

PRIMER REGISTRO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA E HISTORIA DEMOGRÁFICA DEL PEPINO DE MAR *ATHYONIDIUM CHILENSIS* (SEMPER, 1868) PARA CHILE.

Andrea Martínez¹, Darío Navarrete², Belén de la Puente², Elie Poulin^{3,4}, Catalina Merino-Yunnessi¹, Angie Díaz^{2,3}

¹Área Zoología de Invertebrados, Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile

²Departamento de Zoología, Universidad de Concepción, Barrio Universitario s/n, Concepción, Chile.

³Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Las Palmeras # 3425, Ñuñoa, Santiago, Chile.

⁴Laboratorio de Ecología Molecular, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras # 3425, Ñuñoa, Santiago, Chile.

RESUMEN

La Clase Holoturoidea agrupa a los pepinos de mar, un grupo de equinodermos que habitan en todas las profundidades y océanos del mundo. En Chile, destaca *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868), especie de amplia distribución en el Pacífico Sudoriental, debido a su importancia comercial y a los usos recientemente descritos en medicina e industria farmacéutica. No obstante, la actividad extractiva de esta especie carece de regulación y su información biológica, ecológica y pesquera es escasa. Registros de desembarques recientes refieren un esfuerzo de pesca irregular y un desconocimiento del comportamiento de sus poblaciones. El presente estudio analizó los patrones genéticos e inferencia demográfica en una población que carece de registro formal de extracción, por medio del marcador genético Citocromo Oxidasa Subunidad I. Se observó una alta diversidad genética y además la presencia de tres grupos con altos niveles de diferenciación entre ellos, lo que podría explicar en parte tal diversidad genética, pero que contrasta con la variación intraespecífica estimada para otros holoturoideos de similares características. Esta información surge como un punto de partida para evaluar el estado del recurso con miras a desarrollar planes de manejo que aseguren la conservación de esta especie de importancia comercial.

Palabras claves: filogeografía, equinodermos, COI, holoturoideos, pesquerías, Copiapó.

ABSTRACT

First report of genetic diversity and demographic history of the sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868) from Chile. Sea cucumbers inhabit all depths and oceans of the world. In Chile, within this group stands out *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868), a commercial species distributed throughout the Southeastern Pacific, which recently has been involved on applied studies that describes its medical and pharmaceutical industry use. However, mostly of it is biological, ecological and fisheries information is still unknown. Recent fishing landing records points out to an irregular fishing effort and lack of knowledge of its population dynamics. The present study analyzed, through the genetic marker Cytochrome Oxidase Subunit I, the genetic diversity and demographic history of *A. chilensis* from a population that has no formal extractive records. Results showed high genetic diversity and the presence of three groups with high levels of differentiation between them, which could partly explain such genetic diversity, but contrasts with the conspecific variation estimated for other holothuroids with similar characteristics. This information arises as a starting point to evaluate the state of this species and develop management plans that ensure its conservation.

Key words: phylogeography, echinoderms, COI, holothuroids, fisheries, Copiapó

INTRODUCCION

La Clase Holothuroidea reúne a los equinodermos conocidos como pepinos de mar, un grupo que habita en todas las profundidades y océanos del mundo (Pawson 2007). A nivel mundial se conocen 1.693 especies de pepinos de mar (Miller *et al.* 2017), mientras que en Chile, se han descrito 65 especies (Martínez *et al. in progreso*), entre las cuales destaca *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868). Esta especie es endémica del Pacífico Sudoriental, donde se ha registrado a partir de la zona intermareal hasta los 7 metros de profundidad, desde Ancón-Perú (11°44'5" LS) hasta Chiloé-Chile (42°03'55" LS) (Pawson 1983, Lancellotti y Vásquez 2000). Recientes estudios sobre *A. chilensis* han descrito su importancia para la medicina y la industria farmacéutica (Mamelona *et al.* 2007, Zhong *et al.* 2007, Careaga *et al.* 2012, Matsuhiro *et al.* 2012, Sottorff *et al.* 2013) y su condición de recurso altamente cotizado como alimento en el mercado asiático (Toral-Granda *et al.* 2008); no obstante, el conocimiento de su biología y ecología es escaso. Durante los últimos años, la creciente demanda mundial ha provocado una tendencia a la sobreexplotación de alrededor de un 80% de las especies comerciales de pepinos de mar, a nivel global (Guisado *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2011, Robinson y Lovatelli 2015, Alves Pereira *et al.* 2018).

