

## Yaprakta Klorofil Konsantrasyonunun Saptanması Suretiyle Ozon Zararının Ölçülmesi (1)

Abdülkadir Akçin (2)

### 1. GİRİŞ

Hava kirliliğinin bitkilerde oluşturduğu zararı ölçmek için kullanılan en genel metod, yaprak ayasındaki yüzde nekrotik veya klorotik sahanın göz önüne alınmasıdır (3). Yapraklardaki zararın, gözleme dayanan bu tip bir metodla ölçülmesi, gözlemlerde bulunan kişinin de değerlendirme kıstasını içermektedir. Gözlemcinin değerlendirme verileri, denemeler arasında olduğu gibi, bir denemede bitkiler arasında da değişebilmektedir. Bir gözlemci diğerine göre daha farklı gözlemlerde bulunabilmektedir. Bir örneği birden fazla gözlemci değerlendirdiğinde, gözlemci hatası azalmaktadır (8). Yapraklarda meydana gelen zararın saptanmasında, gözlemlerle yapılan ve tahmine dayanan ölçümlere ilişkin diğer bir sorun da, çeşitli laboratuvarlarda gözlemlerle yapılan zarar tahmin standartlarının bulunmamasından kaynaklanmaktadır.

Ozon zararını ölçmek konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır (1,4-8). Bu çalışmalarda, yapraklardaki klorofil kaybı spektrofotometre ve ekstraksiyon işlemleri yardımıyla saptanmış ve buna bağlı olarak da, klorofil kaybına neden olan ozon zararı araştırılmak istenmiştir. Bu işlemlerle ilgili diğer bir sorun ise, klorofil konsantrasyonu belirtmek için uygun bir ölçüm değerinin saptanamamasından ileri gelmektedir. Klorofil konsantrasyonunun belirtilmesinde yaprak kuru ağırlığının ölçülmesi uygun bir kıstas olabilir. Ancak, bildirilen son metodlara göre, bir çok ekstraksiyon işlemleri yaprak dokusunun öğütülmesini içerdiği için, yaprak kuru ağırlığı saptanamamaktadır. Klorofil konsantrasyonunun taze ağırlık üzerinden ifade edilmesi arzu edilmemektedir (1,6). Zira, zarara uğramış bulunan yaprakların dokularında su ve klorofil kaybı olmakta ve dolayısıyla taze ağırlıkta da o oranda bir azalma meydana gelmektedir. Klorofil konsantrasyonları, bitki veya yaprak tiplerine, dolayısıyla da bitki veya yaprak büyüklüklerine göre değiştiğinden kesin olarak ifade edilmemektedir (4,5). Yaprak alanını ölçmek

(1) KNUDSON, L.L., Tibbitts, T. W., ve Edwards, G. E., 1977. Measurement of Ozone Injury by Determination of Leaf Chlorophyll Concentration. Dept. of Hort., Univ. of Wisconsin. Madison. Plant Physiol. Vol. 60. S: 606 608.

(2) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Doçenti.

suretiyle klorofil konsantrasyonunu ifade etmek, şiddetli yaralanma sonucu yaprağın bozulmasından dolayı zordur (8). Yapraklardaki ozon zararının homojen olmayan dağılışından dolayı, yaprağın parçalarından örnek almak suretiyle zararın doğru tahminini yapmak da mümkün değildir (7).

Biz, her bir ünite kuru ağırlıktaki klorofil konsantrasyonuna saptamak için basit ve süratli bir metod geliştirdik. Bu makalede, ozonla fumige edilen fasulye bitkisi yapraklarında meydana gelen zararın ölçülmesinde uyguladığımız bir metodu takdim ediyor ve yapılan işlemleri açıklıyoruz.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Klorofil Tayin İşlemi.

Aşağıda açıklanan klorofil ekstraksiyon ve analiz işlemi, materyal olarak bitki yapraklarını kullanan bir metod biçiminde geliştirilmiştir. Bu methodda belirtilen solusyon miktarları, fasulye bitkisinin üç yaprakçıktan ibaret olan tek yaprağını analiz edecek şekilde saptanmıştır.

