

بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی و ارزش غذایی اندام‌های مختلف گیاه کاکتوس (*Opuntia stricta* Haw.)

(مطالعه موردي: روستاي محمدآباد شهرستان گرگان)

محمد رحيم فروزه^{۱*}, مژگان سادات عظيمي^۲ و محتم اشرف زاده^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۰۵/۱۰

چکیده

کاکتوس گیاهی مقاوم به خشکی و حاجد ارزش‌های خوارکی، دارویی و علوفه‌ای است. با توجه به اهمیت گونه مذکور، این مطالعه به بررسی کیفیت علوفه، ترکیبات فنول تام، فلاونوئید تام و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های مختلف این گیاه شامل پد (برگ مانند)، میوه و دانه آن می‌پردازد. نمونه‌برداری از اندام‌های مختلف این گونه به صورت تصادفی و با ۵ تکرار از اطراف روستای محمدآباد گرگان در سال ۱۳۹۶ انجام شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، به منظور انجام آزمایشات مورد نظر، عصاره‌گیری با استفاده از متانول خالص انجام شد. در ادامه، فنول کل با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو، فلاونوئید با استفاده از روش رنگ‌سنگی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش استاندارد رادیکال‌های آزاد DPPH با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفوتومتری انجام شد. همچنین شاخص‌های کیفیت علوفه (ADF و ME و DMD، CP) رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش‌های سنجش کیفیت علوفه ارزش‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددانه‌ای دانکن صورت گرفت. نتایج نشان داد که میزان فنول و فلاونوئید تام در پد و میوه بیشتر از دانه‌ها است. همچنین میزان آنتی‌اکسیدان در دانه و میوه بیشتر از برگ اندازه‌گیری گردید. از طرفی میزان پروتئین خام در دانه بیشتر از میوه و برگ بود. با توجه به نتایج به دست آمده، بذر و میوه به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر و همچنین ارزش غذایی (CP، DMD و ME) بهتر نسبت به سایر اندام‌ها از اهمیت بیشتری در استفاده‌های دارویی، تغذیه‌ای و علوفه‌ای برخوردار است. بعلاوه با توجه به مقاومت بالای این گونه به شرایط سخت محیطی از جمله: خشکی، کم آبی و همچنین حضور این گونه در مناطق خشک و نیمه‌خشک که با کمبود منابع غذایی برای استفاده‌ی دام مواجه است، می‌توان از این گونه به عنوان علوفه کمکی جهت تعلیف دام به صورت جمع‌آوری، خشک و آسیاب نمودن آن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کیفیت علوفه، آنتی‌اکسیدان، شاخص‌های ارزش غذایی، فنول، فلاونوئید، *Opuntia stricta*.

^۱- استادیار گروه مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: rfroozeh@gmail.com

^۲- استادیار گروه مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۳- دانشجوی دکتری علوم مرتع، گروه مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

لحاظ اعمال فیزیولوژیک و آثار درمانی اهمیت ویژه‌ای دارند. مهم‌ترین پلی فلی‌های بهداشتی به گروه فلاونوئیدها تعلق دارند. فلاونوئیدها به لحاظ ساختار فنلی، توانایی آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. به عنوان مثال، وجود ترکیبات فلی در نمونه‌های میوه گلابی کاکتوس (۲۸)، و محتوای فلاونوئیدی در گونه *Opuntia dillenii* (۲۶) گزارش شده است. اما محتوای فلاونوئید گونه *Opuntia stricta* کمتر شناخته شده است (۲۷). نتایج تحقیقات کانیانگا^۱ و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که میوه‌های *Opuntia stricta* Haw. منبع مهمی از فیبر، انسانس، ویتامین‌ها و مواد معدنی برای گروه‌های آسیب پذیری که در شرایط سختی زندگی می‌کنند، محسوب می‌شود. همچنین ترکیب غذایی و فیتوشیمیائی انواع میوه‌های کاکتوس با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد سرطان، ضد ویروسی، ضد درد، فعالیت‌های هیپوگلیسمی و ضد میکروبی همراه می‌باشد (۴۷، ۳۷، ۱۸، ۱۶ و ۷). کاستلر^۲ و همکاران (۲۰۱۲) به مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی میوه *Opuntia stricta* پرداختند. ایشان دریافتند که میوه *Opuntia stricta* به عنوان یک منبع حاوی غلظت بالا از رنگدانه‌های بتایسین (۸۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) مورد توجه می‌باشد (۷). علاوه بر این، آب میوه *Opuntia stricta* (تازه، خشک یا عصاره) می‌تواند به عنوان یک ماده غذایی طبیعی استفاده شود و رنگ آن، آنتی‌اکسیدان و دیگر ترکیبات فعل زیستی را از نظر کیفیت محصول بهبود ببخشد و ارزش غذایی آن را افزایش دهد که بالطبع مورد توجه مصرف کنندگان می‌باشد (۸، ۹ و ۳۹).

