

شناسایی مورفولوژیک و مولکولی گونه غالب خیار دریایی در منطقه اولی (خلیج فارس-استان بوشهر) و آنالیز برخی ترکیبات دیواره بدن آن

- **فاطمه قبادیان***: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **حسین ذوالقرنین**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **محمدعلی سالاری**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- **ایرج نبی‌پور**: پژوهشکده زیست‌فناوری دریا، مرکز تحقیقات زیست پزشکی شهدای خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
- **امیر وزیری‌زاده**: مرکز تحقیقات آبزیان خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

چکیده

هدف از این پژوهش، شناسایی یکی از گونه‌های غالب خیار دریایی در منطقه اولی- بوشهر، با استفاده از روش مورفولوژیک و مولکولی و بررسی برخی ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره بدن از جمله پروتئین کلاژن بوده است. تا علاوه بر شناسایی دقیق گونه، با مطالعه ترکیبات دیواره بدن آن بتوان، از یافته‌های این تحقیق در جهت ارتقاء صنایع غذایی و دارویی در کشور استفاده نمود. در این راستا، ابتدا با شناسایی مورفولوژیک از طریق بررسی اوسیکل‌های دیواره بدن و سپس با شناسایی مولکولی از طریق تعیین توالی بخشی از ژنوم میتوکندریایی ۱۶S rRNA، گونه مورد بررسی به‌عنوان گونه *Holothuria leucospilota* شناسایی گردید. در بررسی ترکیبات دیواره بدن، پروتئین و رطوبت با مقادیر بالای ۷۰٪ بیش‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده بدن گونه مورد نظر بود و چربی کم‌ترین مقدار را در بین سایر ترکیبات داشته است. از بین ترکیبات پروتئینی، استخراج پروتئین کلاژن به‌روش هضم آنزیمی با پپسین صورت گرفت و با استفاده از آزمون SDS-PAGE، نوع آن و زیر واحدهای تشکیل‌دهنده آن با توجه به پروفایل وزن مولکولی، در مقایسه با سایر تحقیقات، صورت گرفت. روش استخراج موثر تشخیص داده شد و کلاژن استخراجی از نوع I بوده که دارای سه زنجیره $\alpha 1$ با وزن مولکولی حدود ۱۴۰ کیلو دالتون می‌باشد.

کلمات کلیدی: شناسایی مولکولی و مورفولوژیک، خیار دریایی، کلاژن، ترکیبات دیواره بدن



مقدمه

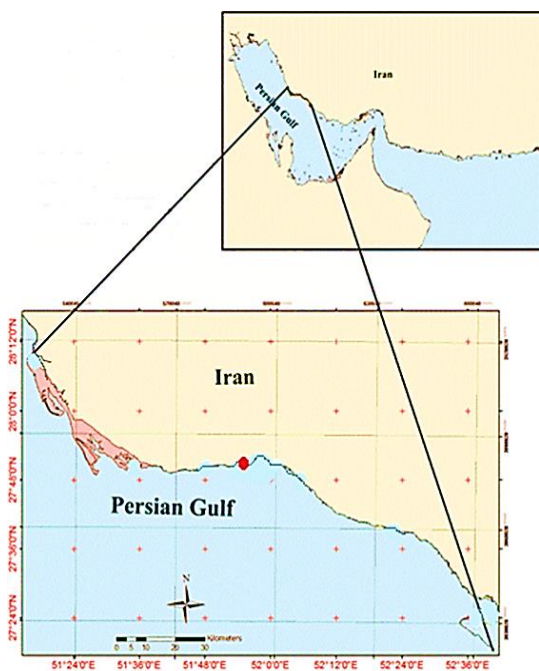
خیارهای دریایی یکی از رده‌های متعلق به شاخه خارپوستان می‌باشند که از منطقه بین جزر و مدی تا اعماق بزرگ‌ترین اقیانوس‌ها یافت می‌شوند. اکثر خیارهای دریایی اپی‌بنتوز هستند. آن‌ها اکثراً جزء جوامع دریایی غالب، به‌ویژه در مناطق مسطح آبسنگی گرمسیری و در اعماق دریا (Billett, 1991؛ Birkeland, 1989) می‌باشند. آن‌ها به‌صورت کفزی و یا پلاژیک (فقط گونه‌های منطقه اعماق اقیانوس) و نیز با تنوع زیستی بالا در اقیانوس هند و جنوب‌غرب آسیا، وجود دارند (Granda, 2006). خیارهای دریایی به‌عنوان یک محصول دارای ارزش اقتصادی و مورد مصرف گسترده به‌عنوان منابع غذایی یا غیرغذایی، هستند (Oedioe, 2017). بیش از هزار گونه خیار دریایی در سرتاسر دنیا وجود دارد که تنها ۵۰ گونه آن خوراکی است (FAO, 2008). این موجودات دریازی به‌عنوان یک غذای سنتی سالم و هم‌چنین به‌عنوان دارو در کشورهای چین، ژاپن، کره و برخی دیگر از کشورهای آسیایی، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Gao و همکاران، 2016). خیارهای دریایی به این دلیل که مانند بسیاری از محصولات دریایی و آبی غنی از پروتئین هستند، به‌عنوان یک غذای سالم و ایده‌آل با ارزش غذایی بالا شناخته می‌شوند (Wen و همکاران، 2010). مطالعات قبلی نیز تایید نموده‌اند که این موجودات دریایی غنی از آمینواسیدها، اسیدهای چرب و عناصر کم‌مقدار (Aydin و همکاران، 2011) و مقادیر چشمگیر از پروتئین بالا و چربی کم می‌باشند (Wen و همکاران، 2010). علاوه بر این خیارهای دریایی دارای مواد بایواکتیو گوناگونی از قبیل کلژن و پلی‌ساکاریدها هستند (Abedin و همکاران، 2013؛ Park و همکاران، 2012). این گروه در رده‌بندی سیستماتیک شامل ۵ راسته و ۲۵ خانواده می‌باشند که خانواده Holothuriidae متنوع‌ترین گروه خیارهای دریایی را در این رده تشکیل می‌دهد و اغلب در مناطق گرمسیری و آب‌های کم‌عمق دیده می‌شوند. این خانواده در کل ۵ جنس دارد (O'Loughlin و همکاران، 2007؛ Samyn و همکاران، 2005) که شامل: *Actinopyga* (Bronn, 1860) (۱۷ گونه)، *Bohadschia* (Jaeger, 1833) (۱۱ گونه)، *Labiodemas* (Linnaeus, 1767) (۱۵۰ گونه)، *Holothuria* (Selenka, 1867) (۸ گونه)، *Pearsonothuria* (Levin, 1984) (۱ گونه). جنس *Holothuria* با دربر داشتن ۱۵۰ گونه، بیش‌ترین تعداد گونه را در این خانواده داشته که تعدادی از این گونه‌ها به منطقه آتلانتیک شرقی محدود می‌شوند و تعدادی دیگر تنها در منطقه آتلانتیک غربی (Pérez-Ruzafa و همکاران، 1999) یا در مناطق گرمسیری مشاهده شده‌اند. گونه مورد بررسی در پژوهش حاضر نیز، متعلق به خانواده Holothuriidae و جنس *Holothuria* بوده است. اهمیت اکولوژیکی و تجاری خیارهای دریایی باعث شده تا مطالعات سیستماتیک در مورد

آن‌ها در سراسر دنیا صورت پذیرد. البته سیستماتیک خیارهای دریایی براساس ویژگی‌های مورفولوژیک آن‌ها، تا به امروز هم‌چنان در حاله‌ای از ابهام مانده است (Kamarul و همکاران، 2009) که این نیازمند استفاده از روش‌های مولکولی به‌عنوان یک روش تکمیلی و قابل اطمینان، برای حل این مشکل می‌باشد (Kamarul و Ridzwan, 2005). در گذشته تنها به شناسایی مورفولوژیک جانداران، با استفاده از کلیدهای شناسایی تهیه شده طی تحقیقات فراوان دانشمندان مختلف، اکتفا می‌شد، ولی امروزه آنالیزهای فیلوژنتیک با استفاده از تعیین توالی DNA به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در مطالعات مولکولی و شناسایی گونه موجودات زنده، بسیار مورد توجه می‌باشد. در این میان، DNA میتوکندریایی (mtDNA) و DNA هسته‌ای دو منبع اصلی از ماده ژنتیکی هستند که به‌عنوان جایگاه‌های هدف در مطالعات فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌یابی DNA، مورد بررسی قرار می‌گیرند. mtDNA دارای یک سری ویژگی‌هایی می‌باشد که این ماده ژنتیکی را به‌ارزج‌ترین مدل در مطالعات اکولوژی مولکولی و شناسایی مولکولی جنس و گونه موجودات زنده، تبدیل نموده است. برخی از این ویژگی‌ها شامل موارد ذیل می‌باشد: (۱) وراثت مادری، (۲) هاپلوئیدبودن ژنوم، (۳) عدم نوترکیبی و (۴) همانندسازی پیوسته. هم‌چنین نرخ جایگزینی در mtDNA به میزان ۵ تا ۱۰ برابر بیش‌تر از یک کپی تک رشته‌ای از DNA هسته‌ای است (Amos و Hoebel, 1992؛ Hartle و Clark, 1989). در مطالعات فیلوژنتیک با استفاده از mtDNA این‌طور استنباط شده است که برخی ژن‌ها، همانند ژن 16S rRNA میتوکندریایی، توانایی ایجاد همبستگی بین مورفولوژی و ژنتیک را دارند (Clouse و همکاران، 2005؛ Kerr و همکاران، 2005). لذا استفاده از توالی‌های این ژن جهت مطالعات فیلوژنتیک و سیستماتیک موجودات زنده، بسیار رواج یافته است. مهم‌ترین رکن و اولین و مهم‌ترین قدم در شروع هر پژوهش بر روی موجودات زنده، شناسایی درست و دقیق گونه مورد مطالعه، می‌باشد تا بتوان در نهایت نتایج قابل استناد از بررسی‌ها، در مورد موجودات زنده با توجه به جنس و گونه مورد بررسی، منتشر نمود. لذا هرگونه مطالعه در این زمینه، چه به‌صورت بررسی‌هایی صرفاً با اهداف شناسایی گونه از طریق ویژگی‌های مورفولوژیک و یا به‌صورت دقیق‌تر با بررسی‌های مولکولی، و چه مطالعاتی که با اهداف دیگر شکل گرفته ولی در گام اول به شناسایی دقیق گونه مورد مطالعه می‌پردازند، به‌تدریج کمک می‌نماید به این‌که شناخت دقیق و جامعی در مورد موجودات ساکن در گستره‌های ارزشمند آبی کشور به‌دست آورد. با توجه به موارد ذکر شده، تصمیم گرفته شد که ابتدا گونه مورد مطالعه را با تلفیق روش مورفولوژیک و مولکولی، شناسایی نموده و در ادامه، به آنالیز تقریبی برخی از ترکیبات دیواره بدن و هم‌چنین استخراج، تعیین نوع و ساختار پروتئین کلژن آن پرداخته شد. کلژن فراوان‌ترین پروتئین



مواد و روش‌ها

نمونه‌های جمع‌آوری شده خیار دریایی از گونه مورد بررسی با توجه به ویژگی‌های ظاهری، در فصل تابستان از منطقه بین جزر و مدی روستای اولی- بوشهر (مختصات جغرافیایی $54^{\circ} 53' 51''$ طول شرقی از نصف النهار گرینویچ و $11^{\circ} 50' 27''$ عرض شمالی) جمع‌آوری گردید (شکل ۱) و با تثبیت در اتانول ۹۶ درصد و تعدادی نیز با رعایت شرایط حمل و نقل به صورت زنده، جهت شناسایی مولکولی، و نیز تعدادی درون یخدان حاوی یخ جهت بررسی پروتئین، به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده آبزیان خلیج فارس بوشهر انتقال یافت. نمونه‌های انتقال یافته با یخ، بلافاصله در فریزر با دمای -80° درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و نمونه‌های زنده، درون آکواریوم با ایجاد شرایط بهینه برای نگهداری آن‌ها، قرار داده شد.



شکل ۱: نقشه منطقه مورد مطالعه (اولی - استان بوشهر)

شناسایی گونه مورد بررسی

شناسایی مورفولوژیک: شناسایی مورفولوژیک گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از دوکلید شناسایی Price (۱۹۸۳) و Conand (۱۹۹۸) مربوط به خیارهای دریایی، با بررسی ویژگی‌های ظاهری و سپس با استخراج اوسیکل‌های دیواره بدن در سطح پشتی و بررسی شکل آن‌ها، صورت گرفت.

