, que define cuatro unidades poblacionales: Atlántico, Índico, Pacífico Occidental y Pacífico Oriental. Este escenario fue el único que arrojó un valor de FCT significativo (FCT= 0.173, $p = 0.044$), lo que indica que el 17.3% de la variación genética total se debe a la diferenciación entre estas cuatro grandes regiones biogeográficas (Tabla 2).

La diferenciación entre poblaciones dentro de cada una de estas regiones fue baja y no significativa (FSC= 0.0025, $p = 0.194$), reforzando que la principal barrera al flujo genético se ubica entre estas cuatro unidades. Aunque la diferenciación entre los grupos es clara, la mayor parte de la diversidad genética (82.47 %) se encontró dentro de las poblaciones locales.

Tabla 2. Comparación de modelos de estructura genética para el tiburón ballena (*Rhincodon typus*) mediante Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Se presentan los resultados para las cuatro hipótesis de agrupación: A) considera dos grupos: Atlántico e Indo Pacífico; B) considera las tres cuencas oceánicas como división de las poblaciones; C) considera cuatro grupos: Atlántico, Pacífico oriental, Pacífico occidental e Índico; D) considera seis unidades poblacionales: Atlántico, Pacífico oriental, Pacífico occidental, Índico, y Arabia Saudita y Yibuti como una quinta unidad poblacional y Qatar como la sexta. La tabla muestra el porcentaje de variación explicado entre los grupos, el índice de fijación (FCT) y su significancia estadística (p -value). El modelo con el mayor soporte estadístico se resalta en negrita.

Variación	Variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
A.	Entre grupos	1736.175	11.79275	39.81	<i>FCT: 0.39806</i> <i>p: 0.13490</i>
	Entre poblaciones dentro de los grupos	123.472	0.10051	0.34	<i>FSC: 0.00564</i> <i>p: 0.01075</i>

	Entre poblaciones	14930.366	17.73203	59.85	<i>FST</i> : 0.39806 <i>p</i> : 0.00000
B:	Entre grupos	1787.742	3.96873	18.25	<i>FCT</i> : 0.18245 <i>p</i> : 0.08602
	Entre poblaciones dentro de grupos	71.906	0.05164	0.24	<i>FSC</i> : 0.00290 <i>p</i> : 0.19355
	Entre poblaciones	14930.366	17.73203	81.52	<i>FST</i> : 0.18482 <i>p</i> : 0.00000
C	Entre grupos	1811.970	3.72487	17.32	<i>FCT</i>: 0.17323 <i>p</i>: 0.04399
	Entre poblaciones dentro de grupos	47.678	0.04523	0.21	<i>FSC</i> : 0.00254 <i>p</i> : 0.19355
	Entre poblaciones	14930.366	17.73203	82.47	<i>FST</i> : 0.17534 <i>p</i> : 0.00000
D	Entre grupos	1869.807	2.63994	12.89	<i>FCT</i> : 0.12893 <i>p</i> : 0.05279
	Entre poblaciones dentro de grupos	250.380	0.22442	1.10	<i>FSC</i> : 0.01258 <i>p</i> : 0.01857
	Entre poblaciones	14669.825	17.61083	86.01	<i>FST</i> : 0.13989 <i>p</i> : 0.00000

Los análisis de Pairwise Fst (Tabla 3) mostraron que el Atlántico difiere significativamente de las otras tres regiones (Índico, Pacífico oriental y Pacífico occidental). Al comparar el Índico con el Pacífico Oriental, se observa una diferenciación

antes y después de la corrección de Bonferroni. Aunque la diferencia no es tan marcada como en el caso del Atlántico, sigue siendo significativa. Por el contrario, en el Pacífico Occidental no se presentan diferencias con respecto al Pacífico oriental o al Índico.