از طرفی میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند فنول و فلاونوئید تام و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آنها به عوامل متعددی از قبیل آب و هوا، گونه، روش استخراج، روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان بستگی دارد (۲۵). با توجه به استفاده بی‌رویه از مراتع و لزوم توجه به ظرفیت و ارزش غذایی سایر گونه‌های سازگار به شرایط خشک و نیمه خشک که بخش عظیمی از کشورمان را شامل می‌شود، کیفیت علوفه گونه کاکتوس نیز در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. بررسی استفاده‌های علوفه‌ای و تغذیه‌ای گونه‌ی کاکتوس توسط دام (بز) و انسان (۲۷) و تعیین ارزش غذایی گونه‌های مختلف

مقدمه

کاکتوس (*Opuntia stricta* Haw.) گیاهی است بوته‌ای به ارتفاع تا ۲ متر که متعلق به خانواده کاکتوس (Cactaceae) می‌باشد. گونه *O. stricta* به سرعت در حال گسترش است و به عنوان گونه‌ای مهاجم در مراتع خشک و نیمه‌خشک در بسیاری از کشورها از جمله استرالیا، آفریقای جنوبی، نامیبیا (۲۱)، یمن (۱۷)، هند، ماداگاسکار (۳۵) و اخیرا نیز اسپانیا و برخی کشورهای شمال آفریقا (۲۹) گزارش شده است. زیستگاه این گونه عمدها در امتداد ساحل فلوریدا محدود به خاک‌های شنی می‌باشد (۶). این گونه در استرالیا و آفریقای جنوبی انتشار گسترده‌ای دارد و از قابلیت استقرار در بسیاری از انواع خاک‌ها، زیستگاهها و اقلیم‌ها برخوردار است (۳۴ و ۲۱). اگر چه *O. stricta* مقاوم در برابر سرما است، اما بهترین شرایط رویش را در مناطق گرم و مطرطب دارد. این گونه همچنین مقاوم به خشکسالی است و جمعیت‌های تهاجمی آن را می‌توان در رژیم بارندگی سالانه ۱۲۰۰-۳۰۰ میلی‌متر یافت که ممکن است شامل هشت ماه خشکی باشد (۳۳). در باغ‌های مناطق خشک از این گیاه به صورت گلستانی و با در نظر گرفتن جنبه تزئینی آن، استفاده می‌شود، زیرا برای زنده ماندن نیاز به آب کمتری دارد. از طرفی، این گونه تنها بومی نواحی خشک جزایر کارائیب می‌باشند، هرچند این گونه به عنوان گونه غالب برخی از ایالات مهم ایالات متحده آمریکا (لوئیزیانا و جرجیا) ثبت شده است (۴۹).

میوه‌های تازه *O. stricta* به طور انحصاری توسط انسان، دام (بز) و حیوانات وحشی مصرف می‌شود. میوه‌ها به صورت گوشتی، با شکل، اندازه و رنگ‌های متفاوت، به همراه تعدادی دانه‌های سخت می‌باشد. این میوه‌های گلابی مانند، در مناطق خشک و نیمه‌خشک به ویژه کشور کنیا به عنوان یکی از میوه‌های مهم برای حفاظت و امنیت غذایی، که در آن تولید مواد غذایی گیاهی به شدت محدود است، تبدیل شده است (۲۶). به دلیل اهمیت بالای گونه‌های کاکتوس، تحقیقات فیتوشیمیایی مختلفی بر روی اندام‌های مختلف این گونه‌ها انجام شده است. از طرفی، مطالعه متابولیت‌های ثانویه گیاهان، به خصوص ترکیب‌های فنلی، به

¹-Castellar

²-Kunyanga

ساختاری خشن)، کلاس خوشخوارکی این گونه پایین (کلاس ۳) و جزء گونه‌های مهاجم به حساب می‌آید. از طرفی با توجه به گستره رویشی این گونه (بارندگی ۳۰۰ تا ۱۲۰۰ میلی‌متر) و حضور این گونه در مناطق خشک و نیمه‌خشک تا مرطوب، لزوم بررسی کیفیت علوفه گونه مذکور و در صورت لزوم از طریق برداشت قسمت‌های با کیفیت آن از نظر تغذیه دام، ابزارداری و آسیاب کردن آن علارغم خصوصیات ضد خوشخوارکی آن (خاردار)، می‌توان در فصول نامناسب سال از نظر کمبود علوفه، اقدام به تعییف دامها کرد.

مواد و روش‌ها:

الف: تهیه نمونه‌های گیاهی:

نمونه‌برداری در تاریخ ۱۰ دی ماه ۱۳۹۶ از اطراف فروندگاه گرگان واقع در روستای محمدآباد و ۴ کیلومتری شمال شهرستان گرگان با عرض جغرافیایی "۳۶°۵۷'۴۷" و طول جغرافیایی "۵۰°۲۵'۵۵" شرقی با میانگین بارندگی ۳۰۴ میلی‌متر انجام شد. ارتفاع این منطقه از سطح دریا از ۳ متر تا ۲۰-۲۰ متر و میانگین دمای سالیانه آن ۱۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (شکل ۳). بهدلیل حاصلخیزی منطقه مورد مطالعه، تقریباً کل منطقه تحت کشت انواع محصولات زراعی قرار دارد و پوشش گیاهی این منطقه بیشتر شامل گونه‌های یکساله و چندساله علفی و همچنین برخی گونه‌های چندساله از جمله نی و گز که در برخی از نقاط از جمله مسیل‌ها به صورت محدود مشاهده می‌گردد. نمونه‌برداری با استفاده از روش کاملاً تصادفی و از نقاط مختلف با ۵ تکرار از هر کدام از اندام‌های گونه کاکتوس (برگ، میوه و دانه) انجام شد. بهدلیل محتوای بالای رطوبتی، اندام‌های گیاه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه در آون قرار داده شد. پس از اطمینان از خشک بودن اندام‌های مختلف این گونه، با استفاده از آسیاب برقی به صورت پودر درآمد. کلیه آزمایشات مربوط به متابولیت‌های ثانویه اندام‌های مختلف کاکتوس در آزمایشگاه علوم باگبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

