

اثرهای تنش شوری و آهن بر رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و باندهای الکتروفورزی بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و بابونه رومی (*Anthemis nobilis* L.)

سیمین سارانی^۱، مصطفی حیدری^{۲*}، محمد گلوی^۳ و براتعلی سیاه‌سر^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت، دانشگاه زابل

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی شاهرود، پست الکترونیک: Haydari2005@gmail.com

۳- دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه زابل

۴- استادیار، گروه زراعت، دانشگاه زابل

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۹

چکیده

به منظور بررسی اثرهای تنش شوری در حضور و عدم حضور عنصر آهن بر رشد، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و نیز تغییرات باندهای الکتروفورزی دو جنس بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) و بابونه رومی (*Anthemis nobilis* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۸۸ در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل دو جنس بابونه آلمانی و رومی به عنوان فاکتور A، چهار سطح شوری ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم به عنوان فاکتور B و دو سطح تیمار آهن شامل ۰ و ۱۰۰ میکرومولار به عنوان فاکتور C در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که با افزایش شوری از شاهد تا ۱۵۰ میلی‌مولار، از وزن تر و خشک اندام‌های هوایی کاسته و بر وزن تر و خشک ریشه افزوده شد. تیمار کمبود آهن نیز از وزن تر و خشک هر دو بخش هوایی و ریشه دو جنس بابونه کاست. البته تأثیر شوری بر رنگیزه‌های فتوسنتزی همراه با کاهش مقادیر کلروفیل a و b و افزایش مقدار کارتنوئیدها بود. در نبود آهن از میزان کلروفیل a به میزان ۳۲/۹٪ و کلروفیل b معادل ۳۵/۵٪ نسبت به تیمار شاهد (حاوی ۱۰۰ میکرومولار آهن) کاسته شد. هر چند در دو سطح شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار یک باند ۴۲ کیلودالتونی در جنس بابونه رومی سنتز شد، اما در بالاترین سطح شوری (۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم) بیشتر باندهای پروتئینی آن حذف شدند. احتمالاً سطح ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم خارج از تحمل بابونه رومی می‌باشد. در این بین، در بابونه آلمانی تحت تنش شوری و کمبود آهن هیچ باندهای حذف نشد و دو باند ۱۴ و ۱۸ کیلودالتونی نیز در آن ظاهر شدند.

واژه‌های کلیدی: بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.)، بابونه رومی (*Anthemis nobilis* L.)، شوری، آهن، رنگیزه‌های فتوسنتزی، الگوی الکتروفورزی.

مقدمه

شوری یکی از عوامل مهم کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی به خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک دنیاست. واکنش معمول گیاهان به بالا رفتن غلظت نمک در محیط ریشه تنش اسمزی، سمیت یونی و کمبود عناصر غذایی است. شوری همچنین منجر به ایجاد تغییراتی در متابولیسم گیاهان می شود (Munns, 1993). کم شدن پتانسیل آب در محیط ریشه، سمیت برخی از یونها همانند Na^+ و Cl^- و نیز عدم تعادل عناصر غذایی در بخش هوایی به واسطه بر هم خوردن جذب عناصر غذایی از عوامل مهم کاهش رشد گیاهان در این شرایط به شمار می رود (Marschner, 1995). کاهش بیوماس تولیدی، کم شدن کارایی فتوسنتز و تغییر در میزان تورگر برگ از اثرات اولیه شوری در گیاهان است (Munns, 2002).

بر هم خوردن تعادل عناصر غذایی به واسطه حضور مقادیر فراوان یونهای Na^+ و Cl^- در محیط ریشه می تواند منجر به تغییرات زیادی در فرایندهای متابولیسمی گیاهان گردد. در این بین شوری تأثیر سوئی بر جذب عناصر غذایی پر مصرف و کم مصرف دارد. عنصر آهن یکی از عناصر غذایی مهم است که جذب آن در حضور شوری دچار اختلال می شود (Grattan & Grieve, 1999). کمبود عنصر آهن در بخش های هوایی و زیرزمینی می تواند سبب تغییرات زیادی در رشد و نمو گیاهان شود (Marschner, 1995). عنصر آهن نقش بسیار مهمی در توسعه کلروپلاست، دریافت انرژی نورانی و انتقال الکترون از آب به $NADP^+$ دارد (Grattan & Grieve, 1999). رنگدانه های دریافت کننده نور در کلروپلاست گیاهانی که تحت شرایط کمبود آهن قرار می گیرند کاهش می یابد و بین رگبرگ های آنها زرد می شود. عنصر آهن همچنین در

انتقال الکترون در فتوسیستم I تأثیر فراوانی دارد. مطالعات نشان داده، کمبود آهن در کاهش تبادل گازی، هدایت روزنه ای، کارایی مصرف آب و افزایش تعرق تأثیر فراوانی دارد (Bertamini et al., 2004). عنصر آهن یک کوفاکتور مهم برای تعدادی از آنزیم هاست که در مسیر بیوسنتز کلروفیل نقش دارند (Briat & Lobreaux, 1998). در اثر کمبود آهن غلظت پروتئین ها و کلروفیل در برگ ها کاهش می یابد (Bisht et al., 2002).

سنتز پروتئین ها در پاسخ به تنش های محیطی همانند گرما، تنش خشکی، سرما، شوری و کمبود آهن تغییر می کند. چنین تنش هایی سبب افزایش سنتز برخی از پروتئین ها و کاهش سنتز عده ای دیگر از آنها می شود. به نظر می رسد که پروتئین های القا شده با شوری می توانند در تحمل به این تنش مؤثر باشند. تاکنون یک سری از پروتئین هایی که در ژنوتیپ های مقاوم به شوری در برخی از گیاهان همانند جو وجود دارند، شناسایی شده اند (Guo et al., 2001). مقاومت به شوری در بسیاری از گیاهان همانند خانواده گراس ها حاصل همکاری چند عامل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است (Hamilton et al., 2000). یکی از این عوامل ممکن است توانایی اتصال یون ها به پروتئین ها باشد. پروتئین های متفاوتی پس از تیمار شوری در بخش های مختلف گیاهان القا می شوند. تنش خشکی و شوری، mRNA های ترجمه شده در ریشه چه های جنینی بذر گندم را تغییر داده و سبب افزایش چشمگیری در برخی از پروتئین ها می شود (Dell'Aquila, 1992). در بین گیاهان دارویی، بابونه یکی از قدیمی ترین و پرمصرف ترین گیاهان دارویی شناخته شده در جهان است و از معدود گیاهانی است که جنبه صنعتی پیدا کرده است. منشأ این گیاه را آسیای صغیر

رنگیزه‌های فتوسنتز و نیز تعیین تغییرات ایجاد شده در الگوهای الکتروفورزی دو جنس بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) و رومی (*Anthemis nobilis L.*) بوده است.

