



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

VALORACIÓN DE LA SENESCENCIA NEGATIVA
COMO ESTRATEGIA REPRODUCTIVA PRESENTE
EN LAS POBLACIONES DE *Panopea globosa*.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

Alejandro Tomás Hernández Muñoz

La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2017

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 21 del Mes de noviembre del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“VALORACIÓN DE LA SENESCENCIA NEGATIVA COMO ESTRATEGIA REPRODUCTIVA PRESENTE EN LAS POBLACIONES DE *Panopea globosa*”

Presentado por el alumno:

Alejandro Tomás Hernández Muñoz

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MARINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



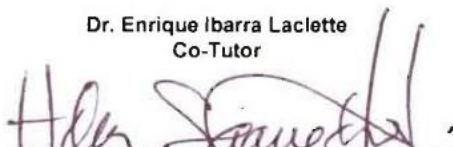
Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota
Co-Director de Tesis



Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega
Co-Directora de Tesis



Dr. Enrique Ibarra Laclette
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comité

Comité tutorial

Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Enrique Ibarra Laclette
Instituto de Ecología, A.C.
Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota
Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega
Dr. Enrique Ibarra Laclette

Jurado de Examen

Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota
Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega
Dr. Enrique Ibarra Laclette

Suplente

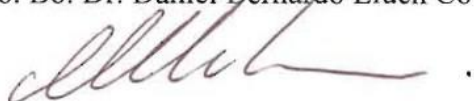
Dr. Sergio Scarry González Peláez

Resumen

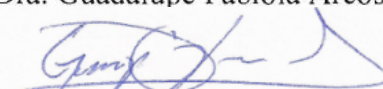
El incremento de la pesquería de la almeja generosa que se desarrolla en México ha venido acompañado de la generación de conocimiento biológico de las especies que componen el recurso (*Panopea generosa* y *P. globosa*) que ha sido útil para implementar estrategias de manejo para su explotación. En *P. globosa*, especie longeva y con gran capacidad reproductiva, se ha sugerido la senescencia negativa como estrategia poblacional que se caracteriza por el decline de las tasas de mortalidad e incremento en la fertilidad conforme incrementa la edad, estrategia que puede ser esencial para el mantenimiento de sus poblaciones. Para probar la presencia de esta estrategia en las poblaciones de *P. globosa* del norte del Golfo de California se analizó el potencial reproductivo en tres grupos de edad; longevidad baja (LB) de 4 a 11 años, longevidad media (LM) de 14 a 21 años, y longevidad alta (LA) de 24 a 36 años, de un total de 115 organismos, 60 de San Felipe, B.C, y 55 de Puerto Peñasco, Son. Ambas poblaciones fueron muestreadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre). Se realizaron análisis morfológicos de largo de concha, pesos totales, drenados y de masa visceral, así como análisis histológicos para estimar el índice de potencial reproductivo, histoquímicos para la determinación de índices de cobertura de lipofuscinas y reservas energéticas (lípidos totales, LT; y carbohidratos, CHO), y bioquímicos, para determinar la concentración de reservas energéticas; carbohidratos (CHO), proteínas totales (PT), lípidos totales (LT) y triglicéridos (TG) en gónada y glándula digestiva. Paralelamente se realizó el análisis molecular en tejido gonadal por grupo de edad para la secuenciación del transcriptoma para ver la expresión diferencial de genes relacionados a la senescencia y la reproducción. La información morfológica y el índice de potencial reproductivo, sugieren incremento en la capacidad reproductiva de los organismos con la edad. Por su parte, la información histoquímica indica actividad reproductiva en organismos de mayor edad (LA), así como acumulación de lipofuscinas en la temporada reproductiva. En tejido gonadal se detectó un incremento en la concentración de LT en temporada reproductiva y TG en temporada no reproductiva con la edad, mientras que, la concentración de CHO y PT se mantuvo constante en ambas temporadas. Se logró la secuenciación *de novo* del transcriptoma de ovario de *P. globosa* en diferentes grupos de edad (LB, LM y LA), logrando anotar un 20% de transcritos del total de contigs resultantes del ensamblado, sin embargo, ninguno de estos estuvo relacionado con la reproducción. La integración general de la información morfológica, histológica, histoquímica y bioquímica parecen soportar la hipótesis de la presencia de senescencia negativa como estrategia reproductiva en las poblaciones de *P. globosa*, que en la región norte del Golfo de California parece operar al menos hasta 21 años de edad. Por lo anterior, se considera apropiado como medida de manejo la inclusión de una talla de máxima captura a fin de conservar a los organismos de mayor edad, que representan una parte importante del stock desovante de la población.

Palabras clave: Senescencia negativa, potencial reproductivo, transcriptoma.

Vo. Bo. Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota



Vo. Bo. Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega



Summary

The increase of the geoduck fishery that develops in Mexico, have been along with the knowledge of the biology of the species that compose this resource (*Panopea generosa* and *P. globosa*). This knowledge has been useful to implement management strategies for resource exploitation. In *P. globosa*, long-lived species with high reproductive capacity, it has been suggested a negative senescence as population strategy, characterized by an increase of fertility and a decline of mortality rates with age. This strategy could be useful to improve the management of the geoduck populations. In *P. globosa*, long-lived species with high reproductive capacity, it has been suggested a negative senescence as population strategy, characterized by an increase of fertility and a decline of mortality rates with age. This strategy could be useful to improve the management of the geoduck populations. In order to prove the presence of negative senescence in *P. globosa* populations of the north of Gulf of California, reproductive potential was estimated in three age groups; low longevity (LL) from 4 to 11 years, medium longevity (ML) from 14 to 21 years, and high longevity (HL) from 24 to 36 years, in 115 organisms, 60 from San Felipe, B.C., and 55 from Puerto Peñasco, Son. Both populations were sampled in non-reproductive (April) and reproductive (December) seasons. Morphological analyses were performed in shell length, total, dry and visceral mass weight, as well as histological analyses to estimate reproductive potential, histochemical analyses to determine lipofuscins and energetic reserves (total lipids, TL; and carbohydrates, CHO) coverture, and biochemical proximal analyses to determine energetic reserves concentrations; carbohydrates (CHO), total proteins (TP), total lipids (TL) and triglycerides (TG) in gonad and digestive gland. Additionally, molecular analysis were made in gonad tissue using two organisms of each age group, by transcriptome sequencing to find genes with differential expression related to senescence and reproduction. The morphological information along with reproductive potential suggest an increment in reproductive capacity of the organisms with age. On the other hand, histochemical information indicate a reproductive activity in oldest organisms (HL), along with lipofuscins accumulation in reproductive season. In gonad tissue was detected an increment of TL concentration in reproductive season, and TG increment in non-reproductive season with age, while CHO and TP were constant in both seasons. *De novo* sequencing and assembly of transcriptome of the ovary performed in the three age groups (LL, ML, and HL), allowed the annotation of 20% of transcripts of all contigs obtained. However, none of these were related to reproduction. The general integration of the morphological, histological, histochemical and biochemical information seem to support the negative senescence hypothesis as reproductive strategy in *P. globosa* in the north of Gulf of California, where it happens at least to 21 years. Considering this, it is appropriate introducing a legal maximum size as management measure, in order to conserve the older organisms that represent an important part of the spawning stock of population.

Keywords: Negative senescence, reproductive potential, transcriptome.

Vo. Bo. Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota

Vo. Bo. Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Dedicatoria

A mi padre, madre y hermano que siempre están ahí.

A los verdaderos amigos que siempre están en las buenas y malas.

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada (número de registro 590677) y por el apoyo a través del proyecto 034-C Extinción local, adaptación o compensación en organismos de vida larga ante el calentamiento global; *Panopea abrupta* en el Pacífico nororiental.

Al CIBNOR, particularmente a la Dirección de Estudios de Posgrado por las facilidades y apoyo otorgado durante mi permanencia como estudiante en esta institución. De manera especial al Laboratorio de Histología donde me ayudaron en gran parte del trabajo. También a los laboratorios de Inmunogenómica Marina, al de Genética Molecular, al de Bioquímica Fisiológica y al de Necton, así como a Dirección General por el apoyo otorgado durante toda la maestría.

Al INECOL por permitirme realizar una estancia para la parte bioinformática y a los investigadores y alumnos que me apoyaron durante el proceso.

A los pescadores de las cooperativas de San Felipe, Baja California y Puerto Peñasco, Sonora, y a los de los diferentes laboratorios Delia Rojas, Mónica Nurenskaya, Sergio Scarry, Noemí Bocanegra, Karina Vázquez, José Hidalgo de la Toba, Rosa María Morelos, Antonio López Carvallo, que fueron de gran ayuda al momento de coleccionar y procesar las muestras.

Al comité tutorial oficial, Dr. Daniel Bernardo Lluch Cota, Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega, Dr. Enrique Ibarra Laclette, y a los no oficiales pero no menos importantes Dr. Sergio Scarry González Peláez y Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo.

Y de manera muy especial a la Dra. Carmen Rodríguez, Dra. Fabiola Arcos, Eulalia Meza y la B. M. Karla Vega que sin duda estuvieron ahí empujándome a seguir con su amistad.

Y a todos los demás que pusieron su granito de arena dentro y fuera del CIBNOR.

GRACIAS

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1 Área de estudio.....	12
6.2 Colecta de organismos	13
6.3 Estimación de la edad.....	15
6.4 Análisis bioquímicos.....	16
6.5 Análisis histológicos e histoquímicos	20
6.6 Análisis estadísticos	25
6.7 Análisis moleculares y bioinformáticos	25
7. RESULTADOS	29

7.1 Análisis morfológicos	32
7.2 Análisis bioquímicos.....	38
7.3 Análisis histológicos e histoquímicos	47
7.4 Análisis bioinformático.....	52
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
10. LITERATURA CITADA	78
11. ANEXOS.....	88
11.1 Anexo A. Protocolo de extracción de RNA para <i>P. globosa</i>	88

Lista de figuras

Figura 1. Sitios de muestreo en el Alto Golfo de California: San Felipe, Baja California y Puerto Peñasco, Sonora.....	13
Figura 2. Sección de la placa del ligamento de la almeja generosa <i>P. globosa</i> teñida con solución Mutvei, mostrando las bandas de crecimiento (A), y líneas de crecimiento (B). Tomada a 4X con un microscopio de campo claro (Olympus- BX-41).....	16
Figura 3. Secciones histológicas e histoquímicas de <i>P. globosa</i> . Tinción H-E de estadios de madurez: (A) Previtelogénesis, (B) vitelogénesis temprana, (C) maduro, (D) desove parcial, (E) postdesove. Tinción S-N: (F) gónada, (G) tejido conjuntivo, (H) glándula digestiva. Tinción AAPAS: (I) gónada, (J) tejido conjuntivo, (K) glándula digestiva. Tinción C-K: (L) gónada, (M) tejido conjuntivo, (N) glándula digestiva, (O) manto. tc, tejido conjuntivo; Og, ovogonias; Pvo, ovocitos previtelogénicos; Vo, ovocitos vitelogénicos; Mo, ovocitos maduros; n, núcleo; a, atresias; l, lípidos; ch, carbohidratos; lpf, lipofuscinas. Microscopia de luz a 20x y 40x.....	23
Figura 4. Secciones histoquímicas de <i>P. globosa</i> . Tinción AAPAS: (J) tejido conjuntivo, (K) glándula digestiva. Tinción C-K: (L) gónada, (M) tejido conjuntivo, (N) glándula digestiva, (O) manto. tc, tejido conjuntivo; Og, ovogonias; Pvo, ovocitos previtelogénicos; Vo, ovocitos vitelogénicos; Mo, ovocitos maduros; n, núcleo; a, atresias; l, lípidos; ch, carbohidratos; lpf, lipofuscinas. Microscopia de luz a 20x y 40x.....	24
Figura 5. Frecuencia de las tallas de longitud de concha en <i>P. globosa</i> para las poblaciones de San Felipe (A) y Puerto Peñasco (B) en el norte del Golfo de California.....	30
Figura 6. Análisis de la longitud de la concha (cm) de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (NR) (abril) y reproductiva (R) (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar; Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	33
Figura 7. Análisis del peso total de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error	

estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.	34
Figura 8. Análisis del peso drenado de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	36
Figura 9. Análisis del peso de la masa visceral de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	37
Figura 10. Análisis de CHO en la gónada de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	39
Figura 11. Análisis de PT en gónada de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	40
Figura 12. Análisis de LT en gónada de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	41
Figura 13. Análisis de TG en gónada de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error	

indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	42
Figura 14. Análisis de CHO en glándula digestiva de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	43
Figura 15. Análisis de PT en glándula digestiva de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	44
Figura 16. Análisis de LT en glándula digestiva de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	45
Figura 17. Análisis de TG en glándula digestiva de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	46
Figura 18. Frecuencia de estadios de madurez observados en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) para la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California; Previtelogénesis (PVT); Vitelogénesis temprana (VT); Maduro (M); Desove parcial (DP); Postdesove (PD).....	47
Figura 19. Análisis de PR de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad(LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	48

Figura 20. Análisis de porcentaje (%) de CHO de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	49
Figura 21. Análisis de % LT de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.....	50
Figura 22. Análisis de porcentaje (%) de lipofuscinas de la almeja <i>P. globosa</i> del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba <i>a posteriori</i> de Tukey.	51
Figura 23. Intervalos de longitud de las secuencias de los transcritos anotados.	53
Figura 24. Diagrama de Venn mostrando el total de transcritos resultantes del ensamblado, separando los transcritos anotados y los no anotados.....	54
Figura 25. Filogenia de las especies utilizadas de referencia incluyendo a <i>P. globosa</i> basada en el trabajo de González <i>et al.</i> (2014).	55
Figura 26. Blastp para la identificación de proteínas de <i>P. globosa</i> homologas a aquellas disponibles para las especies seleccionadas como de referencia.	56
Figura 27. Comparación de rutas metabólicas con base en los transcritos anotados de <i>P. globosa</i> (azul) contra el ostión <i>Crassostrea gigas</i> (rojo) que fue la especie de referencia mejor anotada, usando el servidor KEGG.	57
Figura 28. Resultado de los transcritos anotados para <i>P. globosa</i> usando el servidor de Gene Ontology dividido en tres categorías: (A) Funciones moleculares, (B) componentes celulares y (C) procesos biológicos.	59
Figura 29. Mapa de calor para la expresión diferencial de los transcritos de <i>P. globosa</i> para cada una de las condiciones A (LB), B (LM), C (LA) (Arriba). Mapa de calor para la matriz de correlación de las diferentes condiciones A (LB), B (LM), C (LA), de <i>P. globosa</i> (Abajo).	60

Lista de tablas

Tabla I. Edades de los diferentes grupos: Longevidad baja (LB), Longevidad media (LM) y longevidad alta (LA).....	31
Tabla II. Valores obtenidos del análisis de longitud de concha (cm) en <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).	32
Tabla III. Valores obtenidos del análisis de peso total (gr) en <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).....	34
Tabla IV. Valores obtenidos del análisis de peso drenado en <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).....	35
Tabla V. Valores obtenidos del análisis de peso masa visceral en <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).	37
Tabla VI. Valores obtenidos del análisis de CHO en gónada de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).....	38
Tabla VII. Valores obtenidos del análisis de PT en gónada de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).....	40
Tabla VIII. Valores obtenidos del análisis de LT en gónada de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).....	41
Tabla IX. Valores obtenidos del análisis de TG en gónada de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).....	42
Tabla X. Valores obtenidos del análisis de CHO en glándula digestiva de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).	43

Tabla XI. Valores obtenidos del análisis de PT en glándula digestiva de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).	44
Tabla XII. Valores obtenidos del análisis de LT en glándula digestiva de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).	45
Tabla XIII. Valores obtenidos del análisis de TG en glándula digestiva de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).	46
Tabla XIV. Valores obtenidos del análisis de PR de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).	48
Tabla XV. Valores obtenidos del análisis de % CHO de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).	49
Tabla XVI. Valores obtenidos del análisis de porcentaje (%) de LT de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).	50
Tabla XVII. Valores obtenidos del análisis de porcentaje (%) de lipofuscinas de <i>P. globosa</i> en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).	51
Tabla XVIII. Librerías tipo TruSeq generadas a partir de las condiciones en las muestras de <i>P. globosa</i> . q: Calidad mínima de las secuencias p: Porcentaje mínimo de bases con dicha calidad a: Calidad promedio de las secuencias.	52
Tabla XIX. Longitud de los transcritos anotados a partir del ensamblado de las bibliotecas de <i>P. globosa</i>	53
Tabla XX. Lista de transcritos diferencialmente expresados en <i>P. globosa</i>	62

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso biológico que permite la creación de nuevos organismos, siendo una característica común de todas las formas de vida conocidas. En animales las estrategias reproductivas se dividen de manera general en k (pocas crías con cuidado parental) y r (muchas crías sin cuidado parental) (Morlans, 2004). Sin embargo, existen particularidades dentro de estas estrategias con diferentes características, como lo son los modelos conservador y oportunista, además de la semelparidad e iteroparidad. En el caso de los moluscos bivalvos su gran plasticidad morfológica, diversidad de hábitats que ocupan y hábitos de vida, les han permitido adoptar varias de las estrategias las cuales implican diferentes manifestaciones de sexualidad, tipos de huevo, desarrollo embrionario, desarrollo larvario, mecanismos de dispersión y colonización de hábitats (Baqueiro-Cárdenas, 1998). Ayache *et al.* (2016) encuentran que *Solen marginatus* parece adoptar la combinación de los dos tipos de estrategia reproductiva para la gametogénesis: oportunista, donde el alimento recién ingerido es usado para dicho proceso; y conservadora, donde el organismo utiliza las reservas almacenadas durante cierto tiempo para el evento reproductivo. Por otra parte, la semelparidad se ha identificado como estrategia reproductiva en el microbivalvo *Gaimardia bahamondei*, la cual considera un sólo evento reproductivo en la vida de un organismo (Chaparro *et al.*, 2011). En contraste con esta, Langton *et al.* (1987) reportaron que *Placopecten magellanicus* recurre a la iteroparidad, caracterizada por tener varios eventos reproductivos a lo largo de la vida del organismo. Todas estas estrategias tienen por finalidad la autoperpetuación de cada especie.

Para evaluar la capacidad de producir descendencia de los individuos de una población se toman indicadores o índices denominados de fecundidad específica que sirven para caracterizar el potencial reproductivo a nivel poblacional e incluyen, dependiendo de la especie, factores como la fecundidad individual, inicio de la madurez sexual, proporción de sexos, y periodicidad y frecuencia de las puestas a lo largo del ciclo biológico individual; como tal, el índice de potencial reproductivo, se define como la capacidad de un organismo para producir descendencia, donde una población sostenible será aquella en la que la supervivencia y fecundidad, durante el tiempo de vida de los individuos que la

componen, permiten que esos individuos se reemplacen a sí mismos (Saborido-Rey, 2008). En el caso de invertebrados marinos, como el camarón *Litopenaeus vannamei*, el potencial reproductivo considera el número total de ovocitos, el diámetro promedio de los ovocitos, el cual representa el promedio del diámetro medido de todos los ovocitos en el ovario; la madurez ovárica, representando el área total ocupada (μm^2) por los ovocitos presentes en la gónada de cada hembra; y el área total del ovario que representa el área de la superficie completa (μm^2) ocupada por la gónada (Arcos-Ortega *et al.*, 2005). En moluscos bivalvos como *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis*, el potencial reproductivo se ha estimado usando los ovocitos en todos los estadios de madurez, así como el radio de estos y número total (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2017).

De manera particular para moluscos, varios autores indican que su fecundidad está relacionada a la edad, lo que implica que destinan un mayor esfuerzo energético para la reproducción (producción de gametos); en el mejillón *Mytilus edulis* se producen de 7 a 40 millones de huevos dependiendo de su longitud de concha y en *Ostrea edulis* la producción de huevos varía de cien mil a un millón en función de la edad (Gosling, 2004). Langton *et al.* (1987) demostraron que en hembras del pectinido *Placopecten magellanicus*, hay una relación positiva entre la talla y la cantidad de huevos producidos, así como un mayor esfuerzo reproductivo en función de la edad. En algunas especies de longevidad considerable, como *Panopea generosa* que vive 163 años, *Margaritifera margaritifera* alcanzando 190 años y *Arctica islandica* que llega a vivir hasta 375 años, se ha indicado que no se observa un decline con la capacidad fisiológica y tasas de reproducción (Philip y Abele, 2010). Ridgway *et al.* (2011) han reportado en algunos bivalvos que no se observa una senilidad reproductiva aparente, ya que la producción gonádica continúa e incluso incrementa con la edad, además de un crecimiento indeterminado aunque en proporciones mínimas en edades avanzadas, además de que suponen que los bivalvos longevos son un grupo de organismos que presentan una posible senescencia negativa. En contraste con la senescencia, caracterizada por el decline de la fertilidad y el incremento en las tasas de mortalidad, en la “senescencia negativa” hay un decline en las tasas de mortalidad e incremento en la fertilidad y funcionalidad, conforme avanza la edad (Vaupel *et al.*, 2004).

Además, Berkeley *et al.* (2004), mencionan que el crecimiento y la supervivencia podría relacionarse a la edad maternal, lo cual significa que los individuos más viejos producen larvas con tasas de supervivencia y crecimiento mayores, incrementando así la probabilidad del reclutamiento subsecuente. Por las características anteriores es posible considerar a la senescencia negativa como una estrategia reproductiva que opera en especies longevas para el mantenimiento de sus poblaciones.

En bivalvos de gran longevidad, especialmente en aquellos que viven enterrados en el sustrato, se considera como hipótesis que debido a su forma de vida, el oxígeno es mínimo y estable, lo que podría favorecer una mayor esperanza de vida, previniendo la oxidación de biomoléculas y reduciendo la acumulación de productos celulares (Philip y Abele, 2010). En el caso de las almejas del género *Panopea*, debido a que estas se entierran profundamente en el sustrato (hasta un metro), quedan a resguardo de la mayoría de los depredadores (Sloan y Robinson, 1984), resultado en bajas tasas de mortalidad en sus poblaciones por lo cual se ha sugerido que sus poblaciones presentan gran longevidad (González-Peláez, 2013); en *P. generosa* alcanza hasta los 168 años (Bureau *et al.*, 2002), mientras que para *P. abbreviata* la edad promedio en poblaciones de Argentina es de 40 años (Morsan y Ciocco, 2004), y para *P. globosa* 47 años (González-Peláez, 2013). Además de esto, se ha reportado actividad reproductiva en organismos de avanzada edad (>80 años) (Gribben y Creese, 2003), así como la presencia de esperma y óvulos morfológicamente viables en individuos de edad avanzada en *P. generosa*, donde también se ha observado un incremento en el volumen y peso de la masa visceral con la edad (Sloan y Robinson, 1984), lo cual supone un incremento en el tamaño de la gónada y por ende de la capacidad reproductiva.

Por lo anterior, se ha propuesto en *P. globosa* la posibilidad de la presencia de senescencia negativa ocurra en como estrategia sus poblaciones (González-Peláez *et al.*, 2015). El fenómeno de senescencia negativa se ha observado en los gasterópodos *Umbonium costatum* (Noda, 1991; Noda *et al.*, 1995) y *Litorina rudis* (Huges y Roberts, 1981), así como en bivalvos en el caso de *Yoldia notabilis* (Nakaoka, 1994, 1996), donde la fertilidad se incrementa con el crecimiento individual y la tasa de mortalidad disminuye.

Pese a la evidencia que sustenta la estrategia de senescencia negativa en *P. globosa*, es necesario identificar qué procesos específicos están involucrados a nivel molecular, como la expresión de genes relacionados a la senescencia y al potencial reproductivo, así como el análisis del transcriptoma asociado a este proceso.

