

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Diversidad genética de *Triaenodon obesus* en los archipiélagos de Galápagos (Ecuador) y Revillagigedo (México) y su conectividad**

**Jennifer Maierly Moreno Pantoja**

**Biología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Bióloga

Quito, 9 de mayo de 2025

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Diversidad genética de *Triacnodon obesus* en los archipiélagos de Galápagos (Ecuador) y Revillagigedo (México) y su conectividad**

**Jennifer Maierly Moreno Pantoja**

**Nombre del profesor, Título académico  
Nombre del profesor, Título académico**

**María José Pozo, MBS.  
Diana Pazmiño, PhD.**

Quito, 9 de mayo de 2025

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Jennifer Maierly Moreno Pantoja

Código: 00325357

Cédula de identidad: 1753211554

Lugar y fecha: Quito, 9 de mayo de 2025

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

## RESUMEN

*Triaenodon obesus* o tiburón de arrecife de punta blanca es una de las tres especies de tiburón de arrecife con la distribución más amplia en la región Indo-Pacífica. Sin embargo, resulta paradójica su estrategia de vida caracterizada por desplazamientos cortos, hábitos sedentarios y alta fidelidad residencial. Planteando interrogantes sobre su conectividad genética. Considerando su rol clave como depredador en ecosistemas arrecifales y su estado de vulnerabilidad según la UICN, debido a la pérdida de hábitat y la presión pesquera. Este estudio busco determinar la conectividad y diversidad genética de *T. obesus* en los archipiélagos de Galápagos (Ecuador) y Revillagigedo (México), ambos Patrimonio Natural de la Humanidad. Se analizaron regiones parciales de ADN mitocondrial, correspondientes a los genes COX1 y ND4 de 52 muestras de tejido: 32 de Revillagigedo y 13 de Galápagos, recolectadas entre 2015 y 2024. Se construyeron redes de haplotipos que revelaron un haplotipo dominante compartido entre ambas localidades, sugiriendo conectividad genética. Además, se elaboró un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud, el cual detectó la posible identificación errónea de una muestra en campo. En cuanto a la diversidad genética, los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica requieren una mayor representatividad de muestras y análisis por archipiélago para establecer conclusiones claras, mientras que las pruebas de neutralidad de D de Tajima y  $F_s$  de Fu no fueron estadísticamente significativas en ningún archipiélago. No obstante, los resultados obtenidos establecen una línea base en estas localidades para comprender la conectividad y estructura genética de la especie. Información que podría ser crucial para desarrollar estrategias de conservación, establecer áreas marinas protegidas y evaluar su resiliencia.

**Palabras clave:** Movimientos, polimorfismo, haplotipos, marcadores mitocondriales, ND4, COX1.

## ABSTRACT

*Triaenodon obesus*, commonly known as the whitetip reef shark, is one of three reef shark species with the broadest distribution in the Indo-Pacific region. Paradoxically, this species exhibits a life history strategy characterized by short-distance movements, sedentary habits, and high site fidelity, raising important questions about its genetic connectivity. Given its ecological role as a key predator in reef ecosystems and its current Vulnerable status by the IUCN, due to habitat degradation and fishing pressure. This study aimed to assess the genetic connectivity and diversity of *T. obesus* populations in the Galápagos (Ecuador) and Revillagigedo (Mexico) archipelagos, both recognized as Natural World Heritage Sites. Partial mitochondrial DNA regions corresponding to the COX1 and ND4 genes were analyzed from 52 tissue samples: 32 from Revillagigedo and 13 from Galápagos, collected between 2015 and 2024. Haplotype network analyses revealed a dominant haplotype shared between both archipelagos, suggesting genetic connectivity. Additionally, a phylogenetic tree constructed using the Maximum Likelihood method indicated a potential misidentification of one field sample. Regarding genetic diversity, the haplotype and nucleotide diversity indices suggest the need for broader sample representation and separate analyses per archipelago to draw robust conclusions. Moreover, neutrality tests (Tajima's *D* and Fu's *F<sub>s</sub>*) were not statistically significant in either location. Despite these limitations, the results provide a valuable baseline for understanding the genetic structure and connectivity of *T. obesus* at these sites. This information could be essential for guiding conservation strategies, establishing marine protected areas, and evaluating the species' resilience.

**Keywords:** Movement patterns, polymorphism, haplotypes, mitochondrial markers, ND4, COX1.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
Características generales de <i>Triaenodon obesus</i> .....	11
Conectividad genética y su relevancia en la conservación de <i>Triaenodon obesus</i> ....	12
METODOLOGÍA.....	16
Muestras y Área de estudio .....	16
Extracción y cuantificación del ADN.....	18
Procesamiento de secuencias y Análisis de datos .....	19
RESULTADOS .....	20
Extracción de ADN y cuantificación.....	21
Amplificación y secuenciación.....	21
Árbol filogenético.....	22
Identificación de Haplotipos y sitios polimórficos.....	23
Análisis estadístico .....	25
DISCUSIÓN.....	27
Análisis de las muestras.....	27
Conectividad entre archipiélagos.....	28
Diversidad genética .....	30
CONCLUSIÓN .....	31
REFERENCIAS .....	33
ANEXOS.....	40
Anexo 1. Extracción y cuantificación de ADN de 52 muestras de <i>Triaenodon obesus</i> provenientes de Revillagigedo y Galápagos (Elución 1).....	40
Anexo 2. Árbol filogenético de las secuencias con el marcador de ND4 (51 individuos) empleando como outgroup a <i>Carcharhinus amblyrhynchos</i> .....	42

Anexo 3. Árbol filogenético de las secuencias con el marcador de COX1 (48 individuos) empleando como outgroup a <i>Carcharhinus amblyrhynchos</i> .....	43
---	----



**Tabla 1.** Secuenciación de las regiones mitocondriales COX1 y ND4 para 54 muestras de *T. obesus*, resumidas en tres categorías: exitosa (ambas secuencias de primers de buena calidad), parcialmente exitosa (solo 1 secuencia de primer forward o reverse de buena calidad) e ineficiente (ninguna secuencia de primer de buena calidad). .. 22

**Tabla 2.** Número de haplotipos, índices de diversidad haplotípica, nucleotídica y pruebas de neutralidad (D de Tajima y Fs de Fu) por archipiélago para cada marcador y para los marcadores concatenados. .... 26

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de los archipiélagos trabajados y los puntos de colección de muestras en Revillagigedo (3 localidades) y Galápagos (2 localidades). ....	18
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de las regiones concatenadas COX1 y ND4 (47 individuos) empleando como outgroup a <i>Carcharhinus amblyrhynchos</i> .....	23
<b>Figura 3.</b> Red de haplotipos para cada región mitocondrial analizada ND4 a la izquierda contiene 50 individuos y COX1 a la derecha 47 individuos. ....	24
<b>Figura 4.</b> Red de haplotipos para las regiones mitocondriales concatenadas (ND4 y COX1) trabajada con 46 individuos. ....	25

## INTRODUCCIÓN

### **Características generales de *Triaenodon obesus***

El tiburón punta blanca de arrecife (*Triaenodon obesus*) perteneciente a la familia Carcharhinidae, fue asignado inicialmente al género *Carcharias* por Rüppell, quien lo describió. No obstante, Müller y Henle, en 1837, propusieron su reclasificación dentro del género *Triaenodon*. Esta especie es de tamaño mediano y cuerpo delgado, con una longitud precaudal de hasta 213 cm. Posee una cabeza ancha y deprimida, con un hocico corto y redondeado. Su coloración dorsal es gris parduzca, mientras que ventralmente es blanquecina con tonalidades amarillentas y manchas redondeadas grisáceas. Presenta manchas blancas en las puntas de la primera aleta dorsal y el lóbulo caudal superior, patrón que también puede aparecer en la segunda aleta dorsal y el lóbulo caudal inferior y sirve para la identificación de individuos (Randall, 1977).

Su estrategia reproductiva es vivípara placentaria, con nutrición matrotrófica y crecimiento lento, con un ritmo promedio de 2.1 a 4.2 cm por año (Randall, 1977; Santos et al., 2022). Da a luz entre una y cinco crías, con un promedio de dos por camada. Los machos alcanzan la madurez sexual a los siete años (112–116 cm) y las hembras a los ocho años (114–122 cm) (Robbins, 2006). No obstante, Randall (1977) reportó que la madurez sexual puede ocurrir al alcanzar los 100 cm de longitud. El período de gestación en estado natural es de aproximadamente un año, según registros fotográficos (Whitney et al., 2011); sin embargo, en cautiverio se han observado variaciones en su duración, presentando periodos ligeramente menores o mayores (Santos et al., 2022).