Guisado *et al.* (2012) describen que en la actualidad *A. chilensis* es la holoturia de mayor importancia comercial en la costa del Pacífico Sudoriental. Desde el año 1992, la explotación de este recurso es registrada por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) bajo el nombre genérico de "pepino de mar", sin asegurar que todos los datos correspondan a esta especie. Esto último se suma a varios problemas, entre ellos, una importante variabilidad en los datos de extracción. Por ejemplo, entre los años 1998-2008 se registró un promedio anual de 269 toneladas, con un valor máximo de 1510 toneladas en el año 2000 (Renbo y Yuan 2005, SERNAPESCA 2008, Toral-Granda *et al.* 2008). De igual modo, existe una falta de regulación en esta actividad e incertezas sobre la magnitud real e identificación espacial de la pesquería que se encuentra operando en aguas chilenas, información fundamental para la conservación y regulación de la actividad extractiva.

El estudio de la genética poblacional es una disciplina relevante que permite conocer la historia evolutiva de un grupo. Marcadores genéticos de regiones del ADN mitocondrial han demostrado ser útiles para describir la demografía histórica de las especies (Avice 2000), en particular, el marcador COI (ADNmit) es altamente polimórfico en varias especies de equinoideos (Debenham *et al.* 2000, Lessios *et al.* 2003), permitiendo la descripción de la diversidad genética y la detección de eventos de reducciones poblacionales (cuellos de botella), indicadores de pérdida de diversidad genética que son posibles señales de amenaza para una especie, además de la estructura y el flujo génico histórico y contemporáneo de las especies (Ayre *et al.* 2009, Pelc *et al.* 2009).

Este estudio busca establecer los parámetros de diversidad genética e indagar en la historia demográfica de *A. chilensis* por medio del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I, a partir de una población, que según los datos disponibles no reporta actividad extractiva formal. El objetivo es tener una primera aproximación a la caracterización genética de esta especie de importancia comercial, cuya extracción carece de regulación y planes de manejo que aseguren la conservación del recurso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras de *Athyonidium chilensis* fueron obtenidas en la costa de Copiapó (-27.645867, -70.933550), mediante buceo autónomo realizado en Julio del 2019, en una zona poco profunda (5–10 m) (Figura 1). Los individuos fueron fijados y preservados en alcohol al 96% y trasladados al laboratorio, para realizar la extracción de tejido (tentáculos y músculo).

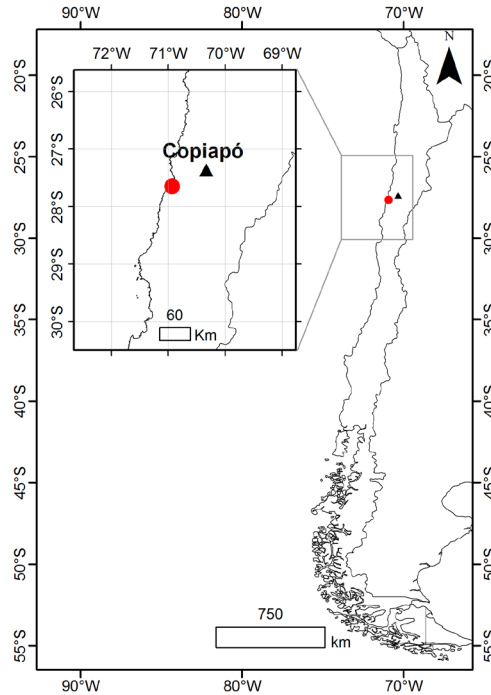


Figura 1. Mapa de la localidad de muestreo de *Athyonidium chilensis* en la costa somera Copiapó, Chile.