La senescencia celular (llamada comúnmente envejecimiento) se define generalmente como la pérdida progresiva de funciones acompañadas de la disminución de la fecundidad y el aumento de la mortalidad con la edad avanzada, lo que es claramente malo para el individuo (Kirkwood, 1999; Kirkwood y Cremer, 1982; Wolf, 2010). Asimismo, la senescencia celular es la respuesta de las células, mitóticamente competentes que responden a estímulos potenciales para causar formaciones neoplásicas y está dada entre otros aspectos, en un arresto de su crecimiento (Campisi, 2003). Esta senescencia se ha observado, al menos en mamíferos, que está regida por un acortamiento del telómero que por mecanismos bioquímicos propios de la replicación del ADN este se va reduciendo durante cada fase S, y ya que la enzima responsable de la síntesis del ADN telomérico no se expresa en la mayoría de las células, los telómeros se acortan en cada ciclo celular (Pardo-Andreu *et al.*, 2005). Por otra parte, en otras especies, como es el caso del nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca *Drosophila melanogaster*, se han observado mecanismos genéticos asociados a la senescencia, particularmente el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- β) y la insulina que regulan las células germinales y su proliferación durante el envejecimiento (Tatar, 2010). Aunado a esto, las características de la senescencia celular características están asociadas con el estrés, que es una condición en la cual el equilibrio dinámico de los organismos, llamado homeostasis, es amenazado por estímulos intrínsecos o extrínsecos, asimismo el estrés oxidativo es un disturbio en el balance entre prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, llevando a un daño oxidativo (Sies, 1991; Sokolova *et al.*, 2012). En respuesta a las condiciones del medio ambiente, los moluscos han desarrollado mecanismos de defensa para adaptarse los cuales pueden prevenir o neutralizar las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ERO/ERN) a causa del metabolismo aeróbico por diferentes vías metabólicas celulares (Rodríguez-Jaramillo, 2014). Dichos mecanismos incluyen metales quelantes (ferritina, transferrina,

metalotioneína entre otros), enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), antioxidantes de bajo peso molecular y mecanismos de reparación de ADN directos (metilación de guanina) e indirectos (intervención de nucleasas y ADN polimerasas) (Hebbel, 1986; Sies, 1993). Así como proteínas de choque térmico (HSP) que son chaperonas moleculares evolutivamente conservadas, con funciones esenciales como citoprotectores en todos los organismos, las cuales se activan por medio de factores de transcripción conocidos como factor de choque térmico (HSF) (Barral *et al.*, 2004; Sorensen *et al.*, 2003). Afectando así la expresión génica como respuesta metabólica al estrés, en particular en situaciones de estrés prolongado o crónico, además de estimular la respuesta inmune (Soti *et al.*, 2005; Sreedhar y Csermely, 2004). Otro mecanismo de defensa es la apoptosis que es un programa regulado de auto-desintegración por el que las células dañadas se eliminan para evitar la evolución de la inflamación y enfermedades, como cáncer (Edinger y Thompson, 2004). Cabe destacar que este mecanismo es altamente conservado y activo en moluscos (Kiss, 2010; Sokolova, 2009).

Cuando los mecanismos de defensa mencionados fallan, se produce acumulación de lipofuscinas, las cuales son agregados de proteínas oxidadas, lípidos y metales no degradables, ha sido considerada como una prueba del proceso de envejecimiento celular, y ha sido utilizada como un indicador de la edad (Brunk *et al.*, 1992a, b). La lipofuscina es un pigmento de color pardo-amarillento con fluorescencia propia, compuesto por polímero de lípidos y fosfolípidos, derivados de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de las membranas subcelulares. Estos son productos celulares que se acumulan en los lisosomas como resultado del daño oxidativo causado por estrés (Viarengo *et al.*, 1992; Mathew y Damodaran, 1997). Los productos de oxidación que resultan de la reparación y mecanismos de absorción, al igual que productos no degradables como lipofuscinas, contribuyen a la acumulación de daño cada vez mayor, que interfiere con el funcionamiento celular en edad tardía, donde la acumulación de lipofuscinas parece jugar un papel crucial en el progreso del envejecimiento celular (Terman y Brunk, 2004; Terman *et al.*, 2007). Existen técnicas específicas para la identificación y cuantificación de lipofuscinas, como el método de

Indofenol, Ziehl-Neelsen, Schmörl, Azul Alciano (Bayliss, 1990; Riga y Riga, 1995), o carbolfuscina Kinyoun creado por AFIP (Prophet *et al.*, 1992). Los gránulos de lipofuscina presentan una característica autofluorescencia amarilla cuando son excitados con luz ultravioleta, debido a la formación de fluoróforos como resultado del catabolismo celular (Brunk *et al.*, 1992a, b).

Finalmente, de confirmarse la presencia de senescencia negativa como estrategia reproductiva en *P. globosa* se podría identificar un rasgo esencial para el mantenimiento de sus poblaciones, particularmente si se considera que sobre esta especie se desarrolla una importante pesquería en el noroeste de México. Por lo anterior, su valoración en las poblaciones del norte del Golfo de California sería de gran valor para mejorar el manejo de este recurso.

2. ANTECEDENTES

En México, la pesquería de almeja generosa inició como pesquería prospectiva en 2002, y en 2004 se estableció como pesquería comercial. De 2006 a 2009, las capturas de almeja generosa en las costas de la Península de Baja California en el Pacífico y el Golfo de California excedieron las 1200 toneladas, y durante 2010 y 2011, se reportaban mayores a 2000 toneladas. El aumento de la pesquería de almeja generosa en los últimos años se debe a su alto valor comercial y el alta demanda en los países asiáticos. Durante 2012 los precios en la costa Pacífico de Baja California se incrementaron a 16 dólares por kg. para *P. globosa*, y 24 dólares por kg. para *P. generosa* (Aragón-Noriega *et al.*, 2012).

La distribución geográfica de *P. generosa* abarca la Costa Occidental de la Península de Baja California, mientras que *P. globosa* abarca desde la región del alto Golfo de California hasta Bahía Magdalena, al suroeste de Baja California Sur (González-Peláez *et al.*, 2013). De estas, *P. globosa*, se ha descrito como un organismo dioico (sexos separados) sin un dimorfismo sexual (Arambula-Pujol, 2008), con un ciclo de vida que se compone por varios estadios que incluyen una larva trocófora, Larva D (prodisoconcha I), larva umbonada (prodisoconcha II), pediveliger (larva enterradora), juvenil y posteriormente el adulto (Ferreira-Arrieta, 2014). La temporada reproductiva de *P. globosa* varía a lo largo de su distribución, donde para las poblaciones del norte del Golfo de California el periodo reproductivo es de diciembre a marzo (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010b), mientras que en la parte central del Golfo en específico en las costas de Sonora, este ocurre entre enero y febrero (Aragón-Noriega *et al.*, 2007), y en la costa Pacífico en Bahía Magdalena, es entre marzo y abril (González-Peláez, 2013). Asimismo *P. globosa* exhibe un desarrollo reproductivo y un desove sincrónicos, además de que tiene un corto periodo reproductivo que dura de tres a cinco meses, y un periodo de reposo extenso donde las almejas no pueden diferenciarse sexualmente. Cabe mencionar que en el desove *P. globosa* empieza la gametogénesis cuando las condiciones son cálidas, y usa la caída de temperatura estacional como activador de dicha gametogénesis, lo que permite a los gametos maduros desarrollarse en cuatro meses, listos para aprovechar como larvas las

condiciones cuando la producción en el océano es más alta (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010b).

El crecimiento de esta especie varía entre poblaciones, por lo cual se ha reportado diferencias entre los modelos de crecimiento y sus respectivos parámetros. En la parte central del Golfo de California se reporta una longitud asintótica de 122.86 mm de longitud de concha y una constante k de 0.330 usando el modelo de von Bertalanffy (Cortez-Lucero *et al.*, 2011), mientras que Cruz-Vásquez *et al.* (2012) reporta que el mejor modelo para describir el crecimiento es el logístico con parámetros de 122.16 y 0.497. En la región norte del Golfo de California se reporta que el crecimiento sigue dos patrones, logístico para la localidad de Puerto Peñasco y Schnute para San Felipe, los valores de L infinita generados por inferencia multimodelo son 161.88 y 205.20 mm de longitud de concha, respectivamente. Para la población de Bahía Magdalena en el suroeste de la Península de Baja California, el modelo que mejor describe el crecimiento de la especie es el Gompertz y sus parámetros son L infinita de 167.51 y k de 0.218 (González-Peláez *et al.*, 2015).

Algunos estudios han caracterizado la gónada y la hemolinfa de la población de *P. globosa* de San Felipe mediante herramientas histológicas, histoquímicas y bioquímicas durante la gametogénesis, encontrando niveles muy altos de proteínas, lípidos y carbohidratos al inicio de la gametogénesis y un posterior decremento de estos componentes bioquímicos en los estadios subsecuentes (León-Hing, 2012), además de encontrar que la mayor concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos fue mayor durante los estadios de previtelogénesis y espermatogénesis temprana (Arcos-Ortega *et al.*, 2015). Por su parte, se ha descrito que el glucógeno desempeña un papel importante como compuesto de reserva en las hembras y que *P. globosa* sigue un modelo conservador, donde las reservas energéticas se acumulan antes de iniciar la gametogénesis (Tapia-Morales, 2014).

En cuanto a los mecanismos genéticos que controlan la expresión de genes en los procesos de interés como la senescencia y la reproducción, se han realizado diversos estudios, sin embargo, estos trabajos se han llevado a cabo en su mayoría en otras especies

de moluscos. Kefaloyianni *et al.* (2005) muestran la activación de los marcadores apoptóticos caspasa-3 y p38-MAPK en *M. edulis* cuando este es expuesto a diferentes estresores ambientales como metales pesados y temperatura, sin embargo, aquellos genes autofágicos no han sido descritos específicamente hasta el momento. Al mismo tiempo, Ivanina *et al.* (2008) estudiaron los efectos del estrés oxidativo y los mecanismos de defensa en dos moluscos, *C. virginica* y *M. mercenaria*, encontrando que la proteína de shock térmico mitocondrial (HSP60) disminuye con la edad en ambas especies, mientras que la HSP70 incrementa y la HSP90 también disminuye por el envejecimiento en *M. mercenaria*, y en *C. virginica* no hay cambio en la HSP70 e incrementa la HSP90 con la edad. En cuanto a los genes asociados a la reproducción Ciocan *et al.* (2011) identificaron genes específicos de la reproducción asociados con la maduración y la exposición del estrógeno en el bivalvo *M. edulis*, concluyendo que los RNA mensajeros aislados y diferencialmente expresados evidencian que *M. edulis* es afectada por la exposición a estrógeno exógeno. Por otra parte, Teaniniuraitemoana *et al.* (2014) analizaron el transcriptoma de la almeja *Pinctada margaritifera* usando como tejido la gónada y encontrando una lista de genes diferencialmente expresados y relacionados a la reproducción, en específico para la determinación del sexo como el pmarg-dmrt, pmarg-fem1-like y pmarg-foxl2. Asimismo López-Landavery (2015) analizó el transcriptoma del abulón rojo *Haliotis rufescens* encontrando genes asociados a la reproducción, en especial la vitelogenina que es crítica durante la madurez ovárica. Mientras que en *P. globosa* Tapia-Morales (2014) analizó el transcrito del gen de la vitelina/vitelogenina obteniendo por primera vez su secuencia, la cual tuvo una similitud arriba de 84% con las reportadas para otros bivalvos.

3. JUSTIFICACIÓN

La almeja generosa *Panopea sp.* es un recurso que tiene alto valor comercial que ha venido explotándose desde hace 12 años, por tal motivo resulta ser una de las pesquerías ribereñas más importantes de Baja California, Baja California Sur y Sonora. Para el caso particular de la almeja del Golfo de California *P. globosa* esta llega a alcanzar un precio en el mercado internacional de 16 dólares americanos por kilo. El crecimiento de la pesquería de almeja generosa *P. globosa* en México, junto con su alto valor económico, hace importante el implemento de estrategias de manejo adecuadas para evitar la sobreexplotación de este recurso. Las medidas a corto plazo consideran fijar tasas de aprovechamiento en función de su disponibilidad, rotación de bancos de cosecha y extracción únicamente de organismos adultos considerando como medida precautoria la talla mínima igual o mayor a la frecuencia modal (González-Peláez *et al.*, 2015).

Con la ejecución del presente trabajo de tesis se pretende determinar la senescencia negativa como rasgo poblacional de la almeja *P. globosa*, mismo que de estar presente implicaría la necesidad de implementar estrategias de manejo pesquero tendientes a proteger la parte de la población que más aporta en términos de producción de larvas.

4. HIPÓTESIS

El conocimiento biológico de la almeja generosa subtropical *P. globosa* ha permitido identificar que es una especie longeva y con gran capacidad reproductiva por lo cual se ha sugerido que la senescencia negativa puede estar presente como rasgo poblacional fundamental en la continuidad de las poblaciones de esta especie en el noroeste de México. Por lo anterior, se esperaría que el potencial reproductivo de la especie se incrementa con la edad, siendo evidente en la fecundidad, tallas de los ovocitos, composición bioquímica de los tejidos que participan en la transferencia de energía a los gametos y la activación de genes específicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Valorar la senescencia negativa como rasgo presente en las poblaciones de la almeja generosa *P. globosa*.

5.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar el potencial reproductivo de *P. globosa* respecto a la edad mediante análisis histológicos e histoquímicos.
- 2) Analizar los cambios en la concentración de lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos en gónada respecto a la edad.
- 3) Evaluar el perfil transcriptómico asociado a la senescencia negativa en *P. globosa*.
- 4) Integrar evidencia a favor o en contra de la hipótesis de la presencia de senescencia negativa.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El área de estudio se ubica en la región del Alto Golfo, al norte del Golfo de California, entre los 31° 00' y los 31° 45' de latitud norte y entre los 114° 30' y 114° 60' de longitud oeste y que limita al oeste con el Estado de Baja California y al este con el Estado de Sonora (Valenzuela-Quiñonez, 2010) (Fig. 1). El Alto Golfo de California tiene características muy variadas, como lo son sus rangos extremos de temperatura, alta evaporación, baja precipitación y salinidad elevada, así como poca profundidad con pendientes del fondo poco pronunciadas, además de componerse por capas de sedimentos, alta turbidez y amplitudes grandes de marea (Nava-Romo, 1994).

En el Alto Golfo las mareas presentan un patrón semi-diurno, registrándose amplitudes hasta de 10 m. Las condiciones extremas del rango de mareas ocasionan una fuerte mezcla de agua, y al mismo tiempo el fenómeno de surgencias de la región norte se presenta durante todo el año por las fuertes corrientes de marea, lo que ocasiona que esta zona sea altamente productiva (Álvarez-Borrego, 1983; Álvarez-Borrego *et al.*, 1975).



Figura 1. Sitios de muestreo en el Alto Golfo de California: San Felipe, Baja California y Puerto Peñasco, Sonora.

6.2 Colecta de organismos

Los organismos analizados en el presente estudio provienen de poblaciones ubicadas en las localidades de San Felipe, Baja California y Puerto Peñasco, Sonora (Fig. 1). El diseño del muestreo se planificó para obtener organismos en reposo reproductivo y

madurez por lo cual se realizaron las capturas en dos periodos del año, abril y diciembre del 2016, respectivamente. Asimismo, el uso de dos zonas de captura permitiría una mayor probabilidad de obtener organismos de diferentes clases de edad.

La recolecta se hizo por buceo autónomo, utilizando una motobomba de 1.5 Hp y una manguera de 50 m. de longitud para dirigir un chorro de agua bombeado desde la superficie para remover el sustrato en el cual se encuentran enterrados los organismos. Estos se colocaron en bolsas de colecta y fueron llevados a la superficie donde se almacenaron en hieleras plásticas para su transporte a tierra y posterior obtención de datos morfométricos y tejidos. De cada organismo se registró el peso total vivo (PT), posteriormente se disecó con el objeto de obtener el peso del animal sin agua o drenado y de la masa visceral (gónada, intestino y estómago), así como del conjunto de todos los tejidos blandos usando una balanza electrónica (± 1 g). Las conchas se marcaron para su posterior identificación y toma de datos de longitud (LC) y ancho de la concha (AC) mediante una cinta métrica (± 1 mm) y cruce de datos con la información de edad estimada. La masa visceral se dividió para los diferentes análisis. Para los análisis moleculares se tomó una muestra aproximadamente de 50 μ g de gónada proveniente de dicha masa visceral, además de dos réplicas de esta, procurando que no contenga tejido diferente al requerido, de todos los organismos (machos y hembras) provenientes de las variantes de los muestreos (diferente sitio y temporada), de tal manera que estén representadas todas las condiciones relacionadas con la edad y el potencial reproductivo, las cuales se pusieron en tubos Crioviales de 2 mL. Para los análisis bioquímicos también se tomaron porciones de gónada, además de glándula digestiva de 0.09 a 0.15 g aproximadamente, provenientes de la misma masa visceral, los cuales se guardaron en tubos Crioviales de 2 mL. En cuanto a los análisis histológicos e histoquímicos se tomó el resto de la masa visceral y se preservó en solución Davidson poniéndose a conservar en hielo. Todas las muestras (con excepción de las muestras para histología e histoquímica) se almacenaron en un tanque con nitrógeno líquido para su preservación, y se transportaron por tierra al CIBNOR en la Paz, B.C.S., México, donde posteriormente se pasaron a ultracongeladores para mantenerse congeladas a -80°C

6.3 Estimación de la edad

En el caso de la determinación de la edad de los organismos, se usó la metodología de Shaul y Goodwin (1982) que implica el conteo de las líneas de crecimiento en una sección de placa del ligamento tomado de la valva derecha de cada organismo. Para ello, la valva se trató previamente adicionando resina epóxica a la región de la placa de ligamento para proteger la capa más externa de la concha. Una vez que la resina se endureció se cortó la concha empleando una sierra de baja velocidad (Isomet Buehler®), la cual se equipó con dos discos de diamante de 127 mm de diámetro y 0.4 mm de ancho, separados entre sí por 1.20 mm. Esto con el fin de obtener un solo corte en la sección de la placa del ligamento de la concha con el grosor correspondiente a la separación entre discos. Los cortes realizados fueron posteriormente fijados a los portaobjetos con resina epóxica y en cuanto se endurecieron fueron pulidos con una serie de lijas comerciales (600, 800 y 2000) y limpiados con alcohol al 70%. Finalmente los cortes se tiñeron con la solución de Mutvei (Schöne *et al.*, 2005) durante 30 minutos para una mayor definición de las líneas de crecimiento, estos se lavaron con agua destilada para quitar el exceso del colorante y se procedió a contar las líneas de crecimiento siendo cada línea equivalente a un año (Fig. 2).

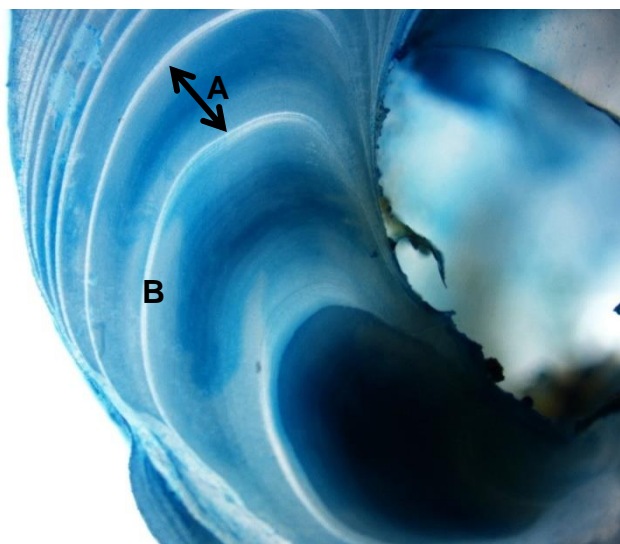


Figura 2. Sección de la placa del ligamento de la almeja generosa *P. globosa* teñida con solución Mutvei, mostrando las bandas de crecimiento (A), y líneas de crecimiento (B). Tomada a 4X con un microscopio de campo claro (Olympus- BX-41).

Una vez obtenidas las edades, se dividió a todos los organismos en tres grupos de edad tomando como referencia la longevidad: longevidad baja (LB) (4-11 años), longevidad media (LM) (14-21 años) y longevidad alta (LA) (24-36 años). Esta clasificación se utilizó en cada uno de los diferentes análisis.

6.4 Análisis bioquímicos

Las muestras de gónada y glándula digestiva destinadas para los análisis bioquímicos se procesaron en el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR, donde fueron descongeladas. Posteriormente se pesó una porción de tejido (gónada y glándula digestiva) de 0.09 a 0.15 g en un tubo Eppendorf de 2 mL, registrando el peso del tubo sin tejido, el peso fresco del tejido y los datos de la muestra (Balanza Ohaus, AP250-D, NJ-USA). Después se procedió a poner parafilm a las muestras en la boca del tubo y luego se mantuvieron a -70°C durante 24 horas. Posteriormente las muestras se colocaron en la liofilizadora (VirtTis, BenchTop 3.5, NY-USA) a -80°C con una presión máxima de 100

mTorr, por un periodo de 24 h. Después se pulverizaron las muestras con ayuda de fragmentadores (perlas) y agitación mecánica con un homogeneizador (MPI, FastPrep-24, CA-USA). Después las muestras fueron rehidratadas con 1mL de agua destilada y homogeneizadas en un vortex. Posteriormente se realizó la cuantificación de Proteínas totales, Lípidos totales, Carbohidratos totales y Triglicéridos.

Las Proteínas totales (PT) se cuantificaron mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) el cual se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinonínico, sal sódica (verdoso) para formar un color morado que es proporcional al contenido proteico de la muestra. En este estudio, se utilizó una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinonínico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284). Para las muestras de tejido se usó una alícuota de 25µl del homogeneizado que se puso a digerir en 500µl de NaOH 0.1N durante 120 minutos, posteriormente se tomaron 25µl del digerido o de la muestra diluida, y se pusieron en el fondo de una microplaca y se le agregó el reactivo preparado de BCA. Se incubó a 60°C durante 15 minutos y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 562 nm (Fujimoto *et al.*, 1985).

Se utilizó una solución estándar con una concentración de 1mg/ml de albúmina bovina, la cual se diluyó en proporción 1:1 en solución salina hasta tener concentraciones, de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/ml de proteína y solución salina como blanco.

La concentración de proteínas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Proteínas (mg/g)} = (\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{FD}) / (\text{m} \times \text{peso de la muestra})$$

(1) Dónde: FD es el factor de dilución y m es la pendiente en la curva estándar.

La concentración obtenida de proteínas se expresó en miligramos por gramo (mg/g).

Para la cuantificación de Carbohidratos totales (CHO), se usó el método de Antrona (Roe, 1955), el cual tiene como principio la deshidratación de carbohidratos con H₂SO₄ concentrado formando furfural, el cual se condensa con antrona para formar un complejo de color verde-azul que puede ser medido a 620 nm. Se tomaron 0.1 mL de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.1 mL de Ácido TriCloroAcético (TCA) al 20% en tubos Eppendorf de 0.65 mL, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm (revoluciones por minuto) por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendor 5810 R, NY-USA), después se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. Para determinar la concentración de carbohidratos totales se utilizó un método basado en Roe *et al.* (1955) donde 25µL de sobrenadante se colocaron en un tubo y se le agregó 0.25 mL de solución de Antrona 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%. Se calentaron a baño maría a 90 °C durante 5 minutos y se enfriaron en baño de hielo. Se leyó su absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) (Roe *et al.*, 1961).

La curva estándar se preparó de la siguiente manera: la solución estándar de carbohidratos contiene 5 mg/mL, se prepararon diluciones en proporción 1:1, en 500 µL de TCA al 20%, quedando concentraciones de 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 y 0.3906 mg/mL de carbohidratos.

La cantidad de carbohidratos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de carbohidratos (mg/gr)} = (\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{FD}) / (\text{m} \times \text{Peso de la muestra})$$

(2) Dónde: m es la pendiente en la curva estándar y FD es el factor de dilución

La concentración obtenida de carbohidratos se expresó en miligramos por gramo (mg/g).

Para obtener la concentración de Lípidos totales (LT) se utilizó el método de la sulfafosfovainillina según Barnes y Blackstock (1973), el cual se basa en la reacción de los

lípidos con ácido sulfúrico, ácido fosfórico y vainillina para dar un complejo de color rojo que puede ser leído a 520 nm. Se tomó una alícuota de 25 μ L de cada muestra, luego se puso en tubos, se les agregó 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado y se incubaron a baño maría a 90°C, por 10 minutos. Los tubos se enfriaron en baño de hielo, posteriormente se tomaron 20 μ L de cada tubo y se colocaron en el fondo del pozo de una microplaca (placa elisa) de 96 pozos, donde se le agregó 200 μ L de solución reactiva para lípidos (fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80%) se dejó incubar la placa por 40 minutos a temperatura ambiente y se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas a 540 nm (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) (Barnes y Blackstock, 1973). Al mismo tiempo que las muestras se hicieron reaccionar una curva estándar la cual se prepara de la siguiente manera:

Curva estándar: A partir de la solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma L2648) contiene 20 mg/ml, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:1, en 1 mL de solución diluyente del estándar de lípidos, quedando concentraciones de 20, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 mg/mL de lípidos. Se utilizó agua como blanco.

La cantidad de lípidos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de lípidos (mg/gr)} = (\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{FD}) / (\text{m} \times \text{Peso de la muestra})$$

(3) Dónde: m es la pendiente en la curva estándar y FD es el factor de dilución.

La concentración obtenida de lípidos se expresó en miligramos por gramo (mg/g).

Finalmente para la determinación de Triglicéridos (TG), se utilizó una prueba enzimática colorimétrica utilizando un kit de RANDOX (No. catálogo TR 1697). Los triglicéridos se determinan a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoinemina formada por peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia de una peroxidasa. Esta técnica ha sido adaptada a microplaca de 96 pozos. Se tomó una alícuota del homogeneizado de 20 μ L y se puso en el fondo de una

microplaca, se le agregaron 200 μ L de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a una absorbancia de 540 nm (Koditschek *et al.*, 1969).

La curva estándar se preparó a partir de la solución estándar de triglicéridos contiene 200 mg/dL, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:1, en 1 mL de agua destilada, quedando concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/dL de triglicéridos. Se utiliza agua destilada como blanco.