A diferencia de la mayoría de los tiburones, *Triaenodon obesus* no necesita nadar constantemente para respirar, lo que le permite permanecer inmóvil en cuevas y grietas durante el día, exhibiendo un comportamiento sedentario. Durante la noche, alcanza su mayor actividad, dedicando entre el 42% y el 67% de su tiempo a nadar en busca de presas (Whitney et al., 2007). Es una especie tranquila, aunque puede mostrar

agresividad en respuesta a ciertos estímulos inducidos o provocados (Randall, 1977).

Está bien adaptada a la alimentación en ecosistemas arrecifales, ya que su morfología le permite moverse con agilidad entre grietas y cavidades, alcanzando presas inaccesibles para otros tiburones de arrecife. Su dieta incluye peces arrecifales (Scaridae, Acanthuridae), cefalópodos, cangrejos, anguilas y langostas espinosas (Randall, 1977).

Es una de las tres especies de tiburones de arrecife más comunes en el Indo-Pacífico y presenta la distribución más amplia entre los tiburones de arrecife en esta región, abarcando desde el mar Rojo y el océano Índico hasta el Pacífico central y oriental, incluyendo archipiélagos remotos (Randall, 1977; Whitney et al., 2012). Su distribución en la columna de agua oscila comúnmente entre los 8 y 40 m de profundidad, aunque se ha registrado desde la superficie hasta los 330 m (Randall, 1977).

Según la Lista Roja de la UICN, está categorizado como vulnerable, con una población en declive debido a diversas amenazas. La pesca, tanto dirigida como incidental, es una de las principales causas de su disminución poblacional. Además, la degradación de arrecifes de coral provocada por el cambio climático, prácticas pesqueras inadecuadas y la contaminación, representa un riesgo significativo debido a su estrecha dependencia a estos ecosistemas. Aunque no existen programas específicos de conservación, la especie habita en áreas protegidas y, en zonas con baja densidad poblacional, presencia de turismo sostenible y regulaciones pesqueras efectivas, sigue siendo relativamente abundante (Simpfendorfer et al., 2020). Asimismo, está incluida en el Apéndice II como una especie CITES, es decir, es regulada por el comercio internacional (UNEP-WCMC (Comps.), 2021).

### **Conectividad genética y su relevancia en la conservación de *Triacodon obesus***

A pesar de su amplia distribución, esta especie presenta una marcada fidelidad a sus sitios de residencia y desplazamientos limitados, lo que plantea interrogantes sobre su

conectividad genética (Randall, 1977; Robbins, 2006). Ante el declive poblacional y el aumento de sus amenazas, resulta fundamental estudiar su conectividad genética en términos ecológicos y evolutivos, ya que influye en la diversidad y adaptación. Este factor es crucial para la persistencia de poblaciones silvestres, pues el aislamiento puede provocar deriva genética y endogamia, reduciendo su capacidad adaptativa. El análisis de material genético permite evaluar el flujo génico y comprender posibles implicaciones evolutivas de la dispersión (Samarasin et al., 2017). Según Lowe y Allendorf (2010), la conectividad genética se define como el grado en que el flujo de genes afecta los procesos evolutivos dentro de subpoblaciones y puede clasificarse en tres tipos: adaptativa, endogámica y por deriva genética.

Este tipo de estudios se han visto favorecidos por el desarrollo de herramientas de biología molecular. Particularmente, el uso de genes mitocondriales como marcadores genéticos ha ganado popularidad debido a su facilidad de amplificación, alta conservación, escasas duplicaciones y ausencia de intrones y regiones intergénicas (Gissi et al., 2008). Además, heredados exclusivamente por vía materna, no experimentan recombinación, lo que simplifica el análisis. Las regiones variables de estos genes, flanqueadas por secuencias conservadas, los hacen ideales para el diseño de primers (Galtier et al., 2009) y las regiones no codificantes presentan alta variabilidad, permitiendo su uso incluso a nivel intraespecífico (Robbins, 2006; Ward et al., 2005). Entre las regiones más variables utilizadas en tiburones se encuentran citocromo oxidasa b y la región D-loop (Kitamura et al., 1996; Martin, 1993). No obstante, la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (COX1) es de las más utilizadas en taxonomía molecular e identificación de especies considerándose una herramienta estándar (Ratnasingham & Hebert, 2007), además de un bioindicador global por su capacidad para diferenciar dentro y entre especies (Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005). Otro marcador mitocondrial de uso frecuente es la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa

(ND4), ampliamente empleado en estudios filogenéticos (Naylor et al., 2005). Este estudio se centró en estos dos últimos genes, no solo por las razones mencionadas, sino también porque estos marcadores están siendo utilizados por Migramar en otra región del continente, lo que permite la comparabilidad de los resultados en el marco de un proyecto colaborativo sobre la conectividad genética de la especie.

En *T. obesus*, los genes mitocondriales se han utilizado para analizar su evolución y taxonomía. A nivel filogenético, han permitido establecer relaciones evolutivas dentro de los elasmobranchios modernos y la familia Carcharhinidae (da Silva Rodrigues-Filho et al., 2023; Naylor et al., 2005). También se han empleado en la identificación de especies (Ward et al., 2005) y en estudios sobre dispersión y conectividad poblacional (Robbins, 2006; Whitney et al., 2012).

Las áreas de estudio del proyecto son de gran interés biológico y para la conservación. Galápagos es uno de los ecosistemas más emblemáticos del mundo, debido a su alto endemismo y biodiversidad. Fue el primer sitio declarado como Patrimonio Natural de la Humanidad por la UNESCO en 1978 (Toulkeridis et al., 2015). Por su parte, Revillagigedo forma parte de las Áreas Naturales Protegidas de México y también ha sido reconocido como Patrimonio Natural de la Humanidad (DOF, 2017). En este archipiélago, *T. obesus* ha sido reportado repetidamente como la especie de tiburón más abundante y con mayor frecuencia de avistamiento, según análisis de distribución espaciotemporal (Aburto-Oropeza et al., 2017; Fuentes, 2018).

Estudiar la conectividad de una especie es un parámetro fundamental en biología de la conservación, y adquiere aún más relevancia en la actualidad, ya que se espera una disminución de la conectividad poblacional debido a la reducción del hábitat y aparición de barreras geográficas. Estimar sus movimientos permite monitorear poblaciones y evaluar la pérdida de diversidad genética, esencial para prevenir extinciones y diseñar

planes de conservación (Samarasin et al., 2017). Las herramientas moleculares facilitan esta investigación, incluso detectando movimientos inusuales a gran escala, algo difícil con métodos ecológicos tradicionales (Faubet et al., 2007). Por lo tanto, conocer la conectividad de una especie es clave para entender su biología y evaluar la salud de sus poblaciones. Esto incluye variabilidad genética, flujo génico, endogamia y posibles aislamientos. Con estudios más profundos, esta información puede ayudar a identificar factores de riesgo, como cuellos de botella, y a diseñar estrategias de conservación efectivas para evitar su declive.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad genética y conectividad regional de poblaciones de *T. obesus* en dos archipiélagos: Galápagos (Ecuador) y Revillagigedo (México), mediante el análisis de dos genes mitocondriales, COX1 y ND4, en muestras de tejido recolectadas entre 2015 y 2024. Buscando aportar con información que permita un mejor entendimiento sobre la especie, su diversidad genética y conectividad en el Pacífico oriental.

A pesar de que existen estudios sobre distribución y abundancia de la especie en Revillagigedo (Fuentes, 2018) y conectividad en otras áreas de su rango global (Robbins, 2006; Whitney et al., 2012), aún se desconocen muchos aspectos sobre sus patrones de movimiento (Whitney et al., 2011). Esto resulta especialmente interesante considerando que, a pesar de su amplia distribución en el Indo-Pacífico, paradójicamente es una especie sedentaria con desplazamientos cortos y alta fidelidad a sus sitios de residencia (Randall, 1977; Whitney et al., 2012). Además, no hay estudios previos sobre conectividad genética en estos archipiélagos ni entre ellos. Por lo que, esta investigación busca responder: ¿Existe flujo y diferenciación genética entre las poblaciones de *Triaenodon obesus* en los archipiélagos de Galápagos (Ecuador) y Revillagigedo (México) durante el período 2015-2024?