مواد و روشها

به منظور بررسی اثر کمبود آهن بر رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و الگوی الکتروفورزی پلی‌پپتیدها دو جنس بابونه آلمانی و رومی تحت تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل در سال ۱۳۸۸ اجرا گردید. در این تحقیق تیمارهای آزمایش شامل دو جنس بابونه آلمانی و رومی به عنوان فاکتور A؛ چهار سطح شوری ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم به عنوان فاکتور B و دو سطح تیمار آهن شامل سطح ۰ و ۱۰۰ میکرومولار به عنوان فاکتور C در نظر گرفته شدند.

به منظور انجام کار، ابتدا بذره‌های دو جنس بابونه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی، سپس در گلدان‌هایی با قطر ۲۰ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری که از قبل سوراخ‌هایی در ته آنها به منظور زهکش تعبیه شده و از ماسه شسته شده پر شده بودند، کشت شدند. تا قبل از جوانه‌زنی همه گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شده و بعد از جوانه‌زنی به وسیله محلول غذایی تغذیه شدند.

محلول غذایی شامل ۰/۷ میلی‌مولار K_2SO_4 ، ۰/۱ میلی‌مولار KCl ، ۲ میلی‌مولار $Ca(NO_3)_2$ ، ۰/۵ میلی‌مولار $MgSO_4$ ، ۰/۱ میلی‌مولار KH_2PO_4 ، ۱۰ میکرومولار H_3BO_3 ، ۰/۵ میکرومولار $MnSO_4$ ، ۰/۵ میکرومولار $ZnSO_4$ ، ۰/۲ میکرومولار $CuSO_4$ و ۰/۰۱ میکرومولار $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ بودند (Mori, 1999).

دانسته‌اند ولی در تمام نقاط جهان به صورت خودرو می‌روید. در ایران نیز گونه‌های مختلف جنس ماتریکاریا در نقاط مختلف کشور رشد می‌کند. بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) گیاهیست یکساله، علفی، با ارتفاع ۳۰ تا ۷۰ سانتی‌متر، دارای برگ‌های بریده بریده و سوزنی‌شکل که به طور متناوب بر روی ساقه قرار دارند. گل‌ها به صورت گل‌آذین کاپیتول، که دو نوع گلچه در گل‌آذین دیده می‌شود؛ گلچه‌های زبانه‌ای به رنگ سفید که از نظر جنسی ماده هستند و گلچه‌های لوله‌ای به رنگ زرد که دوجنسی می‌باشند. میوه‌اش فندقه‌ی خاکستری رنگ به طول ۱ تا ۱/۵ میلی‌متر که وزن هزار دانه‌اش ۰/۰۲ تا ۰/۰۳ گرم است. دو جنس دیگر هم در ایران به بابونه معروف هستند که عبارتند از: بابونه رومی (*Anthemis nobilis*) که دارای خصوصیت‌های متفاوت از بابونه آلمانی است. گیاهی چندساله است با برگ‌های کرک‌دار و اسانس آن به رنگ سبز مایل به زرد است ولی از نظر ظاهری شباهت زیادی به بابونه آلمانی دارد (Khalil Poor, 2006).

تاکنون تحقیقاتی در رابطه با اثر تنش شوری بر روی برخی از گیاهان دارویی همانند بابونه انجام شده است، اما در ارتباط با اثر متقابل شوری و عناصر کم مصرف همانند آهن بر روی این گیاه گزارشی مشاهده نشده است. با توجه به این‌که کشور ما از دو مشکل شوری و خشکی در بیشتر اراضی خود رنج می‌برد و این تنش‌ها می‌توانند بر جذب عناصر غذایی در گیاهان تأثیر سوء داشته باشند، بنابراین ارزیابی گیاهان و یافتن مکانیسم‌های مقاومت در آنها جهت حصول عملکرد بالا ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این آزمایش بررسی اثرات سطوح مختلف شوری در شرایط حضور و عدم حضور عنصر آهن بر چگونگی رشد، میزان

۲- بافر ژل پایین، ۳- بافر ژل بالا، ۴- بافر الکتروود (بافر مخزن)، ۵- پرسولفات آمونیوم ۱۰٪ و ۶- تیمید ۱۰٪.

ژل زیرین

ژل زیرین دستگاه به صورت زیر تهیه می‌شود: ۲۰ میلی‌لیتر از بافر ژل پایین و ۲۵/۹۷ میلی‌لیتر از محلول اکریل آمید را در یک بشر ریخته، سپس ۳۳/۰۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه می‌شود. در نهایت ۸۰۰ میکرولیتر پرسولفات آمونیوم و ۳۵۵/۵ میکرولیتر تیمید به آن اضافه خواهند شد. انعقاد ژل پایین در دستگاه حدود ۴۵ دقیقه طول خواهد کشید و ژل منعقد شده به وضوح از آب مقطر روی آن (به دلیل تفاوت در ضریب شکست نور) قابل تشخیص می‌باشد. غلظت ژل پایین باید در حد ۱۰٪ باشد. پس از انعقاد ژل پایین، محلول ژل بالا بشرح زیر آماده می‌شود: ۲/۵ میلی‌لیتر بافر ژل بالا و ۱/۳ میلی‌لیتر محلول اکریل آمید در بشر ریخته، سپس ۶/۱ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه می‌گردد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر پرسولفات آمونیوم و ۳۰ میکرولیتر تیمید به آن اضافه و پس از مخلوط شدن و هواگیری روی ژل پایین می‌ریزند؛ سپس شانه را در ژل بالا فرو برده، به طوری که دندان‌های آن حدود ۱/۵ سانتی‌متری از سطح ژل پایین فاصله داشته باشد. این ژل پس از ۲۰ دقیقه منعقد خواهد شد. در نهایت شانه‌ها را برداشته و سینی الکتروود را داخل مخزن می‌گذارند تا نمونه‌های پروتئینی داخل چاهک‌های تشکیل شده تزریق گردد. البته غلظت ژل بالا باید ۴٪ باشد.

تزریق نمونه‌های پروتئینی

۱- قبل از لود کردن نمونه‌ها، ژل باید به مدت ۱۵ دقیقه با آمپر ثابت ۳۰ میلی‌آمپر پیشران شود، ۲- در این

تیمارهای شوری و آهن به همراه محلول غذایی هفته‌ای سه بار به گیاهان داده می‌شد. یک ماه پس از اعمال تنش شوری و آهن گیاهان از سطح گلدان‌ها برداشت شدند. پس از برداشت گیاهان وزن تر اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری، سپس جهت اندازه‌گیری وزن خشک، این اندام‌ها به آن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت منتقل گردیدند. اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل a, b و میزان کارتونید از بافت تر برگ‌ها، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد.