آن، می‌تواند گامی در جهت استفاده بهینه از مرتع خشک و شور باشد. شاخص‌های تعیین کیفیت علوفه شامل، ADF، الیاف خام، پروتئین خام و انرژی خام است (۱۵). ارزانی (۲۰۰۹) در تحقیقات خود بیان داشت که چهار شاخص پروتئین، DMD، ME و ADF مهم‌ترین صفات تعیین کننده کیفیت علوفه می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر شماتیک گیاه *O. stricta*

از آنجایی که تاکنون اثر آنتی‌اسیدانی، فنل تام و فلاونوئید تام اندام‌های برگ، میوه و بذر گونه *Opuntia stricta* در ایران گزارش نشده است و با توجه به خواص چند منظوره گیاه کاکتوس (علوفه‌ای، تغذیه‌ای، دارویی، شورپسند)، گستره رویشی آنها و همچنین با توجه به اینکه عوامل بسیار زیادی از قبیل آب و هوا، خاک، روش‌های استخراج و روش‌های اندازه‌گیری آنتی‌اسیدان‌ها در میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله فنل کل، فلاونوئید کل و خواص آنتی‌اسیدانی نقش دارند. لذا تحقیق حاضر به منظور ارزیابی ترکیبات فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اسیدانی گونه‌ی *O. stricta* Haw. در روستای محمدآباد شهرستان گرگان استان گلستان انجام شد. از طرفی بر اساس تحقیقات کانیانگا و همکاران (۲۰۰۹) مبنی بر استفاده از این گونه در مناطقی که مواد غذایی و تولید علوفه بشدت محدود است (مناطق خشک) و بر اساس خصوصیات ظاهری این گونه (وجود خار و اندام‌های

نمونه‌ها پس از ۲ ساعت قراردادن نمونه‌ها در دمای اتاق با BIO-RAD استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (SmartSpec Plus) و در طول موج ۷۶۰ نانومتردر مقابل بلانک (متانول) اندازه‌گیری شد. مقادیر فنول تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره ثبت گردید.

میزان محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ‌سنگی ارزیابی شد (۱۲). عصاره با غلظت 10 mg/ml تهیه شد. 0.1 ml لیتر از عصاره در $1/5$ میلی‌لیتر متانول حل و 0.1 ml لیتر آب مقطر به این مخلوط اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج 415 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر دوگانه مرئی ماورای بنفش اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید.

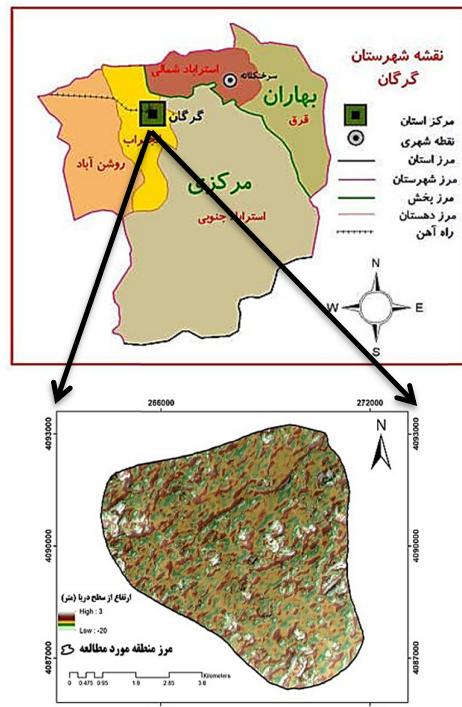
ارزیابی میزان توانایی بهدام اندازی رادیکال DPPH:

به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی از روش استاندارد شامل رادیکال DPPH و قدرت احیا استفاده شد. اساس این روش، به داماندازی رادیکال‌ها (DPPH) دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازیل) بر مبنای توانایی هیدروژن‌دهی است (۱۳). روش مذکور به منظور ارزیابی فعالیت رادیکال آزاد به کار می‌رود و از مزایای آن عدم واستگی به قطبیت نمونه است (۲۳). بدین منظور، 0.5 ml لیتر محلول 10 ml میلی‌مولار DPPH به 0.5 ml لیتر از عصاره اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی تکان داده و به مدت 15 دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در 517 نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. از اسید اسکوربیک نیز به عنوان استاندارد استفاده گردید. درنهایت، مقدار بهداماندازی رادیکال DPPH با رابطه (۱) زیر محاسبه شد.

رابطه (۱):

$$\left[\frac{\text{Ab}_{\text{As}}}{\text{Ab}} \right] \times 100 = \left[\frac{\text{Ab}_{\text{As}}}{\text{Ab}} \right] \times 100$$

$\text{As} = \text{جذب نمونه یا استاندارد}$ $\text{Ab} = \text{جذب بلانک}$



شکل : نقشه منطقه مورد مطالعه

روش تهیه عصاره:

براساس نتایج اعلام شده در مورد انتخاب بهترین حلال برای استخراج ترکیب‌های فنول، فلاونوئید و آنتی کسیدان از منابع گیاهی، از متانول به عنوان بهترین حلال برای عصاره‌گیری استفاده شد. به همین منظور، برگ، میوه و بذر پودر شده کاکتوس به مدت 24 ساعت با متانول خالص به نسبت $1:10$ (حجمی: وزنی) روی شیکر در دمای اتاق عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل با استفاده از کاغذ صافی (Whatman# 42) صاف گردید.

ب: استخراج ترکیب‌های فنول، فلاونوئید و آنتی کسیدان اندازه‌گیری محتوای تام فنولی و فلاونوئیدها:

مقادیر فنول تام با روش فولین سیو-کالتیو اندازه‌گیری شد (۴۱). عصاره متانولی با غلظت 10 mg/ml تهیه شد. 0.5 ml لیتر از عصاره هر کدام از اندام‌ها با $2/5$ میلی‌لیتر 0.2 ml نرمال فولین سیو-کالتیو مخلوط و به مدت 5 دقیقه هم زده شد. سپس 2 ml لیتر محلول کربنات سدیم 20 درصد با غلظت 75 g/m در لیتر اضافه شد. جذب

تجزیه و تحلیل آماری:

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS^{Ver.20} انجام شد.