La cantidad de triglicéridos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de triglicéridos (mg/g)} = (\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{FD}) / (\text{m} \times 100 \times \text{peso de la muestra})$$

(4) Dónde: m es la pendiente en la curva estándar y FD es el factor de dilución

La concentración obtenida de triglicéridos se expresó en miligramos por gramo (mg/g).

Para algunas muestras fue necesario hacer diluciones debido a los altos valores de absorbancia obtenidos.

6.5 Análisis histológicos e histoquímicos

Las muestras histológicas e histoquímicas fueron realizadas en el laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR, donde se usó una parte de la gónada de cada organismo, proveniente de la masa visceral previamente conservada en solución Davidson, esta se disecó y fue colocada en histocassetes que fueron posteriormente deshidratados mediante una serie gradual de alcohol etílico: 70%, 80%, 90%, 96% y 100%, se aclararon con Xileno y se incluyeron en Paraplast X-Tra con un punto de fusión de 54-56°C. Con un micrótopo de rotación Leica RM 2155, se hicieron tres cortes de tejido de 4 μ m de espesor (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008) que se tiñeron mediante el método convencional de

hematoxilina-eosina (H-E) propuesto por Humanson (1972). Cada laminilla fue examinada mediante un microscopio conectado a una videocámara (CoolSNAP-ProColor) y digitalizada usando el programa de análisis de imágenes Image Pro Plus 7.0 examinando tres imágenes de gónada por hembra.

El análisis histológico consistió en determinar la madurez sobre la base de la escala propuesta por Arcos *et al.* (2015), misma que establece los siguientes estadios: 1) Previtelogénico (PVT); caracterizado por tener ovocitos abundantes asociados al tejido conectivo. 2) Vitelogénesis temprana (VT); con presencia de ovocitos elongados asociados a las paredes de los folículos o en el lumen, donde se observa una disminución del tejido conectivo. 3) Maduro (M); caracterizada por una cantidad significativa de folículos grandes y ovocitos maduros. 4) Desove parcial (DP); donde se observan ovocitos no adheridos a las paredes, sino dispersos en espacios vacíos, además de haber una reducción del tejido conectivo. 5) Postdesove (PD); caracterizado por el alto nivel de reabsorción, con ovocitos conspicuos mostrando varios niveles de atresia (Fig. 3A-E).

Posteriormente, se seleccionaron organismos clasificados como hembras, por ende, sólo de la temporada reproductiva para determinar el potencial reproductivo (PR), siguiendo la metodología de Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2017). Este índice se determinó basado en la fecundidad como lo describen Heffeman y Walker (1989), modificado por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2017) donde incluyen ovocitos en todas las etapas de maduración, utilizando la siguiente ecuación: $(4/3\pi) r^3 N$,

(5) Donde r = radio del ovocito y N = número total de ovocitos, pero sólo se contaron los ovocitos presentes en 1.44 mm^2 a $20\times$.

Por otro lado, de las muestras de gónada conservadas en solución Davidson, se usó una porción (hembras únicamente) para determinar la concentración de lípidos y carbohidratos, debido a que los organismos de la temporada no reproductiva tenían gónadas vacías. Esto se realizó mediante las tinciones de Sudán-Negro (S-N) (para lípidos), la cual identifica lípidos insolubles y otros componentes de reserva, y Azul Alciano PAS (AAPAS) (para carbohidratos) que tiñe directamente mucopolisacáridos ácidos de color azul y

mucopolisacáridos neutros de color rosa-magenta (Sheehan y Hrapchak, 1980). Estas muestras se procesaron mediante técnicas histoquímicas ya establecidas en el laboratorio de Histología del CIBNOR. Para estimar la concentración de lípidos y carbohidratos se analizaron tres imágenes en cada uno de los diferentes tejidos: gónada, tejido conjuntivo y glándula digestiva para cada hembra (Fig. 3F-K).

Además se calculó el área de cobertura de lipofuscinas de los organismos de ambas temporadas (no reproductiva y reproductiva), donde las secciones de los tejidos usados (gónada y glándula digestiva), se tiñeron con carbolfucsina Kinyoun (C-K) una tinción histoquímica cuyo colorante lipófilo tiñe lipofuscinas de color rojo (Prophet *et al.*, 1992, modificado por Rodríguez-Jaramillo, 2014). Las secciones de tejido fueron desparafinadas, hidratadas y montadas en medio de montaje de glicerol/TBS 40%. Después se observaron las laminillas al microscopio y se documentaron mediante fotografía digital (Image Pro Plus v.7). Se analizaron tres imágenes en cada uno de los diferentes tejidos: gónada, tejido conjuntivo, glándula digestiva y manto para cada hembra (Fig. 3L-O).

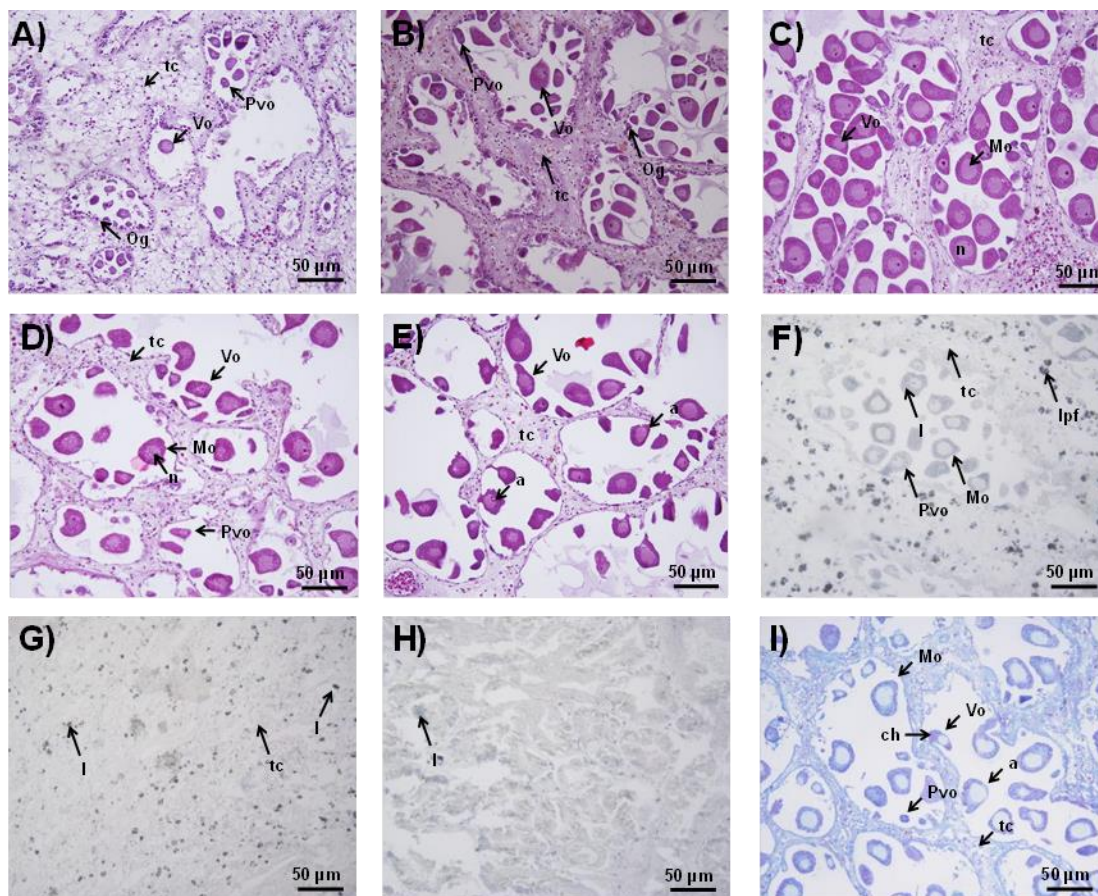


Figura 3. Secciones histológicas e histoquímicas de *P. globosa*. Tinción H-E de estadios de madurez: (A) Previtelogénesis, (B) vitelogénesis temprana, (C) maduro, (D) desove parcial, (E) postdesove. Tinción S-N: (F) gónada, (G) tejido conjuntivo, (H) glándula digestiva. Tinción AAPAS: (I) gónada, (J) tejido conjuntivo, (K) glándula digestiva. Tinción C-K: (L) gónada, (M) tejido conjuntivo, (N) glándula digestiva, (O) manto. tc, tejido conjuntivo; Og, ovogonias; Pvo, ovocitos previtelogénicos; Vo, ovocitos vitelogénicos; Mo, ovocitos maduros; n, núcleo; a, atresias; l, lípidos; ch, carbohidratos; lpf, lipofuscinas. Microscopia de luz a 20x y 40x.

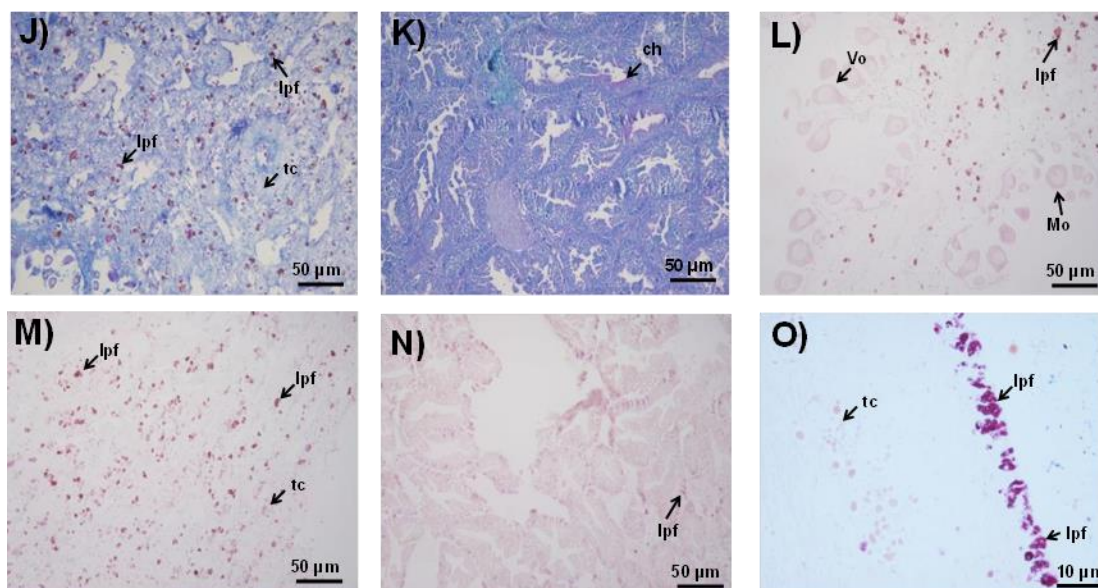


Figura 4. Secciones histoquímicas de *P. globosa*. Tinción AAPAS: (J) tejido conjuntivo, (K) glándula digestiva. Tinción C-K: (L) gónada, (M) tejido conjuntivo, (N) glándula digestiva, (O) manto. tc, tejido conjuntivo; Og, ovogonias; Pvo, ovocitos previtelogénicos; Vo, ovocitos vitelogénicos; Mo, ovocitos maduros; n, núcleo; a, atresias; l, lípidos; ch, carbohidratos; lpf, lipofuscinas. Microscopia de luz a 20x y 40x.

El área teñida se analizó mediante la identificación automática de píxeles del color específicos de la tinción, el área de píxeles se expresa como el área total (μm^2).

Para determinar tres índices fisiológicos: (1) índice de carbohidratos (ICH); (2) índice de lípidos (ILT), (3) índice de lipofuscinas (ILI) para la acumulación de pigmentos resultantes de daño o envejecimiento celular. En todos los casos, las fórmulas estandarizadas por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008, 2014):

$$(6) \text{ ICH} = \text{ACH} / \text{AT} \times 100$$

$$(7) \text{ ILT} = \text{ALT} / \text{AT} \times 100$$

$$(8) \text{ ILI} = \text{ACL} / \text{AT} \times 100$$

Donde ICH, ILT y ILI es el contenido de componentes de carbohidratos, lípidos y lipofuscinas dentro de cada tejido (área de cubierta en μm^2), y AT es el área total de la imagen (μm^2) expresados en porcentaje.

6.6 Análisis estadísticos

Se analizaron los datos de las variables morfológicas, bioquímicas, histológicas e histoquímicas utilizando la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos. Se hizo una normalización de aquellos datos que resultaron no normales usando logaritmo base 10 y arcoseno para así poder analizar de manera uniforme cada variable resultante de los diferentes análisis.

Una vez normalizados los datos, se aplicaron análisis de varianza (ANOVA) unifactoriales al 95% de confianza tomando como factor los grupos de edad establecidos (LB, LM y LA), para comparar los valores estimados de las variables consideradas (morfológicas, bioquímicas, histológicas e histoquímicas) en cada temporada (no reproductiva y reproductiva). En caso de encontrar diferencias se procedió a realizar una prueba *a posteriori* de Tukey para ver que variables eran diferentes entre sí. En el caso de las variables morfológicas se compararon el peso total, peso drenado, peso de masa visceral, largo y ancho de la concha. Las variables bioquímicas que se analizaron fueron carbohidratos, proteínas totales, lípidos totales y triglicéridos en gónada y glándula digestiva. Las variables histológicas que se evaluaron fueron el diámetro y área de los ovocitos, además del estadio de madurez para poder determinar el potencial reproductivo, mientras que las variables histoquímicas evaluadas fueron porcentaje de carbohidratos, lípidos y lipofuscinas.

6.7 Análisis moleculares y bioinformáticos

Las muestras de gónada destinadas a los análisis moleculares se colocaron en una solución de RNA-later (Ambion) para análisis de extracción de RNA total y preparación de

las bibliotecas genómicas. Se realizó la extracción de RNA total únicamente en hembras empleando el método de Trizol Reagent (Invitrogen: 40% de fenol, 24% de guanidina y tiocinato) estandarizado para tejidos de *Panopea spp.*, en el laboratorio de Inmunogenómica Marina del CIBNOR. La calidad de todos los RNA obtenidos se evaluó en geles de agarosa al 1% y mediante un nanodrop (LabTech International). Después se seleccionó el RNA de mayor calidad, con el fin de que estén presente la mayoría de transcritos que se producen en la diferente condición (no reproductiva y reproductiva) y tejido de estudio. El RNA total obtenido se clasificó por grupos de edad. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en Irapuato, Guanajuato, México para realizar la secuenciación directa del RNA mediante la tecnología de RNA-Seq. La plataforma de secuenciación que se utilizó fue de la empresa Solexa/Illumina, realizando un ensamblaje *de novo*, el cual no utiliza un genoma de referencia, sino sólo la información obtenida de la secuenciación como tal para construir el genoma sin tener algún conocimiento de la organización del mismo (Aguilar-Bultet y Falquet, 2015), debido a que en esta especie no existe un transcriptoma de referencia.

Una vez obtenidas las bibliotecas se filtraron usando la herramienta qualityControl.py para tener las secuencias con la mejor calidad con base en los siguientes parámetros:

q: Calidad mínima de las secuencias

p: Porcentaje mínimo de bases con dicha calidad

a: Calidad promedio de las secuencias

Para el ensamblaje *de novo* las lecturas fueron ensambladas a partir de contigs (segmentos contiguos de secuencias), es decir, en secuencias traslapadas, (de ahí la importancia de obtener secuencias largas en la secuenciación del RNA) y se utilizó el programa Trinity que permite la reconstrucción de transcritos, reconoce eventos de *splicing* alternativo y es especializado en análisis de muestras que no tienen genoma de referencia (Grabherr *et al.*, 2011). Después del ensamblaje se realizó un filtro de las secuencias enmascarando y eliminando las regiones correspondientes a poli A/T, secuencias de baja complejidad o extremos con alto contenido de bases indeterminadas. Aunado a esto como

el transcriptoma de *P. globosa* no tiene un genoma de referencia publicado en las bases de datos GenBank de NCBI (National Center of Biotechnology Information) se tomaron como genomas de referencia 10 especies de moluscos relacionadas filogenéticamente a *P. globosa*, cuyo genoma ha sido completamente secuenciado y está disponible en la base de datos GenBank de NCBI. Las especies utilizadas como referencia fueron: *Aplysia californica*, *Lottia gigantea*, *Haliotis diversicolor*, *Placopecten magellanicus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Villosa lienosa*, *Ruditapes philippinarum* y *Meretrix meretrix*. Se realizó un filtrado de las secuencias de las especies de referencia, removiendo secuencias codificantes no traducibles e identificando los marcos de lectura únicos en los transcritos correspondientes, para así generar una base de datos de proteínas para cada una de las especies. Después se utilizó la herramienta AlignWise (Evans y Loose, 2015) para la identificación de marcos de lecturas abiertos ORFs por sus siglas en inglés (Open Reading Frame), y la generación de sus correspondientes proteínas luego de la corrección de errores (Desplazamiento de marcos de lectura).

Adicionalmente se hizo la anotación de genes por homología usando la herramienta BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) que usa los aminoácidos de las secuencias proteicas, con la finalidad de ver que especies de referencia estuvieron mejor anotadas y tuvieron más genes homólogos con *P. globosa*. De los genes resultantes se usaron las herramientas Ortomcl para encontrar genes ortólogos (genes con un mismo origen y misma función), Gene Ontology para ver las funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares donde participan los genes y el servidor KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), para ver las rutas metabólicas donde estos se incluyen.

Por otra parte, se utilizó el paquete estadístico denominado DEseq perteneciente al programa R, el cual permite el análisis de la expresión diferencial entre muestras y tratamientos (Wang *et al.*, 2010), ya que la tecnología de RNA-Seq no es solo para identificar la presencia de transcritos, sino también para cuantificar el nivel de expresión de cada uno. En ese sentido aquellas lecturas que se encuentren en alta proporción representarán niveles altos de expresión de un determinado transcrito y aquellos transcritos

ausentes, o con un bajo número de lecturas, serán aquellos que o no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos (Schenk *et al.*, 2012).

Los análisis realizados (histológicos, histoquímicos y moleculares) se compararon con base en la edad de los organismos para identificar si había cambios en las diferentes variables, con lo cual tener un enfoque integral que permita confirmar la existencia del proceso de senescencia negativa asociado al potencial reproductivo.

7. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron un total de 115 organismos, 60 de San Felipe, B.C, y 55 de Puerto Peñasco, Son., de los cuales 55 se colectaron en temporada no reproductiva (abril) (30 en San Felipe y 25 en Puerto Peñasco) y 60 en la temporada reproductiva (diciembre) (30 en San Felipe y 30 en Puerto Peñasco). La distribución de frecuencias de tallas de la población de San Felipe abarcó de 12 a 17 cm, donde la mayoría de los organismos se ubicaron en los 14 cm, mientras que en Puerto Peñasco la distribución fue de 11 a 18 cm, encontrando a la mayoría de organismos en los 15 cm (Fig. 5).

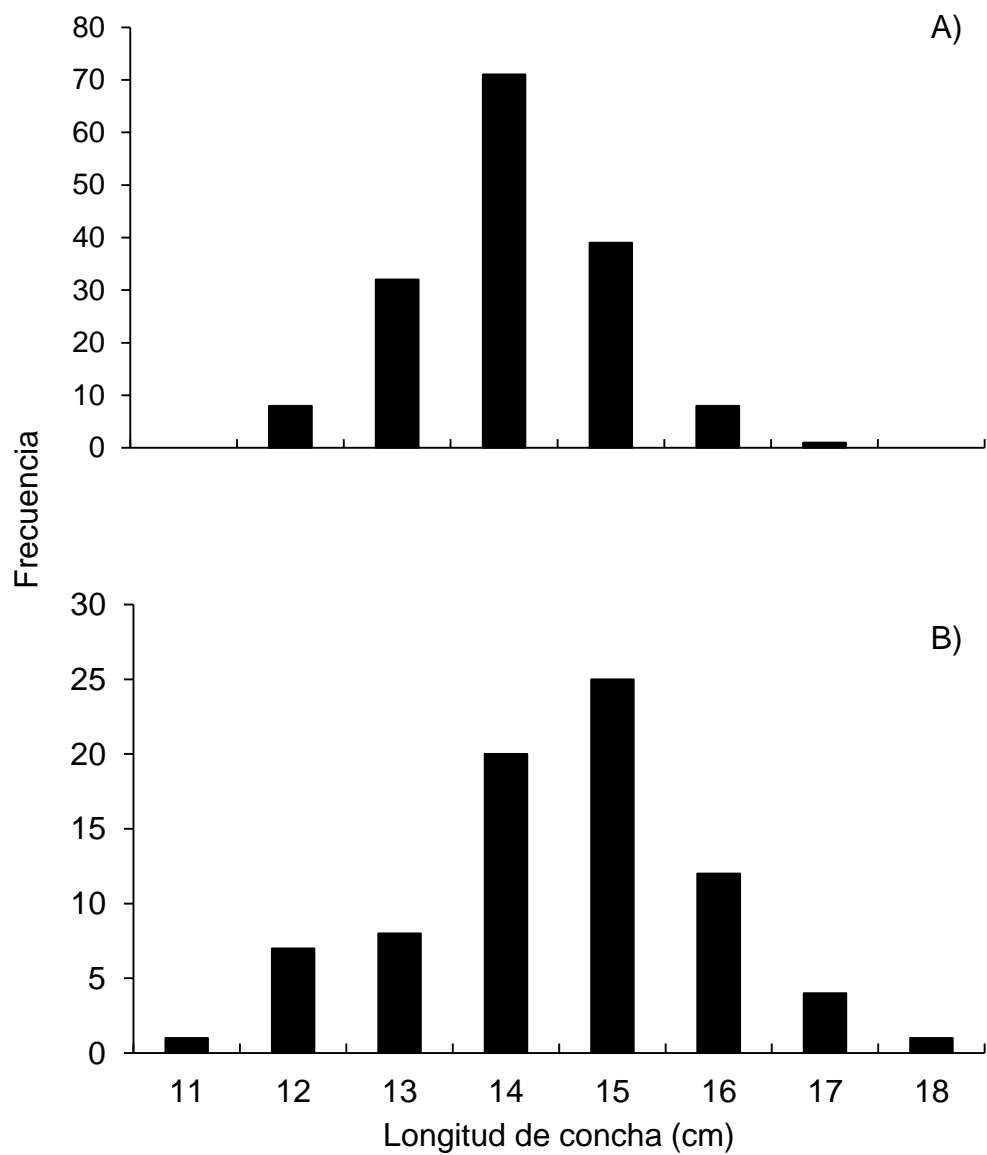


Figura 5. Frecuencia de las tallas de longitud de concha en *P. globosa* para las poblaciones de San Felipe (A) y Puerto Peñasco (B) en el norte del Golfo de California.

El análisis histológico de condición reproductiva comprobó que los 55 organismos colectados en la temporada no reproductiva se encontraron indiferenciados, mientras que de los restantes correspondientes a la temporada reproductiva, 33 fueron machos y 27 fueron hembras. De acuerdo con las edades estimadas para organismos de ambas temporadas, se obtuvo 21 de LB, 27 de LM y 67 para LA (Tabla I).

Tabla I. Edades de los diferentes grupos: Longevidad baja (LB), Longevidad media (LM) y Longevidad alta (LA).

Grupo	Edad	n
LB	4	1
LB	5	3
LB	6	3
LB	7	2
LB	8	2
LB	9	7
LB	10	2
LB	11	1
LM	14	1
LM	15	3
LM	16	2
LM	17	3
LM	18	2
LM	19	3
LM	20	11
LM	21	2
LA	24	2
LA	25	1
LA	26	9
LA	27	31
LA	28	18
LA	29	5
LA	36	1
Total		115

7.1 Análisis morfológicos

La información obtenida de la longitud de la concha arrojó un promedio general de 14.42 cm, con valores desde 8.7 hasta 18.3 cm (Tabla II). Por su parte, los valores promedio en los grupos de edad mostraron diferencias significativas en el análisis por temporada (Fig. 6). Para la temporada no reproductiva la longitud de la concha fue mayor en LM, respecto a LB y LA ($F_{2, 52} = 6.5174$; $P = 0.003$), mientras que para la temporada reproductiva se encontró diferencia entre los tres grupos ($F_{2, 57} = 41.974$; $P > 0.001$), siendo mayor en LM, seguido de LA.