Her bir fasulye bitkisinden bir yaprak kesilir. Kesilen yaprakçıklar, yastıkçık (*Pulvinus*) kısmı hariç olmak üzere kıvrılır, katlanır ve 28 ml. lik bir şişeye konur. Örnekleri içeren şişeler % 100 lük etanol ile doldurulur. kapağı kapatılır ve karanlıkta muhafaza edilmek üzere depoya yerleştirilir.

Yaklaşık olarak 24 saat depolama süresinden sonra örnek şişedeki klorofil-etanol solusyonu 227 ml. lik başka bir şişe içerisine süzülür. Daha sonra, içerisinde yaprak örneği bulunan şişenin yarısı veya 2/3 si tekrar etanol ile durulandıktan sonra bu solusyon yine 227 ml. lik aynı şişeye ilave edilir. Örnek yaprağı içeren şişe tekrar etanol ile doldurulur, kapağı kapatılır ve karanlığa bırakılır. 24 saat sonra aynı işlem tekrarlanarak solusyon 227 ml. lik aynı şişeye ilave edilir. Bu işlem 24 saat sonra yine tekrar edilir. Son durulmadan sonra yaprak 70 °C sıcaklığa ayarlanmış bulunan fırında 3 gün müddetle kurutulur ve daha sonra tartılır.

Etanol-klorofil solusyonu 200 ml. lik balon jøjeye süzülür ve 200 ml. ye tamamlanacak şekilde balon jøjeye etanol ilave edilir. Bu son solusyonun 10 ml. lik kısmı spektrofotometrenin cam test tüpüne konur ve geri kalan kısmı atılır. Daha sonra klorofil ekstraktlarının 665 ve 649 nm. deki absorpsiyonları spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölçümlerin, yaprakların içerdikleri klorofil miktarlarına dönüştürülebilmesi için aşağıdaki formüller kullanılır (9).

$$(1) \quad \frac{\mu \text{ gr. Klorofil a}}{\text{ml. solusyon}} : (13,70) (A_{665} \text{ nm.}) - (5,76) (A_{649} \text{ nm.})$$

$$(2) \quad \frac{\mu \text{ gr. Klorofil b}}{\text{ml. solusyon}} : (25,80) (A_{649} \text{ nm.}) - (7,60) (A_{665} \text{ nm.})$$

Klorofil konsantrasyonları  $\mu$  gr. klorofil / m gr. kuru ağırlık üzerinden hesap edilir.

## 2.2. Klorofil Tayin Metodunun Değerlendirilmesi.

Sihhatli ve ozonla fumige edilmiş yapraklardaki klorofilin ekstraksiyonla tam olarak alınabilmesi konusunda araştırmalar yapılmıştır. Son klorofil ekstraksiyonundan sonra yapraklar öğütülmüş ve 15 ml. etanol ilave edilmiştir. Bu suspansiyon santrifüjden geçirilmiş ve bakiye tortunun klorofil içeriği saptanmıştır.

Bundan önceki bir çok klorofil ekstraksiyon işlemlerinde eritici olarak aseton kullanıldığından, yapraklardaki ozon zararını saptamak için asetonla yapılan klorofil ekstraksiyonunun ölçüm değerleri ile, etanolla yapılan klorofil ekstraksiyonunun ölçüm değerleri mukayese edilmiştir (1,5-8). Asetonla yapılan ekstraksiyon metodunda, sihhatli yaprakların bulunduğu örnek şişelere % 80 lik aseton ilave edilmiştir. Absorpsiyon ölçümleri 652 nm. de alınmıştır (2), Asetonla yapılan klorofil tayininde takip edilen işlem sırası, etanol kullanmak suretiyle yapılan klorofil tayinindeki işlem sırasının aynıdır.

72 saatlik ekstraksiyon süresince klorofilin stabilitesi ışıktaki, karanlıkta, oda sıcaklığında (20 °C civarında), buzdolabı sıcaklığında (5°C civarında) ölçülmüştür. Yine bu süre zarfında karanlıkta oda sıcaklığında, klorofilin aseton içerisindeki stabilitesi, etanol içerisindeki stabilitesi ile mukayese edilmiştir. Ekstraksiyondan biliri bir süre sonra, karanlıkta oda sıcaklığında bekletildikten sonra etanol-klorofil solusyonlarının stabilitesi saptanmıştır.