رابطه (۱):

$$CP = \%N \times \frac{6}{25}$$

رابطه (۲):

(وزن ظرف همراه با رسوب پس از سوختن) - (وزن ظرف همراه با گیاه پیش از سوختن) = وزن ADF

$$ADF = 100 \times (\text{وزن ADF} / \text{وزن اولیه نمونه})$$

رابطه (۳):

$$DMD\% = \frac{83/58 - 0/824}{824} \times 100 = 2/626$$

رابطه (۴):

$$ME (\text{Mcal/kg}) = DMD \% \times 0.17 - 2$$

اندازه‌گیری فاکتورهای کیفیت علوفه:

به منظور بررسی شاخص‌های کیفیت علوفه از جمله دیواره‌ی سلولی عاری از همی‌سلولز (ADF)، انرژی متابولیسمی (ME^۱، هضم‌پذیری ماده خشک (DMD)^۲ و پروتئین خام (CP^۳) در آزمایشگاه، از روش‌های مختلفی استفاده شد. بدین صورت که شاخص پروتئین خام (CP) بر اساس ازت (N) به دست آمده با استفاده از روش کجلدال و طبق رابطه (۱) (۲۴)، دیواره سلولی عاری از همی‌سلولز (ADF) با استفاده از دستگاه فایبرتیک رابطه (۲) (۱)، هضم‌پذیری ماده خشک (DMD) رابطه (۳) و انرژی متابولیسمی (ME) رابطه (۴) با استفاده از روش اودی^۴ و همکاران (۱۹۸۳) اندازه‌گیری شد. کلیه آزمایشات مربوط به اندازه‌گیری شاخص‌های کیفیت علوفه در آزمایشگاه تغذیه دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد.

جدول ۱: مقایسه شاخص‌های کیفیت علوفه با استفاده از تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن

اندام‌های گیاهی			شاخص‌های کیفیت علوفه
میوه	برگ	بذر	
۷/۳±۱۴/۴۹ ^c	۱۳/۴±۱۲/۸۳ ^b	۲۴/۳±۷۹/۵۹ ^a	پروتئین خام (CP) (%)
۲۹/۴±۸۴/۳۹ ^a	۲۶/۱۳±۴۰/۵۱ ^a	۳۴/۱۴±۶۲/۷۵ ^a	هضم‌پذیری ماده خشک (DMD) (%)
۳/۰±۰/۷/۷۴ ^a	۲/۲±۵۳/۲۳ ^a	۳/۲±۸۸/۵۰ ^a	انرژی متابولیسمی (ME Mcal/kg)
۶۵/۵±۳۰/۲۹ ^a	۶۹/۱۶±۵۵/۳۹ ^a	۵۹/۱۷±۷۲/۸۸ ^a	دیواره سلولی فاقد همی‌سلولز (ADF) (%)

جدول ۲: طبقه‌بندی مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه (۱)

مظلوبیت کم	درجه کیفیت	شاخص‌های کیفیت علوفه
مظلوب	خیلی مظلوب	
<۵	۷-۵	>۷ % CP
<۴۰	۶۰-۴۰	>۶۰ % DMD
<۵	۸-۵	ME (Mcal/kg)

اندام‌های برگ و میوه به ترتیب با مقادیر ۰/۲۴ و ۰/۳۱ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم و کمترین میزان فلاونوئید کل مربوط به بذر این گونه با ۰/۱۰ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم بود (جدول ۲). همچنین بیشترین میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به بذر و میوه با مقادیر ۶۹/۴۸ و ۶۹/۴۸ میکرو گرم بر میلی‌لیتر و کمترین میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی در برگ با ۲۱/۶۸ میکرو گرم بر

بررسی تغییرات متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف: نتایج تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه بین اندام‌های مختلف کاکتوس نشان داد که بیشترین میزان فل کل مربوط به اندام‌های برگ و میوه به ترتیب با مقادیر ۰/۴۲ و ۰/۳۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و کمترین میزان فل کل مربوط به بذر این گونه با ۰/۳۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم بود (جدول ۲). بیشترین میزان فلاونوئید کل مربوط به

⁴-Crude Protein

⁵-Oddy

¹-Acid Detergent Solution

²-Metabolism Energy

³- Dry Matter Digestibility

آنـتـیـاـکـسـیدـانـیـ بالـاـ وـ بـرـگـ درـ طـبـقـهـ باـ قـدـرـتـ آـنـتـیـاـکـسـیدـانـیـ مـتـوـسـتـ قـرـارـ مـیـ گـیرـدـ (ـجـدـولـ ـ۴ـ).