## **METODOLOGÍA**

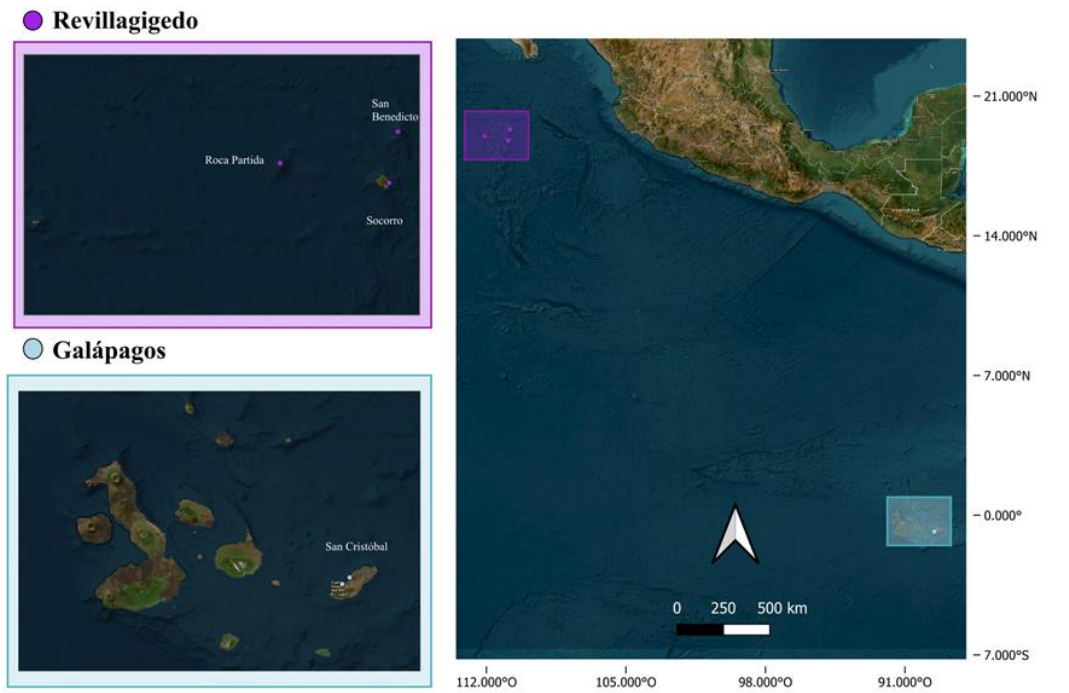
### **Muestras y Área de estudio**

Las muestras de tejido de *T. obesus* fueron recolectadas por investigadores de Pelagios Kakunjá en México, bajo el permiso de Pesca de Fomento DGOPA-024/20, otorgado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y en Ecuador con el permiso CM-2021-0174-M-0001, ambas en

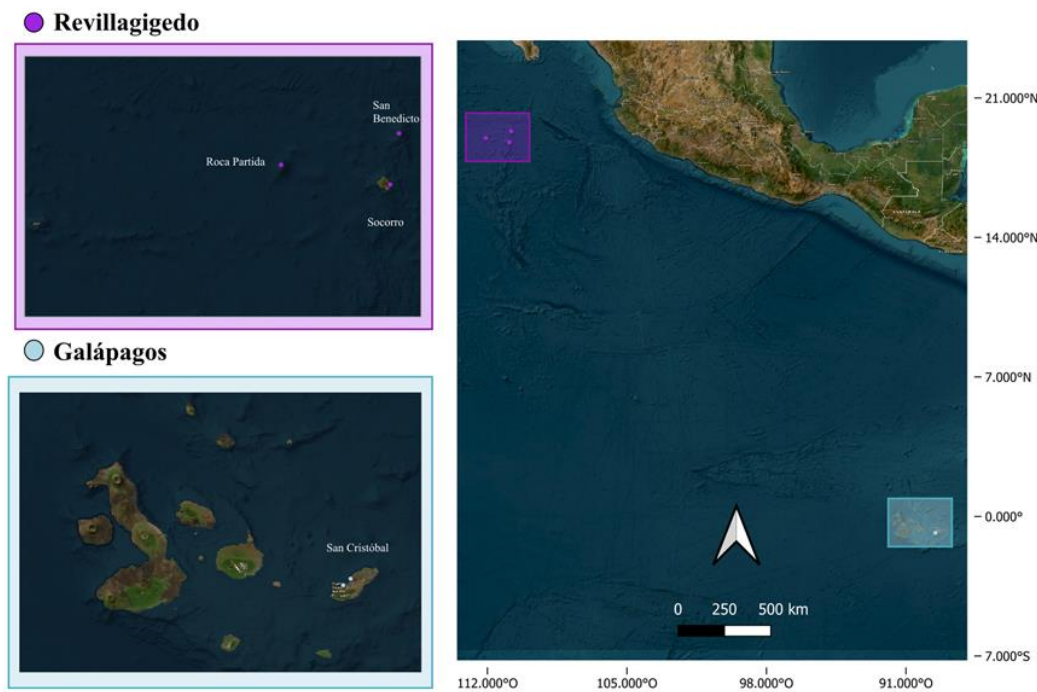


colaboración con la red Migramar. La recolección de muestras en México se realizó de manera *in situ* siguiendo la metodología descrita por Robbins (2006), basada en biopsia remota. En Ecuador se empleó la metodología *ex situ* descrita por Rodríguez Arana Favela (2023), realizando el procedimiento en la parte posterior de la aleta dorsal. En ambos casos, se obtuvieron pequeños fragmentos de <1.5 cm, los cuales se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml con alcohol al 96%. En total, se recibieron 52 muestras: 13 provenientes de Galápagos (Ecuador) y 39 de Revillagigedo (México), las cuales fueron almacenadas a -20°C en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) en octubre del 2024.

El área de estudio en el archipiélago de Galápagos, Ecuador, se ubicó en la isla San Cristóbal, específicamente en las localidades La Seca y Cerro Brujo, donde se obtuvieron 3 y 10 muestras respectivamente, durante el periodo 2022-2024. En el caso del archipiélago de Revillagigedo, México, se trabajó en tres de sus cuatro islas: Socorro, San Benedicto y Roca Partida, ordenadas de mayor a menor superficie (Fuentes, 2018). Se recolectaron 1, 5 y 33 muestras en cada isla, respectivamente, durante los periodos 2015-2016 y 2021-2022. Las localidades de cada archipiélago se pueden apreciar en la



**Figura 1..**



**Figura 1.** Mapa de los archipiélagos trabajados y los puntos de colección de muestras en Revillagigedo (3 localidades) y Galápagos (2 localidades).

### **Extracción y cuantificación del ADN**

Se realizó la extracción de ADN de las 52 muestras de tejido de *T. obesus* utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue, específicamente el Protocolo de Purificación de ADN total de tejidos animales (protocolo de columna centrífuga) (QIAGEN, 2023).

Idealmente, se trabajó con 20 y 25 mg de tejido. No obstante, en 26 muestras provenientes de México la cantidad disponible fue menor, por lo que se utilizaron cantidades inferiores a 20 mg: 19 muestras se procesaron entre 8.5-10mg, y 7 muestras en un rango de 4.3-9 mg. Todas las muestras se dejaron en lisis durante 12 horas, y se obtuvieron dos eluciones por cada muestra. Posterior a la extracción, se realizó la cuantificación de ADN utilizando el espectrofotómetro de Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, 2021).

### **Marcadores mitocondriales, amplificación y secuenciación**

Particularmente, los primers empleados permitieron la obtención de un fragmento parcial para cada una de las regiones mitocondriales. En el marcador de COX1 se usó FishF1 y FishR2 obteniéndose una longitud de 701pb, mientras que para ND4 se empleó ND4 y *Leu-Scyliorhinus* que generan un fragmento de 947pb.

La amplificación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las reacciones para la región COX1 se prepararon con una concentración final de 1X Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM de cada primer (forward y reverse), 0.2 mM dNTPs, 1U de Taq Polimerasa (Invitrogen, MA, USA) y 1.5 ng de ADN, alcanzando un volumen final de 25 µl por muestra. Para la región ND4, las condiciones fueron idénticas, a excepción de la concentración de

MgCl<sub>2</sub>, que se redujo a 0.8 mM, ajustándose según literatura que trabajó con la misma región y primers (Lara-Lizardi et al., 2020).

El programa de termociclado tuvo algunas variaciones dependiendo del marcador molecular. Para COX1, la denaturación inicial se llevó a cabo por 2 min a 95 °C, seguida por la denaturación por 30 s a 94 °C, el annealing por 30 s a 54 °C, la extensión por 1 min a 72 °C y la extensión final por 10 min a 72 °C. Por otro lado, para ND4 la denaturación inicial fue de 5 min a 94 °C, la denaturación 30 s a 94 °C, el annealing 40 s a 54 °C, la extensión 1 min a 72 °C y la extensión final por 5 min a 72 °C. Para ambos casos los pasos de denaturación, annealing y extensión se repitieron por 35 ciclos. Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis empleando geles de agarosa al 1.5% y 100 V. Posterior a la visualización exitosa, las muestras fueron secuenciadas mediante el método Sanger ABI3730XLs.