استخراج پروتئین و الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی

ابتدا برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین کل نمونه‌های برگ و ریشه گیاهان از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. پس از مشخص شدن غلظت پروتئین‌های مجهول، الکتروفورز انجام شد. در این روش با معرف برادفورد (شامل ۰/۱ گرم کوماسی G-۲۵۰، ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵٪، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ در حجم نهایی یک لیتر) غلظت پروتئین براساس غلظت‌های مشخص آلومین سرم گاوی (سیگما) اندازه‌گیری شد. در این روش با استفاده از جذب غلظت‌های مختلف آلومین سرم گاوی در دامنه ۱-۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر منحنی استاندارد رسم گردید و براساس منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

محلول‌های مورد نیاز برای الکتروفورز

برای تهیه محلول‌های مورد نیاز برای الکتروفورز از روش مصطفایی (۱۳۸۲) استفاده گردید که شامل موارد زیر می‌باشد: ۱- محلول استوک اکریل آمید (۳۰/۸٪)،

میانگین داده‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۰.۵٪ نشان داد که جنس رومی به ترتیب دارای ۱۴، ۱۷ و ۱۹ درصد وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر ریشه بیشتری نسبت به جنس آلمانی است (جدول ۲). با افزایش سطح شوری از شاهد تا ۱۵۰ میلی‌مولار نمک NaCl وزن تر و خشک اندام هوایی به ترتیب ۴۴ و ۵۰ درصد کاهش، اما وزن تر و خشک ریشه به ترتیب ۴۶ و ۵۶ درصد افزایش یافت (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس مربوط به اثر متقابل جنس و شوری تنها در مورد وزن خشک ریشه معنی‌دار شد، اما در مورد اثر متقابل جنس و آهن تأثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک ریشه مشاهده نشد (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل جنس و آهن نشان داد که در طی استفاده از آهن در مقایسه با تیمار شاهد وزن تر و خشک ریشه در بابونه آلمانی به ترتیب ۵۶/۶ و ۶۴/۵ درصد افزایش یافت و وزن تر و خشک ریشه بابونه رومی ۵۶/۷٪ و ۴۱٪ افزایش نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲). در بین دو جنس بابونه مورد مطالعه در این آزمایش، جنس آلمانی از وزن خشک ریشه بیشتری در بالاترین سطح شوری برخوردار بود (جدول ۲).

رنگ‌بندی‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان می‌دهد که تنش شوری تأثیر معنی‌داری بر مقادیر سه رنگ‌بندی کلروفیل a، b و میزان کارتنوئید در گیاه بابونه دارد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش سطح تنش از شاهد به ۱۵۰ میلی‌مولار از میزان دو رنگ‌بندی کلروفیل a و b کاسته و بر مقدار کارتنوئید افزوده شد. میزان کاهش برای کلروفیل a و b به ترتیب معادل ۲۷/۹٪ و ۳۱/۴٪ و میزان افزایش برای کارتنوئید برابر ۲۸/۷٪ بود (جدول ۲).

آزمایش مقدار پروتئین لود شده در چاهک‌ها بر حسب غلظت ۱۵۰ میکروگرم بود که با توجه به اینکه غلظت نمونه‌های پروتئینی متفاوت بود ابتدا براساس غلظت مورد نظر از نمونه‌های پروتئینی برداشته، سپس ۱۵ میکرولیتر از بافر استخراج به آن اضافه شد، ۳- از مارکر وزنی (SM0661) که ۱۰ تا ۲۰۰ کیلودالتون بود به مقدار ۱۰ میکرولیتر در چاهک اول لود گردید و ۴- تانک الکتروفورز به دستگاه منبع تغذیه جریان مستقیم الکتریسته وصل شد. در این مرحله پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی در طول ژل حرکت می‌کنند.

رنگ‌آمیزی ژل

پس از اتمام الکتروفورز، ژل به آرامی از شیشه‌ها جدا و بعد به مقدار کافی محلول ثبوت به آن اضافه و به مدت یک ساعت روی شیکر با حرکت آرام قرار می‌دهند، ۲- سپس محلول ثبوت به‌طور کامل تخلیه و به آن مقدار کافی محلول رنگ‌آمیزی اضافه و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با حرکت آرام قرار می‌دهند و ۳- پس از آن با آب مقطر چندین بار شسته تا زمینه ژل شفاف گردد. در این آزمایش داده‌های بدست‌آمده با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۰.۵٪ محاسبه شدند.

نتایج

وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین جنس، شوری و تیمار کودی آهن در مورد وزن تر و خشک گیاه بابونه وجود دارد. مقایسه

در شرایط نبود آهن، باندهای ۶۶، ۶۰، ۵۵، ۵۰، ۴۱، ۳۵، ۳۲ و ۲۸ کیلودالتونی حذف و باند ۲۹ کیلودالتون سنتز شد. در این بین زمانی که گیاه در شرایط نبود آهن و سطح شوری ۵۰ میلی مولار قرار گرفت، علاوه بر حذف باندهای بالا، باند ۲۳ کیلودالتونی نیز حذف و باند جدید ۴۲ و ۱۵ کیلودالتون در آن سنتز شدند. در تیمار تنش آهن و شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار، باندهای ۶۶، ۶۰، ۵۵، ۵۰، ۴۱، ۳۲، ۲۸، ۲۲ و ۲۰ حذف و باندهای ۴۲، ۴۰، ۳۷ و ۱۵ کیلودالتون سنتز شدند (شکل ۳).

الگوی الکتروفورزی برگ‌های بابونه آلمانی

باندهای ظاهر شده در الگوی الکتروفورزی برگ‌های بابونه آلمانی بین ۴۸-۱۴ کیلودالتون بودند (شکل ۴) که نسبت به بابونه رومی باندهایی با وزن مولکولی پایین‌تری سنتز نمود. در بابونه آلمانی تحت تنش شوری و کمبود آهن هیچ باندهای حذف نشد و دو باند ۱۸ و ۱۴ کیلودالتونی ظاهر شدند (شکل ۴). بابونه آلمانی در مقایسه با بابونه رومی، باندهای کمتری سنتز نمود و الگوی الکتروفورزی آن از تنوع کمتری برخوردار بود. شاید دلیل آن، مقاوم بودن بابونه آلمانی به تنش شوری نسبت به بابونه رومی باشد. زیرا گیاهان وقتی در معرض تنش قرار می‌گیرند برای اینکه بتوانند مقاومت کنند یکسری از پروتئین‌های خود را حذف و یا پروتئین جدید سنتز می‌کنند.