مـیـلـیـلـیـترـ بـودـ (ـجـدـولـ ـ۳ـ).ـ بـرـ اـسـاسـ اـینـ نـتـایـجـ،ـ قـدـرـتـ آـنـتـیـاـکـسـیدـانـیـ اـنـدامـهـاـیـ بـذـرـ وـ مـیـوـهـ درـ طـبـقـهـ باـ قـدـرـتـ

جدول ۳: مقایسه میزان متابولیت‌های ثانویه با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن

اندام‌های گیاهی		متabolیت‌های ثانویه	
میوه	برگ	بذر	
.۰/۰±۳۹/۰۰ ^a	.۰/۰±۴۲/۰۱ ^a	.۰/۰±۳۶/۰۳ ^b	فـنـوـلـ کـلـ (ـمـیـلـیـ گـرمـ گـالـیـکـ اـسـیدـ بـرـ گـرمـ)
.۰/۰±۳۱/۱۱ ^a	.۰/۰±۲۴/۰۵ ^a	.۰/۰±۱۰/۰۲ ^b	فـلـاـوـنـوـئـیدـ کـلـ (ـمـیـلـیـ گـرمـ کـوـرـتـسـتـیـنـ بـرـ گـرمـ)
۶۹/۲۵±۴۸/۱۸ ^a	۲۱/۹±۶۸/۳۸ ^b	۷۲/۳۶±۷۵/۱۴ ^a	قدـرتـ آـنـتـیـاـکـسـیدـانـیـ (ـمـیـکـرـوـ گـرمـ بـرـ مـیـلـیـ لـیـترـ)

حروف کوچک لاتین، معنی‌داری متابولیت‌های ثانویه را در هر سطر نشان می‌دهد

جدول ۴: طبقه‌بندی میزان آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی بر اساس وزارت کشاورزی ایالات متحده آمریکا (USDA)

متabolیت‌های ثانویه		طبقه‌بندی میزان آنتی‌اکسیدان	طبقه‌بندی میزان آنتی‌اکسیدان	
پایین	متوسط	بـالـاـ	خـیـلـیـ بـالـاـ	قدـرتـ آـنـتـیـاـکـسـیدـانـیـ (ـمـیـکـرـوـ گـرمـ بـرـ مـیـلـیـ لـیـترـ)
<۱۶	۳۱-۱۶/۶	۳۱/۴۰-۶/۴	۴۰/۸۴-۴/۵	

بودن میزان متابولیت‌های ثانویه را ز عوامل کاهنده‌ی ارزش غذایی گیاهان دانسته‌اند (۱). همچنین به نظر می‌رسد پوسته ضخیم پد (برگ مانند) و وجود خارهای درشت در ساختار برگ از دیگر عوامل موثر در کاهش میزان پروتئین خام برگ‌ها باشد (۱). از طرفی، با توجه به عدم معنی‌داری میزان ADF، DMD و ME بین اندام‌های مختلف، لیکن از نظر عددی و همراستا با میزان پروتئین، بیشترین میزان (۳/۸۸ Mcal/kg) DMD و ME به ترتیب (۳۴/۶۲ درصد) و (۲/۸۸ درصد) را داشته‌اند، از ADF بیشتری (۶۹/۵۵ درصد) مربوط به بذور و کمترین میزان DMD و ME به ترتیب (۲۶/۴ درصد) و (۲/۵۳ Mcal/kg) مربوط به برگ‌ها بود که بیانگر اهمیت بالای بذور این گونه می‌باشد. همچنین اندام‌هایی که کمترین میزان DMD (۲۶/۴ درصد) و ME (۲/۵۳ درصد) را داشته‌اند، از ADF بیشتری (۴۲، ۴۳، ۴۰ و ۲۸) بزرگ‌تر بودند بنابراین، این نتایج در واقع مؤید ساختار خشبي برگ‌ها که در نتیجه آن کاهش میزان پروتئین خام، میزان هضم‌پذیری ماده خشک و انرژی متابولیسمی و بالعکس افزایش میزان درصد ADF است. اشرفتزاده و عرفانزاده (۱۳۹۲) نیز بیان داشته‌اند که بین شاخص‌های کیفیت علوفه (CP، DMD و ME) با ADF رابطه معکوسی برقرار است. با توجه به اینکه حداقل میزان پروتئین خام برای حفظ وضعیت گوارش نشخوارکنندگان در حالت نگهداری ۷ درصد ذکر شده است (۲) و همچنین میزان پروتئین خام در علوفه برای بیشتر علفخواران اهلی و وحشی

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اندام‌های مختلف کاکتوس (برگ، میوه و بذر) حاوی مقداری زیادی فنول کل، فلاونوئید کل، آنتی‌اکسیدان و پروتئین خام می‌باشند. از طرفی، طبق جدول USDA وزارت کشاورزی آمریکا، میزان آنتی‌اکسیدان در میوه و بذر کاکتوس در رده اندام‌های با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا قرار می‌گیرند (جدول ۴). اهمیت هر یک از اندام‌های مورد بررسی به تغییرات میزان متابولیت‌های ثانویه در آن اندام بستگی دارد، به طوریکه بالا بودن میزان فنول، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان، در میوه کاکتوس و همچنین تولید سالانه میوه آن که حدود ۵۰ تن در هکتار در شرایط مطلوب است (۴۳) اهمیت بهره‌برداری از این اندام را با توجه به میزان متابولیت‌های ثانویه آن نشان می‌دهد. در مطالعات متعددی ترکیب غذایی و فیتوشیمیایی میوه‌های گونه‌های مختلف کاکتوس مورد مطالعه قرار گرفته است (۴۰، ۴۲، ۴۳، ۲۸ و ۳۰).