### **Procesamiento de secuencias y Análisis de datos**

Las secuencias crudas se limpiaron y pulieron mediante Geneious Prime v. 2025.0.3, generando una secuencia consenso por muestra, a partir de sus secuencias forward y reverse. Se utilizó el mismo software para alinear las secuencias con cada uno de los marcadores mitocondriales mediante el algoritmo Clustal Omega. Adicionalmente, para garantizar consistencia, se estandarizó la longitud de todas las secuencias para cada región mitocondrial (Geneious Prime., 2025; Kearse et al., 2012).

Se procedió a concatenar las dos regiones mitocondriales en las muestras que presentaron secuencias consenso en ambas. A partir de las secuencias concatenadas por individuo, se repitieron los procesos de alineamiento y estandarización de longitud previamente descritos. Se exportaron tres archivos de alineamiento en formato FASTA: uno por cada marcador (COX1 y ND4) y uno correspondiente a la región concatenada.

Posteriormente, se construyó la red de haplotipos para cada uno de los marcadores y para el fragmento concatenado, utilizando RStudio v.2024.12.0+467 y un script desarrollado por Toparslan et al., (2020). Asimismo, se generaron árboles filogenéticos utilizando MEGA v.11.0.13, mediante el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood), el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano, un bootstrap de 500 réplicas y como grupo externo (outgroup) a *Carcharhinus amblyrhynchos*. En el caso particular de la muestra 28, se realizó una búsqueda BLAST debido a su elevada divergencia, con el fin de verificar si la secuencia correspondía a una especie diferente.

Finalmente, se llevaron a cabo análisis estadísticos para determinar la diversidad genética en cada archipiélago utilizando DnaSP v.6.12.03 (Rozas et al., 2003) y Arlequin v.3.5.2.2. Se calcularon los índices de diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ), así como dos pruebas de neutralidad: la D de Tajima y las Fs de Fu (Excoffier et al., 2007). Todos estos análisis se realizaron individualmente por archipiélago, procurando evitar sesgos debidos al tamaño muestral y la estructura poblacional dentro del archipiélago de Revillagigedo.

## RESULTADOS

### Extracción de ADN y cuantificación

Las muestras procedentes de Galápagos presentaron concentraciones que oscilaron entre 130.2 ng/ $\mu$ l y 867.3 ng/ $\mu$ l, con un promedio de 429.23 ng/ $\mu$ l. Los índices de calidad mostraron valores promedio de 1.98 para la relación A260/A280 y 2.23 para A260/A230. En contraste, las muestras provenientes de México presentaron concentraciones más bajas, con un rango de 3.3 ng/ $\mu$ l a 184.8 ng/ $\mu$ l, alcanzando un promedio de 33.1 ng/ $\mu$ l. Los índices de calidad en promedio fueron de 1.79 para A260/A280 y 1.03 para A260/A230. Los detalles específicos de cada muestra se encuentran disponibles en el Anexo 1.

### **Amplificación y secuenciación**

Se logró una amplificación exitosa en las 52 muestras, obteniendo 104 amplicones correspondientes a los dos marcadores mitocondriales seleccionados. La calidad de la secuenciación se evaluó según la eficiencia de los primers. De los amplicones procesados, 97 lograron una secuenciación completamente exitosa con ambos primers, mientras que cuatro presentaron secuenciación parcialmente exitosa (un solo primer), y tres muestras no lograron secuenciarse eficientemente con ninguno de los primers. En la Tabla 1, se presenta el detalle de la calidad obtenida por cada muestra y región analizada. Por lo tanto, de todos los amplicones, 101 se procesaron exitosamente y se logró obtener una secuencia consenso.

Para el alineamiento, con COX1 se establecieron 48 secuencias, pues las muestras 21, 24 y 26 no lograron generar una secuencia consenso, y la muestra 20 fue descartada por presentar un nivel inusualmente alto de polimorfismo. En cuando a ND4 se trabajó con 51 secuencias, pues la muestra 15 fue eliminada debido a su reducida longitud, lo que implicaba una pérdida significativa de información al estandarizarla con las demás secuencias. Tras alinear las secuencias se establecieron las longitudes para las regiones. En el caso de COX1 los tamaños iniciales de las secuencias eran de aproximadamente 600-700 pb y posterior a la limpieza y alineamiento se estableció 629 pb. Para ND4 el tamaño se redujo de 900-1000 pb a 863 pb después del procesamiento.

En cuanto al alineamiento de los marcadores concatenados se trabajó con 47 secuencias, eliminando las muestras 21, 24, 26, 20 y 15 que presentaron inconvenientes en uno de los dos marcadores. Se obtuvieron secuencias con un tamaño final de 1429pb.

**Tabla 1.** Secuenciación de las regiones mitocondriales COX1 y ND4 para 54 muestras de *T. obesus*, resumidas en tres categorías: exitosa (ambas secuencias de primers de

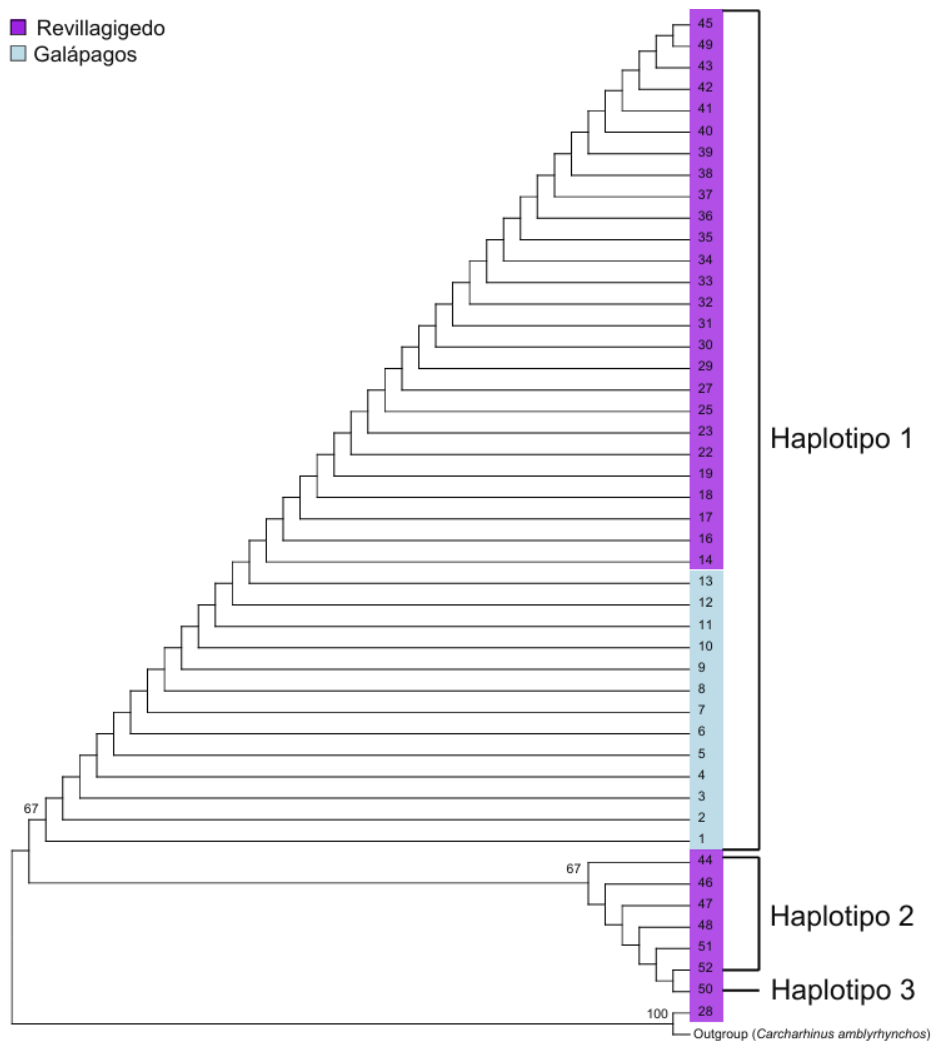
buena calidad), parcialmente exitosa (solo 1 secuencia de primer forward o reverse de buena calidad) e ineficiente (ninguna secuencia de primer de buena calidad).