الگوی الکتروفورزی ریشه بابونه رومی

در ریشه بابونه رومی باندهای ظاهر شده از الگوی الکتروفورزی بین ۴۷-۱۵ کیلودالتون بودند (شکل ۵). در تیمار شوری ۵۰ میلی مولار نمک، باندهای ۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۲، ۲۱، ۱۹، ۱۸ و ۱۵ کیلودالتونی در مقایسه با

در این آزمایش تفاوت معنی داری بین تیمار آهن و دو جنس بابونه از لحاظ این سه رنگیزه وجود داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که هر چند بابونه آلمانی دارای بیشترین میزان کلروفیل b است اما بیشترین میزان کلروفیل a و مقدار کارتنوئید در بین دو جنس مربوط به جنس رومی می‌باشد (جدول ۲). در نبود آهن در این آزمایش از میزان کلروفیل a به مقدار ۳۲/۹٪ و کلروفیل b معادل ۳۵/۵٪ نسبت به تیمار شاهد (حاوی ۱۰۰ میکرومولار آهن) کاسته شد. برخلاف کلروفیل‌ها، در تیمار نبود آهن بر مقدار کارتنوئیدها افزوده شد (جدول ۲).

الگوی الکتروفورزی برگ‌های بابونه رومی

در بررسی باندهای ظاهر شده از الگوی الکتروفورزی بابونه رومی مشاهده گردید که وزن مولکولی باندهای ظاهر شده بین ۶۶-۱۵ کیلودالتون می‌باشد (شکل ۳). در این بین در سطح شوری شاهد، بابونه آلمانی در بخش هوایی خود دارای تعداد پروتئین بیشتری نسبت به دیگر سطوح شوری بود. با بالا رفتن سطح شوری از ۵۰ به ۱۰۰ میلی مولار، باندهای ۶۶، ۶۰، ۵۵، ۵۰، ۴۱ و ۲۸ کیلودالتون که در گیاه شاهد وجود داشتند، حذف شدند و تنها یک باند ۴۲ کیلودالتونی در بابونه رومی سنتز شد. در بالاترین سطح شوری (۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم) علاوه بر باندهای بالا، باندهای ۴۳، ۳۵، ۳۲، ۳۰، ۲۷، ۲۵ و ۲۳ کیلودالتونی نیز حذف شده، و پروتئین جدیدی نیز سنتز نشد. بنابراین به نظر می‌رسد که در شوری ۱۵۰ میلی مولار مقاومت بابونه رومی شکسته شده، زیرا بسیاری از پروتئین‌های آن حذف و پروتئین جدیدی نیز در آن سنتز نگردید.

الگوی الکتروفورزی ریشه بابونه آلمانی

باندهای ظاهر شده در ریشه بابونه آلمانی بین ۵۷-۲۲ کیلودالتون بودند (شکل ۶). باندهای ۵۷ و ۵۳ کیلودالتون در همه تیمارها حذف شدند، همچنین در تنش همزمان شوری و کمبود آهن باندهای ۲۸ و ۲۷ کیلودالتون نیز حذف گردید. در گیاه شاهد و تیمار شوری ۵۰ میلی مولار باند ۲۵ کیلودالتونی سنتز، باند ۲۱ کیلودالتونی در شرایطی که گیاه در معرض همزمان شوری و کمبود آهن قرار گرفت، ظاهر شد (شکل ۶).

شاهد حذف شدند. در این بین در سطوح بالای شوری (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم) علاوه بر باندهای بالا، باند ۲۶ کیلودالتونی نیز حذف گردید. در تیمار نبود آهن، باند جدید ۲۹ و ۲۷ کیلودالتونی سنتز و باندهای ۲۳، ۲۱، ۱۸ و ۱۵ کیلودالتونی حذف شدند (شکل ۵). اثر همزمان شوری و کمبود آهن نیز باعث حذف باندهای ۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۲، ۲۱، ۱۹، ۱۸ و ۱۷ کیلودالتونی شد. ریشه بابونه رومی نیز همانند برگ آن، بسیاری از پروتئین های خود را از دست داد و فقط وقتی در معرض کمبود آهن قرار گرفت پروتئین جدید سنتز نمود.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات رشد و رنگیتهای فتوسنتزی در دو جنس بابونه

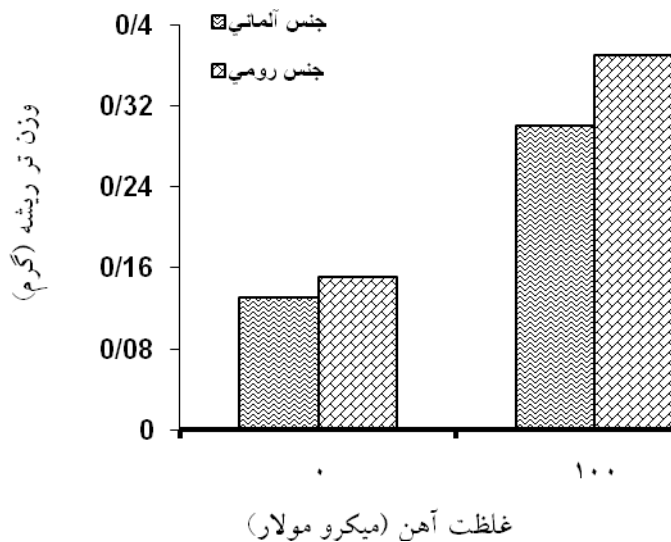
مقایسه میانگینها	درجه آزادی		منابع تغییرات	
	وزن تر	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک
وزن خشک	وزن تر	وزن تر	وزن خشک	وزن خشک
بخش هوایی	بخش هوایی	بخش هوایی	بخش هوایی	بخش هوایی
کارتونید	کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل a	کلروفیل b
۳/۸۷۱ **	۱/۲۶۵ **	۴/۲۰۹ **	۰/۰۰۰۰۲ ns	۰/۰۲۹۸ **
۴/۰۶۰ **	۴/۴۸۸ **	۱۹/۰۹۶ **	۰/۰۰۱۶۵ **	۰/۰۵۰۲ **
۳۰/۸۸۳۵ **	۳۵/۰۵ **	۱۵۵/۶۳ **	۰/۰۰۶۶۴ **	۰/۴۴۶۶ **
۰/۰۴۸ ns	۱/۱۸۸ *	۰/۲۳۷ ns	۰/۰۰۰۳۳ **	۰/۰۰۰۰۷ ns
۰/۰۸۶ ns	۱/۴۵۴ **	۰/۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۶۷ **	۰/۰۰۰۷۴ **
۰/۱۴۸ ns	۰/۱۱۰ *	۰/۱۰۸ ns	۰/۰۰۰۵۸ **	۰/۰۰۰۱ ns
۰/۲۱۱ *	۰/۰۱۲ ns	۰/۱۸۹ ns	۰/۰۰۰۴۳ **	۰/۰۰۰۰۹ ns
۰/۰۸۱	۰/۰۴۷	۰/۲۸۴	۰/۰۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۷
۶/۹۱	۵/۵۰	۵/۸۵	۸/۹۸	۱۱/۱۳
				۱/۲
				۱۶/۰۱
				ضرب تغییرات (%)

* و **، به ترتیب معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪ و ns، غیرمعنی دار است.