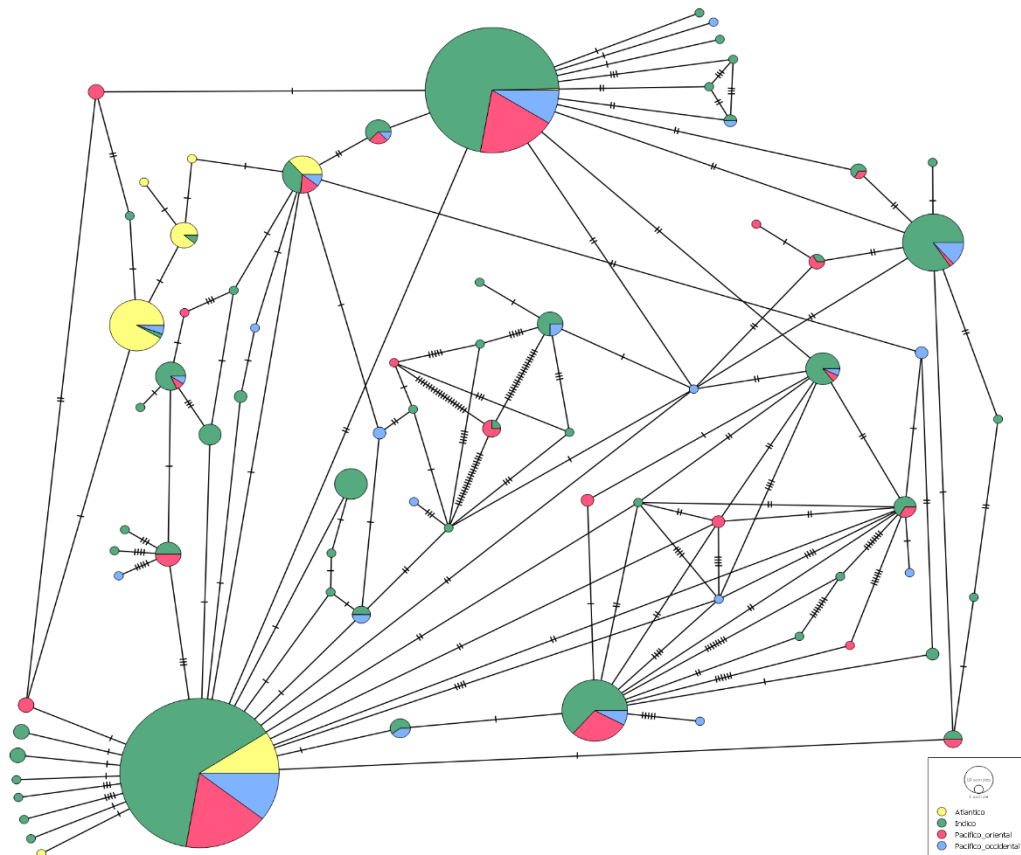
Tabla 3. Resultados de análisis Pairwise Fst para cada una de las poblaciones identificadas de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) en el AMOVA. Por debajo de la diagonal se muestran los resultados de Pairwise Fst basado en el método de distancia, mientras que por encima de la diagonal se muestran los valores con la corrección de Bonferroni. Valores significativos ($p < 0.05^*$) se muestran en negrita acompañados por un *.

	Atlántico	Índico	Pacífico Oriental	Pacífico Occidental
Atlántico	-	0.00000*	0.00000*	0.00000*
Índico	0.42026*	-	0.00293*	0.05664
Pacífico Oriental	0.34309*	0.00790*	-	-0.0320
Pacífico Occidental	0.32353*	0.00697	0.00164	-

La red de haplotipos, construida a partir de 73 secuencias únicas, no evidenció una clara diferenciación entre las regiones geográficas (Figura 3). Los haplotipos más frecuentes y centrales fueron compartidos entre las cuatro cuencas estudiadas: Atlántico (amarillo), Índico (rojo), Pacífico Oriental (verde) y Pacífico Occidental (azul); se observaron diferencias en las frecuencias de estos haplotipos compartidos entre las regiones. Aquellos haplotipos centrales y de mayor frecuencia global se componen

mayoritariamente por la población del Océano Índico. La topología general de la red se caracteriza por la presencia de múltiples estructuras en forma de estrella, donde numerosos haplotipos de baja frecuencia se conectan directamente a un haplotipo central de alta frecuencia. Finalmente, se observaron múltiples haplotipos derivados (ubicados en las puntas de la red) que eran exclusivos de una única región geográfica, estos resultados.