Tabla II. Valores obtenidos del análisis de longitud de concha (cm) en *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Grupo	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	14.23	8	1.30	11.6	15.6
	R	11.24	13	1.33	8.7	13.4
LM	NR	15.89	10	1.10	14.7	18.2
	R	15.64	17	1.91	10.5	18.3
LA	NR	14.96	37	0.88	13	16.9
	R	13.98	30	0.78	12.7	15.4
Total general		14.42	115	1.74	8.7	18.3

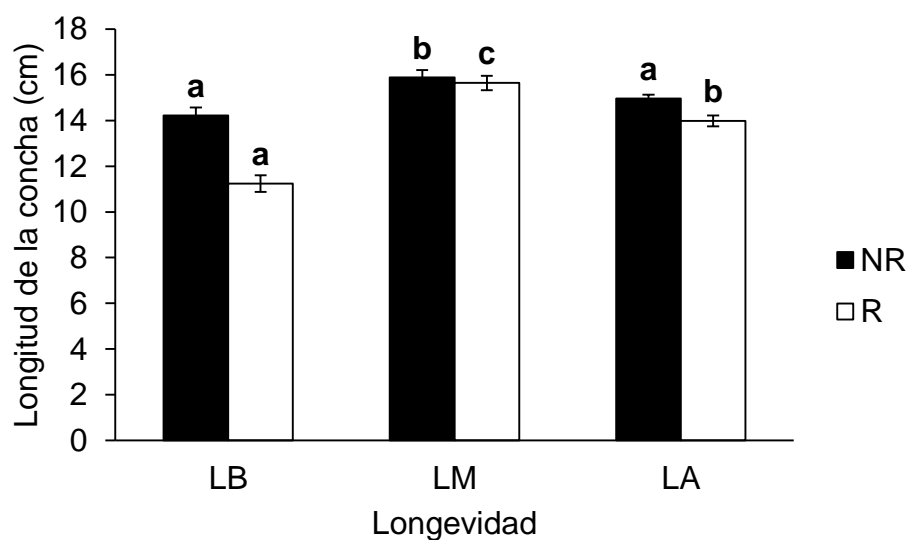


Figura 6. Análisis de la longitud de la concha (cm) de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (NR) (abril) y reproductiva (R) (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar; Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

En cuanto al peso total se estimó un promedio general de 948.14 gr, con registros desde 160 hasta 2,085 gr (Tabla III). Los grupos de edad presentaron promedios que mostraron diferencias significativas, analizados de acuerdo a su temporada. En la temporada no reproductiva, el peso total fue mayor en LM, respecto a LB y LA ($F_{2, 51} = 5.734$; $P = 0.006$), mientras que para la temporada reproductiva se encontró diferencia entre los tres grupos ($F_{2, 57} = 44.132$; $P < 0.001$), siendo LM el valor mayor, seguido de LA y LB (Fig. 7).

Tabla III. Valores obtenidos del análisis de peso total (gr) en *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	980	8	168.48	755	1,240
	R	423.77	13	121.65	160	607
LM	NR	1,270	9	183.75	1045	1,685
	R	1,335.29	17	489.15	339	2,085
LA	NR	1,006.89	37	232.51	580	1,705
	R	778.47	30	115.43	593	1,067
Total general		948.14	114	362.66	160	2,085

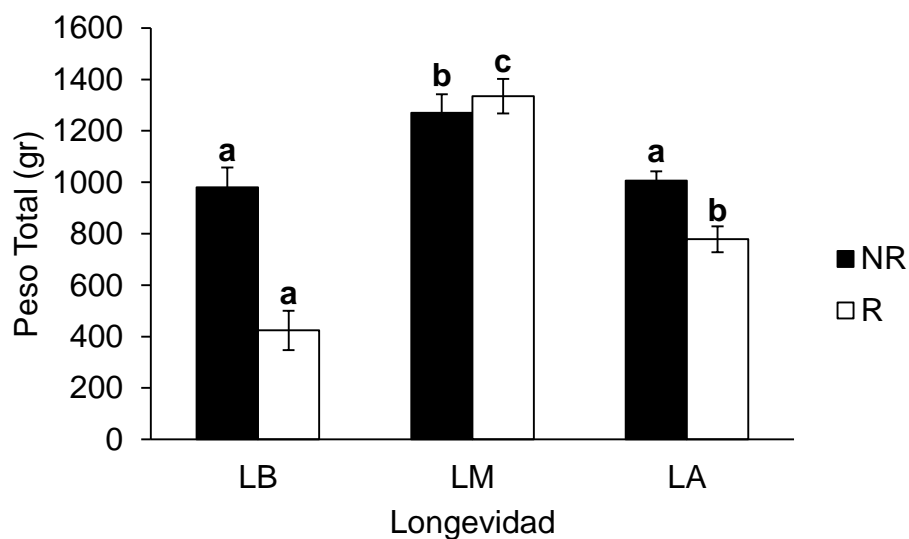


Figura 7. Análisis del peso total de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Para los valores de peso drenado se obtuvo un promedio general de 510.11 gr, con valores desde 123 hasta 956 gr (Tabla IV). Se encontraron diferencias significativas entre los valores promedio de los grupos de edad. En la temporada no reproductiva el peso drenado fue mayor en LM, respecto a LB y LA ($F_{2, 51} = 3.8847$; $P = 0.027$). Por otra parte, para la temporada reproductiva se encontraron diferencias entre los tres grupos ($F_{2, 57} = 41.718$; $P < 0.001$), siendo mayor en LM seguido de LA y LB (Fig. 8).

Tabla IV. Valores obtenidos del análisis de peso drenado en *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	498.63	8	91.70	342	649
	R	243.23	13	65.96	123	343
LM	NR	631.78	9	121.16	511	919
	R	639.76	17	199.98	213	956
LA	NR	563.76	37	100.58	350	842
	R	452.67	30	59.20	347	598
Total general		510.11	114	159.80	123	956

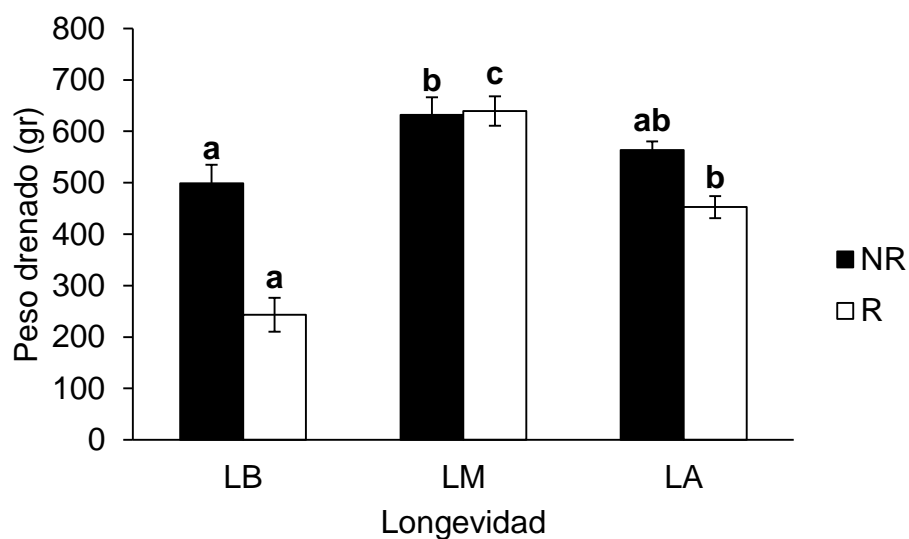


Figura 8. Análisis del peso drenado de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Los valores obtenidos del peso de la masa visceral arrojaron un promedio general de 44.38 gr, con valores desde 9 hasta 103 gr (Tabla V). Sólo se encontraron diferencias significativas para los valores promedio en los grupos de edad en la temporada reproductiva, donde los tres grupos de edad fueron diferentes entre sí ($F_{2, 57} = 25.077$; $P < 0.001$), teniendo a LM como el mayor (Fig. 9).

Tabla V. Valores obtenidos del análisis de peso masa visceral en *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	43.5	8	4.31	38	51
	R	19.08	13	6.71	9	34
LM	NR	56	9	16.87	35	80
	R	56.29	17	27.82	17	103
LA	NR	52.62	37	13.21	26	82
	R	35.17	30	7.81	22	51
Total general		44.38	114	18.91	9	103

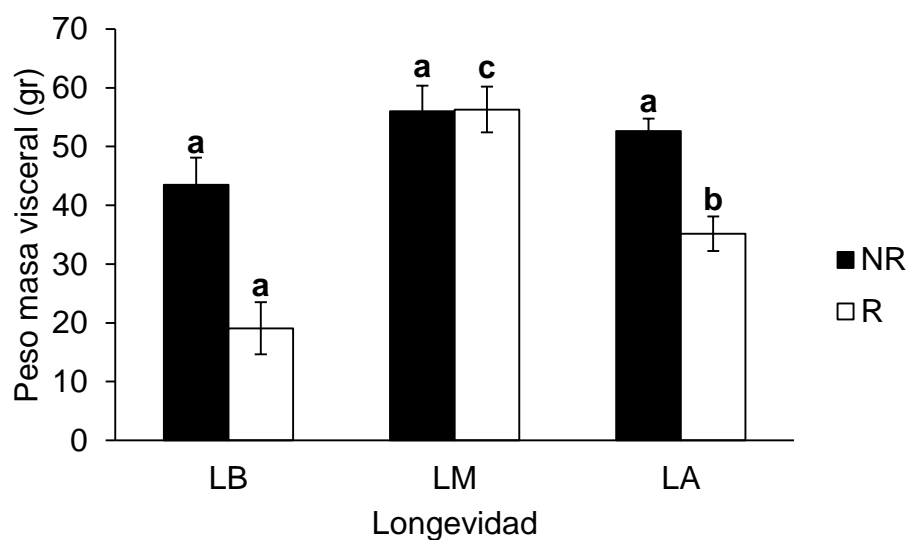


Figura 9. Análisis del peso de la masa visceral de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

7.2 Análisis bioquímicos

Respecto a los valores de carbohidratos (CHO) en gónada el promedio general obtenido fue de 121.23 mg/g, con valores desde 31.91 hasta 308.6 mg/g (Tabla VI). Por otra parte, los valores promedio en los grupos de edad mostraron diferencias significativas ($F_{2, 57} = 9.1529$; $P < 0.001$) únicamente en la temporada reproductiva, donde LB fue el valor mayor (Fig. 10).

Tabla VI. Valores obtenidos del análisis de CHO en gónada de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	176.62	8	53.11	134.89	287.62
	R	95.67	13	67.83	33.58	244.63
LM	NR	159.12	10	42.25	92.15	219.89
	R	77.80	17	40.27	36.28	156.94
LA	NR	187.42	37	48.00	74.79	308.56
	R	47.88	30	21.78	31.91	151.27
Total general		121.23	115	73.55	31.91	308.56

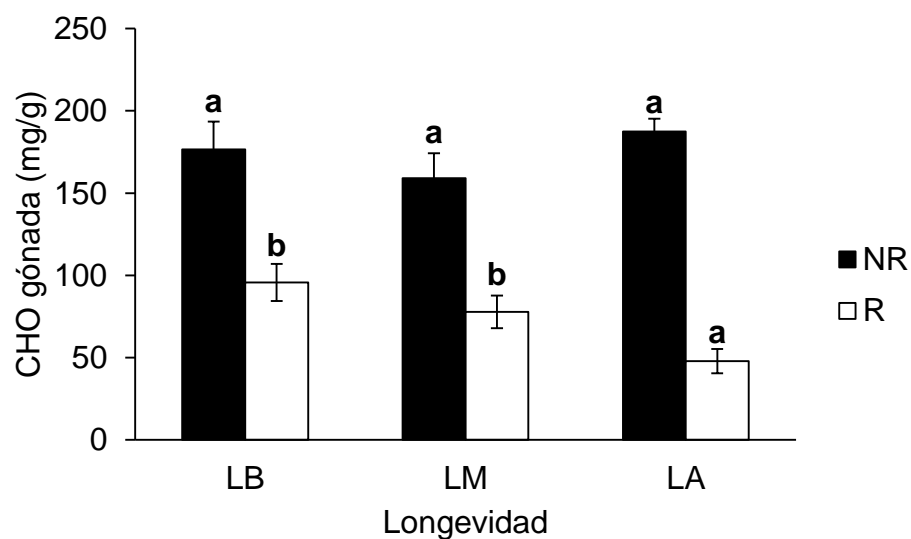


Figura 10. Análisis de CHO en la gónada de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Los valores de proteínas totales (PT) en gónada mostraron un promedio general de 152.20 mg/g, con valores desde 31.7 hasta 407.5 mg/g (Tabla VII). No hubo diferencias significativas entre los valores promedio en los grupos de edad de ambas temporadas. Cabe mencionar, que los valores de la temporada reproductiva fueron superiores respecto a la temporada no reproductiva (Fig. 11).

Tabla VII. Valores obtenidos del análisis de PT en gónada de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	87.12	8	20.63	54.04	114.75
	R	169.62	13	88.44	69.86	339.99
LM	NR	81.93	10	20.52	54.07	113.37
	R	218.60	17	73.48	121.07	407.75
LA	NR	103.17	37	46.40	31.07	286.44
	R	208.28	30	67.72	63.18	382.96
Total general		152.20	115	80.73	31.07	407.75

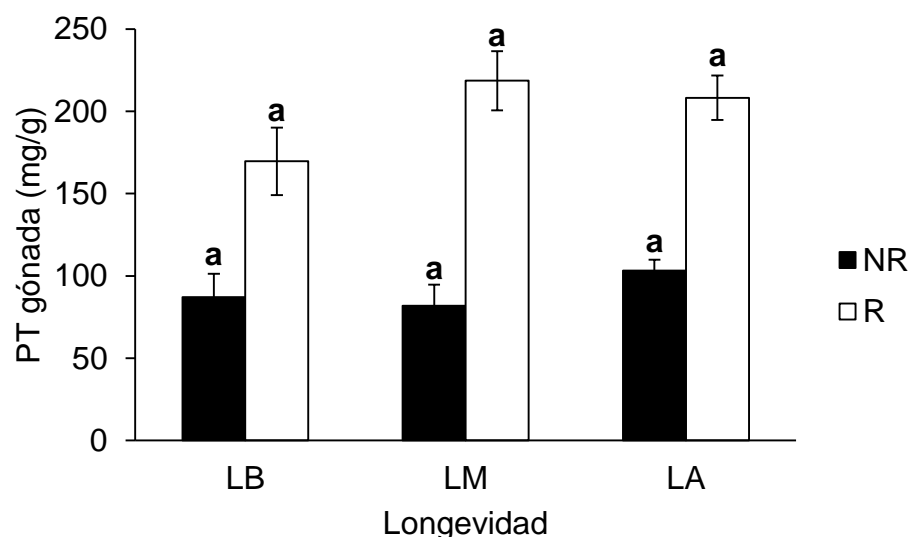


Figura 11. Análisis de PT en gónada de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Para los valores de lípidos totales (LT) en gónada se obtuvo un promedio general de 122.40 mg/g, con valores desde 2.41 hasta 361.56 mg/g (Tabla VIII). Se encontraron diferencias significativas entre los valores promedio de los grupos de edad solo en la temporada reproductiva, siendo LM diferente respecto a LB ($F_{2, 57} = 3.7379$; $P = 0.030$). Aun así, los valores más altos se obtuvieron en la temporada no reproductiva (Fig. 12).

Tabla VIII. Valores obtenidos del análisis de LT en gónada de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	194.66	8	86.92	92.81	361.56
	R	46.95	13	32.57	6.77	114.21
LM	NR	162.12	10	50.44	101.05	237.90
	R	74.61	17	34.83	2.41	140.50
LA	NR	189.27	37	60.57	103.07	342.96
	R	67.17	30	21.32	25.11	98.74
Total general		122.40	115	77.26	2.41	361.56

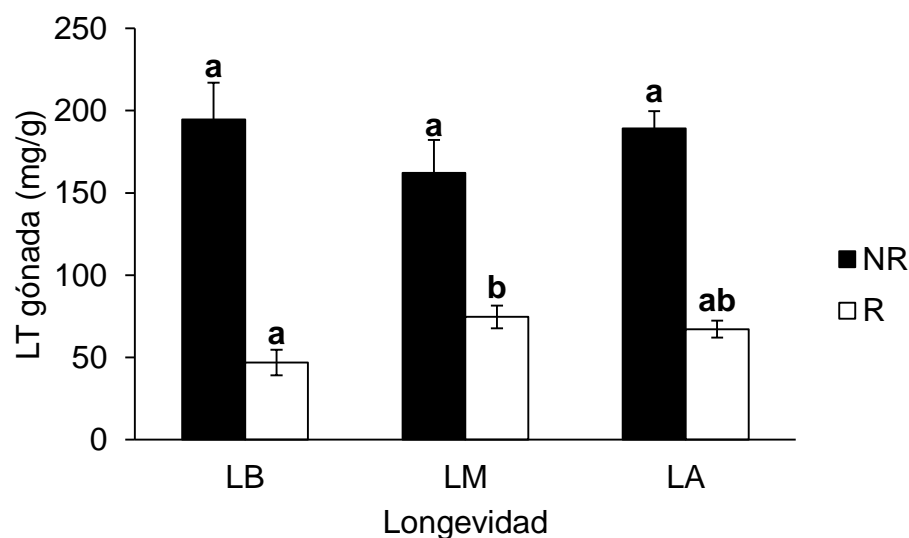


Figura 12. Análisis de LT en gónada de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

En cuanto a los triglicéridos (TG) en gónada, el promedio general obtenido fue de 7.35 mg/g, con valores desde 1.27 hasta 23.74 mg/g (Tabla IX). Sólo se encontraron diferencias significativas para los valores promedio en los grupos de edad de la temporada no reproductiva, donde LA fue diferente ($F_{2, 52} = 3.5447$; $P = 0.036$), respecto a LB (Fig. 13).

Tabla IX. Valores obtenidos del análisis de TG en gónada de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	6.39	8	2.45	3.57	10.86
	R	4.98	13	2.79	1.37	10.36
LM	NR	7.51	10	2.67	4.26	13.85
	R	5.25	17	3.57	1.60	14.30
LA	NR	10.71	37	5.37	3.06	23.74
	R	5.63	30	2.93	1.27	14.28
Total general		7.35	115	4.54	1.27	23.74

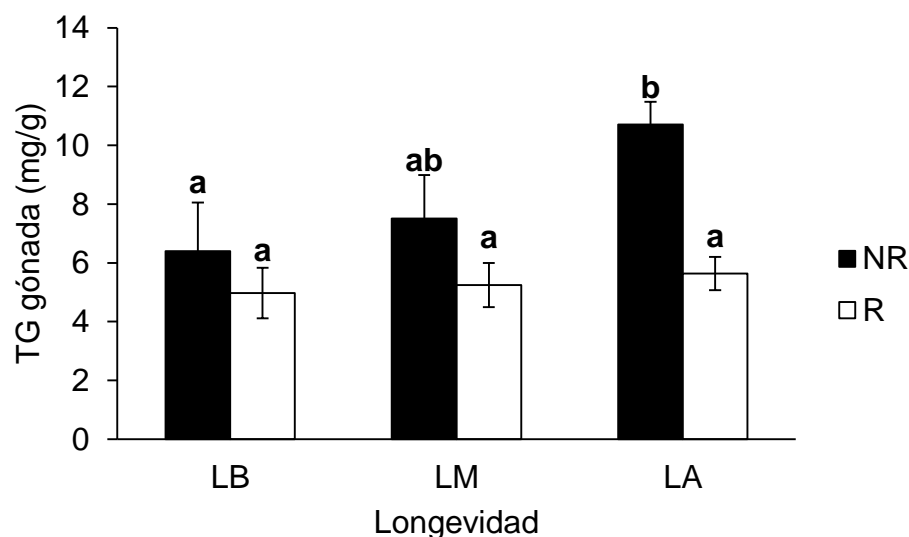


Figura 13. Análisis de TG en gónada de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Por otro lado, los valores obtenidos para CHO de la glándula digestiva, arrojaron un promedio general de 125.81 mg/g, con valores desde 8.43 hasta 267.50 mg/g (Tabla X). Sólo hubo diferencias significativas para los valores promedio en los grupos de edad de la temporada no reproductiva, ($F_{2, 52} = 5.7760$; $P = 0.005$), donde LA fue diferente respecto a LB y LM, siendo estos dos últimos muy similares (Fig. 14).

Tabla X. Valores obtenidos del análisis de CHO en glándula digestiva de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	200.17	8	42.11	134.16	240.46
	R	94.75	13	16.14	64.19	122.48
LM	NR	200.18	10	39.66	144.95	267.50
	R	84.77	17	15.93	61.70	115.14
LA	NR	152.14	37	52.49	8.43	230.00
	R	85.44	30	7.91	69.85	105.46
Total general		125.81	115	55.41	8.43	267.50

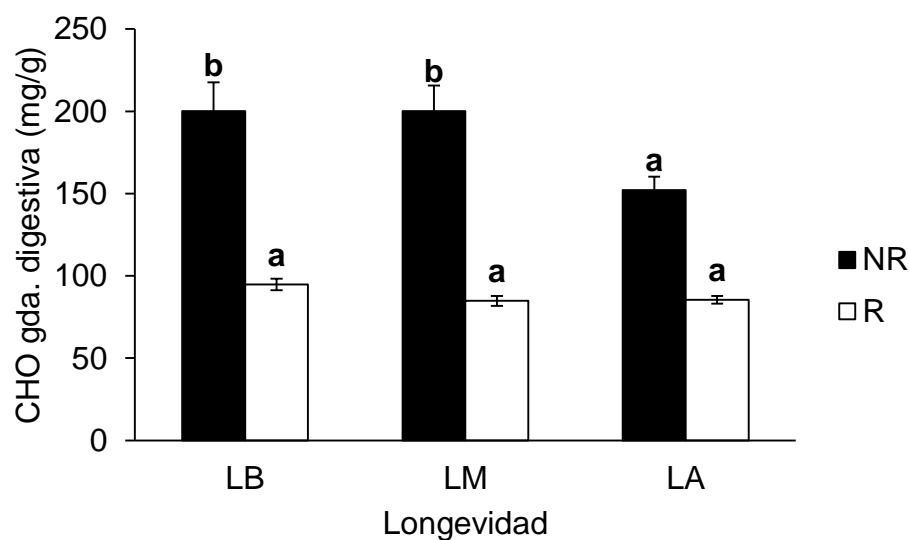


Figura 14. Análisis de CHO en glándula digestiva de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Respecto a las PT de glándula digestiva, se obtuvo un promedio general de 375.51 mg/g, con valores desde 33.97 hasta 551.52 mg/g (Tabla XI). Teniendo diferencias significativas para los valores promedio en los grupos de edad únicamente de la temporada reproductiva ($F_{2, 57} = 4.5096$; $P = 0.152$), donde LA fue diferente, respecto a LB (Fig. 15).

Tabla XI. Valores obtenidos del análisis de PT en glándula digestiva de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	314.85	8	101.79	174.92	451.46
	R	477.05	13	46.70	405.47	551.52
LM	NR	339.14	10	70.12	251.81	492.41
	R	456.63	17	60.31	324.67	532.07
LA	NR	273.50	37	113.27	33.97	455.86
	R	431.98	30	37.80	342.64	507.88
Total general		373.51	115	113.68	33.97	551.52

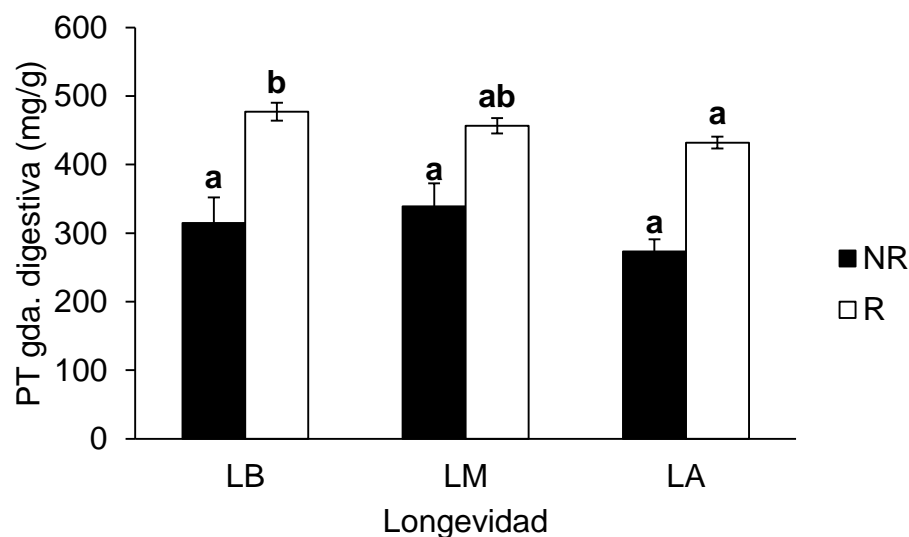


Figura 15. Análisis de PT en glándula digestiva de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

En cuanto a los LT de la glándula digestiva, se obtuvo un promedio general de 173.64 mg/g, con valores desde 10.32 hasta 576.27 mg/g (Tabla XII). Encontrando diferencias significativas únicamente para los valores promedio en los grupos de edad de la temporada reproductiva ($F_{2, 57} = 7.5718$; $P = 0.001$), siendo LA diferente respecto a LM (Fig. 16).