Categoría	N° de amplicones	ID de COX1	ID de ND4
Exitosa	97 (48 de COX1 y 49 de ND4)	1-21, 22, 23, 25, 27-33, 35-52	1-12, 14, 16-21, 23-52
Parcialmente exitosa	4 (1 de COX1 y 3 de ND4)	34(F)	13(F), 15(R), 22(F)
Ineficiente	3 (3 de COX1 y 0 de ND4)	21,24,26	-

### Árbol filogenético

Posteriormente, se construyó un árbol filogenético para cada marcador (Anexos 2 y 3) y para la región concatenada, como se muestra en la Figura 2, donde se observa que la muestra 28 se encuentra más cercana al outgroup que al resto de las muestras de *T. obesus* analizadas en este proyecto. Por esta razón, se realizó un análisis BLAST para esta muestra en ambos marcadores. En el caso de COX1, se obtuvo un 100 % tanto de query cover como de porcentaje de identidad, coincidiendo con la secuencia de la región COX1 de la especie *Carcharhinus albimarginatus*. En cuanto a ND4, se observó un query cover de 100% y un porcentaje de identidad de 98.38% con el genoma mitocondrial completo de la misma especie. Además, en ambos casos, el valor e (e-value) fue de 0.0.

Dado que la muestra 28 probablemente corresponde a la especie *Carcharhinus albimarginatus*, fue excluida al generar las redes de haplotipos y para todos los análisis estadísticos posteriores.



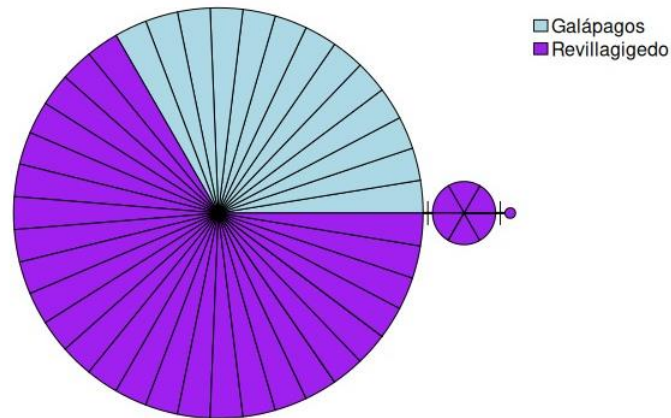
**Figura 2.** Árbol filogenético de las regiones concatenadas COX1 y ND4 (47 individuos) empleando como outgroup a *Carcharhinus amblyrhynchos*

### Identificación de Haplotipos y sitios polimórficos

La red de haplotipos para la región COX1 se construyó con 47 muestras: 13 provenientes de Galápagos y 34 de Revillagigedo. A partir de estas, se identificaron dos haplotipos diferenciados por un único sitio polimórfico. Para la región ND4, se analizaron 50 muestras: 13 de Galápagos y 37 de Revillagigedo, identificándose nuevamente dos haplotipos separados por un único sitio polimórfico. Las redes de haplotipos correspondientes a ambas regiones mitocondriales se muestran en la







**Figura 4.** Red de haplotipos para las regiones mitocondriales concatenadas (ND4 y COX1) trabajada con 46 individuos.

#### **Análisis estadístico**

En el caso del archipiélago de Galápagos, los resultados de los análisis estadísticos fueron idénticos para cada uno de los marcadores analizados por separado (COX1 y ND4), así como para la región concatenada. Tanto el índice de diversidad haplotípica ( $H_d$ ) como el índice de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fueron iguales a 0. Asimismo, en las pruebas de neutralidad, se obtuvo un valor de  $D$  de Tajima igual a 0, con una  $P=1$ , y no fue posible aplicar la prueba de  $F_u$  debido a la ausencia total de variabilidad haplotípica en las secuencias analizadas.

Por otro lado, en Revillagigedo se observaron niveles bajos pero presentes de diversidad genética. Para la región ND4 se registró una  $H_d = 0.3153 \pm 0.0809$  y un  $\pi = 0.00036 \pm 0.00042$ . En cuanto a las pruebas de neutralidad, se obtuvieron valores positivos con un  $D = 0.46195$  ( $P = 0.83200$ ) y  $F_s = 0.90722$  ( $P = 0.49800$ ). En la región COX1, los índices de diversidad fueron aún menores, con una  $H_d = 0.0588 \pm 0.0546$  y un  $\pi =$

$0.00009 \pm 0.00023$ . Los valores obtenidos en las pruebas de neutralidad fueron negativos  $D = -1.13783$  ( $P = 0.11500$ ) y  $F_s = -1.31506$  ( $P = 0.05900$ ).

Finalmente, al considerar las secuencias concatenadas, se obtuvo una  $H_d = 0.3561 \pm 0.0907$  y un  $\pi = 0.00027 \pm 0.00028$ . En este caso, las pruebas de neutralidad arrojaron nuevamente valores negativos  $D = -0.35358$  ( $P = 0.38900$ ) y  $F_s = -0.28498$  ( $P = 0.33400$ ). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Número de haplotipos, índices de diversidad haplotípica, nucleotídica y pruebas de neutralidad (D de Tajima y  $F_s$  de Fu) por archipiélago para cada marcador y para los marcadores concatenados.

Marcador ADNmt(bp)	Localidad(n)	Número de haplotipos	Diversidad de Haplotipos ( $H_d \pm sd$ )	Diversidad de Nucleótidos ( $\pi \pm sd$ )	D de Tajima	p-value	$F_s$ de Fu	P-value
COX1	Revillagigedo (34)	2	$0.0588 \pm 0.0546$	$0.00009 \pm 0.00023$	-1.13783	0.115	-1.31506	0.059
	Galápagos (13)	1	$0.0000 \pm 0.0000$	$0.00000 \pm 0.00000$	0	1	0	N.A.
ND4	Revillagigedo (37)	2	$0.3153 \pm 0.0809$	$0.00036 \pm 0.00042$	0.46195	0.832	0.90722	0.498
	Galápagos (13)	1	$0.0000 \pm 0.0000$	$0.00000 \pm 0.00000$	0	1	0	N.A.
Concatenado COX1 + ND4	Revillagigedo (33)	3	$0.3561 \pm 0.0907$	$0.00027 \pm 0.00028$	-0.35358	0.389	-0.28498	0.334
	Galápagos (13)	1	$0.0000 \pm 0.0000$	$0.00000 \pm 0.00000$	0	1	0	N.A.

## DISCUSIÓN

### Análisis de las muestras

En base a los resultados de la cuantificación de ADN, la reducción en la concentración e índices de calidad en las muestras de Revillagigedo se debió a que en algunos individuos se disponía de menor cantidad de tejido en comparación con Galápagos.

Además, las muestras eran más antiguas y, en ciertos casos, correspondían a diferentes tipos de tejido. Por otro lado, durante el proceso de limpieza y obtención de la secuencia consenso, se logró trabajar con todas las muestras de Galápagos; sin embargo, el número de muestras útiles de Revillagigedo se redujo debido a que algunas regiones no lograron una secuenciación exitosa, posiblemente por los mismos motivos mencionados previamente.

La muestra 28 fue eliminada del proyecto al observar una clara asociación entre ésta y el *outgroup* en los árboles filogenéticos. Adicionalmente, el posterior análisis con BLAST sugiere que esta muestra corresponde a la especie *Carcharhinus albimarginatus*. El error de muestreo pudo haber ocurrido debido a una equivocación en la identificación del individuo al momento de tomar la muestra en campo, considerando que esta especie presenta características que pueden causar confusión, como la coloración blanca en la punta de la aleta dorsal y caudal (Beauvais, 2024). Además, esta muestra proviene de Revillagigedo, donde se realizó la recolección in situ empleando la metodología de Robbins (2006), que utiliza una sonda de biopsia a determinada distancia del animal a ser muestreado, lo que se puede asociar a que no se logró una visualización clara del individuo al muestrearlo. Sin embargo, este hallazgo evidencia la utilidad de las técnicas moleculares y los marcadores mitocondriales empleados en este proyecto para la identificación entre diferentes especies.

### **Conectividad entre archipiélagos**

Las redes de haplotipos sugieren que existe conectividad entre los dos archipiélagos.

Tanto para cada uno de los marcadores como para las regiones concatenadas, se observó que el haplotipo más frecuente, es decir, el que contenía mayor número de individuos, era compartido por la mayoría de las muestras de Revillagigedo y todas las de Galápagos. Esto resulta intrigante, considerando la naturaleza sedentaria de esta especie.

No obstante, coincide con los resultados obtenidos por Whitney et al. (2012), en su estudio de conectividad de *T. obesus*, el cual incluyó más localidades a nivel global.

Dicho estudio sugiere una posible colonización o dispersión reciente a través de la barrera del Pacífico Este, ya que solo se observó un haplotipo en los sitios muestreados de esta región, que además coincidía con el haplotipo más común del Pacífico Central. También se mencionó una posible dispersión oceánica, ya que se observó estructura genética entre hábitats semicontinuos, destacando particularmente la Gran Barrera de Coral (norte y centro) en Australia, mientras que, por otro lado, se detectó conectividad entre archipiélagos que presentan mayor distancia de separación.