Figura 3. Red de haplotipos para el tiburón ballena (*Rhincodon typus*), usando el método de median-joining para los 73 haplotipos encontrados a partir de las secuencias de la CR-ADNmt. Cada círculo representa un haplotipo diferente y los colores corresponden a las cuatro unidades poblacionales identificadas (amarillo: Atlántico, verde: Índico, rojo: Pacífico oriental, azul: Pacífico occidental). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo y las marcas en las líneas representan el número de pasos mutacionales entre un haplotipo y otro.



En total, el análisis de las 848 secuencias reveló un total de 73 haplotipos. Para Colombia, se identificaron cinco haplotipos, incluyendo uno exclusivo para la zona. La diversidad genética para el conjunto de datos global fue alta, con una diversidad haplotípica (h) de 0.7947 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.0480. A nivel de las 15 localidades de muestreo, los índices de diversidad genética mostraron una considerable variación (Tabla 4). La diversidad haplotípica (h) osciló entre un valor mínimo de 0.5758 en Colombia y un máximo de 0.8864 en Filipinas. La diversidad nucleotídica (π) también fue variable, registrando su valor más bajo en Arabia Saudita ($\pi = 0.0229$) y el más alto en Colombia ($\pi = 0.0967$).

Tabla 4. Medidas de diversidad genética en cada localidad, donde n : número de secuencias, N_h : número de haplotipos, h : diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica y s : sitios segregantes.

Lugar	n	N_h	h	π	s
Arabia Saudita	84	9	0.7217 0.0290	+/- 0.022942 +/- 0.011478	4.598098
Yibuti	76	19	0.7554 0.0392	+/- 0.038681 +/- 0.018849	9.181133
Qatar	45	7	0.7283 0.0490	+/- 0.028000 +/- 0.014045	2.286903
Tanzania	57	11	0.7575 0.0370	+/- 0.032054 +/- 0.015826	4.987564
Mozambique	62	18	0.7996 0.0431	+/- 0.053839 +/- 0.026203	11.285567

Seychelles	38	10	0.8151	+/-	0.044693	+/-	8.330187
			0.0450		0.022096		
Maldivas	12	8	0.8485	+/-	0.050169	+/-	10.265318
			0.1039		0.026458		
Ningaloo	162	28	0.7971	+/-	0.034368	+/-	12.540353
			0.0217		0.016671		
Filipinas	33	15	0.8864	+/-	0.066378	+/-	11.087853
			0.0418		0.032726		
Taiwán	26	11	0.7969	+/-	0.033709	+/-	12.054639
			0.0620		0.017051		
Japón	28	6	0.7460	+/-	0.030762	+/-	2.569732
			0.0571		0.015571		
Golfo de California	118	20	0.7836	+/-	0.046061	+/-	11.602541
			0.0256		0.022274		
Golfo de México	80	8	0.6978	+/-	0.073347	+/-	2.422784
			0.0310		0.035541		
Colombia	12	5	0.5758	+/-	0.096656	+/-	13.907850
			0.1634		0.050491		
Panamá	15	4	0.7714	+/-	0.026437	+/-	2.767900
			0.0585		0.013990		

El análisis de la diversidad para los cuatro grupos poblacionales definidos también reveló patrones específicos (Tabla 5). El grupo del Pacífico Occidental mostró la mayor

diversidad haplotípica ($h = 0.8142$), mientras que el del Atlántico presentó la más baja ($h = 0.6978$). Se observó un patrón discordante entre los dos índices de diversidad.

Por otra parte, el grupo del Atlántico, a pesar de tener la menor cantidad de haplotipos ($N_h = 8$) y la menor diversidad haplotípica, registró la diversidad nucleotídica más alta de todos los grupos ($\pi = 0.0733$). Mientras que el grupo del Índico, que contenía el mayor número de haplotipos ($N_h = 52$), presentó la diversidad nucleotídica más baja ($\pi = 0.0297$).

Tabla 5. Datos de diversidad genética de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) para cada unidad poblacional, donde n: número de secuencias, N_h : número de haplotipos, h : diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica y s: sitios segregantes.