Extracción de DNA, amplificación y secuenciación

El ADN total fue extraído utilizando el kit de extracción DNAeasy (QIAGEN), con pequeñas modificaciones al protocolo señalado por el fabricante, según lo sugerido por Benzie y Uthicke (2003). Se verificó la calidad del ADN extraído en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó utilizando el Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

La amplificación parcial del fragmento mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) fue realizada mediante la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando los primers descritos por Arndt *et al.* (1996) (CO1e-F: 5'-ATAATGATAGGAGGRT TTGG-3, CO1e-R: 5'-GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3), bajo las mismas condiciones referidas por Benzie y Uthicke (2003). El producto de PCR fue purificado utilizando QIAquick PRC purification y enviado a secuenciar a la empresa MACROGEN Korea. Las secuencias fueron editadas, corregidas y alineadas con el programa PROSEQ ver.3 (Filatov 2002) y la corrección del marco de lectura se realizó con el código genético para ADN mitocondrial de invertebrados en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

Caracterización genética de la población

Índices de Diversidad: Para estudiar la diversidad genética de la localidad muestreada se calcularon los índices de diversidad estándar tales como: Número de Haplotipos (N), Número de Sitios Polimórficos (S), Diversidad Haplotípica (H), Número promedio de diferencias entre pares de secuencias (II) y Diversidad Nucleotídica (π). Estos índices fueron estimados utilizando el programa Arlequín 3.5 (Excoffier y Lischer 2010).

Análisis Demográficos: Para identificar las relaciones genealógicas entre las secuencias de *Athyonidium chilensis* se realizó una red de haplotipos que fue obtenida utilizando el algoritmo Median-Joining a través del programa Network 5.0 (Fluxus Technology 2017). Este análisis permite determinar la frecuencia de los tipos únicos de secuencias (de aquí en adelante, haplotipos) y su distribución en el espacio.

Con el propósito de evaluar desviaciones del equilibrio mutación-deriva descrito por el modelo de neutralidad de Wright-Fisher, causadas por poblaciones en expansión o cuellos de botellas, se evaluó la historia de cambios demográficos en *A. chilensis* a través de la estimación de los índices de neutralidad D de Tajima (Tajima 1989) y el Fs de Fu (Fu 1997), y sus respectivos valores de probabilidad, en el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). Ambos índices indican si la población se encuentra en equilibrio, expansión o contracción, donde un valor negativo-significativo indica que la población se encuentra en expansión, un valor cercano a 0-significativo indica que la población está en equilibrio y un valor positivo-significativo es señal de que la población experimentó un reciente cuello de botella.

Para profundizar en la señal de posibles cambios demográficos se construyó la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias (mismatch distribution) en el programa DNAsp 5.0 (Librado y Rozas 2009), observando si se ajusta al modelo esperado bajo la ecuación de Rogers y Harpending (1992), que permite determinar si la población ha sufrido un crecimiento instantáneo, o ha atravesado un cuello de botella, reciente o pasado (Rogers y Harpending 1992).

RESULTADOS

Caracterización genética de la población

Índices de Diversidad de las especies: Se encontraron 17 haplotipos en los fragmentos de 663 pb del gen COI amplificado, correspondiente a 22 individuos. Se observó una alta diversidad haplotípica, nucleotídica, 36 sitios polimórficos y un alto número de diferencias entre secuencias (Cuadro 1).

Cuadro 1. Índices de diversidad estimados para *A. chilensis* en el área de muestreo. K: Número de Haplotipos, S: Número de Sitios Polimórficos, H: Diversidad Haplotípica, Π : Número promedio de diferencias entre pares de secuencias, π : Diversidad Nucleotídica

LOCALIDAD	Nº	S	K	H	Π	π
Costa de Copiapó	22	36	17	0.978±0.00036	12.537	0.02502

Análisis Demográficos: Las relaciones genealógicas obtenidas a través del Median-Joining Network, mostraron un patrón caracterizado por la presencia de muchos haplotipos de baja frecuencia, aunque se observan tres agrupaciones de las que emanan nuevos haplotipos separados de estos por varios pasos mutacionales (Figura 2). El análisis de la variación intra-específica de estos tres haplogrupos, presentó valores entre 1,6% y 2,9% de variación entre grupos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de variación intra-específica en las agrupaciones haplotípicas estimadas para *Athyonidium chilensis* (sobre la diagonal: Número de diferencias fijadas entre grupos; bajo la diagonal: Número promedio de diferencias de nucleótidos entre grupos).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1	---	15 (2,3%)	19 (2,9%)
Grupo 2	21,942	---	11 (1,6%)
Grupo 3	22,846	13,750	---