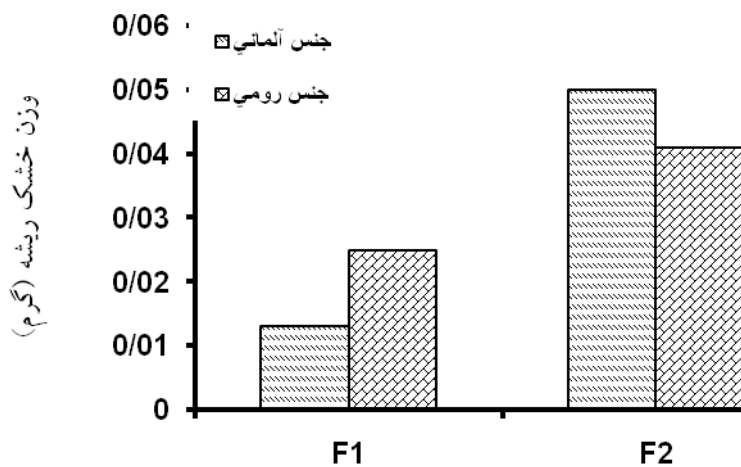
جدول ۲- مقایسه میانگین صفات رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی در دو جنس بابونه

صفت	ورن تر	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک	وزن تر	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنویید
	بخش هوایی	بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	ریشه	(میکروگرم در گرم وزن تر)	(میکروگرم در گرم وزن تر)	
جنس بابونه								
آلمانی	۰/۶۴ b	۰/۰۵ b	۰/۲۱ b	۰/۰۳۲ a	۰/۲۱ b	۸/۸۱ b	۴/۱۲ a	۳/۸۵ b
رومی	۰/۷۵ a	۰/۰۶ a	۰/۲۶ a	۰/۰۳۱ a	۰/۲۶ a	۹/۴۱ a	۳/۸۰ b	۴/۴۲ a
شوری (میلی مولار نمک NaCl)								
۰	۰/۹۳ a	۰/۰۸ a	۰/۱۷ d	۰/۰۲۱ d	۰/۱۷ d	۱۰/۵۱ a	۴/۶۱ a	۳/۴۰ d
۵۰	۰/۷۳ b	۰/۰۶ b	۰/۲۲ c	۰/۰۲۵ c	۰/۲۲ c	۹/۶۵ b	۴/۲۰ b	۴/۰۱ c
۱۰۰	۰/۶۲ c	۰/۰۵bc	۰/۲۵ b	۰/۰۳۱ b	۰/۲۵ b	۸/۶۹ c	۳/۸۷ c	۴/۳۴ b
۱۵۰	۰/۵۲ c	۰/۰۴ c	۰/۳۲ a	۰/۰۴۹ a	۰/۳۲ a	۷/۵۷ d	۳/۱۷ d	۴/۷۷ a
آهن (میکرو مولار)								
۰	۰/۴۵ b	۰/۰۴ b	۰/۱۵ b	۰/۰۲ b	۰/۱۵ b	۷/۳۱ b	۳/۱۰ b	۴/۹۳ a
۱۰۰	۰/۹۵ a	۰/۰۸ a	۰/۳۴ a	۰/۰۴ a	۰/۳۴ a	۱۰/۹۲ a	۴/۸۲ a	۳/۳۳ b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰.۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