Lugar	n	N_h	h	π	s
Atlántico	80	8	0.6978 +/-	0.073347	2.422784
			0.0310	+/-	
Índico	536	52	0.7554 +/-	0.035541	15.742484
			0.0392	0.029730	
				+/-	
				0.014377	
Pacífico Oriental	145	22	0.7771 +/-	0.046398	13.512303
			0.0241	+/-	

Pacífico	87	23	0.8142	+/-	0.042633	12.705053
Occidental			0.0327		+/-	
					0.020748	

4. Discusión

Este estudio constituye la primera descripción de la diversidad genética del tiburón ballena en Colombia mediante el análisis de ADNmt, específicamente en el Santuario de Fauna y Flora Malpelo. Las secuencias obtenidas constituyen las primeras muestras provenientes del país y aportan información de gran relevancia para la comprensión de la estructura genética de la especie. Si bien el tamaño de muestra es reducido, es una limitación común en estudios con grandes vertebrados marinos debido a sus dificultades inherentes en la recolección de datos (Kelley et al., 2016), los resultados alcanzados representan un avance significativo para la región, con implicaciones relevantes para la conservación a escala local y regional.

El análisis de AMOVA reveló una estructura genética compleja, donde la mayoría de la diferencia se encuentra entre poblaciones (82.47%), mientras que la diferenciación dentro de estas fue baja (0.21%). Este patrón ha sido documentado en otras especies marinas, las cuales muestran variación genética entre poblaciones y una diferencia apenas notable dentro de las mismas, derivado de poblaciones grandes y capacidad de dispersión (Palumbi, 1994). Asimismo, el valor de FCT significativo (0.17323; $p=0.04399$) sugiere la existencia de barreras al flujo genético, ya sean oceanográficas (corrientes,

frentes térmicos), geográficas o derivadas de patrones de comportamiento reproductivo (Waples & Gaggiotti, 2006).

Particularmente para el tiburón ballena, su amplia distribución se ha determinado a través de estudios de telemetría y marcaje satelital, reportando desplazamientos de larga escala, con trayectorias de más de 13,000 km en 37 meses, abarcando tanto aguas superficiales (28–32°C) como capas profundas de hasta 240 m, donde la temperatura desciende a 10°C (Eckert & Stewart, 2001). Por otro lado, en el Pacífico Oriental Tropical, se ha observado un patrón de segregación sexual, donde los machos se desplazan hacia el norte y las hembras hacia el sur, con el Santuario de Fauna y Flora Malpelo funcionando como un punto de congregación estratégico (Bessudo et al., 2016). De manera complementaria, en el Atlántico se han identificado agregaciones estacionales en la península de Yucatán, con desplazamientos superiores a 7,200 km en menos de seis meses, posiblemente asociados a procesos reproductivos (Hueter et al., 2013), y en São Pedro y São Paulo se han identificado individuos adultos con evidencias de apareamiento (Macena & Hazin, 2016). Estos hallazgos sugieren posibles patrones de filopatria reproductiva que podrían contribuir a la estructura genética observada.

Los valores de F_{ST} indican que los individuos muestreados en el Santuario de Fauna y Flora Malpelo forman una misma unidad poblacional con los muestreados en México y Panamá (Pacífico Oriental). Esta unidad está claramente diferenciada de las poblaciones del Pacífico Occidental y del Índico, lo que sugiere que los tiburones ballena del Pacífico Este Tropical se desplazan potencialmente de manera exclusiva entre las áreas del CMAR, reforzando la importancia de este corredor biológico que no se trata solamente del Santuario de Flora y Fauna Malpelo, sino que incluye áreas clave como el

Archipiélago de Galápagos (Ecuador), la Isla Coco (Costa Rica) y la Isla Coiba (Panamá), cubriendo alrededor de 21 millones de km² (Enright et al., 2021), conectados por corrientes que proporcionan una diversa gama de condiciones oceanográficas en toda la región y altos niveles de productividad y diversidad (Fiedler & Lavín, 2017). En este sentido, los hallazgos subrayan la necesidad de un manejo regional coordinado que considere la conectividad biológica entre estas áreas, así como la relevancia de incluir otras áreas marinas de México, como el Archipiélago de Revillagigedo (Ramírez-Macías et al., 2012).