شناسایی مولکولی: بررسی و شناسایی مولکولی گونه نیز، با استفاده از بررسی توالی ژن ۱۶S rRNA، به ترتیب ذیل صورت گرفت.

با منشاء جانوری است (Kittiphattanabawon و همکاران، ۲۰۰۵) و تاکنون ۲۹ نوع مختلف از انواع کلاژن شناسایی شده است (Zeugolis و Raghunath، ۲۰۱۱). مهم‌ترین نقش کلاژن در تشکیل ساختار و اسکلت سلولی و ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. این پروتئین در بسیاری از فرآیندهای پایه‌ای فیزیولوژیک از قبیل، رشد، ترمیم، نمو و مورفوژنز نقش مهمی در بدن جانوران مختلف از جمله نمونه‌های ساکن دریاها، ایفا می‌کند. پروتئین کلاژن کاربردهای گسترده‌ای در صنایع آرایشی، پزشکی، داروسازی، صنایع چرم و فیلم، دارد (Ogawa و همکاران، ۲۰۰۴). منابع صنعتی اصلی برای تهیه این پروتئین، پوست و استخوان خوک و گاو است. اما با شیوع بیماری جنون گاوی، نگرانی‌هایی در بین مصرف‌کنندگان محصولات کلاژن و ژلاتین دامی ایجاد نموده است. علاوه بر این کلاژن به دست آمده از استخوان خوک، به دلیل محدودیت‌های مذهبی، توسط بسیاری از افراد قابل استفاده نمی‌باشد (Sadowska و همکاران، ۲۰۰۳). در نتیجه توجهات به سمت یافتن منابع دیگر جهت استخراج و تولید صنعتی کلاژن منعطف گشته است. در این میان جانوران دریایی به دلیل در دسترس بودن، عدم محدودیت غذایی، عدم وجود خطر بیماری و بازده بالای کلاژن، به عنوان منابع بالقوه تولید کلاژن مورد توجه قرار گرفته‌اند (Park و همکاران، ۲۰۱۲). این پروتئین در دهه‌های اخیر از چندین جانور دریایی از قبیل اسکوئید، عروس دریایی و گربه ماهی استخراج گردیده و ویژگی‌های آن در مقایسه با کلاژن پستانداران، مورد مطالعه قرار گرفته است (Zhang و همکاران، ۲۰۰۹؛ Nagai و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین مطالعاتی در زمینه استخراج و بررسی ویژگی‌های این پروتئین از دیواره بدن چند گونه محدود از خارپوستان از جمله خیارهای دریایی در دنیا صورت گرفته است. در ایران نیز مطالعاتی بر روی کلاژن استخراج شده از خیار دریایی گونه *Holothurian parva* (Adibzadeh و همکاران، ۲۰۱۴) و گونه *Stichopus horrens* (عطاران فریمان و همکاران، ۱۳۹۵) هر دو در منطقه چابهار، صورت گرفته است. با توجه به اهمیت یاد شده از کلاژن به عنوان یک پروتئین ساختاری در سلول و نیز اهمیت آن در فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیک بدن موجودات زنده، رفع محدودیت‌های مصرف آن و یافتن منابع مختلف جانوری با بازده بالای استخراج، ضروری به نظر می‌رسد. لذا از آنجایی که، در حدود ۷۰٪ از پروتئین‌های تشکیل دهنده دیواره بدن خیارهای دریایی، شامل فیبرهای کلاژنی بسیار نامحلول می‌باشد (Saito و همکاران، ۲۰۰۲)، مطالعات در جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج و نیز مطالعه ساختار پروتئین استخراجی از این موجودات غنی از کلاژن، می‌تواند گام بزرگی در ارتقای کیفیت محصولات دارای اهمیت اقتصادی در صنایع مرتبط با سلامت و بهداشت و نیز صنعت آبری پروری باشد.



کلروفرم و آیزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۴، به محلول جدا شده اضافه و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه، در دور rpm ۱۲۰۰۰، سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی جداسازی و به اندازه ۲ تا ۲/۵ برابر حجم آن، اتانول مطلق و ۱ برابر حجم آن استات سدیم ۵ مولار به آن اضافه شد. مخلوط به مدت یک شب در دما ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب DNA حاصل، نگه داشته شد. آن گاه با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شسته و در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب DNA به دست آمده به مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا الکل باقی مانده در آن تبخیر شود. آن گاه به آن ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردیده و جهت بررسی‌های بعدی، درون یخچال ۴ درجه قرار گرفت.

ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده: به منظور سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Biotech photometer) ساخت آلمان در طول موج ۲۶۰ نانومتر، و الکتروفورز روی ژل ۱٪ تهیه شده از پودر آگارز (سیناکلون) و بافر TAE 1x استفاده شد. پس از اتمام فرآیند الکتروفورز، ژل حاوی باندهای DNA بلافاصله بر روی دستگاه مولد UV با طول موج ۲۶۰ نانومتر قرار گرفته و با استفاده از دستگاه مستندسازی ژل (XR Bio Rad) مشاهده و از آن تصویربرداری گردید.

تکثیر قطعه مورد نظر از DNA استخراج شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): واکنش PCR استاندارد در این تحقیق ابتدا در حجم ۲۵ میکرولیتر و سپس در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد (Lavery و همکاران، ۲۰۰۴؛ Saiki و همکاران، ۱۹۸۸) ترکیبات یک واکنش PCR استاندارد در حجم ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ترکیبات استفاده شده و مقادیر آن‌ها در واکنش PCR

مقدار (میکرولیتر)	مقدار (میکرولیتر)	ترکیبات
۵	۲/۵	PCR Buffer 10x
۳	۱/۵	MgCl ₂ 50Mm
۲	۱	dNTPs 10Mm
۲	۱	Primer Forward 10pm/μl
۲	۱	Primer Reversed 10pm/μl
۰/۸	۰/۴	Taq DNA polymerase 5U/ μl
۱۰	۵	Template DNA
۲۵/۲	۱۲/۶	ddH ₂ O
۵۰	۲۵	Total

استخراج DNA: تمامی مواد مورد استفاده در این بخش از بررسی، ساخت شرکت Merck آلمان بوده و به مواردی که از شرکت سینا کلون تهیه شده اشاره گردیده است. استخراج DNA در این تحقیق، به سه روش صورت گرفت: روش CTAB، روش TES و استفاده از کیت گیاهی Bioflux. دو روش استفاده از بافر TES و کیت گیاهی Bioflux نتیجه مطلوبی دربر نداشت و فقط روش CTAB بهترین کیفیت و کمیت DNA استخراجی را باعث گردید. استخراج DNA با استفاده از CTAB، براساس دستورالعمل ارائه شده توسط Waldschmid و همکاران (۱۹۹۷)، با کمی تغییر، به شرح زیر انجام گرفت. ابتدا مقدار ۰/۳ گرم از بافت ماهیچه دیواره بدن، روده، درخت تنفسی و بازوی دهانی از نمونه‌های تثبیت شده در اتانول ۹۶٪ و نمونه‌های زنده در آگار یوم (پس از بی‌حس کردن آن‌ها با محلول MgCl₂ با غلظت (w/v) ۲/۵٪) وزن گردید و مقدار ۶۳۰ میکرولیتر محلول CTAB ۲٪ با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به آن‌ها اضافه و نمونه‌ها با قیچی به خوبی خرد گردید. آن گاه مقدار ۷۰ میکرولیتر محلول SDS ۱۰٪ و ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K، به میکروتیوب‌های حاوی نمونه اضافه شده و به مدت یک شب در ترمومیکسر با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰ rpm تیمار گردید. سپس مقدار ۲۴۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار به نمونه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. آن گاه مقدار ۳۸۰ میکرولیتر کلروفرم و فنول به نسبت ۱:۱ به نمونه‌ها اضافه و مخلوط شد. مخلوط حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰، سانتریفیوژ و محلول رویی جداسازی گردید. کلروفرم و آیزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۴، به محلول جدا شده اضافه و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه، در دور rpm ۱۲۰۰۰، سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی جداسازی و به اندازه ۲ تا ۲/۵ برابر حجم آن، اتانول مطلق و ۱ برابر حجم آن استات سدیم ۵ مولار به آن اضافه شد. مخلوط به مدت یک شب در دما ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب DNA حاصل، نگه داشته شد. آن گاه با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شسته و در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب DNA به دست آمده به مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا الکل باقی مانده در آن تبخیر شود. آن گاه به آن ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردیده و جهت بررسی‌های بعدی، درون یخچال ۴ درجه قرار گرفت. سپس مقدار ۲۴۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار به نمونه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. آن گاه مقدار ۳۸۰ میکرولیتر کلروفرم و فنول به نسبت ۱:۱ به نمونه‌ها اضافه و مخلوط شد. مخلوط حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰، سانتریفیوژ و محلول رویی جداسازی گردید.



ژنتیکی با روش kimura-2-parameter و شرایطی از قبیل حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 محاسبه شد (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳). درخت فیلوژنتیک براساس روش NJ Neighbor-joining (NJ) و Maximum likelihood (ML)، با استفاده از مدل kimura-2-parameter و با پشوانه تکرار (boot strop) ۱۰۰۰، حذف کامل Gap یا Pairwise آن، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسورژن، سرعت یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد، نیز به وسیله نرم‌افزار MEGA 6 رسم گردید. هم‌چنین ترکیب بازی توالی‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 محاسبه شد.

آنالیز تقریبی برخی ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره بدن:

در این بخش از مطالعه، مقادیر پروتئین، رطوبت، چربی و خاکستر تشکیل‌دهنده دیواره بدن گونه مورد مطالعه براساس روش‌های AOAC معین گردید. مقدار رطوبت موجود در بافت، با استفاده از روش خشک نمودن نمونه درون آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۶ ساعت، محاسبه گردید. جهت تعیین میزان چربی از روش عصاره‌گیری Soxhlet استفاده شد. جهت تعیین مقدار خاکستر از کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. برای محاسبه مقدار پروتئین خام بافت دیواره بدن از روش Kjeldahl جهت اندازه‌گیری محتوای نیتروژنی کل و از فاکتور تبدیل عددی ۶/۲۵ برای تبدیل مقدار نیتروژن کل به مقدار پروتئین خام، استفاده گردید.

استخراج پروتئین کلاژن: پروتئین کلاژن از دیواره بدن نمونه‌های

مورد نظر به روش Cui و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی تغییر، به دو شکل استخراج شد: (۱) عصاره نامحلول کلاژنی، (۲) عصاره کلاژن محلول، با استفاده از آنزیم پیپسین (PSC). لازم به ذکر است که همه مراحل انجام کار در دمای ۴ درجه انجام شد.