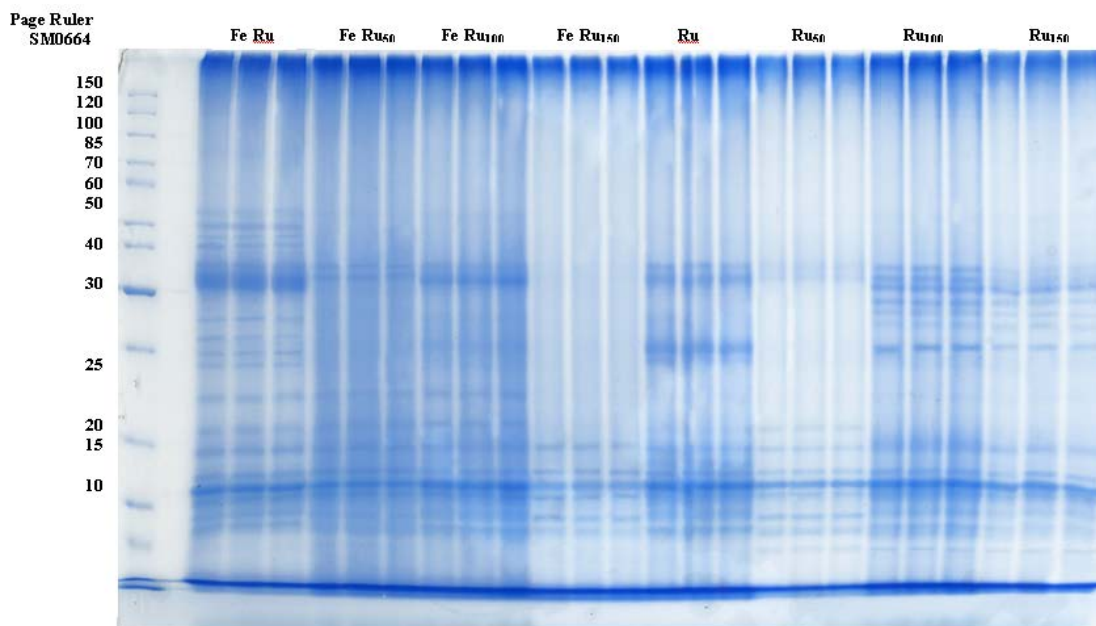


شکل ۱- اثر متقابل جنس و آهن بر روی وزن تر ریشه



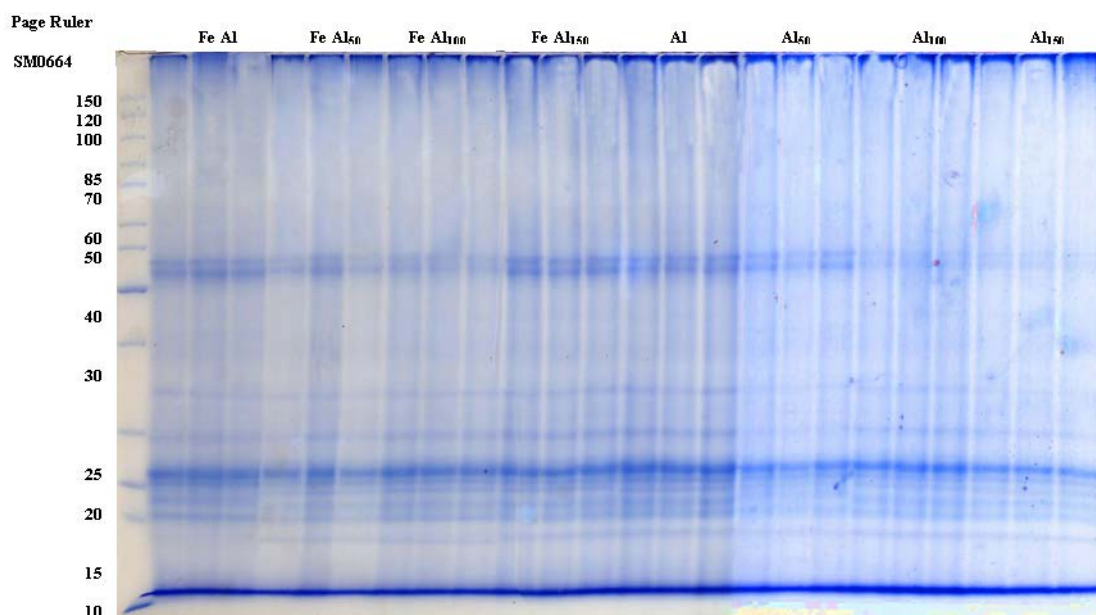
غلاظت آهن (میکرو مولار)

شکل ۲- اثر متقابل جنس و آهن بر روی وزن خشک و تر ریشه دو جنس بابونه

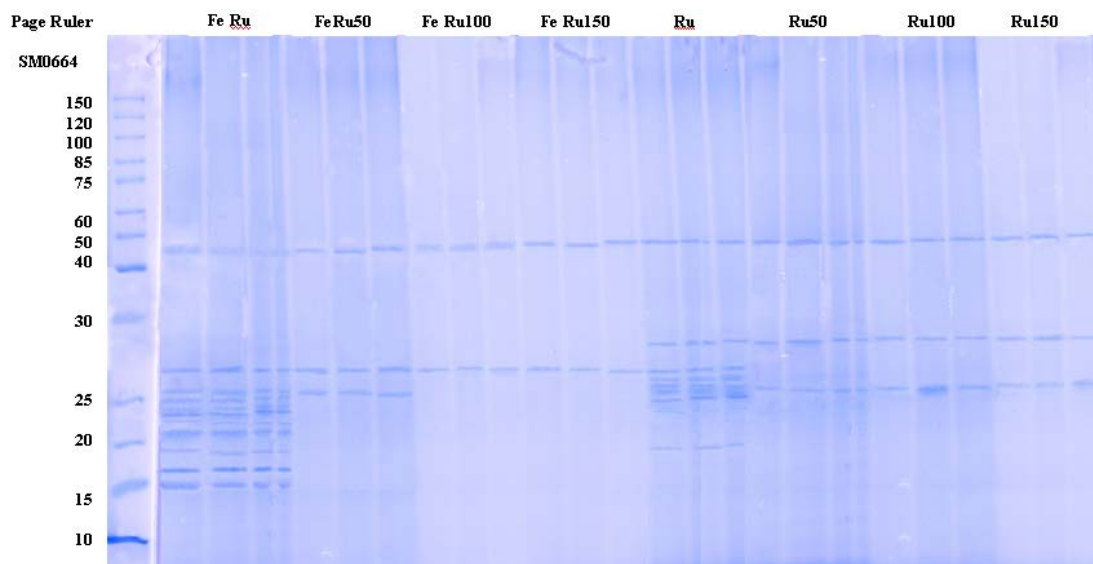


شکل ۳- الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئین برگ بابونه رومی

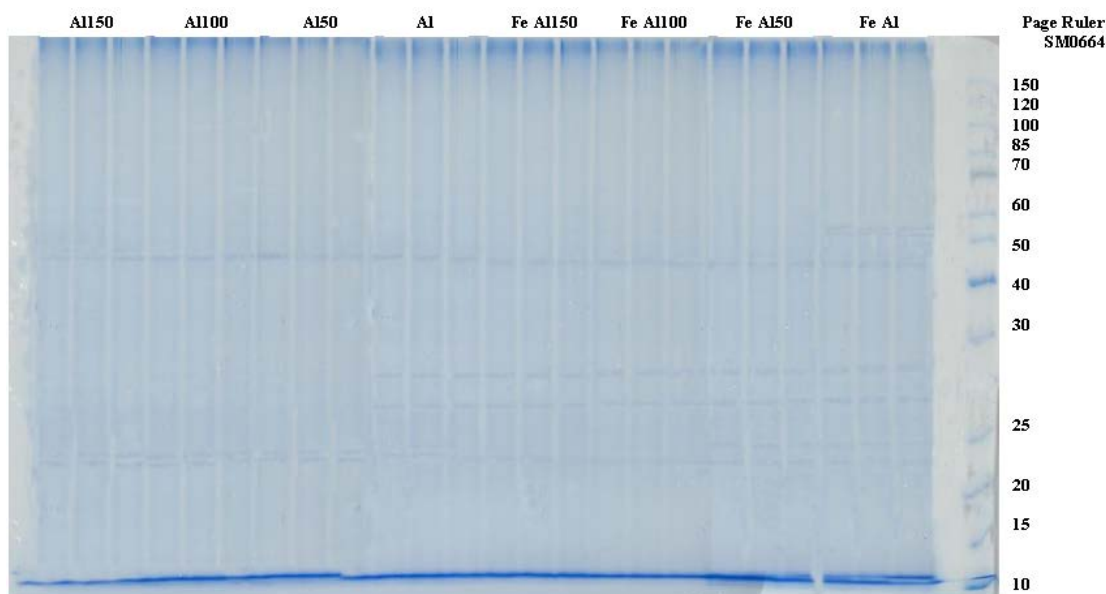
(هر سه ستون مربوط به یک تیمار می باشد.)



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئین برگ بابونه آلمانی
(هر سه ستون مربوط به یک تیمار می باشد.)



شکل ۵- الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئین ریشه بابونه رومی
(هر سه ستون مربوط به یک تیمار می باشد.)



شکل ۶- الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئین ریشه بابونه آلمانی
 (هر سه ستون مربوط به یک تیمار می باشد).