Tabla XII. Valores obtenidos del análisis de LT en glándula digestiva de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	272.87	8	94.91	158.85	422.69
	R	49.30	13	14.18	21.87	69.09
LM	NR	328.63	10	60.47	217.38	418.34
	R	38.28	17	17.97	10.32	84.18
LA	NR	308.86	37	91.96	71.33	576.27
	R	59.32	30	22.77	28.09	113.27
Total general		173.64	115	142.75	10.32	576.27

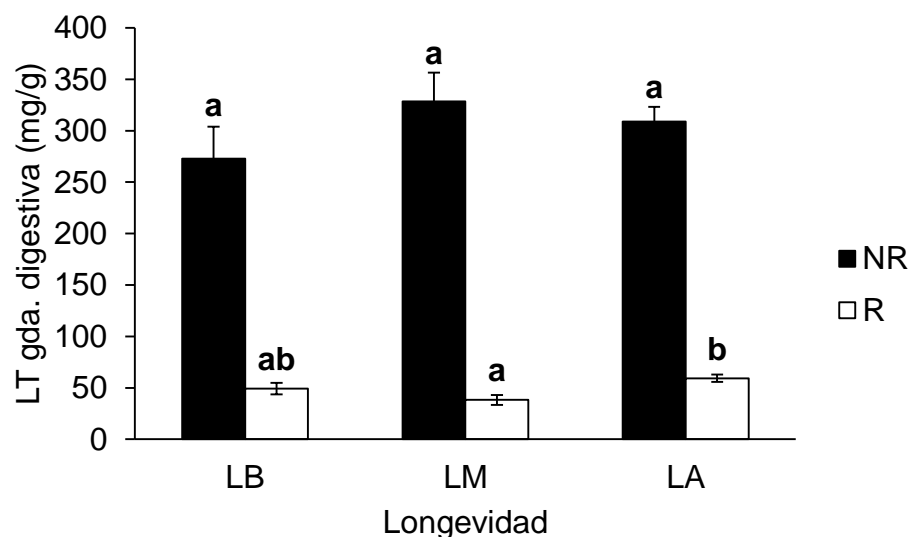


Figura 16. Análisis de LT en glándula digestiva de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

De los valores obtenidos de TG en la glándula digestiva, se obtuvo un promedio general de 25.89 mg/g, con valores desde 4.41 hasta 54.99 mg/g (Tabla XIII). En este caso no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos temporadas (no reproductiva y reproductiva) (Fig. 17).

Tabla XIII. Valores obtenidos del análisis de TG en glándula digestiva de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en ambas temporadas reproductivas: No reproductiva (NR) y reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	32.37	8	9.38	13.98	45.64
	R	22.57	13	12.30	9.63	54.99
LM	NR	31.56	10	6.52	21.96	42.02
	R	19.47	17	13.27	8.29	52.79
LA	NR	29.58	37	10.06	4.41	48.36
	R	22.80	30	6.04	9.26	32.91
Total general		25.89	115	10.52	4.41	54.99

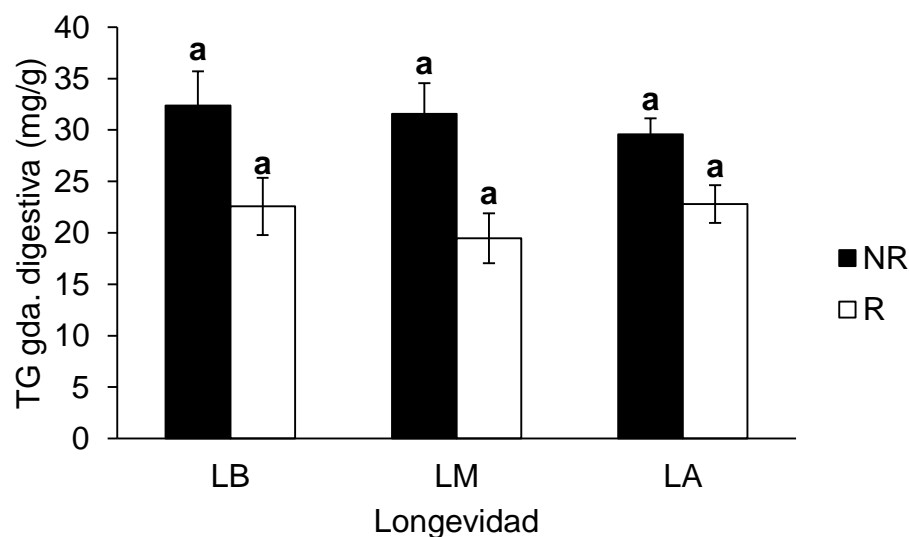


Figura 17. Análisis de TG en glándula digestiva de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en las temporadas no reproductiva (abril) y reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

7.3 Análisis histológicos e histoquímicos

A partir de los estadios de madurez en las hembras de *P. globosa* se determinó la frecuencia de los estadios en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA), donde la mayor parte de los organismos presentaron el estadio de desove parcial (DP), seguido del de vitelogénesis temprana (VTE) (Fig. 18). Considerando los grupos de edad, la mayor frecuencia de este estadio se encontró en LA.

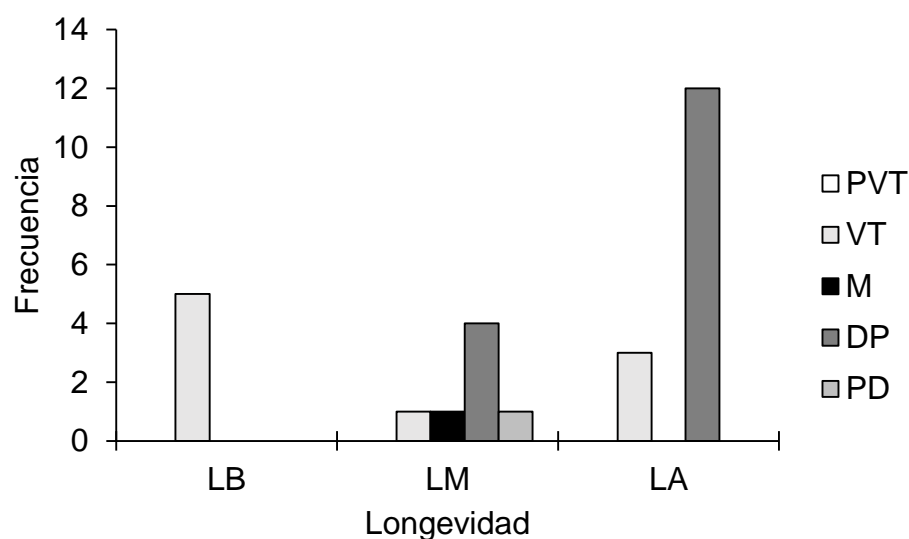


Figura 18. Frecuencia de estadios de madurez observados en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) para la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California; Previtelogénesis (PVT); Vitelogénesis temprana (VT); Maduro (M); Desove parcial (DP); Postdesove (PD).

Respecto al potencial reproductivo (PR), se obtuvo un promedio general de 3,481,569 con valores desde 310,506 hasta 11,448,539 (Tabla XIV). Se encontraron diferencias significativas para los valores promedio en los grupos de edad de la temporada reproductiva ($F_{2, 24} = 3.9271$; $P = 0.033$). El mayor valor se observó en LM y presentó diferencia estadística con LA (Fig. 19).

Tabla XIV. Valores obtenidos del análisis de PR de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).

Longevidad	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	2,843,893.20	5	2,284,184.53	436,435.49	5,831,202.77
LM	5,584,478.17	7	3,638,675.62	310,506.86	11,448,539.71
LA	2,712,770.59	15	1,403,647.39	986,959.59	5,680,028.30
Total general	3,481,569.33	27	2,555,141.33	310,506.86	11,448,539.71

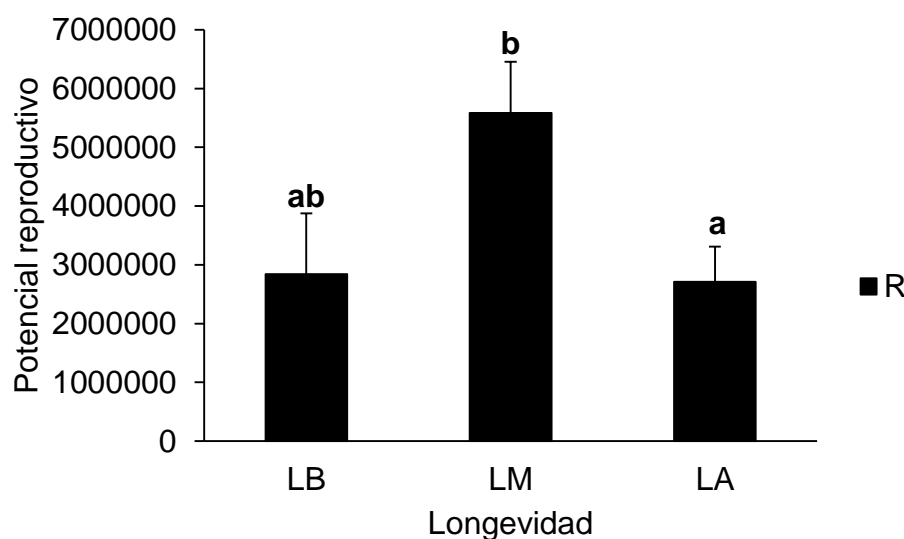


Figura 19. Análisis de PR de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Los valores obtenidos en el porcentaje de CHO arrojaron un promedio general de 11.14, con valores desde 6.46 hasta 16.01 (Tabla XV). Debido a que la gónada estaba vacía en temporada no reproductiva, únicamente se estimó el porcentaje de CHO para la temporada reproductiva, donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de edad (Fig. 20).

Tabla XV. Valores obtenidos del análisis de % CHO de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).

Longevidad	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	10.72	5	1.25	9.47	12.66
LM	10.90	7	2.05	7.87	13.44
LA	11.40	15	2.48	6.46	16.01
Total general	11.14	27	2.14	6.46	16.01

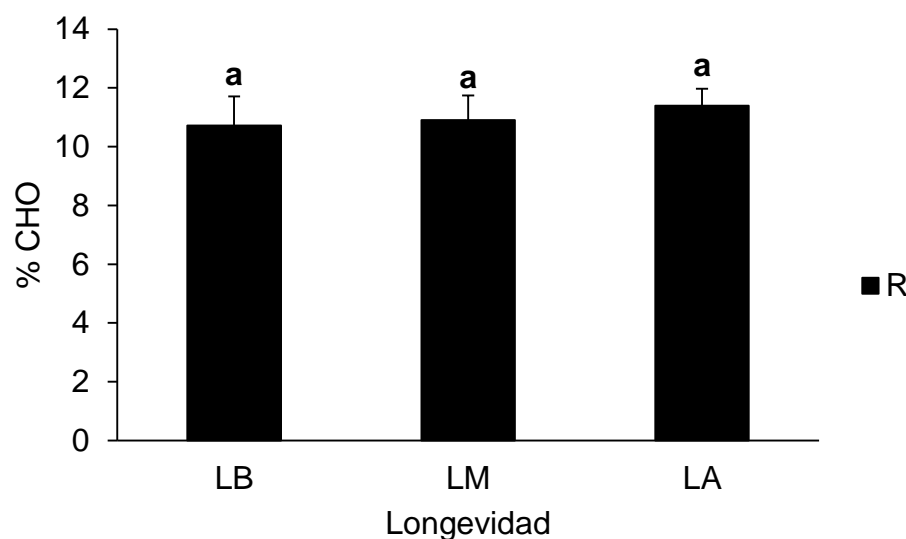


Figura 20. Análisis de porcentaje (%) de CHO de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

En el caso del porcentaje de LT, se obtuvo un promedio general de 14.66, con valores desde 8.68 hasta 21.87 (Tabla XVI). Sólo se estimó para la temporada reproductiva, sin encontrar diferencias significativas entre los valores promedio de los grupos de edad (Fig. 21).

Tabla XVI. Valores obtenidos del análisis de porcentaje (%) de LT de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).

Longevidad	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	12.23	5	2.68	8.68	15.87
LM	13.71	7	3.43	9.99	19.93
LA	15.92	15	3.97	8.87	21.87
Total general	14.66	27	3.82	8.68	21.87

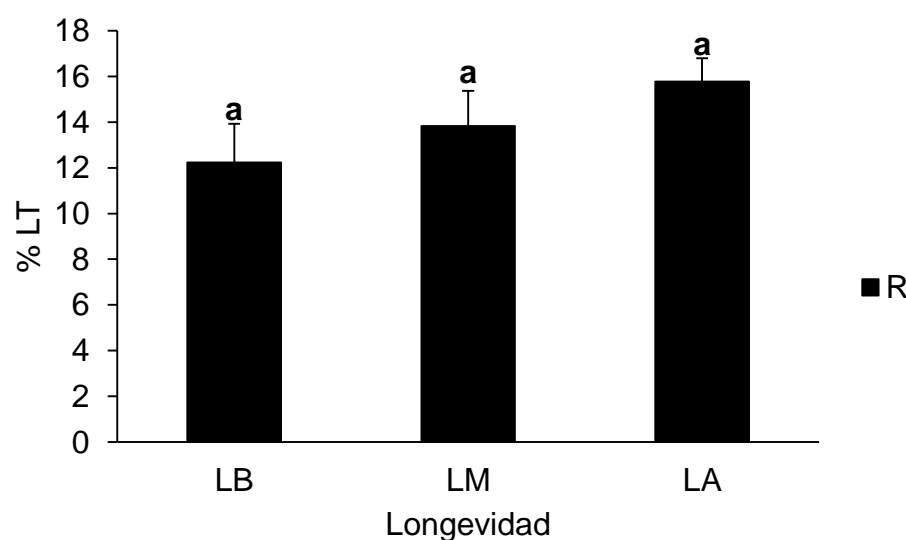


Figura 21. Análisis de % LT de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Respecto al porcentaje de lipofuscinas, se obtuvo un promedio general de 4.99, con valores desde 1 hasta 13.29 (Tabla XVII). Donde no hubo diferencias significativas en la temporada no reproductiva. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas para los valores promedio en los grupos de edad de la temporada reproductiva ($F_{2, 24} = 5.3692$; $P = 0.012$), donde LA fue diferente además de ser el mayor, respecto a LB y LM (Fig. 22).

Tabla XVII. Valores obtenidos del análisis de porcentaje (%) de lipofuscinas de *P. globosa* en los diferentes grupos de edad (LB, LM y LA) en temporada reproductiva (R).

Longevidad	Temporada	Media	n	Des Est	Mín	Máx
LB	NR	5.45	8	1.37	3.32	7.43
	R	3.26	5	1.59	2.12	5.81
LM	NR	6.03	10	3.74	2.87	13.29
	R	3.36	7	1.67	1.00	6.10
LA	NR	4.73	37	2.04	2.18	11.55
	R	6.02	15	2.42	2.43	10.98
Total general		4.99	82	2.39	1.00	13.29

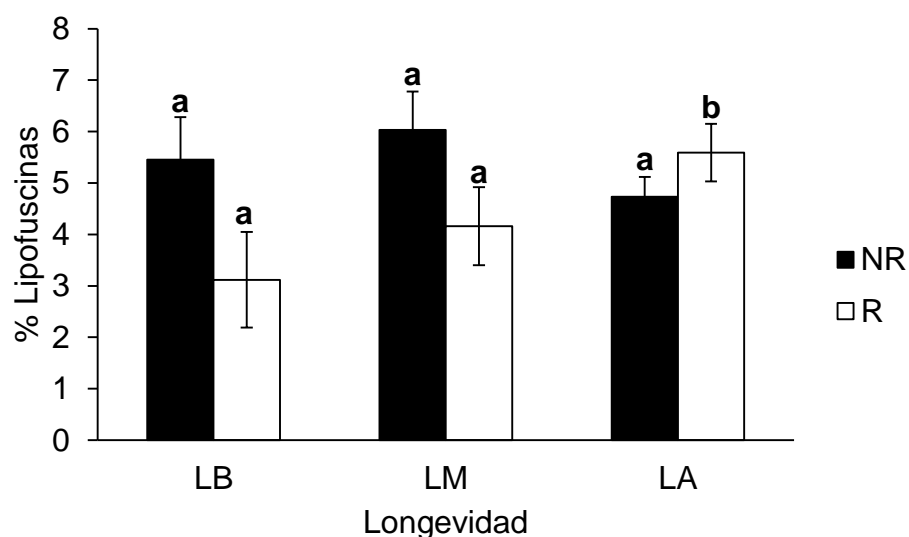


Figura 22. Análisis de porcentaje (%) de lipofuscinas de la almeja *P. globosa* del norte del Golfo de California aplicado a muestras colectadas en la temporada reproductiva (diciembre) para diferentes grupos de edad (LB, LM y LA). Barras de error indican error estándar. Letras indican grupos homogéneos de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

7.4 Análisis bioinformático

Como resultado de la secuenciación del transcriptoma de ovario de *P. globosa* mediante la utilización de la plataforma de Secuenciación por Síntesis (SBS), con el sistema NextSeq 500 medio rendimiento de Illumina en una placa completa 2 x 150, se obtuvieron seis librerías tipo TruSeq en ambos sentidos de la cadena de ARN (forward y reverse) pertenecientes a los diferentes grupos de edades (LB, LM y LA), obteniendo dos librerías por cada grupo de edad. Las librerías se filtraron para tener una alta calidad en las secuencias y realizar los análisis posteriores (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Librerías tipo TruSeq generadas a partir de las condiciones en las muestras de *P. globosa*. q: Calidad mínima de las secuencias p: Porcentaje mínimo de bases con dicha calidad a: Calidad promedio de las secuencias.

Categoría	Librerías	Paired-End reads (2x150 pb)	HQ q 20 p 90 a 30
4-6 años (LB)	DL1TP3SS01	21,086,279	7,554,751
	DL1TP3SS02	23,805,799	7,928,992
18-21 años (LM)	DL1TP3SS03	19,047,392	5,710,991
	DL1TP3SS04	28,379,566	12,270,872
27-29 años (LA)	DL1TP3SS05	30,140,170	13,544,013
	DL1TP3SS06	21,272,623	7,632,882
Total		143,731,829	54,642,501
Por muestra		23,955,304.83	9,107,083.50

De un total de 339,847 contigs (Conjunto de lecturas o reads) que resultaron del ensamblado de las bibliotecas por medio de la herramienta bioinformática Trinity, sólo se pudieron anotar 67,187 transcritos (alrededor de un 20% del total) (Fig. 23), que a su vez contenían un marco de lectura abierto, por sus siglas en inglés (Open Reading Frame, ORF), y que pudieron codificar a una proteína. Asimismo la longitud promedio de los transcritos, de los ORFs y proteínas fue alrededor de 938 pares de base (pb), 487 pb y 162 aminoácidos (aa) respectivamente (Fig. 24) (Tabla XIX).

Tabla XIX. Longitud de los transcritos anotados a partir del ensamblado de las bibliotecas de *P. globosa*.

	Transcritos (pb)	ORFs (pb)	Proteínas (aa)
Longitud mínima	121	48	16
Longitud máxima	13,674	9,435	3145
Longitud promedio	938.71	487.38	162.46
Total de transcritos	67,187	67,187	67,187

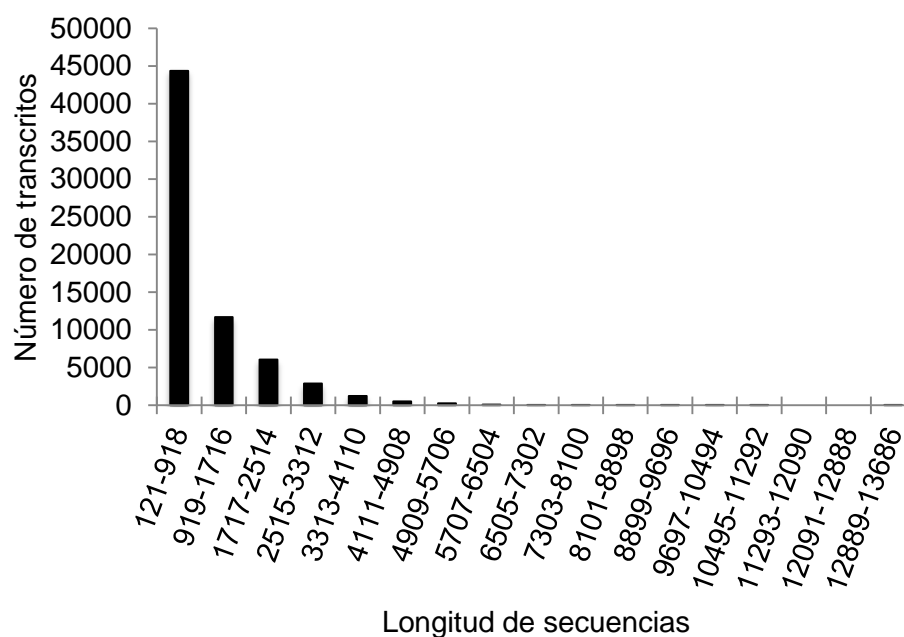


Figura 23. Intervalos de longitud de las secuencias de los transcritos anotados.

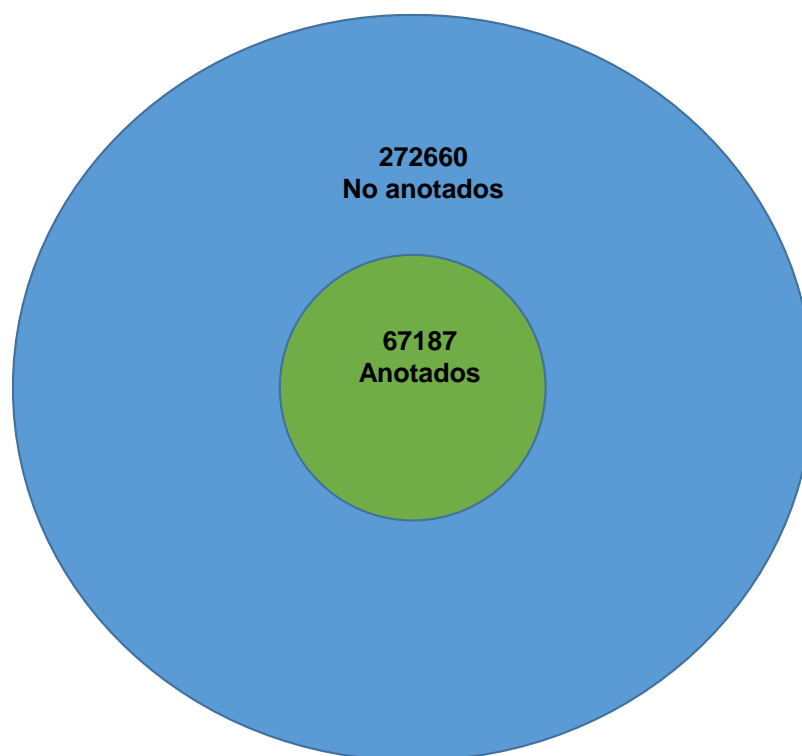


Figura 24. Diagrama de Venn mostrando el total de transcritos resultantes del ensamblado, separando los transcritos anotados y los no anotados.

De las 10 especies de moluscos usadas como referencia en los procesos de anotación y corrección de errores relacionados con el corrimiento de marcos de lectura y la generación de unigenes quiméricos, se realizó un árbol filogenético para conocer su cercanía con *P. globosa* (Fig. 25).

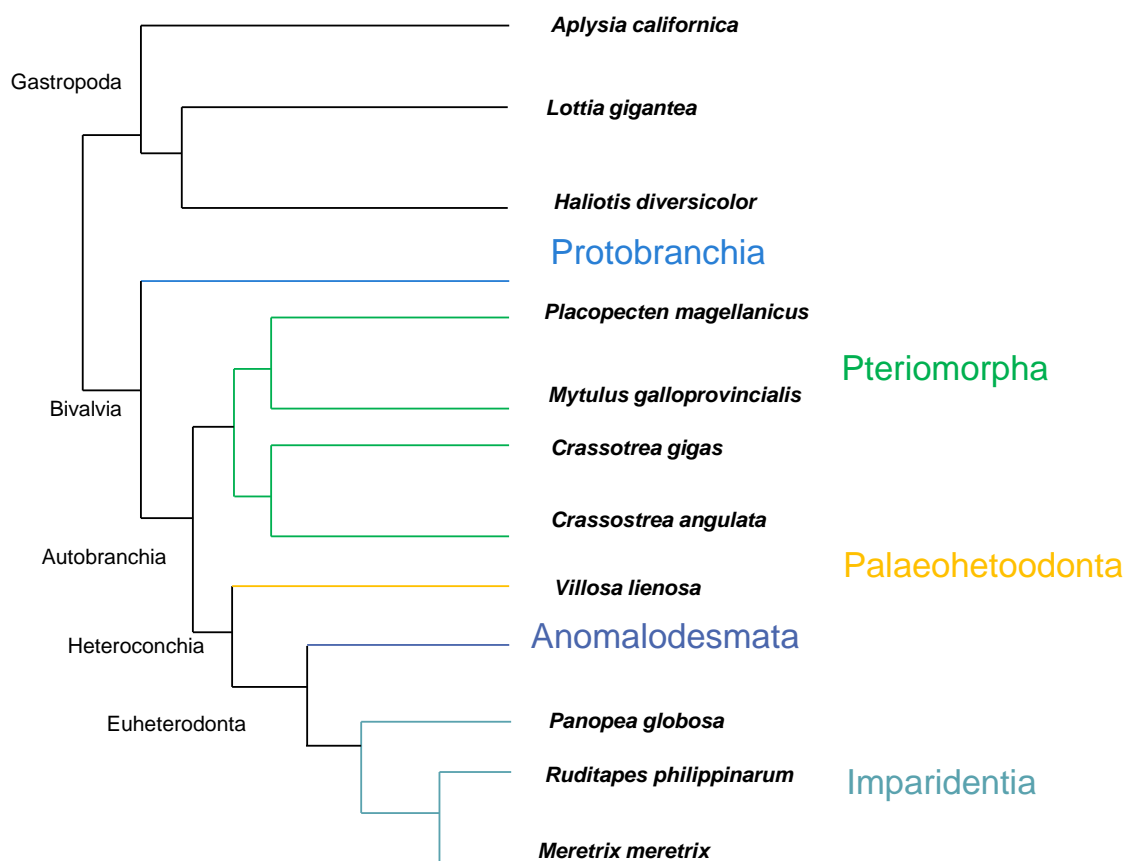


Figura 25. Filogenia de las especies utilizadas de referencia incluyendo a *P. globosa* basada en el trabajo de González *et al.* (2014).