استخراج عصاره نامحلول کلاژنی: ۱۰۰ گرم از دیواره بدن

که به قطعات کوچک ۲×۲ سانتی‌متر مربع برش زده شده بود، در ۱ لیتر آب مقطر برای ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. آن‌گاه محلول رویی با ۱ لیتر آب مقطر جدید جایگزین شد و عصاره‌گیری در آب این‌بار، به مدت ۱ ساعت، انجام گرفت. پس از آن، محلول رویی با یک لیتر از محلول EDTA ۴ میلی‌مولار و Tris-Hcl ۰/۱ مولار (pH=8) جایگزین شد و به مدت ۳ روز، با استفاده از هم‌زن مغناطیسی به هم زده شد. آن‌گاه مایع رویی خارج گردید و به جای آن ۱ لیتر آب مقطر جایگزین شد و نمونه‌ها به آرامی به مدت ۱۵ دقیقه به هم زده شدند و مراحل شستشو ۲ بار دیگر تکرار شد. در نهایت مایع حاصل با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جدید جایگزین شده به مدت ۲ روز به هم زده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دور ۹۰۰۰ g سانتی‌یفوژ شد. مایع

پرایمر استفاده شده در این بررسی شامل یک جفت پرایمر universal از بخشی از توالی DNA میتوکندریایی (۱۶srRNA)، بوده است (Palumbi و همکاران، ۱۹۹۱). قطعه مورد بررسی در محدوده ۵۰۰ bp تا ۶۵۰ bp قرار داشته که توالی نوکلئوتیدی آن در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده جهت

شناسایی مولکولی گونه مورد بررسی (Palumbi et al., 1991)

توالی نوکلئوتیدی پرایمر	نوع پرایمر
5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	۱۶SAR- L (Forward)
5'-GCC GGT CTG AAC TCAGAT CAC GT-3'	۱۶SBR- H (Reverse)

بهینه‌سازی شرایط PCR: برای تکثیر بخشی از ژنوم میتوکندریایی

۱۶SrRNA، ابتدا واکنش‌های PCR بهینه‌سازی شدند. برای بهینه‌سازی واکنش PCR، گرادایان دمایی ۴۸ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، در مدت زمان‌های ۵۰ تا ۶۰ ثانیه، غلظت الگو به میزان ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم، مورد توجه واقع گرفت. پروسه کامل دمایی بهینه شده برای تکثیر این قطعه از ژنوم میتوکندریایی به شرح ذیل بوده است: واسرشت اولیه دو رشته DNA از یکدیگر، در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت. سپس به اندازه ۳۵ چرخه تکثیر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴°C جهت تکمیل واسرشت، ۱ دقیقه در میانگین گرادایان دمایی مورد نظر جهت اتصال جفت پرایمر به الگو، به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت گسترش محصول و سرانجام به مدت ۴ دقیقه جهت گسترش نهایی مجدداً در دمای ۷۲°C قرار گرفت. سپس محصول به دست آمده از تکثیر، جهت بررسی و تعیین کیفیت از طریق روش الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱/۵٪ و بافر TAE 1X، مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین توالی محصولات PCR: از بین نمونه‌های مورد بررسی، نمونه دارای محصول توالی تکثیر شده از ۱۶SrRNA جهت تعیین توالی، به روش سنگر مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز فیلوژنتیک توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار: در یک مطالعه

اولیه، ابتدا صحت توالی‌های حاصل از این تحقیق، از طریق مقایسه با توالی‌های مشابه به سایر گونه‌های جنس *Holothuria* با استفاده از نرم‌افزار Blast موجود در وب سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) مورد مطالعه قرار گرفت (Altschul و همکاران، ۱۹۹۰). هم‌ردیفی اولیه توالی‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آنالیز Clustalw2 انجام شد (Larkin و همکاران، ۲۰۰۷). سپس توالی ۱۶SrRNA در تعدادی از گونه‌های جنس *Holothuria* از بانک جهانی ژن استخراج و هم‌ردیفی آن‌ها با توالی حاصل از این تحقیق با استفاده از برنامه Clustalw گنجانده شده در نرم‌افزار MEGA 6 نیز در ادامه با تنظیم چشمی انجام شد. ماتریکس فاصله



و مارکر پروتئینی با دامنه پایین وزن مولکولی (۱۱-۱۸۰ کیلودالتون) و نیز کلاژن نوع I گاوی جهت مقایسه، هم‌زمان در کنار نمونه‌های استخراج شده از خیار دریایی به‌درون چاهک‌ها تزریق شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل با استفاده از محلول حاوی رنگ (w/v) ۰/۱٪ رنگ Coomassie blue R250، (v/v) ۰/۴۵٪ متانول و (v/v) ۰/۱۰٪ آب مقطر، رنگ‌آمیزی گردید. محلول رنگ بر، نیز ترکیب و نسبت مواد مشابه محلول رنگ‌آمیزی داشته با این تفاوت که فاقد رنگ کوماسی بلو بوده است.

نتیجه

شناسایی مورفولوژیک: با توجه به کلید شناسایی Price (۱۹۸۳) از خارپوستان خلیج فارس و کلید شناسایی Conand (۱۹۹۸) از خیارهای دریایی، با بررسی ویژگی‌های ظاهری شکل بدن، رنگ پوست، شکل و تعداد تتاکل‌های دهانی، وجود یا عدم وجود لوله‌های کوویرین، و شکل اوسیکل‌های دیواره بدن، گونه مورد بررسی به‌عنوان گونه *Holothuria leucospilota* شناخته شد. رنگ بدن کاملاً سیاه رنگ، بدن باریک و کشیده که انتهای جلویی آن باریک‌تر از انتهای عقبی آن است (شکل ۲-الف) پوست بدن دارای رنگیزه بنفش مایل به سرخی نیز می‌باشد که پس از تماس با دست اثر آن به رنگ قرمز روی پوست دست دیده می‌شود. بیش‌ترین طول بدن حدود ۵۵ سانتی‌متر ولی به‌طور معمول حدود ۳۵ سانتی‌متر می‌باشد. میانگین وزن موجود زنده حدود ۰/۳ کیلوگرم است. پوست بدن بسیار نرم بوده و *Podia* در سطح شکمی بسیار فراوان هستند (شکل ۲-ب). دهان موقعیت شکمی دارد و با ۲۰ عدد تتاکل دهانی سیاه‌رنگ احاطه شده است (شکل ۲-ج) و مخرج در موقعیت *subdorsal* قرار دارد. دارای اندام رشته‌ای *Cuvierian* با رشته‌های بلند و باریک سفیدرنگ می‌باشد (شکل ۲-د). اوسیکل‌های غالب دیواره بدن در پوشش شکمی و پشتی، به اشکال میز مانند و دگمه‌ای دیده می‌شوند (شکل ۳). انواع میزمانند آن، دارای یک صفحه دایره‌ای بزرگ که ۸ عدد و یا بیش‌تر، سوراخ دارد و یک ساقه که ۴ پایه دارد و انواع دگمه‌ای به‌صورت منظم دارای ۶ تا ۸ عدد سوراخ و یا نامنظم هستند (شکل ۳). در مورد نمونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق نیز، پس از استخراج و بررسی اوسیکل‌های دیواره بدن، اشکال میزمانند و دگمه‌ای به وفور دیده شدند (شکل ۴).

شناسایی مولکولی

استخراج DNA: براساس بررسی‌های انجام شده در این تحقیق، از سه روش استفاده شده جهت استخراج DNA، استفاده از کیت تجاری و روش TES موفقیت‌آمیز نبود و تنها، روش CTAB از لحاظ کمی، نتیجه مطلوب‌تری داشته و در فرآیند PCR، قطعه مورد نظر از DNA به‌دست آمده از این روش، تکثیر یافته است (شکل ۵). هم‌چنین در

رویی حاصل، که حاوی فیبریل‌های کلاژن آزاد بود، در لوله آزمایش جمع‌آوری شد و فاز جامد جمع شده در ته لوله جدا شده و دوباره با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر هم‌زده شد و مراحل قبلی تکرار شد. در نهایت مایع رویی، در دور ۱۰۰۰۰ g برای ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل که فیبریل کلاژن خام نامیده می‌شود، در شرایط خلاء خشک گردید.

استخراج و تخلیص کلاژن محلول، حاصل از هضم آنزیمی

با پیپسین (Pepsin solubilized collagen = PSC): عصاره فیبریل خام کلاژن در ۲۰ حجم (V/W) از محلول NaOH ۰/۱ مولار، به‌مدت ۳ روز به‌هم زده شد. مواد حاصل از این عصاره‌گیری قلیایی، به‌طور کامل با آب مقطر شستشو داده و سپس با ۱۰ حجم (V/W) محلول استیک اسید ۰/۵ مولار حاوی پیپسین گاوی، با نسبت ۱ به ۱۰۰ (W/W) آنزیم/سوبستر، به‌مدت سه روز، به‌هم زده شد. آن‌گاه مخلوط حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در دور ۹۰۰۰ g سانتریفوژ شد. کلاژن حل شده در پیپسین (PSC) موجود در سوپرناتانت، در محلول نمک NaCl به غلظت نهایی ۰/۸ مولار، قرار داده شد. رسوب نهایی حاصل از این مرحله، با استفاده از سانتریفوژ سرعت پایین، جمع‌آوری شده و در محلول استیک اسید ۰/۵ مولار حل شد. این محلول در مجاورت محلول ۰/۰۲ مولار Na_2HPO_4 (pH=۸) دیالیز گردید. بعد از چندین بار تعویض محلول Na_2HPO_4 ۰/۰۲ مولار، رسوب حاصل به‌وسیله سانتریفوژ سرعت پایین جمع‌آوری شد. این رسوب در مجاورت اسید استیک ۰/۰۱ مولار به‌مدت ۲ روز دیالیز شده و سپس رسوب حاصل از آن در شرایط خلاء خشک گردید و تا انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین نوع و ساختار پروتئین کلاژن (PSC) با استفاده از روش

SDS-PAGE: آزمون SDS-PAGE طبق روش Laemmli (۱۹۷۰) با اندکی تغییر انجام گرفت. غلظت‌های ۰/۴٪ و ۰/۵٪ برای ژل stacking (بالا) و ۰/۷/۵٪ و ۰/۹٪ و ۰/۱۲٪ و ۰/۱۵٪ برای ژل separating (پایین)، مورد آزمون قرار گرفت. ولتاژ جریان مورد استفاده ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۲۰ ولت و مدت زمان الکتروفورز نمونه ۲/۵ و ۳/۵ ساعت، برای به‌دست آوردن شرایط بهینه انجام الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. رقت بافرهای مورد استفاده نیز برای بافر تانک الکتروفورز ۱X و بافر نمونه ۲X بوده است. نمونه‌های کلاژن با غلظت ۱ mg/ml میلی‌گرم/میلی‌لیتر، در محلول Na_3PO_4 ۰/۱ مولار (PH=7.2) جهت تزریق نمونه به‌درون چاهک‌های ژل الکتروفورز تهیه گردید و پس از آن با بافر نمونه (Laemmli، ۱۹۷۰) مخلوط شد. آن‌گاه نمونه‌ها در دو حالت، حضور بتا مرکپتواتانول (β -ME) و عدم حضور آن، به‌درون چاهک‌های ژل تزریق گردید. مارکر پروتئینی با دامنه گسترده وزن مولکولی (۱۱-۲۳۵ کیلودالتون)

بازوهای دهانی (T)- بهترین نتیجه مربوط به بافت درخت تنفسی و روده نمونه‌های زنده در آکواریوم بوده است (شکل ۵).

استفاده از این روش، از بین دو نوع نمونه- نمونه‌های زنده در آکواریوم (HL1,2) و نمونه‌های فیکس شده در الکل اتانول مطلق (HL3,4)- و چهار بافت مورد بررسی- ماهیچه (M)، روده (I)، درخت تنفسی (Bt)،



(ب)



(الف)

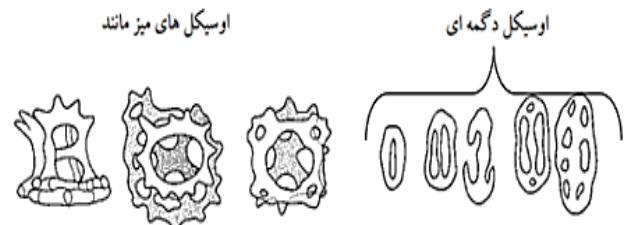
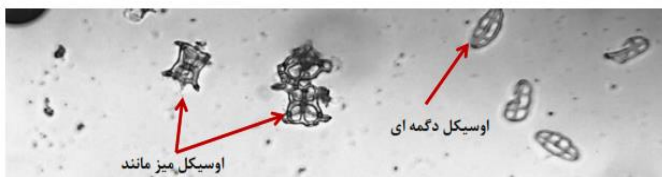
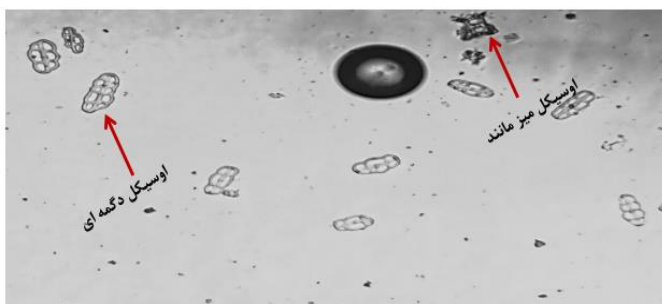


(د)



(ج)

شکل ۲: ویژگی‌های مورفولوژیک خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*: الف) انتهای جلویی باریک‌تر از انتهای عقبی؛ ب) *Podia* فراوان در سطح شکمی؛ ج) موقعیت شکمی دهان با تنتاکل‌های دهانی سیاه رنگ؛ د) اندام رشته‌ای *Cuvierian* با رشته‌های بلند و باریک سفید رنگ



spicules of tegument

شکل ۳: اوسیکل‌های موجود در پوشش بدن (برگرفته از Conand, ۱۹۹۸)

(۱۹۹۸)

شکل ۴: اوسیکل‌های استخراج شده از دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* در منطقه اولی- پوشهر



قطعات ژنوم میتوکندریایی و تعیین توالی این قطعات، نتیجه تعیین توالی به دو شکل کروماتوگرام و FASTA دریافت گردید. پس از بررسی کروماتوگرام هر نمونه به وسیله نرم افزار Chromass و حذف توالی‌های اشتباه، ترادف نوکلئوتیدی آن استخراج و در نهایت یک توالی ۳۹۹ نوکلئوتیدی برای این گونه برای اولین بار از خلیج فارس مشخص شد. توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با دریافت شماره دسترسی آن (جدول ۳) در پایگاه داده‌های NCBI ثبت گردید و چون توالی‌ای از این گونه از آب‌های خلیج فارس در بانک ژنی یافت نشد لذا مقایسه آن با نمونه‌های این گونه در سایر نقاط جهان طبق نتایج Blast، صورت گرفت. نتیجه مقایسه توالی مورد نظر با سایر توالی‌های مشابه همین گونه و گونه‌های دیگر این جنس در سایر نقاط دنیا، با استفاده از نرم افزار آنالین Blast، مشابهت بالا با گونه‌های جنس *Holothuria* را نشان داد و بالاترین مشابهت نیز با گونه *Holothuria leucospilota* مشاهده شد.