بحث

بابونه در شرایط تنش شوری از وزن خشک بخش هوایی، وزن تر و خشک گل و طول پدانکل آن کاسته می شود. هر چند تنش شوری منجر به کاهش وزن تر و خشک بخش هوایی در دو جنس بابونه گردید، اما در مقابل بر وزن خشک و تر ریشه افزوده شد (جدول ۲). اثر شوری و آهن نیز بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه معنی دار بود (جدول ۲). زمانی که گیاه در معرض فقط شرایط کمبود آهن قرار گرفت وزن خشک اندام هوایی ۵/۵٪ و وزن خشک ریشه ۶۰٪ نسبت به شاهد کاهش نشان داد (جدول ۲). تحت تنش شوری و تیمار کمبود آهن با افزایش یافتن شوری وزن خشک اندام هوایی ۴۶٪ کاهش و وزن خشک ریشه ۵۴٪ افزایش نشان داد (نسبت به زمانی که سطح شوری و آهن صفر بود). تحت شرایط آهن کافی با افزایش یافتن سطح شوری وزن خشک اندام هوایی ۵۲٪ کاهش و وزن خشک ریشه ۵۷٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۲).

شوری منجر به کاهش رشد و تغییراتی در متابولیسم گیاهان می شود (Munns, 1993). کم شدن پتانسیل آب در محیط ریشه، سمیت برخی از یون ها همانند Na^+ و Cl^- و نیز عدم تعادل عناصر غذایی در بخش هوایی به واسطه بر هم خوردن جذب عناصر غذایی از عوامل مهم کاهش رشد گیاهان در این شرایط به شمار می رود (Marschner, 1995).

نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که شوری تأثیر معنی داری بر رشد گیاه بابونه دارد (جدول ۱) و منجر به کاهش رشد در دو جنس بابونه آلمانی و رومی گردید (جدول ۲). در این بین تأثیر عمده تنش شوری بر بخش هوایی بود که با کاهش وزن تر و خشک آن در هر دو جنس بابونه همراه بود (جدول ۲). Razmjoo و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که در طی قرارگیری گیاه

کرد که در شرایط تنش خشکی و کمبود آهن از مقادیر کلروفیل a و b در گیاه توت‌فرنگی کاسته شد. تنش شوری و دیگر عوامل بازدارنده محیطی سبب تداخل در فرایندهای رشد و نمو در گیاهان می‌شوند. این تداخل حتی در سطح مولکولی و بیان ژن‌ها نیز نمود پیدا می‌کند. تغییر در بیان ژن‌ها در سطح رونویسی نخستین بار به‌وسیله تجزیه نیمرخ پروتئین تحت تنش شوری در گیاهچه جو شناسایی شد (Ramogopal, 1987). معیوب شدن عمل رونویسی و تغییرات پس از رونویسی پاسخی برای تغییرات ویژه در پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد. به‌طور کلی پروتئین‌هایی که تحت تنش شوری ظاهر می‌شوند می‌توانند در سازگاری به تنش نقش داشته باشند (Ericson, Dubey & Rani, 1990). Alfinito (۱۹۸۴) در طی بررسی اثر شوری بر روی توتون، ظهور باندهای ۲۰ و ۳۲ کیلودالتونی را گزارش کردند. در این آزمایش مشابه نتایج این محققان، در برگ دو جنس بابونه رومی و آلمانی در طی مواجه شدن با تنش شوری هم باند ۲۰ کیلودالتونی مشاهده گردید (شکل‌های ۳ و ۴).

در حضور و عدم حضور تیمار آهن و در طی بروز تنش شوری نیز تغییراتی در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ و ریشه دو جنس بابونه آلمانی و رومی بوجود آمد (شکل‌های ۳ تا ۶). Herbig و همکاران (۱۹۹۶) در بررسی کمبود آهن بر روی بیان پروتئین‌ها در برگ و ریشه گوجه‌فرنگی با تکنیک الکتروفورز دوبعدی مشاهده کردند که غلظت ۳ پلی‌پپتید تحت تنش کمبود آهن افزایش یافت. Rabotti و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که تحت شرایط کمبود آهن در ریشه گیاه خیار، تراکم باندها نسبت به شرایطی که گیاه در معرض آهن

Rabhi و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که شوری و کمبود آهن سبب کاهش رشد بخش هوایی و ریشه در گیاه یونجه می‌شود. آنها گزارش کردند که تأثیر شوری بر روی بخش هوایی بسیار بیشتر از ریشه است. در شرایط کمبود آهن میزان کاهش وزن خشک بخش هوایی در تیمارهای مختلف شوری به میزان زیادی نسبت به شرایط وجود آهن افزایش یافت.

رشد، حاصل فرایند فتوسنتز و انتقال مواد فتوسنتزی ساخته شده در مبدأ به مقاصد مصرف از جمله ریشه‌ها می‌باشد. Sultana و همکاران (۱۹۹۹) اعلام کردند که شوری سبب کاهش فتوسنتز در گیاه برنج می‌شود. یکی از دلایل این کاهش، کم شدن میزان کلروفیل در برگ‌های آن بود. در این آزمایش نیز مشاهده شد که شوری سبب کاهش مقادیر کلروفیل a و b در هر دو جنس بابونه می‌شود (جدول ۲). در این آزمایش همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین مقادیر کلروفیل a و b با وزن تر و خشک بخش هوایی بدست آمد (کلروفیل a, $R^2 = 0/89^{**}$ و $R^2 = 0/95^{**}$ و کلروفیل b, $R^2 = 0/76^{**}$ و $R^2 = 84^{**}$).

مطابق نتایج بدست‌آمده در این آزمایش Kovacic و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که شوری باعث کاهش مقدار کلروفیل در بابونه آلمانی شد. کاهش کلروفیل ممکن است نتیجه توقف مسیر بیوسنتز، تحریک مکانیسم‌های تخریبی آن و یا هر دو حالت باشد.

Oijen و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که از مقدار کلروفیل a در شرایط کمبود آهن در گیاه *Chaetoceros brevis* کاسته می‌شود. در این آزمایش نیز مشخص گردید که در نبود آهن، از میزان کلروفیل a و b به مقدار ۳۳/۱۵٪ و ۳۶/۷۳٪ کاسته شد (جدول ۲). Wang (۲۰۰۰) گزارش

تنش مقاوم می‌باشند پروتئین‌های کمتری را از دست می‌دهند.

منابع مورد استفاده

- مصطفایی، ع.، ۱۳۸۲. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل. انتشارات یادآوران تهران، تهران، ۱۸۴ صفحه.