برخی آزمایشات فیتوشیمیایی بر روی انواع میوه‌های کاکتوس بیانگر وجود خواص آنتی‌اکسیدانی، خواصی ضد التهابی، ضد سرطان، ضد ویروسی، ضد درد و فعالیت‌های ضد میکروبی آن می‌باشد (۳۸، ۳۸، ۱۱، ۱۴ و ۵۱). از طرفی، نتایج این بررسی گوبای آن است که در اندام‌هایی که میزان فنول و فلاونوئید کل بالا بود (برگ و میوه)، ارزش غذایی آن‌ها (پروتئین) پایین است. برخی از محققان، بالا

نتایج نشان داد که میزان فنول و فلاونوئید در پد کاکتوس بالا بود. به طور اصولی، بالا بودن فنول و فلاونوئید در راستای افزایش فعالیت آنتیاکسیدانی بیشتر می‌باشد، بنابراین احتمالاً ترکیبات شیمیایی دیگری در ساختار پدها وجود دارد که باعث کاهش اثر آنتیاکسیدانی پدها و همچنین ارزش پایین غذایی آن‌ها شده است. بر اساس مطالعات انجام شده، بیش از ۳۰ ترکیب پلی فنولی توسط محققان در پد‌های گونه‌های مختلف *Opuntia* شناسایی شده است (۴۵، ۴۶ و ۱۹) که این ترکیبات ممکن است باعث کاهش فعالیت آنتیاکسیدانی و ارزش غذایی پدها شده باشد. همچنین مصرف پد (برگ‌های خشک) به عنوان رژیم غذایی مکمل باعث افزایش سریع هورمون LDL در زنان و کاهش سطح کلسترول همراه با کاهش LDL می‌شود (۳۱). به علاوه بالا بودن خاصیت آنتیاکسیدانی میوه و بذر می‌تواند تحت تأثیر ترکیبات فنولی موجود در آن باشد. فنول‌ها و ترکیبات پلی‌فنولی مانند فلاونوئیدها به‌طور گستردگی در محصولات غذایی و دارویی یافت شده و نشانگر فعالیت آنتیاکسیدانی چشم‌گیر آنها است (۵۰). از طرفی فلاونوئیدها نقش موثری در کاهش برخی از بیماری‌ها دارند و به نوعی بالا بودن میزان متابولیت‌های فنول و فلاونوئید در اندام‌های برگ و میوه می‌تواند نقش و تأثیر بیشتر این دو اندام گیاهی در مبارزه با عوامل بیماریزا داشت (۲۲). کانیوگا و همکاران (۲۰۱۴) میوه‌های *O. stricta* را حاوی مقدار زیادی فنول کل و فلاونوئید کل دانستند که باعث افزایش فعالیت آنتیاکسیدانی و نقش مؤثر آنها در خاصیت ضد دیابتی می‌گردد. از طرفی، میزان فنل تام گیاهان دارویی، منابع غنی از آنتیاکسیدان‌های طبیعی هستند (۳۲). ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه خیلی از گیاهان، بویژه گیاهان دارویی می‌باشد. این ترکیبات، توان آنتیاکسیدانی بالایی دارند و از طرق مختلف، در حذف و جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های آزاد مؤثرند؛ به‌طوریکه این ترکیبات، رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و باعث رسوب عناصر اکسیدانی مانند آهن می‌شوند (۵۲ و ۵۳).

با توجه به نتایج بدست آمده از اندام‌های مختلف کاکتوس، پتانسیل آنتیاکسیدانی عصاره میوه و بذر کاکتوس بالاست، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره‌ها با کمک به انتقال الکترون باعث پایان یافتن

در حالت نگهداری ۷/۵ درصد گزارش شده (۳)، از این رو اندام‌های مختلف این گونه قابلیت تأمین پروتئین خام دام را دارند. از آنجایی که این گونه توان تحمل شرایط اکولوژیکی گسترده‌ای را دارد، بنابراین می‌توان از آن به عنوان تأمین‌کننده بخشی از نیاز غذایی دام و نیز به عنوان علوفه کمکی در مناطقی که گونه‌های گیاهی نمی‌توانند میزان پروتئین لازم رژیم غذایی دام‌ها را تأمین نماید، مد نظر قرار داد.

به‌طور کلی میوه‌های گلابی مانند کاکتوس می‌تواند به عنوان منبعی از کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی و ویتامین‌ها مورد استفاده قرار گیرد. همچنین ترکیبات متعددی از جمله پروتئین، چربی، فیبر و خاکستر در اندام‌های گونه *Opuntia ficus-indica* بیان شده است که بیانگر ارزش غذایی و فعالیت آنتیاکسیدانی بالای این میوه‌هاست (۴۴). به عنوان مثال، برخی از ترکیبات موجود در میوه‌های کاکتوس از جمله فیبر، نقش مفیدی در سلامت بدن دارد به‌طوریکه با سایر ترکیبات زیست فعال در پیشگیری از بیماری‌های مزمن عمل می‌کند (۲۰). همچنین سایر تحقیقات بر روی میوه‌های کاکتوس، حکایت از مقادیر بالای پتاسیم، کلسیم و منیزیم این میوه‌ها می‌باشد، در حالی که سطوح سدیم، آهن و فسفر، در حد معمولی در میوه‌های این گونه وجود دارد (۴۴). از طرفی میوه‌های کاکتوس حاوی مقادیر زیادی کلسیم و فسفر می‌باشند که نقش مهمی در استخوان‌ها دارند و می‌تواند به عنوان یک مخزن معدنی مورد توجه قرار گیرد. مصرف میوه‌های *O. stricta* با توجه به ارزش غذایی آن، می‌تواند به کاهش کمبود مواد مغذی بخصوص در مناطق خشک (آفریقا) که تأمین نیاز غذایی با مشکلات عدیدهای مواجه است، کمک کند (۳۶). در برخی از مطالعات، مصرف روزانه ۲ تا ۴ وعده میوه کاکتوس برای تأمین کربوهیدرات‌های بدن توصیه شده است (۴۸). بنابراین با توجه به نتایج سایر محققان و نتایج بدست آمده در این تحقیق که بیانگر پروتئین بیشتر بذور درون میوه نسبت به گوشت میوه و همچنین خاصیت آنتیاکسیدانی بالای بذر و میوه، بود، از این رو استفاده ترکیبی بذور و گوشت میوه می‌تواند در برگیرنده هر دو مزایای آنتیاکسیدانی بالا و پروتئین بالا باشد.