جدول ۳: شماره دسترسی توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژنوم

۱۶SrRNA تکثیر شده خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*

نام گونه خیار دریایی	شماره دسترسی در پایگاه داده‌های NCBI
<i>Holothuria leucospilota</i>	LC270133.1

بررسی روابط فیلوژنتیک گونه مورد بررسی: از آنجایی که هیچ توالی‌ای از این گونه خیار دریایی در خلیج فارس، تاکنون در بانک ژنی ثبت نشده است و مطالعه حاضر، اولین مورد از بررسی در این زمینه است، لذا از توالی ژنی همین گونه و نیز توالی تعدادی از گونه‌های جنس *Holothuria* ثبت شده در بانک ژنی از سایر نقاط دنیا، جهت آنالیزهای فیلوژنتیک استفاده گردید که شماره دسترسی و زیستگاه جغرافیایی آن‌ها در جدول ۴ ذکر شده است. هم‌چنین گونه *Bohadschia argus* به‌عنوان برون گروه مد نظر قرار داده شد.

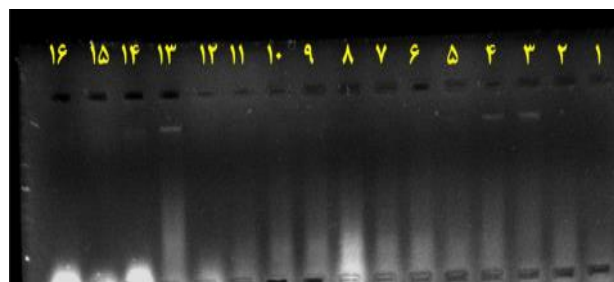
جدول ۴: توالی ژنی تعدادی از گونه‌های جنس *Holothuria*

استخراج شده از بانک ژن

نام گونه	شماره دسترسی	منطقه جغرافیایی
<i>Holothuria leucospilota</i>	KY986423	Malasia
<i>Holothuria leucospilota</i>	EU822444	Australia
<i>Holothuria leucospilota</i>	FJ589211	China
<i>Holothuria leucospilota</i>	JN207541	Mexico
<i>Holothuria hilla</i>	JN207515	Mexico
<i>Holothuria arguinensis</i>	GU797646	Spain
<i>Holothuria dakarensis</i>	EU191979	Spain
<i>Holothuria mammata</i>	GU797569	Spain
<i>Holothuria polii</i>	EU750781	Spain
<i>Holothuria kefersteini</i>	EU220801	Florida(USA)
<i>Holothuria tubulosa</i>	KJ812176	Portugal
<i>Bohadschia argus</i>	FJ589210	China

بررسی پارامترهای فیلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی

ژن ۱۶SrRNA: بعد از هم‌ردیفی توالی‌های مورد بررسی، بخشی از ژن

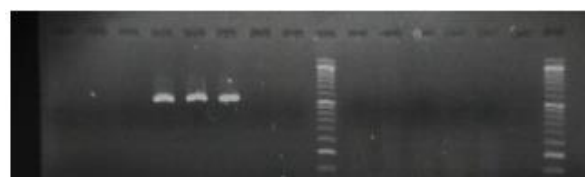


شکل ۵: الگوی حرکتی DNA روی ژل آگارز ۱٪. شماره ۳، HL1-I؛

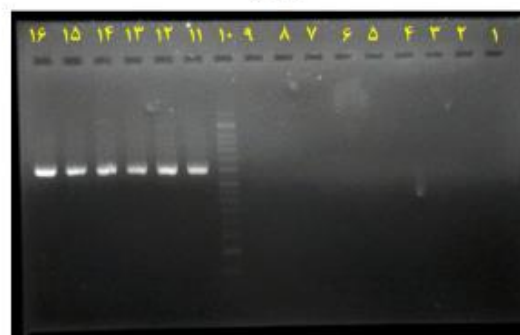
شماره ۴، HL1-Bt؛ شماره ۱۳، HL2-I؛ شماره ۱۴، HL2-Bt

تکثیر و تعیین توالی بخشی از ۱۶SrRNA: بهینه‌سازی

واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه مذکور با استفاده از گرادیانت دمایی نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال زوج پرایمر HL-F /HL-R در محدوده ۵۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت بهینه الگو نیز حدود ۲۵۰ نانوگرم بود. پرایمرهای فوق، امکان تکثیر بخشی از ناحیه ۱۶SrRNA با طول تقریبی ۶۰۰ bp را در دمای ۵۷ تا ۵۹ درجه سانتی‌گراد، فراهم می‌کنند (شکل ۶-الف). الگوی حرکتی محصول PCR فوق، روی ژل آگارز ۱٪ مطابق انتظار بود. همان‌طور نشان داده شده است در دمای ۵۷ و ۵۸ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد، قطعه مورد نظر در نمونه‌های مورد بررسی با موفقیت تکثیر شده است که محصول به دست آمده نیز جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۶-ب).



(الف)



(ب)

شکل ۶: الف) بهینه‌سازی دما جهت اتصال جفت پرایمر؛ ب) الگوی

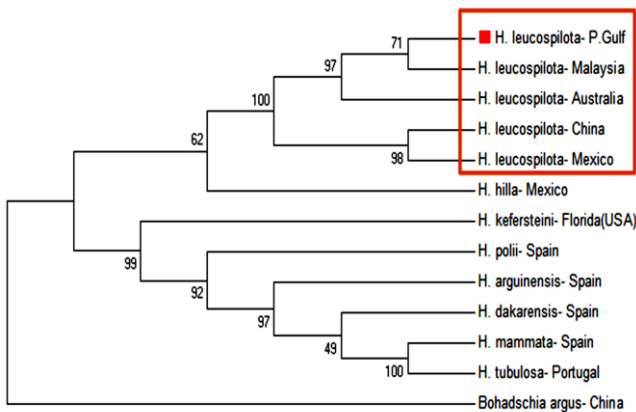
حرکتی محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪

بررسی تشابه توالی تعیین شده DNA مورد بررسی، با توالی

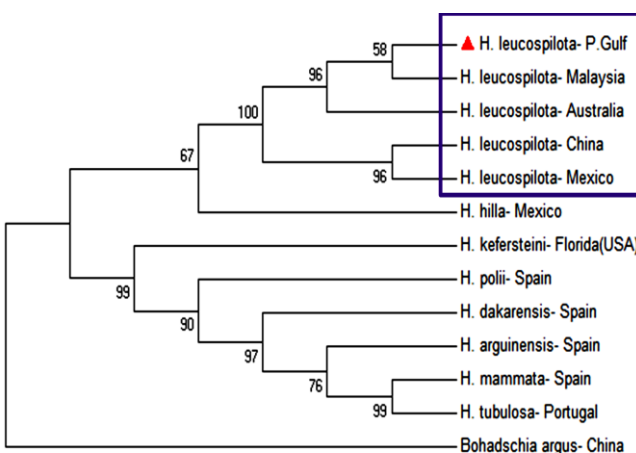
سایر گونه‌های خیار دریایی ثبت شده در بانک ژنی: پس از تکثیر



فاصله ژنتیکی میان توالی نوکلئوتیدی حاصل از این تحقیق با تعدادی از اعضای همین گونه در سایر نقاط جهان و تعدادی از گونه‌های دیگر جنس *Holothuria* (شکل ۹)، با استفاده از مدل Tamura 3-parameter محاسبه شد. نتایج موجود در شکل ۹ نشان داد که کمترین فاصله ژنتیکی بین *H. leucospilota* از خلیج فارس - گونه مورد بررسی در این تحقیق - با همین گونه از مالزی و استرالیا و نیز بین *H. leucospilota* از مکزیک با همین گونه از چین دیده شد که همگی معادل با ۰/۰۰۲۷ بوده است. بیشترین فاصله ژنتیکی نیز بین *Bohadschia argus* از چین با *H. mamata* از اسپانیا به میزان ۰/۲۷۹ دیده شد. نتایج حاصل از بررسی فاصله ژنتیکی نیز تاییدی بر نتایج آنالیزهای فیلوژنتیک به دست آمده در این مطالعه بوده است.



شکل ۷: درخت فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز Mximum likelihood



شکل ۸: درخت فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز Neighbor-Joining

آنالیز تقریبی برخی ترکیبات تشکیل دهنده دیواره بدن:

نتایج به دست آمده در بررسی این بخش از پژوهش، نشان داد که رطوبت و پروتئین بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothurur leucospilota* است. لازم به ذکر است که در

۱۶SrRNA، شامل حدود ۳۹۹ نوکلئوتید که در تمام نمونه‌ها مشترک بود، انتخاب گردید و جهت هم‌ردیفی نهایی مورد توجه قرار گرفت. نتایج هم‌ردیفی نشان داد که در مجموع ۳۹۱ جایگاه وجود دارد، که از بین آن‌ها، ۲۵۲ جایگاه حفاظت شده و ۱۲۶ جایگاه متغیر وجود دارد که ۸۳ جایگاه دارای اطلاعات فیلوژنتیکی در شرایط پارسیمونی، و ۴۳ جایگاه نیز سینگلتون است. بررسی ترکیب نوکلئوتیدی نیز نشان داد که ابتدا آدنین (A) و سپس سیتوزین (C)، بیشترین تعداد نوکلئوتید تشکیل دهنده این توالی هستند (جدول ۵). در ادامه آنالیزها، درخت فیلوژنتیک نیز بر اساس آنالیز Neighbor-Joining (NJ) و Mximum likelihood (ML) رسم گردید (اشکال ۷ و ۸). در درخت رسم شده بر اساس آنالیز Mximum likelihood، تمامی توالی‌های مربوط به گونه *H. leucospilota* از اقیانوس هند و آرام، در یک کلاد با ارزش بوت استرپ بالا (ML=۱۰۰) قرار گرفتند و با گونه *H. hilla* با ارزش بوت استرپ نسبتاً بالا (ML=۶۲ و NJ=۶۷) به عنوان گونه خواهری در یک کلاد قرار گرفتند. گونه *H. leucospilota* مورد بررسی در این تحقیق با همین گونه از مالزی با ارزش بوت استرپ بالا (ML=۷۱)، در یک کلاد قرار گرفتند که این نشان دهنده قرابت ژنتیکی بیش‌تر این گونه از خلیج فارس با همین گونه از آب‌های هند-آرام است. در حالی که افراد گونه‌های دیگر جنس *Holothuria* از اقیانوس اطلس در یک کلاد با ارزش بوت استرپ بالا (ML=۹۹)، قرار گرفتند (شکل ۷). همان‌طور که در شکل ۸ نشان داده شده است، نتایج به دست آمده از درخت رسم شده بر اساس آنالیز Neighbor-Joining، نیز مشابه با نتایج حاصل از آنالیز Mximum likelihood بوده و این نتایج را تایید نمود.