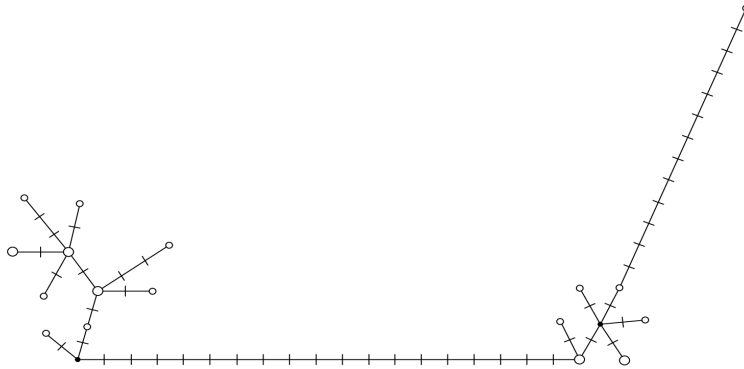


Figura 2. Red de Haplotipos de *Athyonidium chilensis* provenientes de la costa somera de Copiapó, Chile.

Las pruebas de Tajima (D) y Fu (Fs) para identificar si la diversidad genética se aleja del modelo neutral de equilibrio mutación-deriva, con valores positivos y no significativos (D de Tajima: 0.91443; Fs de Fu: 0.14773).

La distribución del número de diferencias entre pares de secuencias (mismatch distribution), no se ajustó al modelo esperado bajo la ecuación de Rogers y Harpending (1992), observándose más de un evento de expansión y reducción poblacional (Figura 3).

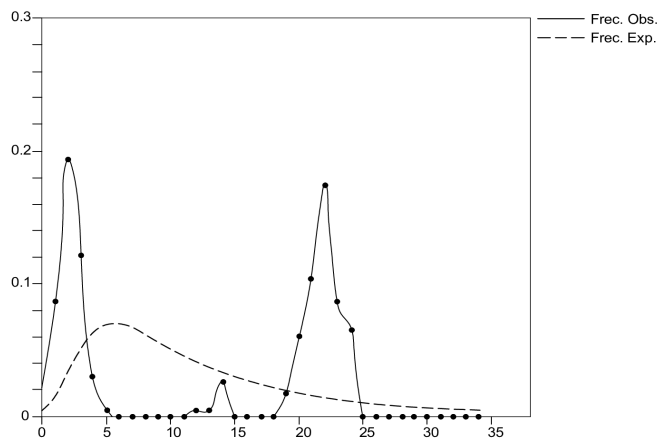


Figura 3. Distribución de desajuste entre pares de secuencias de *Athyonidium chilensis* en la localidad muestreada.

DISCUSION

Algunas características ecológicas y biológicas (e.g. reducida movilidad, distribución agregada) de *A. chilensis* contribuyen a un mayor interés por la captura de esta especie; sin embargo, su conservación se podría ver afectada por el escaso conocimiento de sus poblaciones y la ausencia de evaluaciones de stocks naturales.

La población analizada de *A. chilensis* exhibe una elevada diversidad genética (0.978, SD = 0.00036). Esto coincide con lo registrado para otras especies de holoturias de importancia comercial, entre ellas *Holothuria inornata* (Hd= 0.979) del Pacífico Oriental Tropical (Prieto-Ríos *et al.* 2014), *H. mammata* (Hd= 0.92) del Mediterráneo y el Atlántico (Skillings *et al.* 2011) o para *Holothuria nobilis* (Hd= 0.942) (Benzie y Uthicke 2003), una de las especies más explotadas en el Indo-Pacífico.