غذایی، دارویی و صنعتی استفاده کرد. به علاوه با توجه به مقاومت بالای این گونه به شرایط سخت محیطی از جمله خشکی، کم‌آبی و همچنین حضور این گونه در مناطق خشک و نیمه‌خشک که با کمبود منابع غذایی برای استفاده دام و انسان مواجه است، می‌توان از این گونه به عنوان علوفه کمکی جهت تعلیف دام به صورت جمع‌آوری، خشک و آسیاب نمودن آن و همچنین تغذیه انسان از میوه‌های این گیاه مد نظر قرار داد.

واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد می‌شود. عصاره متابولی بذر و میوه، منابع مفیدی برای تأمین منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی‌اند. بنابراین، با توجه به بالا بودن میزان آنتی‌اکسیدان کاکتوس‌های منطقه گرگان، انجام مطالعات بیشتر در زمینه آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده بر روی عصاره این گیاه، به منظور استخراج مواد مؤثره مهم موجود در آن و استفاده از آن در درمان بیماری‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو حائز اهمیت است و در صورت مطالعه بیشتر و به دست آوردن نتایج مطلوب، می‌توان از آن در فرآورده‌های

References

1. Arzani, H., 2009. Forage quality and requirement of grazing animal. Tehran University Press. 354 p. (In Persian).
2. Arzani, H., M. Basiri., F. Khatibi & G. Ghorbani, 2006. Nutritive value of some Zagros Mountain rangeland species. Journal of Small Ruminant Research, 65:128–135. (In Persian).
3. Arzani, H., J. Motamed., R. Yari., Y. Ghasemi Aryan & J. Khatir Nameni, 2013. Forage quality of important range species in Pashayloogh-e-Maravetapeh rangeland ecosystem in Golestan province, 1(1): 87-103. (In Persian).
4. Ashrafszadah, M. & R. Erfanzadeh, 2013. Relationship between forage quality and palatability of plant species in zarrin-Dasht rangelands. Iranian journal of Rangeland and Desert Research, 20(4): 756-768. (In Persian).
5. Astello-Garcia M. G., I. Cervantes & V. Nair, 2015. “Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia spp.* cultivars with different domestication gradient,” Journal of Food Composition and Analysis, 43: 119–130.
6. Benson, L., 1982. The Cacti of the United States and Canada. Stanford, California, USA: Stanford University Press, 1-1044.
7. Castellar, MR., J.M. Obón., M. Alacid & J.A. Fernández-López, 2003. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. Journal of Agric Food Chem, 51:2772–2776.
8. Castellar, MR., JM. Obón., M. Alacid & J.A. Fernández-López, 2006. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colorant from *Opuntia stricta* fruits. J Sci Food Agric, 86:122–128
9. Castellar, MR., JM. Obón., M. Alacid & J.A. Fernández-López, 2008. Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits for betalains concentration. Journal of Agric Food Chem, 56(11): 4253–4257.
10. Castellar, MR., F. Solano & J.M. Obón, 2012. Betacyanin and Other Antioxidants Production During Growth of *Opuntia stricta* (Haw.). Plant Foods Hum Nutr, 67:337–343.
11. Chang, S., H. Chiu-Lan & Y. Gow-Chin, 2008. The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. Food Chem., 106: 569-575.
12. Chang, Y.L., D.O. Kim, K.W. Lee., H.J. Lee & C.Y. Lee, 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and food chemistry, 50(13): 3713-3717.
13. Chung, Y.C., C.T. Chien., K.Y. Teng & S.T. Chou, 2006. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. Food Chemistry, 97: 418-425.
14. Coria-Cayupán, Y.S., M.J. Ochoa & M.A. Nazareno, 2011. Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia spp.* fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. Food Chem, 126: 514-519.
15. Dahmardeh, M., A. Ghanbari., B.A. Siah Sar & M. Ramroodi, 2010. Effect of planting ratio and harvest time on forage quality of maize in maize-cowpea intercropping, 41(3): 633-642. (In Persian).
16. Delgado-Vargas, F. & O. Jiménez-AparicioParedes-López, 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Crit Rev Food Sci Nutr, 40(3): 173–289.
17. Ellenberg, H., 1982. Opuntien-probleme und Wege zu deren Lösung. GTZ Report, 73. 2109. 4:1-62.
18. Felker, P., FC. Stintzing., E. Müssig., M. Leitenberger., R. Carle., T. Vogt & R. Bunch, 2008. Colour inheritance in cactus pear (*Opuntia ficusindica*) fruits. Ann Appl Biol, 152: 307–318.