جدول ۵: ترکیب نوکلئوتیدی در نمونه‌های حاصل از این تحقیق و سایر گونه‌های مشابه

سایر گونه‌های مشابه				
G	A	C	T(U)	
۲۲	۳۰	۲۴/۹	۲۳/۱	<i>H. leucospilota</i> - P. Gulf
۲۲	۳۰	۲۵/۲	۲۲/۸	<i>H. leucospilota</i> - Malasia
۲۲/۳	۲۹/۷	۲۴/۷	۲۳/۳	<i>H. leucospilota</i> - Australia
۲۱/۵	۳۰/۵	۲۴/۴	۲۳/۶	<i>H. leucospilota</i> - China
۲۱/۵	۳۰/۲	۲۴/۴	۲۳/۹	<i>H. leucospilota</i> - Mexico
۲۲/۳	۳۰/۸	۲۵/۵	۲۱/۵	<i>H. hilla</i> - Mexico
۲۲/۴	۲۸/۶	۲۴/۱	۲۴/۹	<i>H. arguinensis</i> - Spain
۲۱/۸	۲۹...	۲۴/۲	۲۵	<i>H. dakarensis</i> - Spain
۲۲/۴	۲۸/۶	۲۵/۷	۲۳/۲	<i>H. mamata</i> - Spain
۲۱/۶	۳۰	۲۳/۲	۲۵/۱	<i>H. polii</i> - Spain
۲۱	۳۰/۳	۲۳/۹	۲۴/۷	<i>H. kefersteini</i> - Florida (USA)
۲۲/۴	۲۸/۶	۲۵/۴	۲۳/۵	<i>H. tubulosa</i> - Portugal
۲۲/۸	۳۴	۲۳	۲۰/۲	<i>Bohadschia argus</i> - China
۲۲	۳۰/۱	۲۴/۵	۲۳/۴	میانگین



پروتئین و رطوبت در گونه مورد بررسی در این پژوهش بیش تر از دو گونه *Holothuria parva* و *Holothuria arenicola* است. در مورد مقادیر خاکستر نیز، گونه مورد بررسی در مطالعه حاضر، میزان خاکستر بیش تری از گونه *H. arenicola* و کم تر از گونه *H. parva* داشته است.

بررسی میزان رطوبت بافت دیواره بدن موجود، از نمونه های تازه و در بررسی سایر موارد، از نمونه های خشک شده در آون استفاده گردید. مقادیر به دست آمده از ترکیبات به صورت درصد در مقایسه با مطالعات انجام شده بر روی سایر گونه های خیار دریایی در آب های کشور در جدول ۶ آورده شده است. همان طور که مشهود است، مقادیر چربی،

شکل ۹: فاصله ژنتیکی محاسبه شده بین گونه مورد بررسی در این تحقیق، و تعدادی از اعضای همین گونه در سایر نقاط جهان

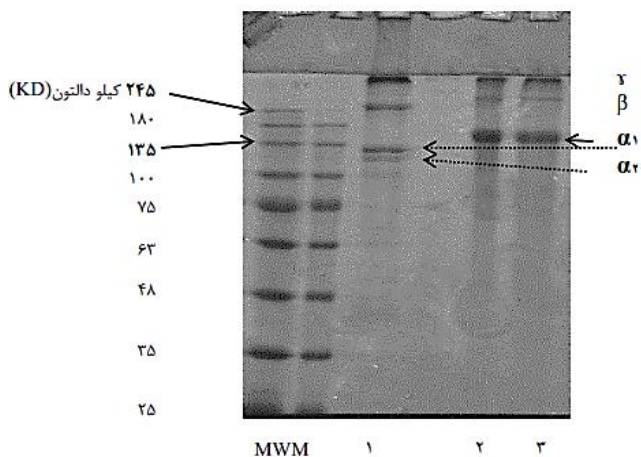
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	H. leucospilota- P.Gulf											
2	H. leucospilota- Malaysia	0.00275										
3	H. leucospilota- Australia	0.00275	0.00551									
4	H. leucospilota- China	0.01671	0.01956	0.01956								
5	H. leucospilota- Mexico	0.01667	0.01951	0.01951	0.00275							
6	H. hilla- Mexico	0.10991	0.11321	0.11321	0.11321	0.11635						
7	H. arguinensis- Spain	0.16030	0.16390	0.16390	0.17855	0.17822	0.17706					
8	H. dakarensis- Spain	0.17087	0.17453	0.17453	0.17453	0.17423	0.16646	0.03377				
9	H. mammata- Spain	0.17822	0.18194	0.18194	0.19709	0.19671	0.17681	0.03980	0.05443			
10	H. polii- Spain	0.16483	0.16849	0.16849	0.17590	0.17553	0.16336	0.05759	0.06948	0.09207		
11	H. kefersteini- Florida(USA)	0.16419	0.16783	0.16058	0.16419	0.16752	0.15272	0.11572	0.11482	0.12575	0.08559	
12	H. tubulosa- Portugal	0.18194	0.18568	0.18568	0.20095	0.20055	0.18046	0.03100	0.04545	0.00829	0.08239	0.11540
13	Bohadschia argus- China	0.25739	0.26147	0.26147	0.25739	0.26117	0.21643	0.27126	0.26746	0.27936	0.25496	0.27509

جدول ۶: درصد ترکیبات تشکیل دهنده دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* (تحقیق حاضر) در مقایسه با سایر گونه های بررسی شده در آب های داخلی کشور

نام گونه	رطوبت (%)	چربی (%)	پروتئین (%)	خاکستر (%)	منبع
<i>Holothuria leucospilota</i>	۸۶/۷۷ ± ۰/۱۵۰	۵/۷۱۲ ± ۱/۴۰۲	۷۹/۰۸۶ ± ۰/۴۲۹	۱۵/۳۱ ± ۰/۴۰۲	(تحقیق حاضر)
<i>Holothuria parva</i>	۶۷/۹۲ ± ۳/۸۱	۲/۴۳ ± ۰/۵۳	۱۷/۶۱ ± ۰/۹۵	۳۲/۷۴ ± ۱/۱۷	Salarzadeh و همکاران، (۲۰۱۲)
<i>Holothuria arenicola</i>	۶۹/۴۹ ± ۳/۰۹	۲/۸۸ ± ۰/۴۷	۲۴/۳۷ ± ۱/۹۳	۱۰/۸۶ ± ۰/۴۰	Salarzadeh و همکاران، (۲۰۱۲)

مقایسه ساختار کلاژن خیار دریایی گونه *Holothuria*

leucospilota با کلاژن نوع (I) مهره داران: نتایج این بررسی نشان داد که بخش عمده کلاژن استخراجی، وزن مولکولی در حدود ۱۴۰ kDa داشته که این وزن مولکولی، تقریباً مشابه کلاژن نوع I پوست گوساله (نانو زیست آرایه) با وزن مولکولی تقریبی ۱۳۵ kD می باشد و مقایسه الگوی باند SDS-PAGE در نمونه خیار دریایی و نمونه کلاژن نوع I پوست گوساله، نشان داد که که قسمت عمده هر دو پروتئین کلاژن، از زنجیره α₁ با وزن تقریبی ۱۳۵-۱۴۰ kDa و مقدار جزئی β دایمر و γ تراپمر، با وزن مولکولی ۲۵۰ kDa و بالاتر، تشکیل شده است (شکل ۱۰). تفاوت ساختاری این دو نمونه پروتئین کلاژن در زنجیره α نمونه ها دیده شد. به این صورت که، در کلاژن نوع I استخراج شده از خیار دریایی، ساختار مارپیچ سه تایی کلاژن به صورت هموترایمر و از سه زنجیره α₁ تشکیل شده است در حالی که، در کلاژن نوع I مهره داران (کلاژن گاوی) ساختار به صورت هتروترایمر و از دو زنجیره α₁ و یک زنجیره α_۲ تشکیل گردیده است (جدول ۷).



شکل ۱۰: مقایسه الگوی باند SDS-PAGE در نمونه کلاژن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* و نمونه کلاژن نوع I پوست گوساله. MW، مارکر وزن مولکولی (سمت چپ: وزن مولکولی طیف گسترده؛ سمت راست: وزن مولکولی پایین); ۱، کلاژن نوع I پوست گوساله؛ ۲، نمونه کلاژن خیار دریایی گونه

Holothuria leucospilota



جدول ۷: مقایسه تعداد و نوع زیر واحدهای تشکیل دهنده پروتئین کلاژن نوع I خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* و کلاژن نوع I پستانداران

الگوی زنجیره سه تایی	الگوی زنجیره سه تایی مولکول
مولکول کلاژن نوع (I)	کلاژن نوع (I) خیار دریایی گونه
پوست گوساله	<i>Holothuria leucospilota</i>
$(\alpha_1(I))_2 \alpha_2(I)$	$(\alpha_1(I))_7$

بحث

شناسایی گونه: گونه *Holothuria leucospilota* گونه‌ای فرصت طلب، که در آب‌های منطقه هند-آرام به خوبی پراکنش یافته است. این گونه از آب‌های جزایر اقیانوس هند غربی، شرق آفریقا، جزایر ماداگاسکار، جنوب شرق عربستان، خلیج فارس، غرب هند، پاکستان، مالدیو، سریلانکا، خلیج بنگال، شرق هندوستان، شمال استرالیا، جزایر فیلیپین، اندونزی، چین، ژاپن، جزایر آرام جنوبی و جزایر هاوایی، گزارش شده است (Brandt, ۱۸۳۵). پراکندگی خیارهای دریایی همانند سایر بی‌مهرگان دریایی در طول دوره لآوری آن‌ها صورت می‌پذیرد. نوع دوره رشد و نمو و نوع لارو، پراکنش گونه‌ای را تحت تاثیر قرار می‌دهد. لاروها می‌توانند پلانکتوتروف باشند یعنی از پلانکتون‌ها تغذیه کنند و یا لسیتوتروف باشند یعنی از ذخیره زرده تخم تغذیه کنند. تعداد بسیار کمی از انواع خیارهای دریایی (Dendrochirotida) جز دسته دوم هستند و در واقع اکثر آن‌ها (Apodida and Aspidochirotida) لاروهای پلانکتوتروف دارند که توان پراکنش جغرافیایی بالاتر در مسافت‌های طولانی، نسبت به انواع لسیتوتروف دارند (Michonneau و همکاران، ۲۰۱۵). همان‌طور که Titterton و Whately (۲۰۰۶) در تحقیقات خود، در مورد پراکنش لاروهای پلانکتوتروف استراکودا در آب‌های منطقه هند-آرام، عنوان نمودند، مکانیسم‌های مختلفی برای مهاجرت پلانکتون‌ها در مسافت‌های طولانی وجود دارد که احتمالاً فاکتور اصلی موثر در این مورد جریان‌های اقیانوسی منفعل، می‌باشند. با توجه به این‌که گونه مورد بررسی در تحقیق حاضر، جزء راسته Aspidochirotida بوده و دارای لارو پلانکتوتروف می‌باشد و نیز با توجه به مرتبط شدن آب‌های خلیج فارس با اقیانوس هند و منطقه هند-آرام، از طریق دریای عمان، می‌توان گفت که احتمالاً جریان‌های اقیانوسی در پراکنش گونه مزبور و به دنبال آن نزدیکی ژنتیکی آن با همین گونه در منطقه هند-آرام، نقش داشته است. لذا هم کلاژن بودن آن با گونه موجود در آب‌های مالزی و استرالیا منطقی می‌باشد. در تحقیقی که به‌طور کلی ۱۷ گونه از ۵۰ گونه ثبت شده از خیارهای دریایی مالزی در بانک جهانی ژنی (NCBI) در آنالیزهای فیلوژنتیک