Existen varias opciones que podrían explicar los movimientos o la conectividad observada en *Triaenodon obesus*. Una de ellas es la hipótesis del "*poor swimmer, good drifter*", que plantea una dispersión pasiva o semipasiva. En este escenario, los individuos pueden ser arrastrados mar adentro por tormentas o marejadas y quedar asociados a restos y escombros flotantes, quedando a la deriva en el océano. Sin embargo, ciertas características de *T. obesus*, como su baja tasa metabólica, la capacidad de permanecer en reposo y su asociación con estructuras bentónicas, podrían permitirle sobrevivir durante períodos prolongados en mar abierto (Whitney et al., 2012). Otro factor que apoya esta teoría es la presencia de tormentas y huracanes que afectan a Revillagigedo y a la costa central del Pacífico mexicano entre junio y noviembre (Corgos & Rosende-Pereiro, 2016). Además, deben considerarse las

corrientes oceánicas que atraviesan los archipiélagos, como las múltiples que pasan por Galápagos, siendo las más conocidas la corriente de El Niño y la fría de Humboldt (Collins et al., 2013; Hinz, 1999), o la corriente de California y la contracorriente norecuatorial en Revillagigedo (Aburto-Oropeza et al., 2017).

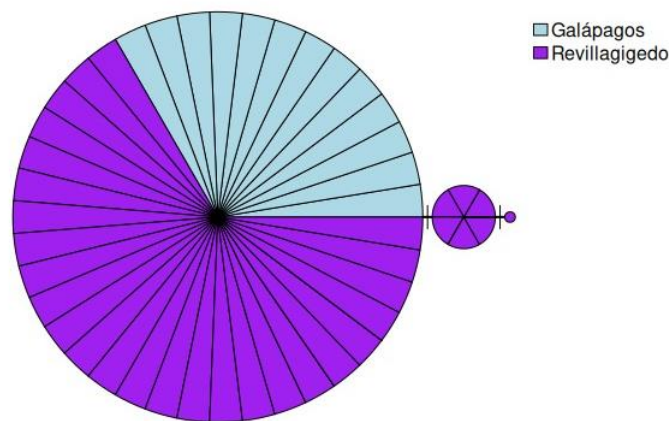
Otra explicación contempla la existencia de movimientos a gran escala aún poco conocidos, posiblemente impulsados por factores como la densidad poblacional o condiciones ambientales. En el caso de la densidad, se ha observado en el islote Roca Partida (Revillagigedo) una alta concentración de individuos, que incluso comparten refugios apilándose unos sobre otros. Por lo que la escasez de refugio podría fomentar el desplazamiento hacia otras áreas, y este factor dependiente de la densidad podría intensificarse en islas oceánicas, generando tasas de dispersión más elevadas que en hábitats costeros (Whitney et al., 2012). En el segundo caso, se deben tomar en cuenta los factores ambientales que ocurren en el área de estudio, como corrientes y fenómenos naturales, siendo una clara ejemplificación el año de El Niño, un fenómeno que provoca una disminución en el afloramiento o surgencias (*upwelling*), generando un efecto de abajo hacia arriba (*bottom-up*) al reducir la disponibilidad de alimento y forzando a los depredadores de niveles tróficos altos a alejarse más de las islas (Klimley et al., 2022).

La posibilidad de movimientos entre los archipiélagos de Revillagigedo y Galápagos, a pesar de la considerable distancia entre ellos, ha sido documentada en otras especies. Se ha sugerido que la isla de Clipperton funciona como paso intermedio (*stepping-stone*).

Por ejemplo, en una hembra de *Carcharhinus galapagensis* se registró uno de los desplazamientos más largos en esta especie: fue marcada en la isla Socorro (Revillagigedo), luego detectada en Clipperton y posteriormente en la isla Darwin (Galápagos) (Lara-Lizardi et al., 2020). Además, se ha reportado el movimiento de un posible híbrido entre *C. galapagensis* y *C. obscurus* entre estos archipiélagos, utilizando Clipperton como paso intermedio (Pazmiño et al., 2019).

### Diversidad genética

En cuanto a los análisis estadísticos, los índices de diversidad mostraron un patrón similar tanto al analizar las regiones por separado como concatenadas. Se observó una diversidad baja para Revillagigedo y nula para Galápagos. Esto concuerda con las redes de haplotipos (



), en las cuales la mayoría de las muestras de Revillagigedo y todas las de Galápagos se ubicaron en el mismo haplotipo, siendo escasos los individuos con polimorfismos en sus secuencias, los cuales se presentaron únicamente en Revillagigedo.

Respecto a las pruebas de neutralidad, la región de ND4 presentó valores positivos tanto para la prueba D de Tajima como para  $F_s$  de Fu en Revillagigedo. El valor positivo de la D podría asociarse a un exceso de mutaciones intermedias en frecuencia (Ashfaq et al., 2015), mientras que el valor positivo de  $F_s$  sugiere que hay una cantidad menor de haplotipos respecto a lo esperado bajo un modelo neutro (Nemati et al., 2021). No obstante, en ambos casos, los valores de  $P$  no fueron significativos, por lo que no es posible interpretar estos resultados como indicativos de una población en declive o de un proceso de selección purificadora.

Por otro lado, para la región COX1 y la región concatenada, se observó un patrón opuesto: valores negativos para D (posiblemente asociados a un exceso de mutaciones) y para Fs, lo que podría indicar la presencia de haplotipos raros en una proporción mayor a la esperada bajo neutralidad. Sin embargo, nuevamente, la falta de significancia estadística impide relacionarlos con una expansión poblacional reciente (Domínguez, 2014; Nemati et al., 2021).

A pesar de que algunos de los valores obtenidos en los análisis brindan información útil para comenzar a comprender la diversidad genética de estas dos localidades, es importante destacar que la probabilidad de sesgo debido a la representatividad del muestreo es alta. En Revillagigedo, la mayoría de los individuos provienen del islote Roca Partida, mientras que solo cinco provienen de San Benedicto y uno de Socorro. Además, no se muestreó Clarión, la isla más lejana del archipiélago y más cercana al Pacífico central la cual podría presentar otros haplotipos o una frecuencia diferente de los observados en este estudio.

En el caso de Galápagos, los resultados tampoco son concluyentes, ya que las muestras se obtuvieron en solo una de las 13 islas principales, y los dos puntos de muestreo están geográficamente próximos entre sí. Por lo tanto, la representación poblacional de ambos archipiélagos es limitada.

Aunque estos resultados permiten un análisis preliminar de la conectividad entre ambos archipiélagos, sería necesario contar con una mayor representatividad y una distribución más homogénea de las muestras para poder determinar con mayor precisión la existencia de múltiples haplotipos y su frecuencia relativa.



## CONCLUSIÓN

Este estudio proporciona información novedosa sobre la diversidad genética y la conectividad de *Triaenodon obesus* en los archipiélagos de Galápagos y Revillagigedo. Los análisis con los marcadores mitocondriales COX1 y ND4 sugieren conectividad genética entre ambas localidades, y diversidad genética baja en Revillagigedo y nula en Galápagos. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela, debido a las limitaciones en el número y distribución de muestras, especialmente en los análisis estadísticos de diversidad nucleotídica, haplotípica y en las pruebas de neutralidad.

Adicionalmente se recalca que este proyecto forma parte de una investigación más amplia, por lo que en el futuro se incluirán análisis con SNPs, se agregarán nuevas muestras de Galápagos y también se incorporarán muestras de Panamá. No obstante, es fundamental reconocer que la obtención de muestras en este tipo de entornos presenta alta complejidad logística, y que diversos factores pueden dificultar un muestreo homogéneo.

Como recomendación, además de continuar con el análisis de las regiones utilizadas en este estudio, sería valioso incorporar otras regiones mitocondriales con alta variabilidad reportada en tiburones, como D-loop y Cyt b (Kitamura et al., 1996; Martin, 1993). En particular, D-loop ha sido empleada en estudios previos de conectividad al ser una región no codificante que acumula mutaciones con mayor frecuencia, facilitando el análisis de la variabilidad (Robbins, 2006; Whitney et al., 2012). Por ello, sería interesante comparar los resultados obtenidos en estas muestras con los de los otros

autores, con el fin de lograr una mejor comprensión de la conectividad a nivel global en la especie. Asimismo, sería relevante incrementar el tamaño de muestra (n) para ambas localidades y sobre todo equilibrar su distribución dentro y entre los archipiélagos, en la medida de lo posible, con el fin de obtener patrones que se acerquen de la manera más fidedigna a las poblaciones reales.