19. Guevara-Figueroa, T., H. Jimenez-Islas & M.L. Reyes-Escogido, 2010. "Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia spp.*)," Journal of Food Composition and Analysis, 23(6): 525–532.
20. Guzmán-Maldonado, S.H., Herrera-Hernández, G., Hernández-Lopez, D., Reynoso-Carmacho, R., Guzmán-Tovar, A., F. Vaillant & P. Brat, 2010. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilized fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. Food Chem, 121: 381-386.
21. Henderson, L., 2001. Alien Weeds and Invasive Plants. Plant Protection Research Institute Handbook No. 12. Cape Town, South Africa: Paarl Printers.
22. Hertog, M.L.G., E.J.M. Feskens., P.H.C. Hollman., M.B. Katan & Kromhout, D, 1993. Dietary antioxidants flavonoids and the risk of coronary heart disease (the zutphen elderly study). Lancet, 342: 1007–1011.
23. Kartal, N., M. Sokmen., B. Tepe., D. Daferera., M. Polissiou & Sokmen, A, 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100(2): 584-589.
24. Kejeldahl, J., 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. Zeitschreft fur Analytics Chemise, 22: 366-1883.
25. Kumar Gupta, A. & M. Neelam, 2006. Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of chamomile capitula in paracetamol intoxicated albino rats. American Journal of Pharmacology and Toxicology, 1(1): 17-20.
26. Kunyanga, C.N., S. Strum., S. Graham & J.K. Imungi, 2009. Physico-chemical methods for preservation of *Opuntia* cactus fruit syrup: Empowerment of Maasai women in Laikipia, Kenya. Paper presented at the African Crop Science Society Conference on Science and Technology Supporting Food Security in Africa, Cape Town, South Africa.
27. Kunyanga, C.N., V. Vellingiri & K.J. Imungi, 2014. Nutritional quality, phytochemical composition and health protective effects of an under-utilized prickly Cactus fruit (*Opuntia stricta* Haw.) collected from Kenya. African Journal of Food, Agriculture Nutrition and Development, 14(7): 9561-9577.
28. Kutti, J.O., 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. Food Chem.; 85: 527-533.
29. Le Houérou, HN., 2002. Cacti (*Opuntia spp.*) as a fodder crop for marginal lands in the Mediterranean basin. Proceedings of the 4th International Congress on cactus pear and cochineal. Acta Horticulturae, 581:21-46.
30. Lee, J.C. & K.T. Lim, 2000. Effects of cactus and ginger extract as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid level. Food Sci. Biotechnol, 9: 83- 88.
31. Linarès, E., C. Thimonier & M. Degre, 2007. "The effect of Ne *Opuntia* on blood lipid parameters—risk factors for the metabolic syndrome (syndrome X)," Advances in Therapy, 24(5): 1115–1125,
32. Lloyd, D.R. & D.H. Phillips, 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. Mutat Res, 424(1-2): 23-36.
33. Malan, D.E., 1989. Australian pest pear. Weeds A.29, Government Printer, Pretoria, South Africa, 2 pp.
34. Mann, J., 1970. Cacti naturalized in Australia and their control. Brisbane, Australia: Department of Lands.
35. Middleton, K., 1999. Who killed 'Malagasy Cactus'? Science, environment and colonialism in southern Madagascar (1924-1930). Journal of Southern African Studies, 25:215-248.
36. Ministry of Public Health Services [Kenya] and Save the Children UK, Report on Nutrition Situation in Kenya. Latest draft, May, 2011.
37. Moreno, D.A., C. García-Viguera., J.I. Gil & A. Gil-Izquierdo, 2008. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutricional health. Phytochem Rev, 7: 261–280
38. Moussa-Ayoub, T.E., S.K. El-Samahy., S. Rohn & L.W. Kroh, 2011. Flavonols, betacyanins content and antioxidant activity of cactus *Opuntia macrorhiza* fruits. Food Res Int, 44: 2169-2174.
39. Obón, J.M., M.R. Castellar., M. Alacid & J.A. Fernández-López, 2009. Production of a red-purpled food colorant from fruits by spray drying and its application in food model systems. J Food Eng, 90:471–479.
40. Oddy, V.H., G.E. Robards & S.G. Low, 1983. Prediction of In-vivo Dry Matter Digestibility from the Fiber and Nitrogen Content of a Feed, In Feed Information and Animal Production. eds Roberds G.E. and Packham R.G. Commonw Ealth Agriculture Bureaux, Australia, 395-398. Pp.
41. Ordóñez, A.A.L., J.D. Gomez & M.A. Vattuone, 2008. Antioxidant activities of *Sechium edule* swartz extracts. Food Chemistry, 97: 452-458.
42. Piga, A., A. Del Caro., I. Pinna & M. Agabbiro, 2003. Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. LWT Food Sci Technol, 36: 257-262.
43. Ramadan, M.F. & J.T. Morsel, 2003. Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). Food Chem, 82: 339-345.

44. Sepulveda, E. & C. Saenz, 1990. Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 30: 551-555.
45. Stintzing, F.C. & R. Carle, 2005. "Cactus stems (*Opuntia spp.*): a review on their chemistry, technology, and uses," Molecular Nutrition & Food Research, 49(2):175–194.
46. Stintzing, F.C., K.M. Herbach & M.R. Mosshammer, 2005. "Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones," Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(2): 442-451.
47. Tesoriere, L., D. Butera., M. Allegra., M. Fazzari & M.A. Livrea, 2005. Distribution of betalain pigments in red blood cells alter consumption of cactus pear fruits an increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. Journal of Agric Food Chem, 53: 1266-1270.
48. USDA., 2010. Downloaded from <http://www.mypyramid.gov/>. Accessed on 8th October, 2013.
49. USDA-ARS., 2007. Germplasm Resources Information Network (GRIN). Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>.
50. Van Acker, S.A.B.E., D.J. Van Den Berg., M.N.J.L. Tromp., D.H. Griffioen., W.P. Van Bennekom & W.J.F. Van der Vijgh, 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavanoids. Free Radical Biology and Medicine, 20(3): 331-342.
51. VanderJagt, T.J., R. Ghattas., DJ. Vander-Jagt Crossey & RH. Glew, 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. Life Sci, 70: 1035-1040.
52. Williams, R.J., J.P. Spencer & C. Rice-Evans, 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic Biol Med, 36(7): 838-49.
53. Wong, C.C., H.B. Li., K.W. Cheng & F. A. Chen, 2006. Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chem, 97(4): 705-711.