En contraste, las poblaciones del Pacífico Occidental y el Índico no mostraron diferenciación significativa, lo que resulta consistente con estudios de telemetría que documentan migraciones de 13.000 a 20.000 km (Eckert & Stewart, 2001; Guzman et al., 2022). Esto sugiere un flujo genético mantenido entre ambas cuencas. Por su parte, el Atlántico presentó valores de diferenciación significativos antes y después de la corrección de Bonferroni, lo que indica que su población está genéticamente separada. Este patrón coincide con lo señalado por Castro et al. (2007), Meekan et al. (2017) y Yagishita et al. (2020) mediante análisis de CR-ADNmt; por Schmidt et al. (2009) utilizando microsatélites; por Hardenstine et al. (2022) y Vignaud et al. (2014) empleando tanto ADNmt como microsatélites; y por Toha et al. (2020) utilizando COI.

La red de haplotipos (Figura 3) mostró una organización estrellada, con haplotipos centrales de alta frecuencia (H1, H2) compartidos entre las cuatro unidades poblacionales, lo que evidencia una ancestralidad genética común. Este patrón podría explicarse por la baja tasa de sustitución del genoma completo del tiburón ballena (Weber

et al., 2020), favoreciendo la conservación de estructuras genéticas ancestrales y resultando en haplotipos compartidos o poco diferenciados.

Además, las cuencas del Océano Índico y del Pacífico occidental muestran pocos pasos mutacionales entre sus haplotipos, lo que sugiere una diferenciación genética mínima entre los individuos de esas regiones (Toha et al., 2020). En contraste, los individuos del Pacífico Oriental presentan un mayor número de pasos mutacionales respecto a esas cuencas, y el Atlántico no solo evidencia esta diferenciación, sino que también exhibe un agrupamiento geográfico más marcado. Estos patrones respaldan los resultados obtenidos en el análisis de estructura poblacional, indicando que, aunque la mutación es lenta, los efectos acumulativos junto con aislamiento geográfico o barreras oceánicas pueden generar diferenciación cuando el tiempo o las distancias son suficientemente grandes.

La diversidad haplotípica encontrada es alta ($h = 0.76$) concuerda con valores reportados previamente, posiblemente por el alto número de haplotipos y la proporción de haplotipos únicos (alrededor del 30 %) distribuidos globalmente, donde el haplotipo H1, es compartido por 313 individuos (36.9 %), sugiriendo un intercambio genético ancestral entre cuencas, esto apoya la hipótesis de migraciones de largas distancias propuesta por Castro et al. (2007). La diversidad nucleotídica ($\pi = 0.048$), refleja una baja divergencia entre los haplotipos, un patrón típico de especies pelágicas abundantes con amplia distribución y longevidad (Avice et al., 1992; Kottillil et al., 2023).

La alta diversidad haplotípica, en conjunto con la baja diversidad nucleotídica y la estructura estrellada de la red de haplotipos sugieren que la especie atravesó un crecimiento poblacional reciente (Grant & Bowen, 1998) y explican los resultados del

AMOVA, donde en cada grupo poblacional se pueden encontrar los haplotipos más comunes, junto a haplotipos únicos de cada unidad geográfica, disminuyendo las diferencias dentro de los grupos (FSC: 0.01258).

En conjunto, los resultados indican que, si bien existe una conectividad global del tiburón ballena, existen unidades poblacionales diferenciadas cuya conservación requiere estrategias de manejo multinacionales. Para Colombia, las primeras secuencias de Malpelo proporcionan una línea base esencial y resaltan la necesidad de integrar esta región en esfuerzos del CMAR y en redes globales de monitoreo genético. Ampliar el muestreo en sitios poco explorados y combinar marcadores mitocondriales con datos nucleares fortalecerá la comprensión de la conectividad del tiburón ballena y permitirá diseñar estrategias de manejo más efectivas y adaptadas a su naturaleza altamente migratoria.

4. Conclusiones

Este estudio constituye la primera descripción de la diversidad genética del tiburón ballena en Colombia, proporcionando secuencias mitocondriales inéditas para el Santuario de Fauna y Flora Malpelo y estableciendo una línea base esencial para futuros estudios en el país.