لحاظ شده است. در مطالعه صورت گرفته توسط Kamarudin و همکاران (۲۰۱۰) در آب‌های مالزی بر روی فیلوژنی خیارهای دریایی از طریق بررسی توالی ۱۶SrRNA، ۵۰۳ جایگاه از بازهای هم‌تراز شده، با در نظر گرفتن GAPهای احتمالی، برای ایجاد درخت‌های فیلوژنتیک مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز Maximum parsimony (MP) نشان داد که ۲۰۵ جایگاه ثابت، ۷۶ جایگاه متغیر و parsimony informative و ۲۲۲ جایگاه parsimony informative بودند. هم‌چنین در مطالعه آنان، گونه *Holothuria leucospilota* از منطقه مورد بررسی با هم گونه خود از منطقه نامعلوم که توالی آن از بانک ژنی استخراج شده بود، با هم در یک کلاژ با ارزش بوت استراپ بالا (ML=100 و NJ=100) قرار گرفتند و با گونه *H. hilla* از منطقه مورد بررسی، با ارزش بوت استراپ بالا (ML=83 و Nj=95) به‌عنوان گونه خواهری در یک کلاژ قرار گرفتند که این نشان‌دهنده روابط ژنتیکی نزدیک آن‌ها است. در بررسی میانگین فاصله ژنتیکی نیز، فاصله گونه‌های *H. leucospilota* با هم بسیار کم و به اندازه ۰/۰۰۲۱۴ بوده است. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نیز، مشابه با نتایج تحقیق ذکر شده در آب‌های مالزی بوده است. هم‌چنین در مطالعات Kamarudin و همکاران (۲۰۱۱) در آب‌های مالزی بر روی فیلوژنی گونه *H. leucospilota* بر اساس توالی COI، نشان داده شد که در رسم درخت فیلوژنی NJ، تمام نمونه‌های گونه مذکور، با یکدیگر در یک خوشه (کلاژ) با ارزش بوت استراپ بالا (NJ=100) قرار گرفتند که این نشان‌دهنده مونوفیلیتیک بودن آن‌ها بوده است و هم‌چنین کلاژ مونوفیلیتیک نمونه‌های *H. leucospilota* با گونه *H. coluber* با ارزش بوت استراپ بالا (NJ=73) با هم در یک خوشه قرار گرفتند که این نشان‌دهنده روابط ژنتیکی نزدیک آن‌ها است. هم‌چنین میانگین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های *H. leucospilota* در تحقیقات آن‌ها، بسیار کم (=۰/۰۱۳) بوده است که فاصله ژنتیکی بسیار کم بین نمونه‌ها نشان‌دهنده منشاء گرفتن آن‌ها از یک گونه است. این نتایج با هم تاییدی بر نتایج به‌دست آمده از درخت فیلوژنی NJ با ارزش بوت استراپ بالا (=۱۰۰) است. هم‌چنین در مطالعه آنان، در رسم درخت فیلوژنی ML نیز نمونه‌های *H. leucospilota* با هم در یک کلاژ با ارزش بوت استراپ بالا (=۱۰۰) قرار گرفتند که این یافته نیز، تاییدی بر مونوفیلیتیک بودن گونه مذکور است و این‌که کلاژ مونوفیلیتیک خودش را دارد که به‌طور واضح از دیگر گونه‌ها متمایز می‌شود. در ادامه بررسی‌های آنان، نتایج MP، ۱۴۹ جایگاه ثابت، ۲۴ جایگاه متغیر و parsimony uninformative و ۳۲۱ جایگاه هم parsimony informative بودند. نتایج تحقیق حاضر نیز در قیاس با تحقیقات سایر دانشمندان، به‌ویژه در آب‌های مالزی، نشان‌دهنده مونوفیلیتیک بودن گونه *H. leucospilota* بوده و فاصله کم ژنتیکی (۰/۰۰۲۷) بین این گونه از خلیج فارس با نمونه‌های آن در مالزی و



با توجه به میزان رطوبت، ارتقاء می یابد. Jing و همکاران (۲۰۱۰) در مقایسه بین مطالعات مختلف عنوان نمودند که با کاهش مقادیر رطوبت، افزایش در مقادیر پروتئین محاسبه شده دیده شده است. با توجه به این که نمونه‌های بافت دیواره بدن، مورد استفاده جهت سنجش میزان پروتئین در گونه خیار دریایی مورد تحقیق حاضر، به صورت خشک شده در آن بوده است، لذا مقادیر به دست آمده از پروتئین در تحقیق حاضر (۷۹/۸۶ درصد)، مشابه با تحقیقاتی بوده است که نمونه‌ها به صورت خشک شده جهت سنجش مقدار پروتئین مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در تحقیقات Bilgin و Tanrikalu (۲۰۱۸) بر روی بافت تازه دیواره بدن نمونه *H. tubulosa* تحت شرایط مختلف دمایی، مقادیر چربی کم‌تر از ۱ درصد (۰/۱۰-۱۹۱/۸۷۳ درصد) محاسبه گردید که در نمونه‌های خشک شده در آن مقدار ۰/۷۵۸ درصد تخمین زده شد. هم‌چنین Ozer و همکاران (۲۰۰۴) مقادیر چربی را در گونه *H. Scabra* در ماه‌های مختلف، ۰/۳۷-۰/۱۷ درصد تخمین زدند. در تحقیقات Cakli و همکاران (۲۰۰۴) در مورد گونه *H. tubulosa* در نمونه‌های تازه مقادیر چربی ۰/۱۶ درصد و در نمونه‌های خشک شده ۰/۶۰ درصد بیان شد. Lee و همکاران (۱۹۸۹) مقادیر چربی را در همین گونه، در نمونه‌های تازه ۰/۳ درصد و در نمونه‌های خشک شده ۲-۳ درصد عنوان نمودند. Bechtel و همکاران (۲۰۱۳) در آلاسکا نیز در مورد گونه *Parastichopus californicus* مقادیر ۸ درصد چربی را در بافت دیواره بدن (خشک شده با Freez dryer) محاسبه نمودند. Bilgin و Izci (۲۰۱۶) در تحقیقات خود دریافتند که مقادیر چربی در گونه *H. Forskali* به طور چشمگیری در نمونه‌های خشک شده افزایش می‌یابد. همان‌طور که Bilgin و Tanrikalu (۲۰۱۸) در تحقیق خود عنوان داشتند، تفاوت‌ها در مقادیر چربی (خام) ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط فرآوری، زمان جمع‌آوری نمونه در طول سال و هم‌چنین تفاوت گونه‌ای باشد. مقادیر به دست آمده چربی در گونه *H. leucospilota* در تحقیق حاضر، در نمونه‌های خشک شده مورد بررسی ۴ درصد به دست آمد که این اختلاف ممکن است به دلیل روش فرآوری شرایط تغذیه‌ای و فصل جمع‌آوری و نیز اختلاف گونه‌ای باشد. مقادیر خاکستر در نمونه‌های خشک مورد بررسی در این تحقیق ۱۵ درصد محاسبه گردید. در مطالعات Bilgin و Tanrikalu (۲۰۱۸) مقدار خاکستر در نمونه‌های خشک شده در آن ۳۰/۳۰ درصد و در نمونه‌های تازه ۰/۷۲ درصد گزارش شد. در تحقیقات Wen و همکاران (۲۰۱۰) نیز نتایج مشابهی در نمونه‌های خشک شده گونه *H. fuscogilva* (۲۶/۴ درصد) و *H. fuscopunctata* (۳۹/۶ درصد) گزارش گردید. Ozer و همکاران (۲۰۰۴) اعلام نمودند که مقدار خاکستر در نمونه‌های *H. Scabra* در ماه‌های مختلف سال از ۴/۶۸ تا ۱۱/۰۶ درصد متغییر بوده است. با توجه به مطالعات محققان مختلف، احتمالاً تفاوت و تغییرات در مقدار خاکستر، با توجه

استرالیا، قرابت ژنتیکی آن‌ها و منشاء گرفتن آنان از یک گونه را نشان می‌دهد. هم‌چنین در تحقیق حاضر مشابه با نتایج Kamarudin و همکاران (۲۰۱۰) گونه *H. hilla* با ارزش بوت استراپ بالا (ML=62, NJ=67) به عنوان گونه خواهری در یک خوشه قرار گرفتند.

آنالیز تقریبی ترکیبات دیواره بدن: طبق مطالعات Jing و همکاران (۲۰۱۰) در کشور چین که بر روی کیفیت غذایی و ترکیبات شیمیایی بدن نمونه‌های خشک ۸ گونه خیار دریایی، که جهت استفاده خوراکی رایج بودند، صورت گرفت، نتایج به دست آمده از مقادیر پروتئین ۷/۳-۶۳/۰ درصد، چربی ۱/۱-۰/۳ درصد، خاکستر ۳۶/۶-۱۵/۴ درصد، عنوان شد. میزان رطوبت نیز ۱۳-۱/۲ درصد تخمین زده شد. در نتایج به دست آمده از تحقیقات Ozer و همکاران (۲۰۰۴) در کشور ترکیه که بر روی بررسی ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده بدن گونه *H. Scabra* صورت گرفت، نیز مقادیر پروتئین ۶۰/۲-۳۹/۸ درصد، چربی ۲/۴-۱/۲٪، خاکستر ۴/۵-۱۷/۹ درصد در نمونه‌های خشک فرآوری شده تخمین زده شد. هم‌چنین میزان رطوبت در نمونه‌های تازه ۸۷/۲۱-۸۴/۵۴ درصد محاسبه گردید. به طور مشابه Adyin و همکاران (۲۰۱۱) در کشور ترکیه نیز در مورد میزان رطوبت در نمونه‌های تازه *H. tubulosa* نتایج مشابهی (۸۴/۳۰ درصد) را بیان کردند. نتایج به دست آمده از بررسی میزان رطوبت در گونه *H. leucospilota* در تحقیق حاضر نیز مشابه با نتایج Adyin و همکاران (۲۰۱۱) و Ozer و همکاران (۲۰۰۴) بوده ولی با نتایج Jing و همکاران (۲۰۱۰) متفاوت بود. Bilgin و Izci (۲۰۱۶) در ترکیه در تحقیقات خود در مورد گونه *H. Forskali* بیان کردند، میزان رطوبت در نمونه‌های خشک شده (۱۰/۳۳ درصد) نسبت به نمونه‌های تازه (۸۶/۹۳ درصد) کم‌تر بوده است. از آنجایی که نمونه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر جهت سنجش میزان رطوبت، به صورت تازه بوده است لذا مقادیر به دست آمده نزدیک به نتایج سایر تحقیقاتی است که بر روی نمونه‌های تازه صورت گرفته است. مقادیر به دست آمده از پروتئین در تحقیق حاضر، مشابه با نتایج به دست آمده از تحقیقات Jing و همکاران (۲۰۱۰) و Cakli و همکاران (۲۰۰۴) و Bilgin و Tanrikalu (۲۰۱۸) بوده است. Bilgin و Tanrikalu (۲۰۱۸) مقادیر پروتئین در نمونه‌های خشک شده با آن را معادل با ۶۰/۹۵ درصد و در نمونه‌های تازه را معادل با ۱۲/۳۰ درصد عنوان نمودند. Cakli و همکاران (۲۰۰۴) در ترکیه نیز مقادیر پروتئین در نمونه‌های تازه را معادل با ۸/۱۸ درصد، ۱۵ درصد در نمونه‌های جوشانده شده و ۶۶/۴۵ درصد در نمونه‌های کاملاً خشک شده بیان نمودند. Jing و همکاران (۲۰۱۰) نیز مقادیر پروتئین در نمونه‌های خشک شده ۸ گونه مورد بررسی را ۶۳/۳-۴۰/۷ درصد عنوان نمودند. Telahigue و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که مقادیر پروتئین کل در دیواره بدن گونه *H. Forskali* در نمونه‌های خشک شده در دماهای مختلف و نیز



می‌باشد. Montero و همکاران (۱۹۹۰) در تحقیقی مشابه بر روی hake و trout نیز نتایج مشابهی را عنوان نمودند. این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده برای کلاژن پوست (Ciarlo و همکاران، ۱۹۹۷)، Ogawa Black drum (Muyonga و همکاران، ۲۰۰۴)، و همکاران، Ogawa Sheephead sea bream (۲۰۰۳)، و همکاران، Snapper Big eye (Kittiphattanabawon و همکاران، ۲۰۰۵) بوده است. همچنین آن‌ها ترکیبات با وزن مولکولی بالا شامل β و γ را به عنوان مولکول‌های با اتصالات عرضی، نیز مشاهده نمودند. حضور مولکول‌های با وزن مولکولی بالا و با اتصالات عرضی در کلاژن، با سن جاندار (Foegeding و همکاران، ۱۹۹۶) افزایش می‌یابد و همچنین ماهیانی که در دوره‌های قطعی و گرسنگی هستند، در مقایسه با افرادی که به خوبی تغذیه کرده‌اند، دارای مقادیر بیش‌تری از کلاژن دارای اتصالات عرضی هستند (Sikorski و همکاران، ۱۹۹۰؛ Love و همکاران، ۱۹۷۶). کلاژن نوع I در این مهره‌داران مورد مطالعات دانشمندان در سراسر دنیا، شامل دو زنجیره α_1 و یک زنجیره α_2 به عنوان اصلی‌ترین ترکیب بوده است. حضور ترکیب β ، تایید می‌کند که کلاژن بیش‌تر شامل اتصالات عرضی بین مولکولی است. حضور ترکیب γ نشان می‌دهد که سه زنجیره از کلاژن به‌طور درون مولکولی از طریق اتصالات عرضی متصل شده‌اند (Lewis و piez، ۱۹۶۴). به‌طور کلی طبق بررسی‌های مختلف انجام شده توسط محققین بر روی این پروتئین و مقایسه ساختار آن در مهره‌داران و بی‌مهرگان، دانشمندان معتقدند که ساختار زنجیره $\alpha_1(I)$ در پروتئین کلاژن نوع I بی‌مهرگان بسیار زیاد دیده می‌شود (Mizuta و همکاران، ۱۹۹۲؛ Kimura و Tanaka، ۱۹۸۳).