- Bertamini, M., Nedunchezian, N. and Borghi, B., 2004. Effect of iron deficiency induced changes on photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, and photosystem activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) Leaves. *Photosynthetica*, 39: 59-65.
- Bisht, S.S., Nautiyal, B.D. and Sharma, C.P., 2002. Biochemical changes under iron deficiency and recovery in tomato. *Indian Journal of Plant Physiology*, 7(2): 183-186.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Briat, J.f. and Lobreaux, S., 1998. Iron storage and ferritins in plants. *Metal Ions in Biological Systems*, 35: 379-563.
- Dell'Aquila, A., 1992. Water uptake and protein synthesis in germination wheat embryos under the osmotic stress. *Annals of Botany*, 69(2): 167-171.
- Dubey, R.S. and Rani, M., 1990. Influence of NaCl salinity on the behavior of protease, aminopeptidase and carboxypeptidase in rice seedlings in relation to salt tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17(2): 215-223.
- Ericson, M.C. and Alfinito, S.H., 1984. Protein produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiology*, 74(3): 506-509.
- Grattan, S.R. and Grieve, C.M., 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78: 127-157.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.K., 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant Cell*, 13: 1383-1399.
- Hamilton, L.E.W., Mcnaughton, S.J. and Coleman, J.S., 2000. Molecular, physiological and growth responses to sodium stress in C4 grasses from a soil salinity gradient in the Serengeti ecosystem. *American journal of botany*, 88(7): 1258-1260.
- Herbik, A., Giritch, A., Horstmann, C., Becker, R., Balzer, H.J., Bsumlein, H. and Stephan, U.W., 1996. Iron and copper nutrition dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the

کافی قرار دارد بیشتر است. افزایش در سنتز پروتئین نتیجه پاسخ سازگاری به کمبود آهن می‌باشد.

براساس نتایج بدست آمده در این آزمایش می‌توان بیان کرد که در شرایط عدم وجود تنش شوری بابونه رومی از نظر وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر ریشه نسبت به بابونه آلمانی از موقعیت مناسبتری برخوردار می‌باشد. با افزایش سطح شوری از وزن تر و خشک اندام هوایی هر دو جنس بابونه کاسته و بر وزن تر و خشک ریشه آنها افزوده شد. کمبود آهن نیز از وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه هر دو جنس بابونه کاست. تغییر در سطح شوری در حضور و یا عدم حضور آهن، سبب تغییراتی در باندهای پروتئینی هر دو جنس بابونه گردید. به طوری که در بابونه رومی و در سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم، بیشتر باندهای پروتئینی حذف شدند. در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار در این جنس یک باند ۴۲ کیلودالتونی سنتز گردید. این احتمال وجود دارد که سطح ۱۵۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم خارج از آستانه تحمل بابونه جنس رومی باشد. در بابونه آلمانی تحت تنش شوری و کمبود آهن هیچ باندهای حذف نشد و دو باند ۱۴ و ۱۸ کیلودالتونی در آن ظاهر شد. الگوی الکتروفورزی بابونه آلمانی از تنوع کمتری برخوردار بود. شاید دلیل آن مقاوم بودن بابونه آلمانی به تنش شوری نسبت به بابونه رومی باشد. در نبود آهن هم باندهای ۲۹، ۲۷ و ۲۶ کیلودالتونی سنتز شدند که به باند ۲۶ کیلودالتونی اسموتین نام نهاده‌اند. در ریشه بابونه آلمانی باندهای کمتری تحت تنش شوری حذف شد. بابونه آلمانی در شرایط تنش شوری پروتئین‌های کمتری را از دست داد. با توجه به اینکه بابونه آلمانی گیاه مقاوم به شوری می‌باشد، پس می‌توان نتیجه گرفت گیاهانی که به

- Rabhi, M., Barhoumi, Z., Ksouri, R., Abdelly, C. and Gharsalli, M., 2007. Interactive effects of salinity and iron deficiency in *Medicago ciliaris*. *Comptes Rendus Biologies*, 330(11): 779-788.
- Rabotti, G., De Nisi, P. and Zocchi, G. 1995. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant Physiology*, 107(4): 1195-1199.
- Ramagopal, S., 1987. Salinity stress induced tissue-specific proteins in barley seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 84(2): 324-331.
- Razmjoo, Kh., Heydarizadeh, P. and Sabzalian, M.R., 2008. Effect of salinity and dDrought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(4): 451-454.
- Sultana, N., Ikeda, T. and Itoh, R., 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany*, 42(3): 211-220.
- Wang, S.Y., 2000. Effect of methyl jasmonate on water stress in strawberry. *Acta Horticulturae*, 516: 89-93.
- nicotianamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiology*, 111(2): 533-540.
- Khali Poor Asbagh, J., 2006. Chamomile (*Matricaria recutita* L.) characters and application. *Mahat Journal*, 56: 30-33.
- Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J. and Backor, M., 2009. Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of *Matricaria chamomilla* plants. *Ecotoxicology*, 18(5): 544-554.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, 889p.
- Mori, S., 1999. Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3): 250-253.
- Munns, R., 1993. Physiological process limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment*, 16: 15-24.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2): 239-250.
- Oijen, T.V., Van leeuwe, M.A., Gieskes, W.W.C. and de Baar, H.J.W., 2004. Effects of iron limitation on photosynthesis and carbohydrate metabolism in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology*, 39(2): 161-171.

Effects of salinity and iron on growth, photosynthetic pigments and electrophoresis bands in two genus chamomile (*Matricaria chamomilla* L. and *Anthemis nobilis* L.)

S. Sarani¹, M. Heidari^{2*}, M. Glavi³ and B.A. Siah sar³

1- MSc. Student, Department of Agronomy, University of Zabol, Zabol, Iran

2*- Corresponding author, Agronomy and Plant Breeding Department, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

E-mail: Haydari2005@gmail.com

3- Department of Aronomy, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: September 2010

Revised: April 2012

Accepted: April 2012

Abstract

To evaluate the effects of salinity in the presence and absence of iron on growth, photosynthesis pigments and electrophoresis bands in two chamomiles, an experiment was conducted as completely randomized factorial design with three replicates at university of Zabol in 2009. The treatments were two genuses of chamomile (German and Roman chamomile), four levels of salinity (0, 50, 100 and 150 mM NaCl) and two levels of iron (0 and 100 μ mol). Results showed that, by increasing salinity from 0 to 150 mM NaCl, fresh and dry weight of shoot were reduced but root dry weight was added. At the absence of iron treatment, fresh and dry weight of both shoot and root were reduced in two genus of chamomile. Salinity decreased the amount of two pigments chlorophyll a and b and increased the amount of carotenoids. At the absence of iron, the amount of chlorophyll 'a' (32/9) and chlorophyll 'b' (35/5) percent decreased in comparison to control treatment (100 μ mol). Unlike chlorophyll, at the absence of iron treatment, the amount of carotenoid was added. At the salinity stress from 0 to 150 mM, many protein bands in Roman chamomile were excluded. However, at the levels of 50 and 100 mM NaCl, a 42 KDa fraction band in this material was synthesized, but at the highest level of salinity (150 mM NaCl) many of their bands were removed. Presumably, the 150 mM NaCl is out of tolerance of Roman chamomile genotype. In this study, at the German chamomile genotype under salinity and iron deficiency no bonds were not removed and two bands 14 and 18 KDa were appeared.

Key words: *Matricaria chamomilla* L., *Anthemis nobilis* L., salinity, iron, photosynthesis pigments, electrophoresis pattern.