A pesar de las limitaciones de las muestras dentro de cada archipiélago, de manera general, este trabajo logró evaluar la diversidad genética y conectividad regional entre las poblaciones de *T. obesus* en los archipiélagos de: Galápagos (Ecuador) y Revillagigedo (México), mediante el análisis de dos genes mitocondriales, COX1 y ND4, en muestras de tejido recolectadas entre 2015 y 2024. Este proyecto establece una línea base en ambos archipiélagos al ser el primero en estudiar la diversidad genética y la conectividad en esta especie utilizando marcadores mitocondriales. La información generada aporta al entendimiento de la especie y podría constituir una herramienta crucial para el diseño de proyectos de conservación, delimitación de áreas protegidas, evaluaciones de su resiliencia, y del estado poblacional en general.

## REFERENCIAS

- Aburto-Oropeza, O., Ballesteros, E., Ezcurra, E., Friedlander, A., Henning, B., Hoyos, M., Johnson, A. F., Mascareñas-Osorio, I., Mayorga, J. S., Muñoz, A., Salinas de León, P., Sánchez-Ortiz, C., Thompson, C., & Sala, E. (2017). *Archipiélago de Revillagigedo: Biodiversidad, Amenazas y Necesidades de Conservación*. <https://escholarship.org/uc/item/31f8s4hj>
- Ashfaq, M., Hebert, P. D. N., Mirza, M. S., Khan, A. M., Mansoor, S., Shah, G. S., & Zafar, Y. (2015). *Genetic diversity indices and neutrality tests (Fu's  $F_s$  and Tajima's  $D$ ) in the mtCOI-5' (barcode) sequences of putative species in *Bemisia tabaci* complex from Pakistan and India*. [Dataset]. PLOS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104485.t002>
- Beauvais, S. M. S. (2024). *Patrones de movimiento y uso del hábitat del tiburón punta plateada (*Carcharhinus albimarginatus*) en el Archipiélago de Revillagigedo* [doctoralThesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.]. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3195>
- Collins, C., Mascarenhas, A., & Martinez, R. (2013). Structure of ocean circulation between the Galápagos Islands and Ecuador. *Advances in Geosciences*, 33, 3-12. <https://doi.org/10.5194/adgeo-33-3-2013>
- Corgos, A., & Rosende-Pereiro, A. (2016). First record of the whitetip reef shark, *Triaenodon obesus* from the coast of Jalisco, western Mexico mainland. *Marine Biodiversity Records*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s41200-016-0069-7>
- da Silva Rodrigues-Filho, L. F., da Costa Nogueira, P., Sodré, D., da Silva Leal, J. R., Nunes, J. L. S., Rincon, G., Lessa, R. P. T., Sampaio, I., Vallinoto, M., Ready, J. S., & Sales, J. B. L. (2023). Evolutionary History and Taxonomic

- Reclassification of the Critically Endangered Daggernose Shark, a Species Endemic to the Western Atlantic. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2023(1), 4798805.  
<https://doi.org/10.1155/2023/4798805>
- DOF. (2017, noviembre 27). *Decreto por el que se declara como área natural protegida, con el carácter de parque nacional, la región conocida como Revillagigedo, localizada en el Pacífico Mexicano*.  
<https://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC171410/>
- Domínguez, J. C. (2014). *Estructura y diversidad genética de las poblaciones de topillo campesino (Microtus arvalis) en España*.  
<https://digital.csic.es/handle/10261/147375>
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2007). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Faubet, P., Waples, R. S., & Gaggiotti, O. E. (2007). Evaluating the performance of a multilocus Bayesian method for the estimation of migration rates. *Molecular Ecology*, 16(6), 1149-1166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03218.x>
- Fuentes, C. C. (2018). *Distribución espacio-temporal y preferencias ambientales de tiburones en el área natural protegida Archipiélago de Revillagigedo*.  
<http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2814>
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541-4550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>
- Geneious Prime. (2025). *Geneious Prime User Manual*.  
<https://manual.geneious.com/en/latest/index.html>

- Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4), 301-320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hinz, E. R. (1999). 28 Galapagos Islands. En *Landfalls of Paradise* (pp. 339-346). University of Hawaii Press.  
<https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/9780824843533-035/pdf?licenseType=restricted>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kitamura, T., Takemura, A., Watabe, S., Taniuchi, T., & Shimizu, M. (1996). Molecular Phylogeny of the Sharks and Rays of Superorder Squalea Based on Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Fisheries science*, 62(3), 340-343.  
<https://doi.org/10.2331/fishsci.62.340>
- Klimley, A. P., Arauz, R., Bessudo, S., Chávez, E. J., Chinacalle, N., Espinoza, E., Green, J., Hearn, A. R., Hoyos-Padilla, M. E., Nalesso, E., Ketchum, J. T., Fischer, C., Ladino, F., Shillinger, G., Soler, G., Steiner, T., & Peñaherrera-Palma, C. (2022). Studies of the movement ecology of sharks justify the existence and expansion of marine protected areas in the Eastern Pacific Ocean. *Environmental Biology of Fishes*, 105(12), 2133-2153.  
<https://doi.org/10.1007/s10641-021-01204-6>

- Lara-Lizardi, F., Hoyos-Padilla, M., Hearn, A., Klimley, A. P., Galván-Magaña, F., Arauz, R., Bessudo, S., Castro, E., Clua, E., Espinoza, E., Fischer, C., Peñaherrera-Palma, C., Steiner, T., & Ketchum, J. T. (2020). *Shark movements in the Revillagigedo Archipelago and connectivity with the Eastern Tropical Pacific* (p. 2020.03.02.972844). bioRxiv.  
<https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972844>
- Lowe, W. H., & Allendorf, F. W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology*, 19(15), 3038-3051.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04688.x>
- Martin, A. P. (1993). Application of mitochondrial DNA sequence analysis to the problem of species identification of sharks. *Conservation biology of elasmobranchs*, 53-59.
- Naylor, G. J. P., Ryburn, J. A., Fedrigo, O., & López, J. A. (2005). Phylogenetic Relationships among the Major Lineages of Modern Elasmobranchs. En *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes*. CRC Press.
- Nemati, S., Anbaran, M. F., Rahimi, H. M., Hosseini, M. S., Aghaei, S., Khalili, N., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2021). Evolutionary and phylogenetic analyses of the barcoding region suggest geographical relationships among *Blastocystis* sp., ST3 in humans. *Infection, Genetics and Evolution*, 96, 105151.
- Pazmiño, D. A., Simpfendorfer, C. A., Junge, C., Donnellan, S. C., Hoyos-Padilla, E. M., Duffy, C. A. J., Huveneers, C., Gillanders, B. M., Butcher, P. A., & Maes, G. E. (2019). Introgressive hybridisation between two widespread sharks in the east Pacific region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, 119-127.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.013>
- QIAGEN. (2023). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. QIAGEN.

- Randall, J. E. (1977). *Contribution to the biology of the whitetip reef shark (Triaenodon obesus)*. <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/1188>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Robbins, W. D. (2006). *Abundance, demography and population structure of the grey reef shark (Carcharhinus amblyrhynchos) and the white tip reef shark (Triaenodon obesus) (Fam. Carcharhinidae)* [Phd, James Cook University]. <https://eprints.jcu.edu.au/2096/>
- Rodriguez Arana Favela, J. P. (2023). *Estructura poblacional y conectividad genética del tiburón martillo Sphyrna lewini en el Pacífico Oriental Tropical* [Tesis doctoral,]. CICIMAR-IPN.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496-2497. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- Samarasin, P., Shuter, B. J., Wright, S. I., & Rodd, F. H. (2017). The problem of estimating recent genetic connectivity in a changing world. *Conservation Biology*, 31(1), 126-135. <https://doi.org/10.1111/cobi.12765>
- Santos, S. R., Takatsuka, V., Bonatelli, S. P., Amaral, N. L. L., Goés, M. F., & Valle, R. F. (2022). Courtship and Reproduction of the Whitetip Reef Shark *Triaenodon obesus* (Carcharhiniformes: Carcharhinidae) in an Ex Situ Environment, with a Description of the Late Embryonic Developmental Stage. *Animals*, 12(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ani12233291>
- Simpfendorfer, C., Yuneni, R. R., Tanay, D., Seyha, L., Haque, A. B., Bineesh, K. K., Bin Ali, A., Gautama, D. A., Maung, A., Sianipar, A., Utzurrum, J. A. T., & Vo,