بررسی روش استخراج: روش‌های مختلفی برای جداسازی و تخلیص انواع و مقادیر مختلف کلاژن از بافت‌ها و گونه‌های مختلف جانداران، در طول سال‌ها مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است (روش استخراج نمکی خنثی، روش‌های استخراج اسیدی، بازی و آنزیمی) ولی روش استخراج اسیدی و آنزیمی بیش‌ترین برتری را نسبت به سایر روش‌ها داشته است (Nalinanon و همکاران، ۲۰۰۷؛ Skierka و Sadowska، ۲۰۰۷). محلول‌های اسیدی رقیق اگرچه به‌طور موثر باعث از بین رفتن ارتباط بین اتصالات عرضی بین مولکولی از نوع آلدهیدی می‌شوند، اما در مقابل اتصالات عرضی با ثبات‌تر مثل پیوندهای کتونی، غیرموثر هستند. به این منظور روش‌هایی براساس استفاده از آنزیم‌های پروتئولایتیک، برای شکستن اتصالات عرضی اضافی و انحلال/استخراج بیش‌تر کلاژن، ابداع و استفاده می‌شوند (Zeugolis و همکاران، ۲۰۰۸؛ Friess، ۱۹۹۸). اثبات شده است که به‌دست آوردن یک محلول کلاژن مونومری واقعی، نزدیک به غیرممکن است. اما در هر صورت کلاژن استخراج شده با روش هضم آنزیمی pepsin، معمولاً شامل سهم بیش‌تری از مونومر کلاژن، نسبت به روش‌های استخراج نمکی یا اسیدی است

به زمان و مکان جمع‌آوری نمونه و خشک یا تازه بودن نمونه مورد بررسی، تغییر می‌کند. هم‌چنین Oedjoe (۲۰۱۷) در تحقیق خود منتشر نمود که، با توجه به تحقیقات مختلف و بررسی‌های انجام شده بر روی مقادیر ترکیبات شیمیایی تغذیه‌ای تشکیل‌دهنده بدن خیارهای دریایی، می‌توان گفت این مقادیر از منطقه‌ای به منطقه دیگر متفاوت می‌باشد و این احتمالاً به دلیل تفاوت در فاکتورهای محیطی، فصل‌ها، مناطق مورد مطالعه، گونه‌ها و اندازه نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. هم‌چنین براساس توصیفات صورت گرفته توسط Chukwo (۲۰۰۹) ترکیبات مغذی تشکیل‌دهنده بدن خیارهای دریایی بستگی به عواملی مانند، گونه مورد بررسی، تغییرات فصلی، تغذیه جانور و نیز روش فرآوری آن دارد. در تحقیق حاضر با توجه به میزان بالای پروتئین و میزان کم چربی در بافت دیواره بدن گونه *H. leucospilota* می‌توان گفت که این گونه از لحاظ غذایی و دارویی جزء مواد با کیفیت و سالم و مناسب برای سلامتی می‌باشد.

بررسی تعیین ساختار و نوع زیرواحدهای تشکیل‌دهنده:

الگوی SDS-PAGE کلاژن حل شده با پیپسین استخراج شده از خیار دریایی جنس *Holothuria leucospilota* بیش‌تر مشابه با نتیجه گزارش شده از خیار دریایی گونه *Bohadschia spp.* از مالزی با ساختار زنجیره $\alpha_1(I)$ با وزن مولکولی ۱۳۸ kDa و مقدار جزئی دایمر β با وزن مولکولی در حدود ۲۶۰ kDa بوده است (Siddiqui و همکاران، ۲۰۱۳). هم‌چنین نتایج این بررسی، مشابه با نتایج تحقیقات انجام شده توسط Trotter و همکاران (۱۹۹۵) روی گونه *Cucumaria frondosa*، Cui و همکاران (۲۰۰۷) روی گونه *Stichopus japonicus*، Liu و همکاران (۲۰۱۰) روی گونه *Parastichopus californicus*، عطاران و همکاران (۱۳۹۵) روی گونه *Stichopus horrens* دریای عمان و Adibzadeh و همکاران (۲۰۱۴) روی گونه *Holothuria parva* دریای عمان، بوده است که در همه موارد، کلاژن مورد بررسی کلاژن نوع I تشخیص داده شده که دارای ساختار زنجیره $\alpha_1(I)$ مقدار جزئی دایمر β بوده‌اند و نیز در برخی موارد دارای مقدار بسیار کم‌تر از تراپمر γ بوده است. در مقابل، نتایج حاصل از مطالعات دانشمندان بر روی پروتئین کلاژن مهره‌داران آبی نتایج پروفایل زیر واحدهای تشکیل‌دهنده ساختار آن براساس روش SDS-PAGE، در اکثر موارد، نشان می‌دهد که زنجیره‌های α_1 و α_2 اصلی‌ترین و بیش‌ترین زیر واحدهای ساختاری تشکیل‌دهنده کلاژن استخراجی بوده که این ساختار مربوط به کلاژن نوع I می‌باشد. البته این الگوی زنجیره α_1 و α_2 بر روی ژل SDS-PAGE مشابه با کلاژن نوع I پوست گوساله به‌عنوان یکی از مهره‌داران خشکی، می‌باشد. در مطالعه کلاژن پوست دیواره بدن *browstrip red snapper*، نتایج در حضور و یا عدم حضور بتامر کپتواتانول (B-mer) یکسان بوده است که این نشان‌دهنده عدم وجود باندهای دیسولفیدی



بارگاهی و جناب آقای دکتر سیدمصطفی محمدی در بخش پژوهشکده زیست فناوری دریا، که حمایت‌های علمی‌شان را در پیشبرد این تحقیق، دریغ نمودند و هم‌چنین از جناب آقای مهندس احسان توسل‌پور در مجموعه آزمایشگاهی شاخه زیتون‌لیان به‌خاطر حمایت‌های علمی و از آقای مهندس عادل دانشی کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده زیست فناوری دریا (دانشگاه علوم پزشکی بوشهر) به‌خاطر زحمات بی‌دریغشان، که همگی امکان انجام این پژوهش را فراهم نمودند قدرانی می‌گردد.

منابع

۱. عطاران فریمان، گ.؛ طاهری، ع. و برزکار، ن.، ۱۳۹۵. ارزیابی کلاژن دیواره بدن خیار دریایی گونه *Stichopus horrens* خلیج چابهار و ژلاتین حاصل از آن. مجله فصلنامه علوم و صنایع غذایی. دوره ۵۲، شماره ۱۳، صفحات ۷۹ تا ۸۹.
۲. Abedin, M.Z.; Karim, A.A.; Ahmed, F.; Latiff, A.A.; Gan, C.Y. and Ghazali, F. C., 2013. Isolation and characterization of pepsin-solubilized collagen from the integument of sea cucumber (*Stichopus vastus*). J Sci Food Agric. Vol. 93, pp: 1083-1088.
۳. Adibzadeh, N.; Aminzadeh, S.; Jamili, S.; Karkhane, A.A. and Farrokhi, N., 2014. Purification and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from Skin of Sea Cucumber *Holothuria parva*. Appl Biochem Biotechnol. Vol. 173, No. 6, pp: 143-154.
۴. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. and Lippman, D.J., 1990. Basic local alignment search tools. Mol Biol. Vol. 215, No. 3, pp: 403-410.
۵. Amos, B. and Hoelzel, A.R., 1992. Application of Molecular Genetic Techniques to The Conservation of small populations. Biol Conserv. Vol. 61, pp: 133-144.
۶. AOAC. 1990. Official Methods of Analyses of Association of Analytical Chemists. AOAC, Washington, DC (15th edn.)
۷. Aydin, M.; Sevgili, H.; Tufan, B.; Emre, Y. and Kose, S., 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. Int J Food Sci Technol. Vol. 46, pp: 500-508.
۸. Aydin, M.; Sevgili, H.; Tufan, B.; Emre, Y. and Köse, S., 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. Int J Food Sci Technol. Vol. 46, No. 3, pp: 500-508.
۹. Bilgin, Ş. and İzci, L., 2016. The effects of drying & boiling process on nutritional components of *Holothuria forskali* (Delle Chiaje, 1823). J Food Health Sci. Vol. 2, No. 1, pp: 1-8.
۱۰. Bilgin, S. and Tanrikulu, O.H., 2018. The changes in chemical composition of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) with ambient-drying and oven-drying methods. Food Sci Nutr. Vol. 2, pp: 1-6.
۱۱. Billett, D.S.M., 1991. Deep Sea Holothurians. Oceang Mar Biol. Vol. 29, pp: 259-317.
۱۲. Birkeland, Ch., 1989. The influence of echinoderms on coral reef communities: pp: 1-79. In: Jangoux, M. and Lawrence, J.M., (eds.). 1989. *Echinoderm Studies*. Balkema, Rotterdam, Brookfield. 383 P.

(Friess, ۱۹۹۸). مقدار خلوص محلول کلاژن، در طول سال‌ها با روش‌های بسیاری با میزان پیچیدگی‌های مختلفی، ارزیابی شده است که روش SDS_PAGE معمول‌ترین روش مورد استفاده برای ارزیابی میزان خلوص رسوب‌های کلاژنی حاصل از روش‌های مختلف است (Jaeemllie, ۱۹۷۰). نتایج آزمون SDS-PAGE با حضور تک باند در محدوده وزنی پپتید α کلاژن و حضور دو باند در محدوده وزنی دایمر و تراپیر پپتید α (باند‌های β و γ)، مبنی بر خلوص کلاژن استخراجی می‌باشد (Cui و همکاران، ۲۰۰۷). پس می‌توان گفت، روش هیدرولیز آنزیمی کلاژن، در فرآیند استخراج آن از دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*، نیز همانند سایر تحقیقات انجام شده در دنیا، روشی موثرتر و کارا تر نسبت به سایر روش‌های استخراج می‌باشد. به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گونه شناسایی شده خیار دریایی، گونه *Holothuria leucospilota* بوده و اعضای این گونه مونوفیلتیک می‌باشند. بیش‌ترین نزدیکی ژنتیکی این گونه از آب‌های خلیج فارس با نمونه‌های منطقه هند و آرام از آب‌های مالزی و استرالیا بوده است که این احتمالاً به‌خاطر ارتباط این آب‌ها با خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد. در این مورد نیز می‌توان مطالعاتی گسترده‌تر بر روی این گونه، در مناطق مختلف سواحل ایرانی خلیج فارس جهت بررسی وسیع‌تر این روابط، تعریف نمود. در بررسی ترکیبات دیواره بدن نیز نتایج این تحقیق با برخی تحقیقات مشابه و با برخی تفاوت داشته است که این احتمالاً به‌دلیل تفاوت در نمونه‌ها از لحاظ خشک و تر بودن، گونه مورد بررسی، زمان نمونه‌برداری و منطقه جغرافیایی جمع‌آوری نمونه و نوع مواد غذایی در دسترس جاندار بوده است. لذا در بررسی ترکیبات بدن می‌توان مطالعاتی طراحی نمود که با ارتباط میزان این ترکیبات با تغییرات عوامل محیطی مورد مطالعه قرار گیرد. در بررسی پروتئین کلاژن نیز نتایج به‌دست آمده نشان داد که روش هضم آنزیمی با پپسین روش موثری جهت استخراج کلاژن با خلوص بالایی می‌باشد. در بررسی‌های وسیع‌تر می‌توان روش‌های مختلف استخراج را نیز جهت مقایسه مورد بررسی قرار داده و یا بر روی ابداع روش‌های موثر با مدت زمان و هزینه کم‌تر، متمرکز گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که کلاژن بافت دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* کلاژن نوع I بوده است که این نتیجه همانند نتایج به‌دست آمده از تحقیقات در نقاط دیگر دنیا روی گونه‌های مختلف خیار دریایی بوده است.