Los análisis de F_{st} evidencian que los individuos del Pacífico Oriental (Santuario de Fauna y Flora Malpelo en Colombia, Panamá y México) forman una unidad poblacional diferenciada del Pacífico Occidental y del Índico, lo que sugiere

desplazamientos regulares de tiburones ballena entre las áreas del Corredor Marino del Pacífico Este Tropical (CMAR).

El Atlántico mostró una separación genética significativa respecto a las demás cuencas, corroborando estudios previos y destacando la existencia de unidades poblacionales diferenciadas a escala global.

La alta diversidad haplotípica global ($h = 0.76$) y la baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.048$), sugieren una expansión demográfica reciente a partir de un acervo genético ancestral común, lo cual es consistente con la baja tasa de sustitución del genoma del tiburón ballena (Weber et al., 2020).

6. Recomendaciones (Opcional)

Los resultados previamente visualizados, enfatizan en la necesidad de un manejo regional coordinado entre los países del CMAR e iniciativas globales de conservación, incluyendo la incorporación de áreas estratégicas como el Archipiélago de Revillagigedo en México.

Asimismo, se sugiere ampliar el muestreo en regiones poco exploradas y aumentar el tamaño de muestras en áreas críticas Incorporando a su vez marcadores nucleares y genómicos que permitan caracterizar con mayor precisión la estructura poblacional y los patrones de conectividad.

Referencias Bibliográficas

- Avise, J. C., Bowen, B. W., Lamb, T., Meylan, A. B., & Bermingham, E. (1992). *Mitochondrial DNA Evolution at a Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in the Testudines*. <https://academic.oup.com/mbe/article/9/3/457/1037261>
- Castro, A. L. F., Stewart, B. S., Wilson, S. G., Hueter, R. E., Meekan, M. G., Motta, P. J., Bowen, B. W., & Karl, S. A. (2007). Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology*, 16(24), 5183–5192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03597.x>
- Chen, V. Y., & Phipps, M. J. (2002). *Management and Trade of Whale Sharks in Taiwan A TRAFFIC East Asia REPORT*. <http://www.wow.org.tw>
- Compagno, L. V. J. (2001). Fishery and Aquaculture Economics and Policy Division. *Sharks of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date, Volume 2*.
- Compagno, L. J. V. (1984). *SHARKS OF THE WORLD An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date Part 1-Hexanchiformes to Lamniformes prepared by UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS* (Vol. 4, Issue 125).
- Cortés, E. (2000). Life History Patterns and Correlations in Sharks. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 299–344. <https://doi.org/10.1080/10408340308951115>

- Eckert, S. A., & Stewart, B. S. (2001). Telemetry and satellite tracking of whale sharks, *Rhincodon typus*, in the Sea of Cortez, Mexico, and the north Pacific Ocean. In *Environmental Biology of Fishes* (Vol. 60).
- Enright, S. R., Meneses-Orellana, R., & Keith, I. (2021). The Eastern Tropical Pacific Marine Corridor (CMAR): The Emergence of a Voluntary Regional Cooperation Mechanism for the Conservation and Sustainable Use of Marine Biodiversity Within a Fragmented Regional Ocean Governance Landscape. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.674825>
- Fiedler, P. C., & Lavín, M. F. (2017). Oceanographic Conditions of the Eastern Tropical Pacific. In *Coral Reefs of the World* (Vol. 8, pp. 59–83). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_3
- Grant, W. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. In *The American Genetic Association* (Vol. 89).
- Guzman, H. M., Collatos, C. M., & Gomez, C. G. (2022). Movement, Behavior, and Habitat Use of Whale Sharks (*Rhincodon typus*) in the Tropical Eastern Pacific Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.793248>
- Hardenstine, R. S., He, S., Cochran, J. E. M., Braun, C. D., Cagua, E. F., Pierce, S. J., Prebble, C. E. M., Rohner, C. A., Saenz-Agudelo, P., Sinclair-Taylor, T. H., Skomal, G. B., Thorrold, S. R., Watts, A. M., Zakroff, C. J., & Berumen, M. L. (2022). Pieces in a global puzzle: Population genetics at two whale shark aggregations in the western Indian Ocean. *Ecology and Evolution*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/ece3.8492>