Los resultados de la herramienta BLASTp para ver la homología de las proteínas de *P. globosa* contra las proteínas de las especies de referencia en la base de datos GenBank de NCBI, mostró que *C. gigas* es la especie que más homología contiene, mientras que la menos tuvo fue *H. diversicolor*. En cuanto a los análisis posteriores sólo se emplearon las cinco especies mejor anotadas que fueron *R. philippinarum*, *A. californica*, *L. gigantea*, *V. lienosa* y *C. gigas* (Fig. 26).

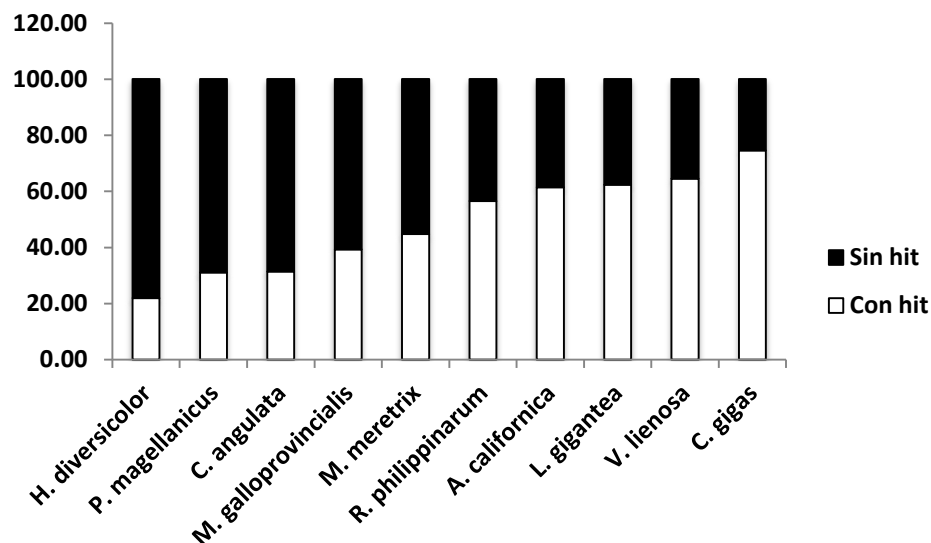


Figura 26. Blastp para la identificación de proteínas de *P. globosa* homologas a aquellas disponibles para las especies seleccionadas como de referencia.

Durante el análisis con OrthoMCL para *P. globosa* con las cinco especies mejor anotadas se observó un total de 44,147 genes ortólogos, de los cuales 1,328 genes están presentes en las cinco especies y en *P. globosa*. Mientras que se encontraron 27,331 genes únicos de *P. globosa*, asimismo hubo genes únicos para cada especie y compartidos entre ellas mismas aunque en menores cantidades (Fig. 27).

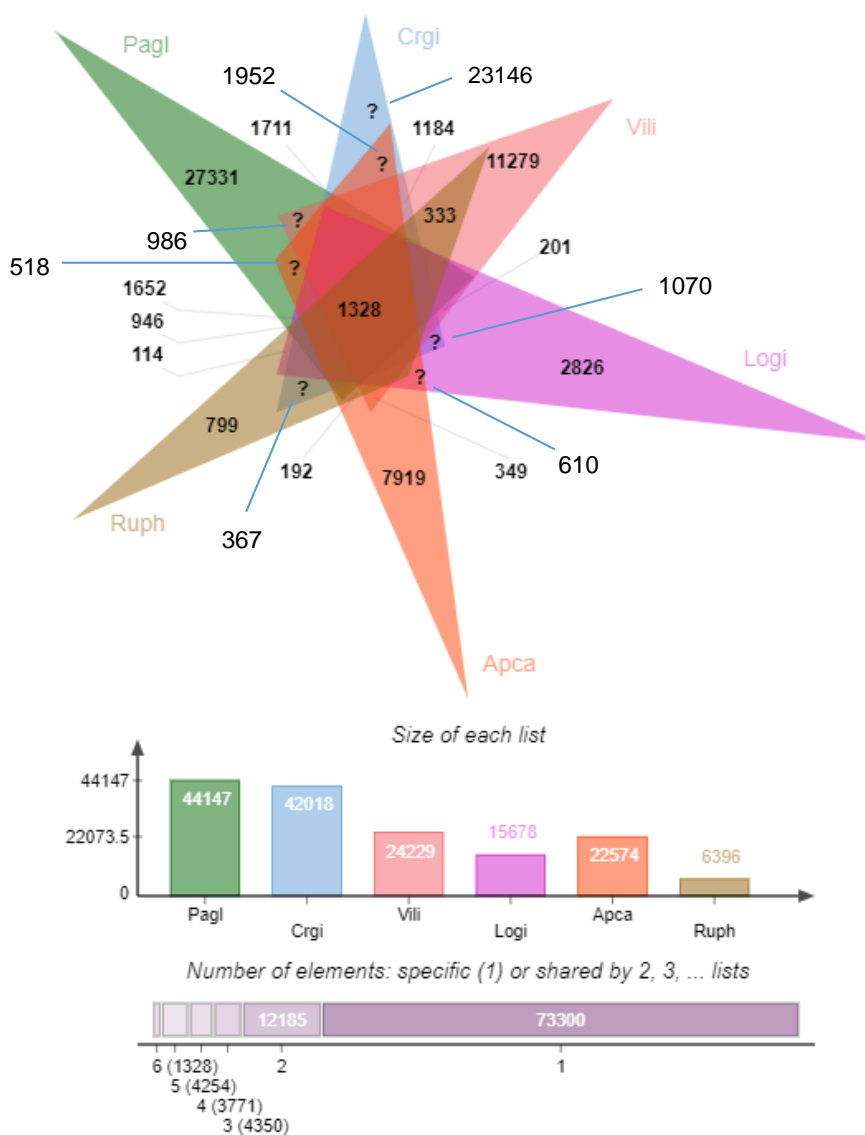
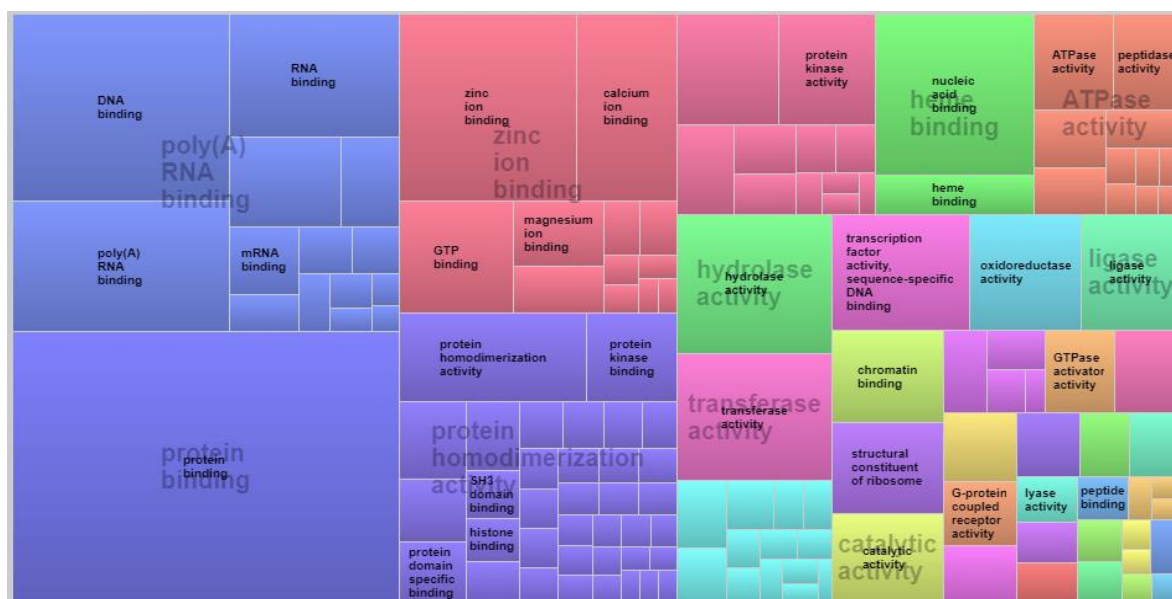


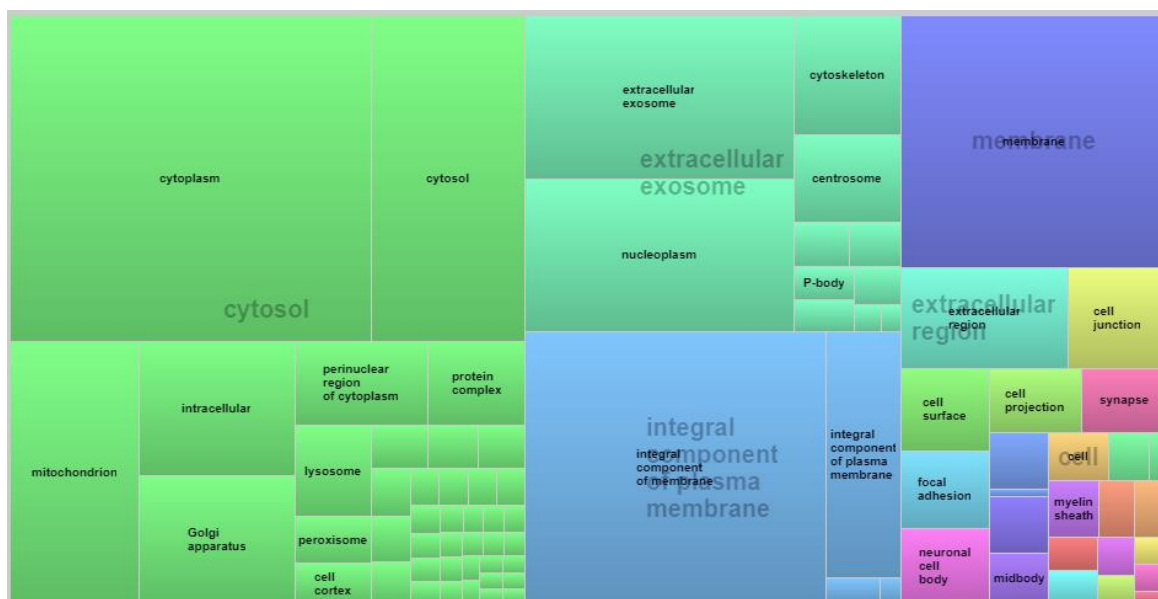
Figura 27. Comparación de rutas metabólicas con base en los transcritos anotados de *P. globosa* (azul) contra el ostión *Crassostrea gigas* (rojo) que fue la especie de referencia mejor anotada, usando el servidor KEGG.

La lista de transcritos anotados en *P. globosa* fue usada en el servidor de Gene Ontology (GO) el cual identifica y clasifica a los transcritos con un número de acceso (GOterm) en tres categorías: Funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos (Fig. 28).

A)



B)



C)

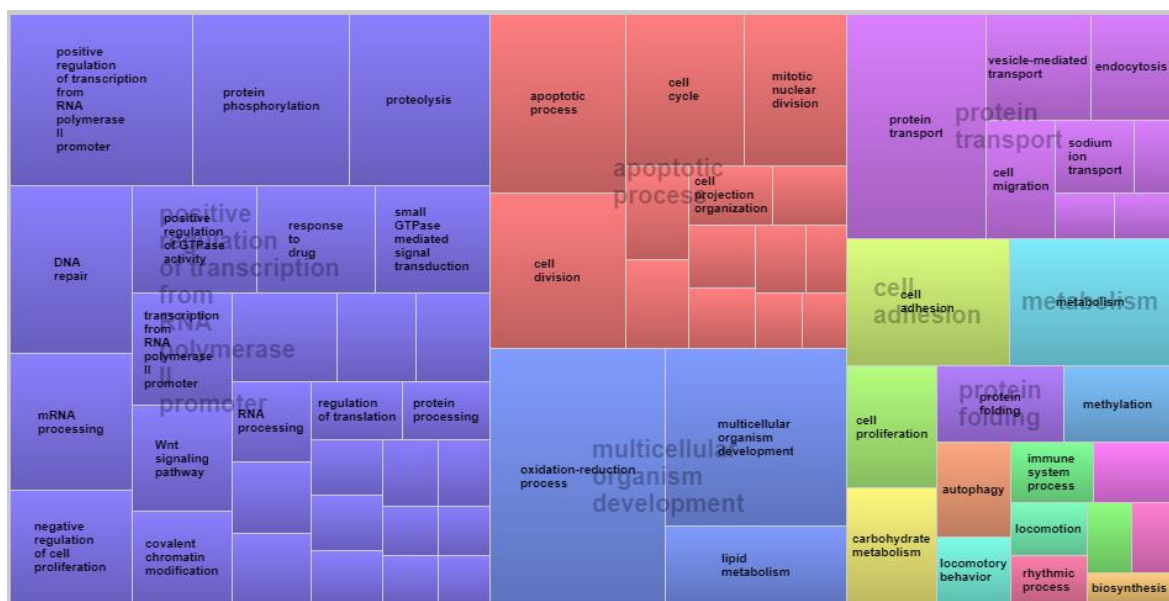


Figura 28. Resultado de los transcritos anotados para *P. globosa* usando el servidor de Gene Ontology dividido en tres categorías: (A) Funciones moleculares, (B) componentes celulares y (C) procesos biológicos.

Para el análisis de expresión diferencial se usaron las herramientas RSEM y DESeq las cuales dieron como resultado mapas de calor (heatmaps) mostrando la expresión diferencial del total de transcritos no redundantes en las diferentes condiciones de las muestras (clases de edades) que en este caso se dividieron en A: 4 y 6 años (LB); B: 18 y 21 años (LM); C: 27 y 29 años (LA). Al mismo tiempo también se muestra la correlación entre las condiciones A (LB), B (LM) y C (LA) (Fig. 29). Donde se observó que de los ocho transcritos relacionados con senescencia cuatro se expresaron más en LM, y los restantes en LA y LB.

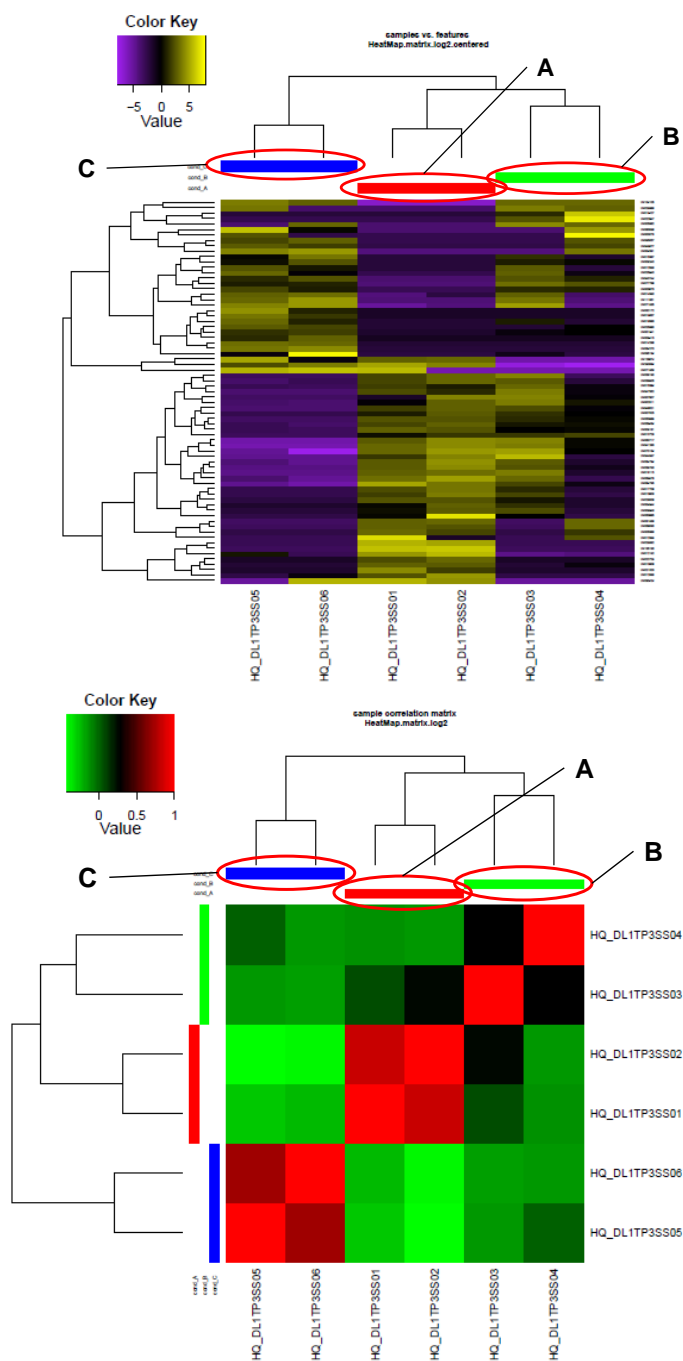


Figura 29. Mapa de calor para la expresión diferencial de los transcritos de *P. globosa* para cada una de las condiciones A (LB), B (LM), C (LA) (Arriba). Mapa de calor para la matriz de correlación de las diferentes condiciones A (LB), B (LM), C (LA), de *P. globosa* (Abajo).

Finalmente del análisis de expresión diferencial tuvo como resultado una lista de 72 transcritos de los cuales sólo se encontraron ocho transcritos relacionados con la senescencia ya sea directa o indirectamente (Tabla XX).

Tabla XX. Lista de transcritos diferencialmente expresados en *P. globosa*.

Transcrito	Proteína	Función
XM_011453316.1	Dedo de zinc	Uniones con el ion zinc
XM_020062591.1	Heat shock 70 kDa protein 12A	Respuesta al estrés
XM_011437610.2	26S proteasa subunidad regulatoria 8	Degradación de proteínas ubiquitinadas
XM_011450259.2	Eiger	Induce la apoptosis y suprime tumores
XM_011441975.2	Proteína quinasa serina/treonina dual y tirosina	Regulación de la apoptosis dependiente e independiente de caspasa en respuesta al estrés por UV
XM_011413819.2	Transportador 1 de sodio acoplado monocarboxilado	Involucrado en apoptosis, supresor de tumores
XM_011443582.2	Proteína 5 de lipofuscinosis ceroidea neuronal	Degrada proteínas post-traduccionales modificadas en lisosomas
UN010729	Modulador 1 de especies reactivas de oxígeno (ERO)	Induce ERO para la proliferación de células, induce daño oxidativo al ADN y senescencia replicativa

8. DISCUSIÓN

El análisis de las poblaciones de las especies del género *Panopea* ha permitido ofrecer elementos para el diseño de estrategias destinadas a mejorar el aprovechamiento de este recurso en la región noroeste del país (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010a; Cortez-Lucero *et al.*, 2011; DOF, 2012). En este sentido, se procedió a analizar variables morfológicas, bioquímicas, histológicas, histoquímicas y moleculares de almeja generosa *P. globosa* de la región norte del Golfo de California a fin de poder probar la hipótesis de la presencia de senescencia negativa, rasgo poblacional que se ha sugerido para la especie (González-Peláez *et al.*, 2015) y que, de existir, tendría que ser considerada para incluir medidas de manejo tendientes a cuidar la parte reproductiva de la población garantizando su sustentabilidad.

En esta sección, se discute por separado el resultado morfológico, histológico, histoquímico y molecular, para posteriormente integrar un análisis global interpretable en términos de senescencia negativa.

Siguiendo la definición de senescencia negativa, la cual indica que existe un decline en la mortalidad con la edad después de la madurez reproductiva generalmente acompañada por un incremento en la fecundidad (Vaupel *et al.*, 2004), las almejas del género *Panopea* parecen apearse a la definición considerando que sus tasas de mortalidad en la etapa adulta son muy bajas (Cortez-Lucero *et al.*, 2011), lo que da lugar a organismos longevos (González-Peláez, 2013). Dando por hecho de que existe un decline en la mortalidad después de la madurez reproductiva, que para el caso de las almejas del género *Panopea* se ha indicado próximo a los tres años de edad (Sloan y Robinson, 1984), el único rasgo pendiente de verificar es el aumento de la fecundidad conforme avanza la edad. Considerando el análisis morfológico para los tres grupos de edad establecidos en este estudio, se encontraron elementos que indicaron un aumento en la fecundidad derivado de un incremento en la longitud de la concha, peso total, drenado y de la masa visceral que pueda ser directamente interpretable como un incremento en la capacidad reproductiva de los organismos. Este aumento significativo se mostró en el paso del primer grupo de edad

al segundo (LB y LM, respectivamente), planteando la posibilidad de la existencia de un incremento en la capacidad reproductiva conforme se incrementa la edad, y de lo cual en este estudio se ofrece evidencia de que dicho supuesto se cumple al menos hasta los 21 años de edad (límite superior del grupo de LM). Por otra parte, los organismos del grupo de edad LA mostraron una disminución significativa en todas las variables morfológicas respecto a LM, sin embargo, dado que la mayoría de los organismos de LA estuvieron en fase de desove parcial, no es posible concluir sobre si este grupo de edad se apega al patrón observado en los otros grupos de edad. Además, la diferencia de longitud de concha entre LM y LA sugiere que los organismos de este último grupo crecieron en condiciones menos favorables que los del grupo LM. Respecto a esto Goodwin y Pease (1987) han descrito que el crecimiento en las poblaciones de *Panopea* es variable como resultado de las condiciones ambientales imperantes en la zona a un tiempo dado. Considerando que el crecimiento en *P. globosa* sigue un patrón asintótico después de alcanzar los 10 años de edad (Aragón-Noriega *et al.*, 2015; Cruz-Vázquez *et al.*, 2012; González-Peláez *et al.*, 2015; Hidalgo-de-Toba *et al.*, 2015), no existe posibilidad de que las tallas del grupo LA disminuyan. Una explicación alterna a haber encontrado organismos más chicos de longitud de concha en este último grupo de edad, puede deberse a errores en el muestreo, en el que se seleccionó organismos pequeños, y que influyó en el resto de las variables analizadas (peso total, drenado y de masa visceral). Por lo anterior, el resto de la discusión tratará de manera muy somera los diferentes análisis de este último grupo.

El análisis bioquímico de gónada y glándula digestiva para los grupos de edad mostró diferentes patrones en cada uno de los tipos de reservas energéticas (CHO, PT, LT y TG), entre temporadas (reproductiva y no reproductiva). Específicamente la glándula digestiva se ha señalado como importante en la transferencia de lípidos hacia la gónada en *P. globosa* (CITA), no obstante, otras reservas energéticas destinadas a la gametogénesis, provienen del manto (en el caso de CHO y LT) y sifón (en el caso de PT) (Cruz-Gómez, 2012). Dado que los valores en cada una de las reservas en la glándula digestiva fueron constantes por temporada, y no mostraron diferencias significativas entre los grupos de edad, se descarta un aporte energético adicional de la glándula digestiva para la producción

de gametos conforme avanza la edad, por lo que en las siguientes secciones sólo se discuten los resultados del análisis bioquímico obtenido en gónada.

Tomando en cuenta que la gónada es el tejido donde se almacena y destina energía para el periodo reproductivo, es de esperarse cambios en la concentración de reservas bioquímicas en este tejido. Las reservas bioquímicas han sido consideradas en moluscos bivalvos como indicadores de desarrollo gonádico, es decir, son las principales reservas que se acumulan durante el avance de la gametogénesis (Arcos *et al.*, 2015; Cruz-Gómez, 2012; Tapia-Morales, 2014), por lo cual en este estudio se consideró analizarlas como indicadores de una actividad reproductiva con relación a la edad. Aunque la acumulación de proteínas (PT) en la gónada es el producto de la formación de gametos, los cambios en sus valores no representan una contribución al desarrollo gametogénico (Berthelin *et al.*, 2000; León-Hing, 2012; Vite-García, 2005). Esto explicaría porque la concentración de PT en el tejido gonadal analizado no mostró diferencias significativas entre grupos.