تشکر و قدرانی

از تمامی کارکنان و مسئولین دانشگاه علوم پزشکی بوشهر در مرکز تحقیقات زیست پزشکی علی‌الخصوص، جناب آقای دکتر افشار



۲۹. **Kamarul, R.K. and Ridzwan, B.H., 2005.** Distribution and Taxonomic Revision of Sea Cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) in Several Populations of Malaysia. International Conference on Biogeography and Biodiversity: Wallace in Sarawak- 150 Years Later, 13-15 July, Kuching, Sarawak, Malaysia. 225 p.
۳۰. **Kerr, A.M.; Janies, D.A.; Clouse, R.M.; Samyn, Y.; Kuszak, J. and Kim, J., 2005.** Molecular Phylogeny of Coral-Reef Sea Cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotrida) Based on 16S Mitochondrial Ribosomal DNA Sequence. Mar Biotechnol. Vol. 7, pp: 53-60.
۳۱. **Kimura, S. and Tanaka, H., 1983.** Characterization of top shell muscle collagen comprising three identical α_1 chains. Bull Jpn Soc Sci Fisheries. Vol. 49, pp: 229-232.
۳۲. **Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T. and Tanaka, M., 2005.** Characterisation of acid soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). J Food Chem. Vol. 89, pp: 363-372.
۳۳. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, pp: 680-685.
۳۴. **Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J. and Higgins, D.G., 2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatic. Vol. 23, No. 21, pp: 2947-2948.
۳۵. **Lavery, S.; Chan, T.K.; Tam, Y.K. and Chu, K.H., 2004.** "Phylogenetic relationship and evolutionary of the shrimp genus *Penaeus s.l.* derived from mitochondrial DNA. Mol Phyl and Evol. Vol. 31, pp: 39-49.
۳۶. **Lewis, M.S. and Piez, K.A., 1964.** The characterization of collagen from the skin of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. J Biol Chem. Vol. 239, No. 10, pp: 3336-3340
۳۷. **Liu, Z.; Oliveira, A.C. and Su, Y.C., 2010.** Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). J Agric Food Chem. Vol. 58, No. 2, pp: 1270-1274.
۳۸. **Love, R.M.; Yamaguchi, Y.; Creach, Y. and Lavety, J., 1976.** The connective tissues and collagens of cod during starvation. Comp. Biochem and Physio. Part B. Vol. 55, pp: 487-492.
۳۹. **Michonneau, F.; McPherson, S.; Mark O'Loughlin, P. and Paulay, G., 2015.** More than meets the eye: diversity and geographic patterns in sea cucumbers. <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2015/01/23/014282>.
۴۰. **Mizuta, S.; Yoshinaka, R.; Sato, M.; Itoh, Y. and Sakaguchi, M., 1992.** Subunit composition of distinct types of collagens in the muscle of the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Comp Biochem and Physio. Vol. 102, pp: 803-811.
۴۱. **Montero, P.; Borderias, J.; Turnay, J. and Leyzarbe, M.A., 1990.** Characterization of hake (*Merluccius merluccius L.*) and trout (*Salmo irideus Gibb*) collagen. J Agric Food Chem. Vol. 38, No. 3, pp: 604-609.
۴۲. **Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B. and Duodu, K.G., 2004.** Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). J Food Chem. Vol. 85, No. 1, pp:81-89.
۴۳. **Nagai, T.; Worawattanamateekul, W.; Suzuki, N.; Nakamura, T.; Ito, T. and Fujiki, K., 2000.** Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jelly fish (*Rhopilema asamushi*). J Food Chem. Vol. 70, pp: 205-208.
۴۴. **Nalinanon, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W. and Kishimura, H., 2007.** Use of pepsin for collagen extraction
۱۳. **Çaklı, Ş.; Cadun, A.; Kışla, D. and Dinçer, T., 2004.** Determination of quality characteristics of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) in Turkish Sea (Aegean Region) depending on sun drying process step used in Turkey. J Aquat Food Product Technol. Vol. 13, No.3, pp: 69-78.
۱۴. **Chang-Lee, M.V.; Price, R.J. and Lampila, L.E., 1989.** Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus* spp.). J Food Sci. Vol. 54, pp: 567-572.
۱۵. **Chukwu, O., 2009.** Influences of drying methods on nutritional properties of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). World J Agric Sci. Vol. 5, pp: 256-258.
۱۶. **Ciarlo, A.S.; Paredi, M.E. and Fraga, A.N., 1997.** Isolation of soluble collagen from hake skin (*Merluccius hubbsi*). J Aquat Food Product Technol. Vol. 6, No.1, pp: 65-77.
۱۷. **Clouse, R.; Janies, D. and Kerr, A.M., 2005.** Resurrection of *Bohadschia bivittata* from *B. marmorata* (Holothuroidea: Holothuriidae) based on behavioral, morphological, and mitochondrial DNA evidence. Zoology. Vol. 108, No. 1, pp: 27-39.
۱۸. **Conand, C., 1998.** Holothurians (Sea Cucumber, Class Holothuridea). FAO, Rome, FAO species identification guid for fishery parpose. pp: 1158-1190.
۱۹. **Cui, F.X.; Xue, C.H.; Li, Z.J.; Zhang, Y.Q.; Dong, P.; Fu, X.Y. and Gao, X., 2007.** Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. Food Chem. Vol. 100, No. 3, pp: 1120-1125
۲۰. **FAO. 2008.** Sea cucumbers: A global review of fisheries and trade. FAO FAO Fish Aquac Tech Pap. Vol. 516, pp: 1-317.
۲۱. **Foegeding, E.A.; Lanier, T.C. and Hultin, H.O., 1996.** Collagen. In O. R. Fennema (Ed.), Food chem (3rd ed): New York: Marcel Dekker, Inc. pp: 902-906.
۲۲. **Friess, W., 1998.** Collagen biomaterial for drug delivery. Eur J Pharm Biopharm. Vol. 45, pp: 113-136.
۲۳. **Gao, Y.; Li, Z.; Qi, Y.; Guo, Z.; Lin, Y.; Li, W.; Hu, Y. and Zhao, Q., 2016.** Proximate composition and nutritional quality of deep sea growth sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from different origins. J Sci Food Agric. Vol. 96, pp: 2378-2383.
۲۴. **Granda, V.T., 2006.** The biological and trade status of sea cucumber in the families Holothuridae and Stichopodidae. In: Convention on International trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Twenty- Second meeting of the animals Committee. pp: 7-13
۲۵. **Hartl, D.L. and Clark, A.G., 1989.** Principles of Population Genetics. 2nd ed. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. 682 p.
۲۶. **Kamarudin, K.R.; Hashim, R. and Usup, G., 2010.** Phylogeny of Sea Cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) as Inferred from 16S Mitochondrial rRNA Gene Sequences. Journal of Sains Malaysiana. Vol. 39, No. 2, pp: 209-218.
۲۷. **Kamarudin, K.R.; Rehan, A.M.; Hashim, R.; Usup, G.; Fauzanahmad, H.; Anua, H.A. and Yamanidris, M., 2011.** Molecular Phylogeny of *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* (Brandt 1835) as Inferred from Cytochrome C Oxidase I Mitochondrial DNA Gene Sequences. Journal of Sains Malaysiana. Vol. 40, No. 2, pp: 125-133.
۲۸. **Kamarul R.K.; Aisyah, M.R.; Ahmad Lutfi, L.; Hajar Fauzan, A.; Mohd Hanafi, A.; Noor Faizul Hadry, N.; Ridzwan, H.; Rosnah, H. and Gires, U., 2009.** Coral Reef Sea Cucumbers in Malaysia. Malay J Sci. Vol. 28, No. 2, pp: 171-186.



۶۰. Skierka, E. and Sadowska, M., 2007. The influence of different acid and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem. Vol. 105, pp: 1302-1306.
۶۱. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6. Mol Biol Evol. Vol. 30, pp: 2725-2729.
۶۲. Telahigue, K.; Hajji, T.; Imen, R.; Sahbi, O. and El Cafsi, M., 2014. Effects of drying methods on the chemical composition of the sea cucumber *Holothuria forskali*. The Open Food Sci J. Vol. 8, pp: 1-8.
۶۳. Titterton, R. and Whatley, R., 2006. Recent marine Ostracoda from the Solomon Islands: part 1- Cypridoidea, Platycopina & Cladocopina. Journal of Micropalaeontology. Vol. 25, pp: 73-94.
۶۴. Trotter, J.A.; Lyons-levy, G.; Thurmond, F.A. and Koob, T.J., 1995. Covalent composition of collagen fibrils from the dermis of sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, a tissue with mutable mechanical properties. Comp Biochem Physiol. Part A: Physiology. Vol. 112, No. 3-4, pp: 463-478.
۶۵. Waldschmidt, A.Ma.; Salomao, T.M.F.; Barros, E.G.; Campos, L. and Antônio, O., 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Braz. J. Gen. [online]. Vol. 20, No. 3.
۶۶. Wen, J.; Hu, C. and Fan, S., 2010. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. J Sci Food Agr. Vol. 90, pp: 2469-2474.
۶۷. Zeugolis, D. and Raghunath, L., 2011. Collagen: Materials Analysis and Implant Uses. Compr Biomater J. pp: 261-278.
۶۸. Zeugolis, D.I.; Paul, R.G. and Attenburrow, G., 2008. Extruded collagen-polyethylene glycol fibers for tissue engineering applications. J Biomed Mater Res. Part B: Applied Biomaterials. Vol. 85, pp: 343-352.
۶۹. Zhang, M.; Liu, W. and Li, G., 2009. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). J Food Chem. Vol. 115, pp: 826-831.
۴۵. O'Loughlin, P.M.; Paulay, G.; Vandenspiegel, D. and Samyn, Y., 2007. New Holothuria species from Australia (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae), with comments on the origin of deep and cool holothuriids. Mem Mus Vic. Vol. 64, pp: 35-52.
۴۶. Oedjoe, M.D.R., 2017. Composition of Nutritional Content of Sea Cucumbers (Holothuroidea) in Mania Waters, Sabu Raijua Regency, East Nusa Tenggara. J Aquac Res Dev. Vol. 8, No. 7, pp: 1-3.
۴۷. Ogawa, M.; Portier, R.J.; Moody, M.W.; Bell, J.; Schexnayder, M.A. and Losso, J.N., 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheephead seabream (*Archosargus probatocephalus*). J Food Chem. Vol. 88, pp: 495-501.
۴۸. Ozer, N.P.; Mol, S. and Varlik, C., 2004. Effect of the handling procedures on the chemical composition of sea cucumber. Turk J Fish Aquat Sci. Vol. 4, pp: 71-74.
۴۹. Palumbi, S.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W.O.; Stice, L. and Grabowski, G., 1991. The Simple Fool's Guide to PCR. Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii. 47 p.
۵۰. Park, S.Y.; Lim, H.K.; Lee, S.; Hwang, H.C.; Cho, S.K. and Cho, M., 2012. Pepsin-solubilised collagen (PSC) from Red Sea cucumber (*Stichopus japonicus*) regulates cell cycle and the fibronectin synthesis in HaCaT cell migration. J Food Chem. Vol. 132, pp: 487-492.
۵۱. Pérez-Ruzafa, A.; Entrambasaguas, L. and Bacallado, J.J., 1999. Fauna de equinodermos (Echinodermata) de los fondos rocosos infralitorales del archipiélago de Cabo Verde. Rev Acad Canar. Cienc. Vol. 11, pp: 43-62.
۵۲. Price, A.R.G., 1983. Echinoderms of Saudi Arabia. Echinoderms of the Arabian Gulf (Persian Gulf) coast of Saudi Arabia. Fauna of Saudi Arabia. Vol. 5, pp: 28-108.
۵۳. Sadowska, M.; Kolodziejaska, I. and Niecikowska, C., 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). J Food Chem. Vol. 81, pp: 257-262.
۵۴. Saiki, R.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. and Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. Vol. 239, pp: 487-491.
۵۵. Saito, M.; Kunisaki, N. and Urano, N., 2002. Collagen as the major edible component of sea cucumber. Food Sci. Vol. 67, pp: 1319-1322.
۵۶. Salarzadeh, A.R.; Afkhami, M.; DarvishBastami, K.; Ehsanpour, M.; Khazaali, A. and Mokhlesi, A., 2012. Proximate Composition of Two Sea Cucumber Species *Holothuria pavra* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf. Ann Biol Res. Vol. 3, No. 3, pp: 1305-1311.
۵۷. Samyn, Y.; Appeltans, W. and Kerr, A.M., 2005. Phylogeny of *Labidodemas* and the Holothuriidae (Holothuroidea: Aspidochirotrida) as inferred from morphology. Zool J Linn Soc. Vol. 144, pp: 103-120.
۵۸. Siddiqui, Y.D.; Arief, E.M.; Yusoff, A.; Hamid, S.S.A.; Norani, T.Y. and Abdullah, M.Y.S., 2013. Extraction, Purification and Physical Characterization of Collagen from Body wall of Sea cucumber *Bohadschia bivitatta*. Health Envi J. Vol. 4, No. 2, pp: 53-65.
۵۹. Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A. and Pan, B.S., 1990. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation; Sikorski, Z.E., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA. pp: 29-54.