- Hsu, H.-H., Joung, S. J., Hsun Hsu, H. A., Jeng Joung, S. A., Hueter C, R. E., & Ming Liu, K. B. (2014). *Age and growth of the whale shark (Rhincodon typus) in the north-western Pacific*. <https://doi.org/10.1071/MF1330>
- Hueter, R. E., Tyminski, J. P., & de la Parra, R. (2013). Horizontal Movements, Migration Patterns, and Population Structure of Whale Sharks in the Gulf of Mexico and Northwestern Caribbean Sea. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071883>
- Ibarra-García, E. C., Ortiz, M., Ríos-Jara, E., Cupul-Magaña, A. L., Hernández-Flores, Á., & Rodríguez-Zaragoza, F. A. (2017). The functional trophic role of whale shark (*Rhincodon typus*) in the northern Mexican Caribbean: network analysis and ecosystem development. *Hydrobiologia*, 792(1), 121–135. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-3049-3>
- Kelley, J. L., Brown, A. P., Therkildsen, N. O., & Foote, A. D. (2016). The life aquatic: Advances in marine vertebrate genomics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 17, Issue 9, pp. 523–534). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.66>
- Kottillil, S., Rao, C., Bowen, B. W., & Shanker, K. (2023). Phylogeography of sharks and rays: a global review based on life history traits and biogeographic partitions. *PeerJ*, 11. <https://doi.org/10.7717/peerj.15396>
- Macena, B. C. L., & Hazin, F. H. V. (2016). Whale shark (*Rhincodon typus*) seasonal occurrence, abundance and demographic structure in the mid-equatorialatlantic ocean. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164440>

- Martin, R. A. (2007). A review of behavioural ecology of whale sharks (*Rhincodon typus*). In *Fisheries Research* (Vol. 84, Issue 1, pp. 10–16). <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.11.010>
- McClain, C. R., Balk, M. A., Benfield, M. C., Branch, T. A., Chen, C., Cosgrove, J., Dove, A. D. M., Gaskins, L. C., Helm, R. R., Hochberg, F. G., Lee, F. B., Marshall, A., McMurray, S. E., Schanche, C., Stone, S. N., & Thaler, A. D. (2015). Sizing ocean giants: Patterns of intraspecific size variation in marine megafauna. *PeerJ*, 2015(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.715>
- Meekan, M., Austin, C. M., Tan, M. H., Wei, N. W. V., Miller, A., Pierce, S. J., Rowat, D., Stevens, G., Davies, T. K., Ponzio, A., & Gan, H. M. (2017). iDNA at sea: Recovery of whale shark (*Rhincodon typus*) mitochondrial DNA sequences from the whale shark copepod (*Pandarus rhincodonicus*) confirms global population structure. *Frontiers in Marine Science*, 4(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00420>
- Norman B. (2004). Review of the Current Conservation Concerns for the Whale Shark (*Rhincodon typus*), a Regional Perspective. Coast and Clean Seas Project 2127. In *Australian Government, Department of the Environment and Heritage, Canberra*.
- Norman, B. M., Holmberg, J. A., Arzoumanian, Z., Reynolds, S. D., Wilson, R. P., Rob, D., Pierce, S. J., Gleiss, A. C., De La Parra, R., Galvan, B., Ramirez-Macias, D., Robinson, D., Fox, S., Graham, R., Rowat, D., Potenski, M., Levine, M., McKinney, J. A., Hoffmayer, E., ... Morgan, D. L. (2017). Undersea constellations: The global biology of an endangered marine megavertebate further informed through citizen science. In *BioScience* (Vol. 67, Issue 12, pp. 1029–1043). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix127>