Si bien *A. chilensis* exhibe una elevada diversidad, la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias (mismatch distribution) muestra tres eventos de expansión/reducción del tamaño poblacional en el tiempo, señal de inestabilidad demográfica, que no se observa en las otras especies citadas. Por el contrario, las especies del mar Mediterráneo *Parastichopus regalis* y *Holothuria polii*, reflejan eventos demográficos unimodales (Maggi y González-Wangüemert 2015, Valente *et al.* 2014).

El análisis de la variación intra-específica de los tres haplogrupos que se diferencian en la red de haplotipos, presentó valores mayores a lo reportado en otras especies de holotúridos de importancia comercial, que señalan una variación intra-específica del 1.3 % (Uthicke *et al.* 2010). Los altos porcentajes estimados permiten entender la alta diversidad genética e inestabilidad demográfica observada y, por otra parte, plantean la interrogante de si el género monotípico *Athyonidium* está efectivamente representado por una sola especie en el Pacífico Sudoriental. Otra probable explicación a la divergencia obtenida entre los tres grupos, es que estemos observando solo una parte de poblaciones estructuradas. Valente *et al.* (2014), encuentran una baja pero significativa diferenciación genética entre siete poblaciones del Mediterráneo occidental y oriental en *Holothuria polii*, pero postulan que esta diferenciación puede estar correlacionada con los procesos históricos que han afectado al mar Mediterráneo en lugar de revelar interrupciones genéticas. No obstante, para corroborar o descartar un escenario similar en *A. chilensis*, es imprescindible incluir más poblaciones en este tipo de análisis.

CONCLUSION

El presente análisis nos indica que la población estudiada de *A. chilensis* presenta una alta diversidad genética y tres grupos con altos niveles de diferenciación entre ellos. Frente a este escenario, es imperativo desarrollar y profundizar estudios que incorporen poblaciones de todo el rango de distribución de la especie, incluyendo aquellas que cuentan con reportes formales de actividad extractiva, para desarrollar un análisis comparativo de poblaciones explotadas frente a no explotadas, un antecedente importante para el establecimiento del estado de la pesquería y el diseño de planes de manejo que aseguren la conservación de la especie. Esta información es particularmente necesaria frente al eventual aumento en las capturas a partir de los nuevos usos descritos, contribuyendo a evitar una posible sobreexplotación de un recurso que carece de regulación extractiva, como ha ocurrido con más del 80% de las pesquerías de pepinos de mar a nivel global.

AGRADECIMIENTOS

Los y las autoras agradecen el financiamiento del Proyecto al Fondo de Apoyo de Investigación Curatorial (FAIP INV-37) del Servicio Nacional del Patrimonio Cultural, a cargo de Andrea Martínez y Angie Díaz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-PEREIRA, V., FORTE, J.M., ARRUDA-JÚNIOR, J.P.V., DINIZ, F.M., MAGGIONI, R. y C.S.B. SALMITO-VANDERLEY
2018 Identification and characterization of microsatellite loci in West Atlantic sea cucumber *Holothuria grisea* (Selenka 1867). *Journal of Genetics*, 97(5): 1363-1369.
- ANDERSON, S.C., FLEMMING, J.M., WATSON, R. y H.K. LOTZE
2011 Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries*, 12(3): 317-339.
- ARNDT, A., MARQUEZ, C., LAMBERT, P. y M.J. SMITH
1996 Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 6: 425-437
- AVISE, J.C.
2000 *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. London, England.
- AYRE, D.J., MINCHINTON, T.E. y C. PERRIN
2009 Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Molecular Ecology*, 18(9): 1887-1903.
- BENZIE, J.A.H. y S. UTHICKE
2003 Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Molecular Ecology*, 12(10): 2635-48.
- CAREAGA, V.P., MUNIAIN, C. y M.S. MAIER
2012 Fatty acid composition of the edible sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Natural Product Research*, 27(7): 639-647.
- DEBENHAM, P., BRZEZINSKI, M., FOLTZ, K. y S. GAINES
2000 Genetic structure of populations of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 253(1): 49-62.
- EXCOFFIER, L. y H.E. LISCHER
2010 Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology Ecology Resources*, 10(3): 564-567.
- FILATOV, D.
2002 ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2: 621-624
- FU, Y.
1997 Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- GUISADO, C., CARRASCO, S.A., DÍAZ-GUISADO, D., MALTRAIN, R. y H. ROJAS
2012 Embryonic development, larval morphology and juvenile growth of the sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(1): 65-73.