- V. Q. (2020). IUCN Red List of Threatened Species: *Triaenodon obesus*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Thermo Fisher Scientific. (2021, noviembre). *NanoDrop One User Guide*. Thermo Fisher Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/manuals/nanodrop-one-user-guide-EN-309102-REV-A.pdf>
- Toparslan, E., Karabag, K., & Bilge, U. (2020). A workflow with R: Phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome b gene sequences. *PLOS ONE*, 15(12), e0243927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243927>
- Toulkeridis, T., Addison, A., Constantin, S., & Arce, O. (2015). Candidatos ecuatorianos para la Lista Mundial del Patrimonio Natural-Las cuevas Triple Volcán y Tayos. *Memorias*, 21. [https://www.researchgate.net/profile/Swen-Waterreus/publication/308074037\\_Descubriendo\\_el\\_Geoturismo\\_en\\_Manabi\\_Distrito\\_Jama\\_-\\_Pedernales\\_p\\_56/links/57d8f1b708ae5f03b4986e56/Descubriendo-el-Geoturismo-en-Manabi-Distrito-Jama-Pedernales-p-56.pdf#page=21](https://www.researchgate.net/profile/Swen-Waterreus/publication/308074037_Descubriendo_el_Geoturismo_en_Manabi_Distrito_Jama_-_Pedernales_p_56/links/57d8f1b708ae5f03b4986e56/Descubriendo-el-Geoturismo-en-Manabi-Distrito-Jama-Pedernales-p-56.pdf#page=21)
- UNEP-WCMC (Comps.). (2021). *Checklist of CITES species*. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland and UNEP-WCMC, Cambridge, United Kingdom.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Whitney, N. M., Papastamatiou, Y. P., Holland, K. N., & Lowe, C. G. (2007). Use of an acceleration data logger to measure diel activity patterns in captive whitetip reef sharks, *Triaenodon obesus*. *Aquatic Living Resources*, 20(4), Article 4. <https://doi.org/10.1051/alr:2008006>



- Whitney, N. M., Pyle, R. L., Holland, K. N., & Barcz, J. T. (2011). Movements, reproductive seasonality, and fisheries interactions in the whitetip reef shark (*Triaenodon obesus*) from community-contributed photographs. *Environmental Biology of Fishes*, 93(1), 121-136. <https://doi.org/10.1007/s10641-011-9897-9>
- Whitney, N. M., Robbins, W. D., Schultz, J. K., Bowen, B. W., & Holland, K. N. (2012). Oceanic dispersal in a sedentary reef shark (*Triaenodon obesus*): Genetic evidence for extensive connectivity without a pelagic larval stage. *Journal of Biogeography*, 39(6), 1144-1156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02660.x>

## ANEXOS

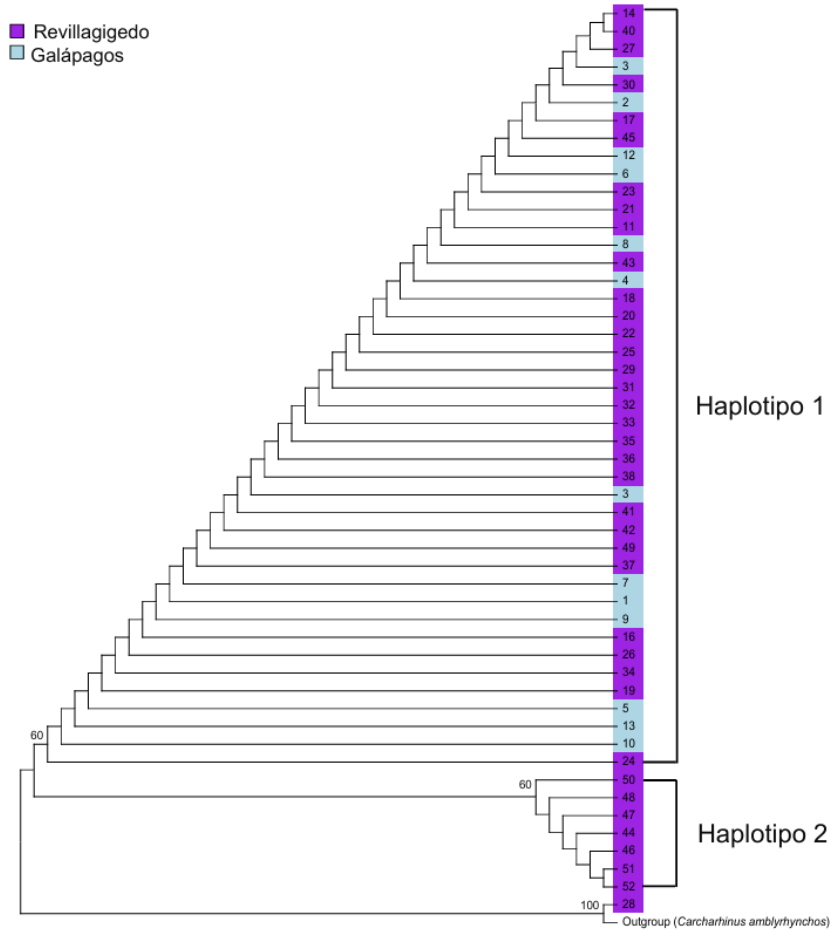
### Anexo 1. Extracción y cuantificación de ADN de 52 muestras de *Triaenodon obesus* provenientes de Revillagigedo y Galápagos (Elución 1).

ID	Localidad	Código Muestra	Concentración	Calidad	
			ng/ul	A260/A280	A260/A230
1	Galápagos	1331	322.2	1.99	2.26
2	Galápagos	1985	319.9	1.98	2.11

3	Galápagos	1986	335	1.98	2.23
4	Galápagos	1721	480.2	1.97	2.25
5	Galápagos	1722	237.9	2.09	2.42
6	Galápagos	1724	130.2	1.95	2.09
7	Galápagos	1728	573.1	1.98	2.28
8	Galápagos	1723	302	1.96	2.09
9	Galápagos	1729	678.3	1.91	2.27
10	Galápagos	1726	262.4	2	2.07
11	Galápagos	1725	483.2	1.97	2.26
12	Galápagos	1727	867.3	1.94	2.31
13	Galápagos	1984	588.3	2	2.35
14	México	886TOBRPT22	16.2	1.31	0.64
15	México	899TOBRPT22	3.3	1.42	0.46
16	México	890TOBRPT22	42.7	2.04	1.48
17	México	894TOBRPT22	11.1	0.49	0.47
18	México	874TOBRPT21	56.5	1.98	1.46
19	México	873TOBRPT21	109.6	2	2.22
20	México	865TOBRPT21	41.9	1.99	1.6
21	México	870TOBRPT21	30.7	1.9	1.16
22	México	869TOBRPT21	184.8	1.99	2.11
23	México	876TOBSOC22	49.2	1.95	1.29
24	México	871TOBRPT21	15.6	2.01	0.89
25	México	459TOBRPT16	8.2	1.65	0.46
26	México	451TOBRPT15	4.6	1.88	0.36
27	México	900TOBRPT22	18.9	2.29	1.35
28	México	27TOBRPT22	116.8	2.04	1.55
29	México	888TOBRPT22	22.8	2.04	1.64
30	México	463TOBRPT16	44.9	1.81	0.81
31	México	867TOBRPT21	42.3	1.93	0.91
32	México	885TOBRPT22	43.2	2.05	1.57
33	México	462TOBRPT15	43	2.05	1.59

34	México	456TOBRPT15	8.3	1.35	0.56
35	México	892TOBRPT22	25.3	2.11	1.52
36	México	893TOBRPT22	5.2	1.72	0.39
37	México	884TOBRPT22	17.2	2.18	1.01
38	México	448TOBRPT15	56.6	1.85	1.73
39	México	883TOBSBN22	4.3	1.43	0.24
40	México	879TOBSBN22	5.9	1.83	0.58
41	México	460TOBRPT16	34.4	1.77	0.73
42	México	875TOBRPT22	34	1.89	1.09
43	México	868TOBRPT21	52.2	1.93	1.71
44	México	452TOBRPT16	20.5	1.71	0.6
45	México	882TOBSBN22	23.2	1.86	1.06
46	México	866TOBRPT21	54.1	1.88	1.44
47	México	880TOBSBN22	8.7	1.53	0.67
48	México	895TOBRPT22	3.4	1.11	0.21
49	México	898TOBRPT22	7.2	1.35	0.56
50	México	887TOBRPT22	4.4	1.61	0.32
51	México	881TOBSBN22	11.4	1.98	1.06
52	México	889TOBRPT22	8.3	1.85	0.54

**Anexo 2. Árbol filogenético de las secuencias con el marcador de ND4 (51 individuos) empleando como outgroup a *Carcharhinus amblyrhynchos***



**Anexo 3. Árbol filogenético de las secuencias con el marcador de COX1 (48 individuos) empleando como outgroup a *Carcharhinus amblyrhynchos***