- Palumbi, S. R. (1994). Further ANNUAL REVIEWS. In *Annu. Rev. Ecol. Syst* (Vol. 25).
www.annualreviews.org
- Pierce, S. J., & Norman. (2016). *Rhincodon typus, Whale Shark THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIESTM*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T19488A2365291.en>
- Ramírez-Macías, D., Vázquez-Haikin, A., & Vázquez-Juárez, R. (2012). Whale shark *Rhincodon typus* populations along the west coast of the Gulf of California and implications for management. *Endangered Species Research*, 18(2), 115–128.
<https://doi.org/10.3354/esr00437>
- Rowat, D., & Brooks, K. S. (2012). A review of the biology, fisheries and conservation of the whale shark *Rhincodon typus*. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 80, Issue 5, pp. 1019–1056). <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03252.x>
- Rowat, D., & Engelhardt, U. (2007). Seychelles: A case study of community involvement in the development of whale shark ecotourism and its socio-economic impact. *Fisheries Research*, 84(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.11.018>
- Sandra Bessudo, F, L., L, Q., G, S., P, S., & M, H. (2016). Resultados preliminares sobre los patrones de movimiento de los tiburones ballena (*Rhincodon typus*) en el Pacífico Oriental Tropical. In *Libro de resúmenes del V Encuentro Colombiano sobre Condrictios* (p. 17).
- Schmidt, J. V., Schmidt, C. L., Ozer, F., Ernst, R. E., Feldheim, K. A., Ashley, M. V., & Levine, M. (2009). Low genetic differentiation across three major ocean populations of the whale shark, *Rhincodon typus*. *PLoS ONE*, 4(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004988>

- Sequeira, A. M. M., Mellin, C., Meekan, M. G., Sims, D. W., & Bradshaw, C. J. A. (2013). Inferred global connectivity of whale shark *Rhincodon typus* populations. *Journal of Fish Biology*, *82*(2), 367–389. <https://doi.org/10.1111/jfb.12017>
- Sigsgaard, E. E., Nielsen, I. B., Bach, S. S., Lorenzen, E. D., Robinson, D. P., Knudsen, S. W., Pedersen, M. W., Jaidah, M. Al, Orlando, L., Willerslev, E., Møller, P. R., & Thomsen, P. F. (2016). Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(1). <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0004>
- Soler, G. A., Bessudo, S., & Guzmán, A. (2013). *Long term monitoring of pelagic fishes in Malpelo Island LONG TERM MONITORING OF PELAGIC FISHES AT MALPELO ISLAND, COLOMBIA*. *3*(2), 28–37.
- Toha, A. H. A., Dailami, M., Anwar, S., Setiawan, J. B., Jentewo, Y., Lapadi, I., Sutanto, S., Aryasari, R., Ambariyanto, Runtuboi, F., & Madduppa, H. (2020). The genetic relationships and indo-pacific connectivity of whale sharks (*Rhincodon typus*) with particular reference to mitochondrial COI gene sequences from Cendrawasih bay, Papua, Indonesia. *Biodiversitas*, *21*(5), 2159–2171. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210544>
- Vignaud, T. M., Maynard, J. A., Leblois, R., Meekan, M. G., Vázquez-Juárez, R., Ramírez-Macías, D., Pierce, S. J., Rowat, D., Berumen, M. L., Beeravolu, C., Baksay, S., & Planes, S. (2014). Genetic structure of populations of whale sharks among ocean basins and evidence for their historic rise and recent decline. *Molecular Ecology*, *23*(10), 2590–2601. <https://doi.org/10.1111/mec.12754>

- Waples, R. S., & Gaggiotti, O. (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. In *Molecular Ecology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 1419–1439). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x>
- Weber, J. A., Gu Park, S., Luria, V., Jeon, S., Kim, H.-M., Jeon, Y., Bhak, Y., Hun Jun, J., Wha Kim, S., Hee Hong, W., Lee, S., Sung Cho, Y., Karger, A., Cain, J. W., Manica, A., Kim, S., Kim, J.-H., Edwards, J. S., Bhak, J., ... analyzed data, J. (2020). *The whale shark genome reveals how genomic and physiological properties scale with body size*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922576117/-/DCSupplemental>
- Yagishita, N., Ikeguchi, S. I., & Matsumoto, R. (2020). Re-Estimation of Genetic Population Structure and Demographic History of the Whale Shark (*Rhincodon typus*) with Additional Japanese Samples, Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Pacific Science*, 74(1), 31–47. <https://doi.org/10.2984/74.1.3>