LANCELOTI, D.A. y J.A. VASQUEZ

2000 Zoogeografía de macroinvertebrados bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(1): 99-129.

LESSIOS, H.A., KANE, J. y D.R. ROBERTSON

2003 Phylogeography of the pantropical sea urchin *Tripneustes*: contrasting patterns of population structure between oceans. *Evolution*, 57(9): 2026-2036.

LIBRADO, P. y J. ROZAS

2009 DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.

MAGGI, C. y M. GONZÁLEZ-WANGÜEMERT

2015 Genetic differentiation among *Parastichopus regalis* populations from Western Mediterranean Sea: potential effects of its fishery and current connectivity. *Mediterranean Marine Science*, 16(3): 489-501.

MAMELONA, J., PELLETIER, E., GIRARD-LALANCETTE, K., LEGAULT, J., KARBOUNE, S. y S. KERMASHA

2007 Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104(3): 1040-1047.

MATSUHIRO, B., OSORIO-ROMÁN, I. O. y R. TORRES

2012 Vibrational spectroscopy characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Carbohydrate Polymers*, 88(3): 959-965.

MILLER, A.K., KERR, A.M., GUSTAV, P., REICH, M., WILSON N.G., CARVAJAL, J.I. y G.W. ROUSE

2017 Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111: 110-131

PAWSON, D.L.

1969 Holothuroidea from Chile. Report no. 46 of the Lund University Chile expedition 1948-1949. *Sarsia* 38:121-146.

PAWSON, D. L.

2007 Phylum Echinodermata. *Zootaxa*, 1668(1): 749-764.

PELC, R.A., WARNER, R.R. y S.D. GAINES

2009 Geographical patterns of genetic structure in marine species with contrasting life histories. *Journal of Biogeography*, 36(10): 1881-1890.

PRIETO-RIOS E., F.A. SOLÍS-MARÍN, G.H. BORRERO- PÉREZ y P. DÍAZ-JAIMES

2014 Filogeografía de *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868 (Echinodermata: Holothuroidea). *Revista Peruana de Biología*, 21(2): 155-162.

RENBO, W. y C. YUAN

2005 Breeding and culture of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, Liao. *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. *FAO Fisheries Technical Paper*, 463: 277-286.

ROBINSON, G. y A. LOVATELLI

2015 Global sea cucumber fisheries and aquaculture FAO's inputs over the past few years. *FAO Aquaculture Newsletter*, 53: 55-57.

ROGERS, A. y H. HARPENDING

1992 Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3): 552-569.

SERNAPESCA

2008 Anuario estadístico de pesca. Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción, Servicio Nacional de Pesca, Valparaíso.

SKILLINGS D.J., C.E. BIRD y R.J. TOONEN.

2011 Gateways to Hawai'i: Genetic Population Structure of the Tropical Sea Cucumber *Holothuria atra*. *Journal of Marine Sciences*, Article 153654. 16 pp.

SOTTORFF, I., ABALLAY, A., HERNÁNDEZ, V., ROA, L., MUÑOZ, L.X., SILVA, M., BECERRA, J. y A. ASTUYA

2013 Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(1): 23-35.

TAJIMA, F.

1989 Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A. y S. KUMAR

2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.

TORAL-GRANDA, V., LOVATELLI, A. y M. VASCONCELLOS

2008 Sea cucumbers: a global review of fisheries and trade (Vol. 516). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

UTHICKE, S., BYRNE, M. y C. CONAND

2010 Genetic barcoding of commercial Bêche de mer species (Echinodermata: Holothuroidea). *Molecular Ecology Resources*, 10(4): 634-646.

VALENTE, S., SERRÃO, E. A. y M. GONZÁLEZ-WANGÜEMERT

2014 West versus East Mediterranean Sea: origin and genetic differentiation of the sea cucumber *Holothuria polii*. *Marine Ecology*, 36(3): 485-495.

ZHONG, Y., KHAN, M. A. y F. SHAHIDI

2007 Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4): 1188-1192.