En el caso de CHO, se observó una disminución significativa en el paso del grupo LM a LA de la temporada reproductiva, mientras que en la temporada no reproductiva se mantuvo constante entre los grupos de edad. León-Hing (2012) indica que a medida que la maduración avanza, los carbohidratos son utilizados para la síntesis de lípidos, lo cual explicaría la disminución de la concentración de CHO en el grupo LA, compuesto principalmente por organismos desovados.

En contraste, la concentración LT mostró un aumento significativo del paso de los organismos de LB a LM en temporada reproductiva, mientras que en el grupo de edad LA, se observó una ligera disminución aunque sin diferencias significativas, lo cual se puede explicar porque todos los organismos de este grupo estaban en fase de desove parcial, y al respecto Tapia-Morales (2014) sugiere que la disminución de LT en gónada se da como consecuencia del desove, debido a que los lípidos se depositan en los ovocitos. Respecto a esto, Cruz-Gómez (2012) menciona que la gónada es uno de los tejidos que más almacena lípidos, esto debido a que dicho tejido requiere de más energía durante el periodo reproductivo, por ello el aumento en la concentración de LT en los grupos de edad

evidencia actividad reproductiva en organismos mayores. Por otra parte, la concentración de TG mostró un incremento hacia los grupos de mayor edad en la temporada no reproductiva. En relación con lo anterior, Tapia-Morales (2004) encontró que los TG se mantienen constantes a lo largo del avance de la gametogénesis en *P. globosa*. En contraste, en la ostra *Pteria sterna* se ha reportado una mayor concentración de TG en organismos que inician el proceso de gametogénesis (Vite-García, 2005). Dado que no se encontró un aumento significativo en la concentración de TG en la temporada reproductiva, esto indicaría una actividad reproductiva continua del organismo.

En el análisis histológico se estimó por primera vez el índice de potencial reproductivo en *P. globosa* para determinar directamente la senescencia negativa como estrategia reproductiva en la especie. En bivalvos que presentan gónada difusa este índice ha resultado útil para obtener un estimado de la fecundidad media de los ostiones *C. gigas* y *C. corteziensis*, destacando sobre otros indicadores porque toma en cuenta varios factores como el área, el diámetro y el tipo de ovocito, así como el área de cobertura gonádica y la madurez del organismo lo que lo confiere la capacidad de determinar con mayor precisión la capacidad reproductiva de las especies (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2017). Las almejas del género *Panopea* también presentan gónada difusa, por lo cual ésta se encuentra inmersa en la masa visceral, al igual glándula digestiva y tejido conectivo (Yonge, 1971). Por lo anterior, este índice parece ser un buen estimador de la fecundidad para la especie. En este estudio el potencial reproductivo mostró un aumento significativo en el paso del grupo de edad LB a LM, evidenciando una manifestación concreta de senescencia negativa. Considerando los resultados obtenidos, existen elementos para sostener que este proceso opera al menos hasta los 21 años de edad en las poblaciones del norte del Golfo de California. En el caso del grupo de edad LA, no fue posible hacer inferencias respecto a la senescencia negativa, debido a que las muestras analizadas se presentaron en estadio de desove parcial.

Por su parte, el análisis histoquímico de CHO y LT no mostró diferencias en la cobertura de los tejidos para los grupos de edad. Considerando que el análisis bioquímico presentó un incremento en la concentración de LT en gónada, se esperaría observar un

patrón similar en la cobertura de LT del análisis histoquímico, sin embargo, esta relación no puede ser directa debido a: El uso de diferentes unidades de muestreo (mg/g versus porcentaje de cobertura), la comparación de diferentes tejidos (gónada, versus masa visceral, que incluye gónada, glándula digestiva y tejido conjuntivo). Por lo cual, este resultado no descartaría el hecho de que existe una mayor concentración de LT en organismos del grupo de edad LM respecto a LB. Respecto a esto, Cruz-Gómez (2012) reporta que dicha reserva energética se encuentra mayormente en gónada, ya que esta requiere más energía metabólicamente accesible y eficiente en la reproducción. Por lo anterior, una mayor concentración de LT conferiría una mayor capacidad reproductiva en organismos de edad mayor (al menos hasta los 21 años como se indicó anteriormente).

Respecto a la acumulación de lipofuscinas en la masa visceral, no se observaron diferencias en la temporada no reproductiva, mientras que en la temporada reproductiva se observó un incremento conforme avanzó la edad. En el primer caso, los valores constantes muestran la capacidad de esta almeja para desplazar las lipofuscinas hacia otros tejidos aun en los organismos más viejos. Mientras que, el incremento se explica porque la reproducción implica un mayor esfuerzo metabólico por parte del organismo, lo cual conlleva a la generación de residuos (proteínas y lípidos peroxidados) al momento del desove. Además, según el resultado del potencial reproductivo, la producción de gametos es mayor conforme se incrementa la edad (al menos hasta los 21 años), lo cual resultaría en una mayor acumulación de lipofuscinas, evidenciando mediante este pigmento, no sólo el estrés oxidativo, sino también el proceso de senescencia de los organismos mayores (Abele *et al.*, 2008).

Finalmente, cabe destacar que el análisis de lipofuscinas en los diversos tejidos de la masa visceral (tejido conjuntivo, glándula digestiva y el epitelio que recubre a la masa visceral) evidenció que este pigmento se mantuvo al mínimo en la gónada en comparación con el resto de tejidos. El epitelio que recubre a la masa visceral es donde se observó una mayor acumulación de lipofuscinas, lo cual pudiera ser una estrategia para proteger a la gónada de *P. globosa* del daño oxidativo de estos residuos durante la producción de gametos en la temporada reproductiva. Respecto a la acumulación de desechos en bivalvos,

se tiene la hipótesis de que aquellos que viven enterrados en el sustrato mantienen una baja concentración de oxígeno que podría favorecer una mayor longevidad previniendo la oxidación de biomoléculas y reduciendo la acumulación de residuos, como se ha visto en *Arctica islandica*, donde la alta tasa de proliferación de células y procesos autofágicos remueven las lipofuscinas de los tejidos (Philip y Abele, 2010). Esto se ha demostrado en dos especies de ostión en el estudio de Rodríguez-Jaramillo (2014), donde las lipofuscinas son movilizadas por las células café que las fagocitan eliminándolas de tejidos sensibles como gónada y branquias y las acumulan en otros tejidos como el tejido conjuntivo.

En relación al análisis bioinformático a la fecha no se cuenta con un transcriptoma completo de *P. globosa* en las bases de datos mundiales de GenBank, por lo que en el presente trabajo se realizó una secuenciación *de novo* del transcriptoma de ovario, lo que significa que no hubo un genoma de referencia. Respecto a la importancia de analizar el transcriptoma Meng *et al.* (2015) menciona que este permite enriquecer la información del genoma, además de proveer bases para futuros análisis sobre los mecanismos moleculares que rigen un proceso en específico, que en el presente estudio sería la senescencia negativa en cuestión. En cuanto al resultado del análisis del transcriptoma de ovario de los organismos pertenecientes a las diferentes clases de edades determinadas en este estudio, se logró anotar alrededor de un 20% de transcritos del total de contigs resultantes del ensamblado de las bibliotecas usando la herramienta Trinity. Dejando la incógnita de si dentro de este 80% restante de contigs pudiera haber transcritos asociados a la reproducción, ya que no se encontró ningún transcrito asociado a este proceso, diferencialmente expresado. Además existe la posibilidad de que en el 80% de contigs no anotados, existan transcritos que pudieran dar algún indicio de senescencia negativa asociada a potencial reproductivo. La posible causa de no lograr un mayor porcentaje de contigs anotados podría ser que ese 80% restante fueran ARNs largos no codificantes (long non-coding RNAs), los cuales son fragmentos de ARN superiores a 200 nucleótidos aparentemente sin una función y que están presentes en niveles muy bajos, también conocido como ARN basura (Palazzo y Lee, 2015). Sin embargo, para corroborar dicha

hipótesis se requerirían más análisis en dichas secuencias con diferentes herramientas bioinformáticas, los cuales están fuera de los objetivos del presente trabajo.

Respecto a los transcritos anotados, se obtuvo un total de 67,187, para lograr su anotación se utilizaron 10 especies de moluscos como referencia, y se realizó un análisis filogenético sencillo para determinar qué tan emparentadas estaban con *P. globosa*. A pesar de no haber realizado un análisis filogenético tan estricto, esto permitió tener una idea de las relaciones filogenéticas entre dichas especies. Cabe resaltar, que al tener especies más emparentadas se puede obtener una mayor precisión en la anotación de transcritos, a diferencia de si se tomaran especies demasiado alejadas filogenéticamente que pudieran arrojar datos erróneos. Sin embargo, durante el alineamiento con la herramienta BLASTp para ver la homología de proteínas entre especies, llama la atención que el ostión *C. gigas* sea la especie mejor anotada contra *P. globosa* siendo que no es la especie más emparentada, como es el caso de *R. philippinarum* y *M. meretrix* que son más cercanas filogenéticamente de entre las 10 especies, y fueron las más distantes en cuanto a transcritos homólogos. Esto se debe en primera instancia a que *C. gigas* es una de las especies con transcriptomas completos reportados en la base de datos GenBank y a una mala identificación de modelos génicos predichos computacionalmente en los genomas disponibles para las especies más cercanas a *P. globosa*, además de que casi no se cuenta con información en la base de datos GenBank respecto a moluscos marinos. Siendo este el motivo por el cual los resultados arrojaron ciertas discrepancias en cuanto a la homología entre especies. Por otra parte, el análisis con la herramienta OrthoMCL arrojó los genes ortólogos que compartieron las cinco especies de moluscos, tomadas como las mejores anotadas contra *P. globosa*, siendo *C. gigas* la que mayormente tuvo genes en común con *P. globosa*. Dicha herramienta funciona utilizando el algoritmo de modelos ocultos de Markov que agrupa genes ortólogos de múltiples especies y es útil para poder comparar diferentes patrones de proteínas en linajes distintos (Li *et al.*, 2003). En el presente estudio, se realizó la caracterización funcional de los transcritos anotados fue posible con el uso de los servidores KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y GO (Gene Ontology), donde en el primero *C. gigas* fue la referencia puesto que fue la mejor especie

anotada, notando la gran similitud entre las rutas metabólicas estimadas tanto para *P. globosa* como para *C. gigas*; en el caso del servidor GO se encontraron procesos biológicos de interés como la apoptosis, los enlaces del ion zinc, o la actividad de las proteínas quinasas, los cuales están estrechamente relacionados con el proceso de senescencia el cual es el principal interés en este estudio, debido a que son participes de daños celulares que a su vez pueden desencadenar en la síntesis de lipofuscinas que es evidencia del envejecimiento de los organismos. Cabe mencionar que el término unión fue el predominante en la categoría de función molecular, así como los procesos celulares y metabólicos en la categoría de procesos biológicos. Dicho patrón ha sido reportado anteriormente en el abulón rojo *Haliotis rufescens*, donde López-Landavery (2015) menciona que este patrón refleja el diseño universal y funcionalidad conservada de la maquinaria celular.

El análisis de expresión diferencial permitió obtener un total de 72 transcritos diferencialmente expresados, de los cuales ocho estuvieron relacionados a la senescencia, sin embargo, no se encontraron transcritos asociados a la reproducción. En este caso dado que la gónada fue el único tejido en el cual se realizaron análisis moleculares, es posible que no se hayan identificado transcritos asociados a la reproducción, no por su ausencia, sino más bien porque al ser la gónada un tejido meramente reproductivo, quizás estos transcritos no hayan tenido niveles de expresión lo suficientemente altos, pero sin duda deben estar presentes. Como han sido reportados anteriormente por López-Landavery (2015) al encontrar en el abulón rojo *Haliotis rufescens* niveles de expresión significativamente diferentes de vitelogenina (gen asociado a la reproducción), que es el precursor de una de las principales proteínas del vitelo, la vitelina, en ovocitos de vertebrados e invertebrados y que es crítica durante la maduración ovárica. Además de que Tapia-Morales (2014) reporta dicho gen en *P. globosa*, confirmando que este gen es un indicador de sexo ya que sólo se expresa en hembras, lo que deja en evidencia la presencia de transcritos asociados a la reproducción propiamente en la especie de interés.

Mientras que en los transcritos encontrados relacionados a la senescencia, se encontró un “dedo de zinc” los cuales son uniones del ion zinc que se ha reportado

participan en el proceso de síntesis de lipofuscinas uniendo proteínas ubiquitinadas que inducen la disociación del complejo formado por HDAC6 (Histona deacetilasa 6), proteínas de shock térmico, factores de shock térmico y el gen P97/VCP (Höhn y Grune, 2013). En este mismo proceso de síntesis de lipofuscinas también se asocian dos transcritos encontrados en el presente estudio, que son la unidad 26S proteasa y la proteína de shock térmico 70 (HSP70), donde la primera es altamente susceptible a su inactivación durante estrés oxidativo, lo que ocasiona la acumulación de las proteínas poliubiquitinadas, mientras que en el caso de la HSP70, después de la unión de proteínas ubiquitinadas por los dedos de zinc que disocian el complejo anteriormente mencionado, ocurre una sobrerregulación de la HSP70 por lo que se inhibe (Höhn y Grune, 2013). La proteína HSP70 ha sido reportada en otros trabajos con moluscos bivalvos donde se ha encontrado que se activa como respuesta al estrés térmico en contra de especies reactivas de oxígeno (Rodríguez-Jaramillo, 2014), también por presencia de patógenos y condiciones fisiopatológicas relacionadas a la inflamación (Gestal *et al.*, 2007), además de formar parte de un fuerte sistema antioxidante en moluscos (Zhang *et al.*, 2012) que sería también la causa de la alta longevidad reportada en *P. globosa* por González-Peláez (2013). Además de los transcritos descritos, se encontraron algunos que están propiamente involucrados en el proceso de apoptosis como la proteína Eiger, la proteína quinasa serina/treonina dual y tirosina y el transportador 1 de sodio-acoplado monocarboxilado. La proteína Eiger se ha encontrado en estudios del género de mosca *Drosophila*, esta puede inducir la apoptosis dependiente de caspasa, y a su vez esta proteína se ha demostrado que depende de la actividad de la proteína quinasa c-Jun N-terminal (JNK) aunque cómo funciona el mecanismo de señalización es desconocido (Moreno *et al.*, 2002). En ese sentido, la proteína Eiger estaría asociada a la proteína quinasa serina/treonina dual y tirosina encontrada en el presente estudio, ya que Cross *et al.* (2000) encontraron que algunas proteínas quinasas, entre ellas la proteína quinasa del presente trabajo, en conjunto con la JNK son promotores del proceso de apoptosis dependiente de caspasas, ya que dicha combinación induce las caspasas 8 y 9 y a su vez toda esta cascada de señalizaciones inducen los genes proapoptóticos. Que aunque Eiger no está directamente señalada en el proceso mencionado, el estudio de Moreno *et al.* (2002) la asocia directamente cuando hay

actividad por parte de la JNK. En el caso de la proteína del transportador 1 de sodio-acoplado monocarboxilado, Ganapathy *et al.* (2008) han reportado que está presente en el colon en humanos en condiciones normales y que funciona como un supresor de tumores e inductor de apoptosis selectivo en las células cancerígenas. Por otra parte, uno de los transcritos diferencialmente expresados es la proteína 5 de lipofuscinosis ceroida neuronal (CLN5), la cual Mamo *et al.* (2012) describe que es una enfermedad humana neurodegenerativa que conlleva a desordenes desde la niñez, pérdida progresiva de la visión, sordera, retraso mental y una gran reducción en la esperanza de vida. Además de mencionar que a nivel celular esta se caracteriza por la acumulación de lipopigmentos con heterogeneidad morfológica en diferentes formas. Se ha encontrado que CLN5 tiene un rol en el tráfico retrogrado de los receptores del lisosoma, que es el lugar donde se generan las lipofuscinas de acuerdo al estudio de Höhn y Grune (2013). Finalmente también se encontró el transcrito que codifica a la proteína 1 moduladora de especies reactivas de oxígeno (ERO) que ha sido caracterizada por Zhao *et al.* (2013) en la lamprea japonesa *Lampetra japonica*, y que se ubica en la mitocondria incrementando el nivel de EROs en las células, mencionando que aunque se les señala de ser causantes de daño celular las EROs tienen un rol en el crecimiento, la supervivencia y la regeneración de tejidos, además de regular la respuesta inmune y la proliferación de las células.

Los transcritos encontrados asociados a la senescencia se encontraron expresados en su mayoría en el grupo de edad LM. Cabe mencionar, que al no encontrar transcritos relacionados a la reproducción, el análisis molecular carece de herramientas para sustentar la presencia o no de senescencia negativa como estrategia reproductiva en *P. globosa*.

Dejando de lado el análisis molecular, el conjunto de evidencias tanto del análisis morfológico, específicamente el incremento en biomasa (peso total, drenado y masavisceral), como el histológica, referente al potencial reproductivo, y bioquímico e histoquímico, relativa a la actividad reproductiva, parecen demostrar que la estrategia reproductiva de senescencia negativa ocurre al menos hasta los 21 años en las poblaciones del norte del Golfo de California. Aunque los resultados no son totalmente concluyentes respecto al último grupo de edad LA (24-36 años), existen elementos de apoyo a la teoría

de la senescencia negativa, que indican que en almejas del género *Panopea* no presentan reducción de su fecundidad en organismos viejos (>50 años; Sloan y Robison, 1984). Lo anterior, representan nuevos elementos técnicos a considerar para el diseño de estrategias de manejo en la pesquería de la almeja *P. globosa*. Como se demostró, los individuos mayores a los 11 años son la parte de la población que tiene mayor importancia en términos de producción de gametos, y consecuentemente en la producción de larvas para el mantenimiento de la población. Considerando que la evidencia que se tiene refleja que el incremento en el potencial reproductivo es sostenido al menos hasta los 21 años, se considera apropiado tomar esta última edad como punto de referencia para proponer una talla máxima de captura para la especie. Sobre la base de los parámetros de crecimiento para la especie en la zona norte del Golfo de California (Aragón-Noriega *et al.*, 2015), la talla a esa edad corresponde a 161.73 mm de longitud de concha (LC) para la población de Puerto Peñasco y 143.09 mm de LC para la población de San Felipe. Si estas tallas de máxima captura fuesen implementadas para cada zona, se protegería al 56 % de la población en el caso de San Felipe y el 17 % en Puerto Peñasco. Las diferencias entre sitios obedecen a la estructura de tallas de cada población. Estos estimados de talla máxima de captura reflejan la necesidad de implementar estrategias particulares en cada una de las poblaciones para mejorar del plan de manejo actual y lograr la sustentabilidad de la pesquería. En apoyo a esto, Arney (2009) indica que el manejo de la pesquería, debe de considerar la protección de las cohortes más viejas de *P. generosa* que se han ido acumulando en las poblaciones con el tiempo, ya que estos organismos mantienen la fecundidad con la edad. Además, siguiere que, si las poblaciones estuvieran dominadas por juveniles, estas serían incapaces de sustentar el repoblamiento, y por consiguiente, el desbalance de las cohortes podría crear que la población colapsara.

La talla de máxima captura ha mostrado ser una herramienta útil para evitar la sobrepesca de reclutamiento, la cual puede ocurrir si la biomasa de organismos reproductores adultos es reducida con tal intensidad que derive a su vez en la disminución del reclutamiento de las siguientes generaciones (Peterson, 2002). Siendo que los organismos mayores tienen un mayor aporte en cuanto a la fecundidad, y por lo tanto, son

los principales responsables de mantener a la población. Esto se ha observado en otras especies de tiburones, donde las hembras presentan un aumento de tamaño y fecundidad cada año, así como un mayor reclutamiento en comparación con hembras pequeñas (FAO, 2005). De manera similar, en las langostas *Panulirus cygnus* (Melville-Smith *et al.*, 2009) y *Jasus verreauxi* (Montgomery y Craig, 2005) y en el gasterópodo *Trochus niloticus* (Foale y Day, 1997) se ha implementado una talla máxima de captura. Aunque estos animales conforman una pequeña parte de la población, se cree que tienen una mayor contribución en cuanto a la producción de huevos en comparación con las hembras pequeñas (McClanahan y Castilla, 2008). Para que la estrategia de talla máxima sea efectiva en *P. globosa* se deberá de considerarse también el hecho de que presentan fecundación es externa por lo cual es importante tomar en cuenta una densidad mínima poblacional que permita fecundaciones exitosas.

En la pesquería de la almeja generosa se ha establecido como medida de manejo los 130 mm de LC como la talla mínima de captura para las dos especies del género *Panopea* que se capturan en México (DOF 2012), sin embargo, su efectividad ha sido cuestionada debido a las diferencias entre especies y poblaciones sobre las que se aplican (Aragón-Noriega *et al.*, 2015). Cortéz-Lucero *et al.* (2011) indica que para la población de *P. globosa* de Guaymas (Son.), esta medida limita el acceso a tan sólo el 31% de la población natural, ya que en términos generales las almejas crecen menos en la región central del Golfo de California. Dado que no hay forma de saber la talla de los organismos hasta su captura, aquellos que no cumplen con dicha talla son descartados ocasionando un incremento en las tasas de mortalidad de la población. La implementación de esta estrategia pretende evitar la sobrepesca por crecimiento, definida como la captura de organismos que aún no alcanzan la talla comercial (Diekert, 2012), sin embargo, los resultados del presente estudio sugieren que tendría un mayor impacto la propuesta de una talla máxima de captura en *P. globosa* para conservar a los organismos de mayor edad, ya que son los que tienen un mayor aporte de gametos, representando una parte importante del stock desovante de la población.

Las poblaciones de *P. generosa* de Columbia Británica y Washington, donde la especie tiene más de 40 años de ser capturada comercialmente, las medidas de manejo aplicadas siguen dos esquemas diferentes. En el primer caso, se trata a la almeja como un pez, donde se pesca de manera constante pero moderada en toda la costa, mientras que en el segundo caso, se maneja a la almeja como un árbol, donde las capturas se concentran en parches bien definidos en los cuales se van rotando cada cierto tiempo (Orensanz *et al.*, 2000). La definición de las tasas de explotación en Canadá, toman en cuenta la estructura de edades basados en la acumulación histórica y mortalidad natural (Zhang y Hand, 2006).

Otras implicaciones que el presente trabajo puede tener son las relativas a los procesos de cultivo, ya que organismos adultos (>11 años) potencialmente pueden producir más gametos, y por ende larvas, que organismos jóvenes (<11 años). Los cultivos con organismos viejos (>21 años) que presentan mayor potencial reproductivo, podrían incrementar la capacidad de producción de los cultivos.

9. CONCLUSIONES

1. La información morfológica y el índice de potencial reproductivo, sugieren un incremento en la capacidad reproductiva de los organismos con la edad.
2. La información histoquímica indica actividad reproductiva en los organismos de mayor edad (LA) y acumulación de lipofuscinas con la edad en la temporada reproductiva.
3. En el análisis bioquímico de tejido gonadal detectó un incremento en la concentración de LT en temporada reproductiva y TG en temporada no reproductiva conforme avanza la edad, mientras que, la concentración de CHO y PT se mantuvo constante en ambas temporadas.
4. Se logró la secuenciación *de novo* del transcriptoma de ovario de *P. globosa* en diferentes grupos de edad (LB, LM y LA), logrando anotar un 20% de transcritos del total de contigs resultantes del ensamblado, el 80% restante pudiera ser ARN no codificante.
5. La comparación con *C. gigas* de genes ortólogos y rutas metabólicas identificadas para *P. globosa* evidencian que se obtuvo una buena cobertura de transcritos anotados.
6. El análisis general de la evidencia morfológica, histológica, histoquímica y bioquímica soportan la hipótesis de la presencia de senescencia negativa como estrategia reproductiva en *P. globosa* al menos hasta 21 años de edad.

RECOMENDACIONES

En el presente estudio se obtuvieron evidencias suficientes para suponer que los organismos adultos en *P. globosa* presentan una senescencia negativa al menos hasta los 21 años. Sin embargo, sería prudente realizar estos análisis en un periodo más largo, por lo menos en un año completo de muestreo, para poder ver si el patrón se presenta durante toda la temporada, específicamente tomando en cuenta los grupos de edades. Un aspecto importante que se debe considerar en cuanto a las reservas bioquímicas es que también están distribuidas en otros tejidos blandos, mismos que conforman la masa drenada del organismo, la cual mostró un incremento en el paso del grupo de edad LB a LM durante el análisis morfológico, por lo que sería conveniente analizar más tejidos (manto y sifón) para tener un análisis más preciso. Al ser el primer intento de secuenciar el transcriptoma de ovario de *P. globosa*, sería recomendable en estudios posteriores obtener el transcriptoma con un mayor número de organismos de ambos sexos y de mayor edad para describir un enfoque integral al respecto. Finalmente en cuanto a la gran cantidad de contigs que no pudieron ser anotados, sería ideal continuar con los análisis correspondientes para poder descifrar si realmente fue contaminación de ADN de otra especie, o si fue ARN no codificante.

10. LITERATURA CITADA

Abele, D., J. Strahl, T. Brey, E.E.R. Philipp. 2008. Imperceptible senescence: Aging in the ocean quahog *Arctica islandica*. Free Radical Res. 42 (5):474-480.

Aguilar-Bultet, L., L. Falquet. 2015. Secuenciación y ensamblaje *de novo* de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. Rev. Salud Anim. 37 (2):125-132.

Álvarez-Borrogo, S., B.P. Flores-Báez, L.A. Galindo-Bect. 1975. Hidrología del Alto Golfo de California II. Condiciones durante invierno, primavera y verano. Cienc. Mar. 2:21-36.

Álvarez-Borrogo, S. 1983. Gulf of California. Ecosystems of the world. 26:427-449.

Arambula-Pujol, E.M., A.M. García-Juárez, E. Alcántara-Razo, E.A. Aragón-Noriega. 2008. Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. Hidrobiológica. 18 (2):89-98.

Aragón-Noriega, E.A., J.C. Villalba, P.E. Gribben, E. Alcántara-Razo, A.N. Maeda-Martínez, E.M. Arambula-Pujol, A.M. García-Juárez, R. Maldonado-Amparo. 2007. Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) in the central Gulf of California. J. Shellfish Res. 26 (2):423-431.

Aragón-Noriega, E.A., E. Alcántara-Razo, L.E. Calderón-Aguilera, R. Sánchez-Fourcade. 2012. Status of geoduck clam fisheries in Mexico. J. Shellfish Res. 31:733-738.

Aragón-Noriega, E.A., L.E. Calderón-Aguilera, S.A. Pérez-Valencia. 2015. Modeling growth of the Cortes geoduck *Panopea globosa* from unexploited and exploited beds in the northern Gulf of California. J. Shellfish Res. 34 (1):119-127.

Arcos-Ortega, F.G., I.S. Racotta, E. Palacios, A.M. Ibarra. 2005. Ovary development at the onset of gametogenesis is genetically determined and correlated with reproductive traits at maturity in shrimp *Litopenaeus* (Penaeus) *vannamei*. Mar. Biol. 148:339-346.

Arcos-Ortega, F.G., S.J.S. León-Hing, C. Rodríguez-Jaramillo, M.A. Burgos-Aceves, I. Giffard-Mena, Z. García-Esquivel. 2015. Biochemical and histochemical changes associated with gonad development of the Cortez geoduck *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico. J. Shellfish Res. 34 (1):71-80.

Arney, B.D. 2009. Thermal and dietary optimization in the hatchery culture of juvenile Pacific geoduck clams (*Panopea generosa*, Gould, 1850). Tesis de Maestría. Universidad de Columbia Británica. 150p.

Ayache, N., L. Hmida, J.F.M.F. Cardoso, Z. Haouas, F.D. Costa, M.S. Romdhane. 2016. Reproductive cycle of the razor clam *Solen Marginatus* (Pulteney, 1799) in the southern Mediterranean Sea (Gulf of Gabes, South Tunisia). *J. Shellfish Res.* 35 (2):389-397.

Baqueiro-Cárdenas, E.R. 1998. Patrones en la dinámica poblacional y ciclo reproductor de moluscos bivalvos y gasterópodos de importancia comercial en México. Tesis de doctorado. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 295p.

Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimations of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanilin method for "total" lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103-145.

Barral, J.M., S.A. Broadley, G. Schaffar, F.U. Hartl. 2004. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 15:17-29.

Bayliss, O.H. 1984. Lipid Histochemistry. Royal Microscopical Society. Microscopy Handbooks. Ed. Bios Scientific Publishers Ltd. 64p.

Berkeley, S.A., C. Chapman, S.M. Sogard. 2004. Maternal age as a determinant of larval growth and survival in a marine fish, *Sebastes melanops*. *Ecology.* 85:1258-1264.

Berthelin, C., K. Kellner, M. Mathieu. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Phys. B.* 125:359-269.

Brunk, U.T., M.R. Marzabadi, C.B. Jones. 1992a. Lipofuscin, lysosomes, and iron. En: Lauffer, R. B. Ed. Iron and Human Disease. CRC Press, Boca Ratón, FL. pp 237-260.

Brunk, U.T., C.B. Jones, R.S. Sohal. 1992b. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and celular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat. Res.* 275:395-403.

Bureau, D., W. Hajas, N.W. Surry, C.M. Hand, G. Dovey, A. Campbell. 2002. Age, size structure, and growth parameters of geoducks (*Panopea abrupta* Conrad, 1849) from 34 locations in British Columbia sampled between 1993 and 2000. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2494. 29p.

Calderón-Aguilera, L.E., E.A. Aragón-Noriega, C.M. Hand, V.M. Moreno-Rivera. 2010a. Morphometric relationships, age, growth and mortality of the geoduck clam *Panopea generosa*, along the Pacific coast of Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 29 (2):319-326.

Calderón-Aguilera, L.E., E.A. Aragón-Noriega, H. Reyes-Bonilla, C.G. Paniagua-Chávez, A.E. Romo-Curiel, V.C. Moreno-Rivera. 2010b. Reproduction of the Cortes geoduck

Panopea globosa (Bivalvia: Hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. *J. Shellfish Res.* 29:135-141.

Campisi, J. 2003. Cellular senescence and apoptosis: How cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp. Gerontol.* 38 (1):5-11.

Chaparro, O.R., A.J. Schmidt, L.M. Pardo, P.V. Andrade, C.E. Wagner, V.M. Cubillos. 2011. Reproductive strategy of the semelparous clam *Gaimardia bahamondei* (Bivalvia, Gaimardiidae). *Invertebr. Biol.* 130 (1):49-59.

Ciocan, C.M., E. Cubero-León, C. Minier, J.M. Rotchell. 2011. Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *Plos one.* 6 (7):1-8.

Cortez-Lucero, G., J.A. Arreola-Lizárraga, J. Chávez-Villalba, E.A. Aragón-Noriega. 2011. Edad, crecimiento y mortalidad de la almeja de sifón, *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) en la región central del Golfo de California, México. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 46 (3):453-462.

Cross, T.G., D. Scheel-Toellner, N.V. Henriquez, E. Deacon, M. Salmon, J.M. Lord. 2000. Serine/Threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256: 34-41.

Cruz-Gómez, L.M. 2012. Ciclo anual de la condición nutricional en la almeja generosa, *Panopea globosa*, de Bahía Magdalena B. C. S. México. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 65p.

Cruz-Vásquez, R., G. Rodríguez-Domínguez, E. Alcántara-Razo, E. A. Aragón-Noriega. 2012. Estimation of individual growth parameters of the Cortes geoduck *Panopea globosa* from the Central Gulf of California using a multimodel approach. *J. Shellfish Res.* 31 (3):725-732.

Diekert, F.K. 2012. Growth overfishing: The race to fish extends to the dimension of size. *Environ. Resource Econ.* 52:549-572.

DOF. 2012. Diario Oficial de la Federación. Viernes 23 de marzo de 2012. Primera sección. Plan de Manejo para la Pesquería de Almeja Generosa (*Panopea* spp.) en las costas de Baja California, México. Páginas 20-52. (<http://dof.gob.mx/index.php?year=2012ymonth=03yday=23>)

Edinger, A.L., C.B. Thompson. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:663-669.

Evans, T., M. Loose. 2015. AlignWise: a tool for identifying protein-coding sequence and correcting frame-shifts. *BMC Bioinform.* 16:376-387.

- FAO. 2005. Management Techniques for Elasmobranch Fisheries. Food & Agriculture Org. 251p.
- Ferreira-Arrieta, A. 2014. Anatomía interna y patrones bioquímicos de *Panopea globosa* durante su desarrollo larval. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 65p.
- Foale, S., R. Day. 1997. Stock assessment of trochus (*Trochus niloticus*) (Gastropoda: Trochidae) fisheries at West Nggela, Solomon Islands. Fish. Res. 33:1-16.
- Fujimoto, E.K., N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150:76-85.
- Ganapathy, V., M. Thangaraju, E. Gopal, P.M. Martin, S. Itagaki, S. Miyauchi, P.D. Prasad. 2008. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cáncer. AAPS. J. 10 (1):193-199.
- Gestal, C., M.M. Costa, A. Figueras, B. Novoa. 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. Gene. 406:134-143.
- González, V.L., C.S. Andrade, R. Bieler, T.M. Collins, C.W. Dunn, P.M. Mikkelsen, J.D. Taylor, G. Giribet. 2014. A phylogenetic backbone for Bivalvia: an RNA-seq approach. Proc. R. Soc. 282:1-9.
- González-Peláez S.S. 2013. Almeja generosa de Bahía Magdalena: dinámica poblacional y consideraciones para el manejo. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 116 p.
- González-Peláez S.S., Leyva-Valencia I., Pérez-Valencia S. y D.B. Lluch-Cota. 2013. Distribution limits of the geoduck clams *Panopea generosa* and *P. globosa* on the Pacific coast of Mexico. Malacologia. 56:85-94.
- González-Peláez, S.S., E. Morales-Bojórquez D.B. Lluch-Cota, S.E. Lluch-Cota, J.J. Bautista-Romero. 2015. Modeling Geoduck growth: Multimodel inference in *Panopea globosa* from the Southwestern Baja California Peninsula, Mexico. J. Shellfish Res. 34 (1):101-112.
- Goodwin, C.L., B. Pease. 1987. The distribution of geoduck (*Panopea abrupta*) size, density and quality in relation to habitat characteristics such as geographic area, water depth, sediment type, and associated flora and fauna in Puget Sound Washington. Reporte técnico del Departamento de Pesquerías. 44p.
- Gosling, E. 2004. Bivalve mollusk. Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books. Oxford. 443p.

- Grabherr, M.G., B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, A. Regev. 2011. Full length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29:644-652.
- Gribben, P.E., R.G. Creese. 2003. Protandry in the New Zealand geoduck, *Panopea zelandica* (Mollusca, Bivalvia). *Invertebr. Reprod. Dev.* 44:2-3.
- Hebbel, R.P. 1986. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.* 107 (5):401-404.
- Hefferman, P.B., R.L. Walker. 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *J. Mollus. Stud.* 55:135-137.
- Hidalgo-de-la-Toba, J.A., S.S. González-Peláez, E. Morales-Bojórquez, J.J. Bautista-Romero, D.B. Lluch-Cota. 2015. Geoduck *Panopea generosa* growth at its southern distribution limit in North America using a multimodel inference approach. *J. Shellfish Res.* 34 (1):91-99.
- Höhn, A., T. Grune. 2013. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol.* 1:140-144.
- Huges, R., D. Roberts. 1981. Comparative demography of *Litorina rudis*, *L. nigrolineata* y *L. neritoides* on three contrasted shores in north wales. *J. Anim. Ecol.* 50 (1):251-268.
- Humanson, G.L. 1972. *Animal tissue techniques.* 641p.
- Ivanina, A.V., I.M. Sokolova, A.A. Sukhotin. 2008. Oxidative stress and expression of chaperones in aging mollusks. *Comp. Biochem. Physiol.* 150:53-61.
- Kefaloyianni, E., E. Gourgou, V. Ferle, E. Kotsakis, C. Gaitanaki, I. Beis. 2005. Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-mapk signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (lam.). *J. Exp. Biol.* 208:4427-4436.
- Koditschek, L.K., W. Umbreit. 1969. Enzymatic colorimetric test for triglycerides with lipid clearing factor (LCF). *J. Bacteriol.* 68:1063-1068.
- Kirkwood, T.B.L., T. Cremer. 1982. Cytogerontology since 1881: A reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Hum. Genet.* 60:101-121.
- Kirkwood, T.B.L. 1999. *Time of our lives: The science of human aging.* Editorial Oxford University Press. E.U.A. 288p.

- Kiss, T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis*. 15 (3):313-321.
- Langton, R.W., W.E. Robinson, D. Schick. 1987. Fecundity and reproductive effort of sea scallops *Placopecten magellanicus* from the Gulf of Maine. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37:19-25.
- León-Hing, S.J. 2012. Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B. C. México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 102p.
- Li, L., C.J. Stoeckert, D.S. Roos. 2003. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *C. S. H. L. P.* 13:2178-2189.
- López-Landavery, E. A. 2015. Análisis del transcriptoma gonadal del abulón rojo *Haliotis rufescens* cultivado en Baja California, México. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 156 p.
- Mamo, A., F. Jules, K. Dumaresq-Doiron, S. Costantino, S. Lefrancois. 2012. The role of ceroid lipofuscinosis neuronal protein 5 (CLN5) in endosomal sorting. *Mol. Cell. Biol.* 32 (10):1855-1866.
- Mathew, S., R. Damodaran. 1997. Lipofuscin as physiological indicator of heavy metal stress in *Sunetta scripta* (yellow clam) and *Perna viridis* (Green mussel). *Indian J. Mar. Sci.* 26 (1):64-67.
- McClanahan, T., J.C. Castilla. 2008. Fisheries Management: Progress toward Sustainability. John Wiley & Sons. 352p.
- Melville-Smith, R., S. Lestang, N.E. Beale, D. Groth, A. Thompson. 2009. Investigating reproductive biology issues relevant to managing the western rock lobster broodstock. Fisheries Research and Development Corporation Report. 91p.
- Meng, X.L., P. Liu, F.L. Jia, J. Li, B.Q. Gao. 2015. *De novo* Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* ovary and testis by RNA-Seq: Identification of genes involved in gonadal development. *Plos one*. 10 (6):1-19.
- Montgomery, S.S., J.R. Craig. 2005. Distribution and abundance of recruits of the eastern rock lobster (*Jasus verreauxi*) along the coast of New South Wales, Australia. *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 39:619-628.
- Moreno, E., M. Yan, K. Basler. 2002. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr. Biol.* 12:1263-1268.
- Morlans, M.C. 2004. Introducción a la ecología de poblaciones. Editorial Científica Universitaria. Argentina. 16p.

- Morsan, E., N.F. Ciocco. 2004. Age and growth model for the southern geoduck *Panopea abbreviata*, of Puerto Lobos (Patagonia, Argentina). *Fish. Res.* 69:343-348.
- Nakaoka, M. 1994. Size-dependent reproductive traits of *Yoldia notabilis* (bivalvia, protobranchia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114 (1-2):129-137.
- Nakaoka, M. 1996. Size-dependent survivorship of the bivalve *Yoldia notabilis* (Yokoyama, 1920): the effect of crab predation. *J. Shellfish Res.* 15 (2):355-362.
- Nava-Romo, J.M. 1994. Impactos, a corto y largo plazo, en la diversidad y otras características ecológicas de la comunidad béntico-demersal capturada por la pesquería de camarón en el norte del Alto Golfo de California, México. Tesis de Maestría, ITESM-campus Guaymas, Sonora. 86p.
- Noda, T. 1991. Shell growth of the sand snail *Umbonium costatum* (Kiener) in hakodate bay. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 42 (4):115-125.
- Noda, T., Nakao S., S. Goshima. 1995. Life story of the temperate subtidal gastropod *Umbonium Costatum*. *Mar. Biol.* 122 (1):73-78.
- Orensanz J.M., Hilborn R. y A.M. Parma. 2000. Harvesting Methuselah's clams – Is the geoduck fishery sustainable, or just apparently so? *Fisheries and Oceans Science. Canadian Stock Assessment Secretariat.* 69p.
- Palazzo, A.F., E.S. Lee. 2015. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.* 6 (2):1-11.
- Pardo-Andreu, G., P. Hernández-Casaña, R. Delgado-Hernández. 2005. La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Rev. Cubana Med.* 44 (22):1-12.
- Peterson, C.H. 2002. Recruitment overfishing in a bivalve mollusk fishery: hard clams (*Mercenaria mercenaria*) in North California. *Can. J. Aquat. Sci.* 59:96-104.
- Philip, E.R., D. Abele. 2010. Masters of longevity: Lessons from long-lived bivalves – A mini-review. *Gerontology.* 56:55-65.
- Prophet, E.B., B. Mills, J.B. Arrington, L.H. Sobin. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology.* Armed Forces Institute of Pathology. 275p.
- Ridgway, I.D., C.A Richardson, S.N. Austad. 2011. Maximum shell size, growth rate, and maturation age correlate with longevity in bivalve molluscs. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 66A (2):183-190.
- Riga, D., S. Riga. 1995. Lipofuscin and ceroid pigments in aging and brain pathology. A review. I. Biochemical and morphological properties. *Rom. J. Neurol. Psych.* 33:121-136.

- Rodríguez-Jaramillo, C., M.A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano, E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J. Shellfish Res.* 27 (5):1129-1141.
- Rodríguez-Jaramillo, C. 2014. Cambios fisiológicos durante la gametogénesis en respuesta a incremento de la temperatura experimental y natural: Comparación entre una especie de ostión templada (*Crassostrea gigas*) y una tropical (*C. corteziensis*). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 229p.
- Rodríguez-Jaramillo, C., A.M. Ibarra, P. Soudant, E. Palacios. 2017. Comparison of quantitative gonad maturation scales in a temperate oyster (*Crassostrea gigas*) and a subtropical oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Invertebr. Reprod. Dev.* 61 (3):147-156.
- Roe, J.H. 1955. The determination of sugar in blood and spinal with anthrona reagent. *J. Biol. Chem.* 220:212-335.
- Roe, J.H., J.M. Bailey, R.R. Gray, J.N. Robinson. 1961. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J. Biol. Chem.* 236 (5):1244-1246.
- Saborido-Rey, F. 2008. Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos. Tesis de doctorado. Universidad de Vigo. España. 71p.
- Schenk, P.M., L.C. Carvalhais, K. Kazan. 2012. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends Biotechnol.* 30 (3):177-184.
- Schöne, B.R., E. Dunca, J. Fiebig, M. Pfeiffer. 2005. Mutvei's solution: An ideal agent for resolving microgrowth structures of biogenic carbonates. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.* 228:149-166.
- Shaul, W., C.L. Goodwin. 1982. Geoduck (*Panopea generosa*: Bivalvia) age as determined by internal growth lines in the Shell. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:632-636.
- Sheehan, D., B.B. Hrapchak. 1980. Theory and practice of histotechnology. Segunda edición. Ohio: Battelle Press. 481p.
- Sies, H. 1991. Oxidative stress from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:31-38.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215 (2):213-219.
- Sloan, N.A., M.C. Robinson. 1984. Age and gonad development in the geoduck clam *Panopea abrupta* (Conrad) from Southern British Columbia, Canada. *J. Shellfish Res.* 4:131-137.

- Sokolova, I.M. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Surviv. J.* 6:49-58.
- Sokolova, I.M., A. Sukhotin, G. Lanning. 2012. Stress effects on metabolism and energy budgets in mollusks. En: Abele, D., J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín (Ed). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Wiley-Blackwell, UK. pp 263-280.
- Sorensen, J.G., T.N. Kristensen, V. Loeschcke. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6:1025-1037.
- Soti, C., E. Nagy, Z. Giricz, L. Vigh, P. Csermely, P. Ferdinandy. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Brit. J. Pharmacol.* 146 (6):769-780.
- Sreedhar, A.S., P. Csermely. 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 101 (3):227-257.
- Tapia-Morales, S. 2014. Movilización de reservas bioquímicas y expresión del gen de la vitelina (mRNA VT/VTG) durante el desarrollo gonádico de la almeja de sifón, *Panopea globosa*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. México. 94p.
- Tatar, M. 2010. Reproductive aging in invertebrate genetic models. *Ann N Y Acad. Sci.* 1204:149-155.
- Teaniniuraitemoana, V., A. Huvet, P. Levy, C. Klopp, E. Lhuillier, N. Gaertner-Mazouni, Y. Gueguen, G.L. Moullac. 2014. Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera*: identification of potential sex differentiation and sex determining genes. *BMC. Genomics.* 15:1-20.
- Terman, A., U.T. Brunk. 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell B.* 36:1400-1404.
- Terman, A., B. Gustafsson, U. Brunk. 2007. Autophagy, organelles and ageing. *J. Pathol.* 211: 134-143.
- Valenzuela-Quíñonez, F. 2009. Hábitos alimenticios del pez guitarra *Rhinobatos productus* en el Alto Golfo de California. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 94p.
- Vaupel, J.W., A. Baudisch, M. Dölling, D.A. Roach, J. Gampe. 2004. The case for negative senescence. *Theor. Popul. Biol.* 65:339-351.
- Viarengo, A., M.N. Moore, M. Pertica, G. Mancinelli, R. Accomando. 1992. A simple procedure for evaluating the protein degradation rate in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) tissues and its application in a study of phenanthrene effects on protein catabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 103b:27-32.

- Vite-García, M.N. 2005. Almacenamiento y utilización de reservas energéticas en relación con la reproducción de las ostras perleras *Pteria sterna* (Gould, 1851) y *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 95p.
- Wang, H., Y. Xiao, L. Fu, H. Zhao, Y. Zhang, X. Wan, Y. Qin, Y. Huang, H. Gao, X. Li. 2010. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. BMC Biotechnol. 10 (14):1-9.
- Wolf, S.N. 2010. Comparative biology of aging. Editorial Springer. E.U.A. 391p.
- Yonge, C.M. 1971. On functional morphology and adaptive radiation in the bivalve superfamily Saxicavacea (*Hiatella* (=Saxicava), *Saxicavella*, *Panomia*, *Panope*, *Cyrtodaria*). Malacologia. 11 (1):1-44.
- Zhang, Z., C. Hand. 2006. Recruitment patterns and precautionary exploitation rates for geoduck (*Panopea abrupta*) populations in British Columbia. J. Shellfish Res. 25 (2):445-453.
- Zhang, G., X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, H. Qi, Z. Xiong, H. Que, Y. Xie, P.W.H. Holland, J. Paps, Y. Zhu, F. Wu, Y. Chen, J. Wang, C. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Huang, Q. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. Liu, T. Domazet-Loso, Y. Du, X. Sun, S. Zhang, B. Liu, P. Cheng, X. Jiang, J. Li, D. Fan, W. Wang, W. Fu, T. Wang, B. Wang, J. Zhang, Z. Peng, Y. Li, N. Li, J. Wang, M. Chen, Y. He, F. Tan, X. Song, Q. Zheng, R. Huang, H. Yang, X. Du, L. Chen, M. Yang, P.M. Gaffney, S. Wang, L. Luo, Z. She, Y. Ming, W. Huang, S. Zhang, B. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. Ni, G. Miao, J. Wang, Q. Wang, C.E.W. Steinberg, H. Wang, N. Li, L. Qian, G. Zhang, Y. Li, H. Yang, X. Liu, J. Wang, Y. Yin, J. Wang. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature. 490:49-54.
- Zhao, C., B. Feng, Y. Cao, P. Xie, J. Xu, Y. Pang, X. Liu, Q. Li. 2013. Identification and characterisation of ROS modulator 1 in *Lampetra japonica*. Fish Shellfish Immunol. 35:278-283.

11. ANEXOS

11.1 Anexo A. Protocolo de extracción de RNA para *P. globosa*.

1. Se colocó 0.1mL de perlas en crioviales de 2 mL. Después se marcaron los tubos con claves para identificación y se les adicionó 800 μ L de tripure o trizol por tubo (se hizo dentro de una campana de extracción).

Nota: El tripure debe almacenarse en refrigeración a 4°C sin luz. Los tubos que contienen tripure deben mantenerse en hielo.

2. Se disecaron las muestras para pasar a tubos con tripure.

Tubos	Muestras (Clave)
1	15-2 P
2	16-1 P
3	18-2 P
4	21-1 P
5	6-2 P
6	25-2 P
7	27-2 P
8	8-1 P
9	4-2 S
10	6-2 S
11	14-1 S
12	PP 21-2
13	PP 29-2

3. Una vez tenido el tejido de entre 30-60 mg en los tubos con tripure y esferas se pasó al equipo homogeneizador FastPrep24 por 45 segundos 4 m/s (Se repitió el paso tres veces debido a que el tejido no se rompía totalmente).
4. Se centrifugaron los tubos a 12000 rpm (revoluciones por minuto) por 10 minutos a 4°C.
5. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a tubos de 1.6 mL para después colocarlos en un equipo Vortex por 15 segundos. Las muestras se pusieron a incubar durante 5 minutos.
6. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C.

7. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a tubos de 1.6 mL previamente marcados con claves para identificación. A estos se les adicionó 500 μ L de etanol puro, se mezcló bien y se esperó una hora.
8. Se centrifugaron las muestras a 12000rpm 15 minutos 4°C y se descartó el sobrenadante. Después se les agregó 500 μ L de etanol al 70% y se despegó el pellet formado en el fondo del tubo.
9. Se incubó durante 10 minutos.
10. Se centrifugaron las muestras a 12000rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
11. Se centrifugaron las muestras a 12000rpm por 1 minuto a 4°C, se quitó el excedente de etanol con una pipeta (50 μ L aproximadamente) y se dejó secar el pellet en la campana de extracción.
12. Se les agregó a las muestras 50 μ L de H₂O DEPC y se disolvió el pellet para tener el ARN resuspendido.
13. Se almacenó a -20°C.