## 2.3. Ozon Uygulamaları ve Zarar Ölçümleri.

Biotron'da (Wisconsin Üniversitesi) Pinto, Northrup, King ve Co. Lot No. 35486-00400 fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*) çeşitleri tohumdan yetiştirilmiştir. Araştırma süresince bitki büyüme odası 16-saatlik fotoperiyot.  $20.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$  oda sıcaklığı ve %  $69 \pm 5$  relatif rutubet olacak şekilde düzenlenmiştir.

Sıcaklık ölçümleri günlük olarak "thermocouple" ile rutubet ölçümleri ise "thermistor psychrometer" ile alınmıştır. Saksıların üst kısmındaki ışık şiddeti, Infrared radyasyon  $0.100 \pm 0.005 \text{ w/m}^2 \cdot \text{nm}$  (755-825 nm.), soğuk beyaz floresans ve normal lambalarla  $30.42 \pm 1.47 \text{ nE/sec. cm}^2$  (400-700 nm.) olarak ölçülmüştür. Işık ölçümleri Lambda model LI-185 metre ölçüm aleti ile kuantum ve Infrared ölçüm aletleri kullanılmak suretiyle yapılmıştır. Bitkiler, içerisinde pit-vermikülit karışımı olan 10 cm. çapındaki plastik saksılarda yetiştirilmiştir. Ekimden sonra, saksılara 40 ml. su veren otomatik sulama sistemi yardımıyla günde 4 defa olmak üzere bitki besin elementleri yarıya indirilmiş Hoagland gıda solusyonundan verilmiştir. 11. günün sonunda bitkiler, uygulanacak işlemler için seçilmiştir.

Ekimden 12 gün sonra bitkiler bir saat süreyle ozonla fumigasyona tabi tutulmuşlardır. Fumigasyon, büyütme odasının % 5 ekolojik koşulunu içeren yan odalardaki 0.3 m<sup>3</sup> lük pleksiglas kabinlerle yapılmıştır. Ozon gazı "Mast oxidant" metreye bağlı ultraviyole lambalardan elde edilmiş ve sürekli olarak ozon ölçümleri yapılmıştır. Bitkilere 16 saatlik ışık periyodunun 4. ve 7. saatleri arasında ozon verilmiştir. Uygulamayı takiben bitkiler, hasata kadar bırakılmak üzere büyütme odalarına getirilmişlerdir. Uygulama saatlerinin her bir zamanında 6 bitki her gün 1 ila 3 defa fumigasyona tabi tutulmuşlardır. Her grup fumige edilen bitki sayısı kadar da kontrol bitki ayrılmıştır:

Fasulye bitkilerine, 0.90 µl/l'lik ozon miktarının 6 ayrı fumigasyon seviyesi uygulanmıştır. Fumigasyondan sonra yaprakların optimum hasat zamanı saptanmıştır. Uygulamadan 2,4 ve 6 gün sonra her bir fumigasyon seviyesine tabi tutulan bitkilerden birer yaprak hasat edilerek klorofil tayini yapılmıştır.

0.50 ile 0.90 µl/l arasındaki farklı ozon konsantrasyonları ile fumige edilen bitkilerde meydana gelen zararın gözlemlenmesi, klorofil konsantrasyonunun saptanması işlemi ile mukayese edilmiştir. Her birisinde 6 bitki bulunan ve 10 tekrürlü olarak düzenlenen deneme saksılarındaki bitkiler, 1 saat süreyle fumigasyona tabi tutulmuş ve yapraklar, uygulamadan 4 gün sonra hasat edilmiştir. Ozon zararının gözlem yapmak suretiyle ölçülmesinde ilk araştırmacı (Knudson 1977), yaprak alanında görülen nekroz ve klorozu en yakın % 5 yanılma ile tahmin etmiştir. Yapraklardaki zarar tahmininde, tepe ve alt yaprak yüzeyleri için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır. Ozon zararının gözleme dayanan tahmininden sonra, her bir yaprak için klorofil tayin işlemi yapılmıştır. Fasulye yapraklarında meydana gelen ozon zararının ölçüm değeri, kontrol bitkilerin yapraklarının içerdikleri klorofil konsantrasyonlarına göre, ozon uygulamalarına tabi tutulmuş bulunan bitkilerin yapraklarının içerdikleri klorofil konsantrasyonlarındaki yüzde azalına olarak saptanmıştır.

### 3. SONUÇLAR ve MÜNAKAŞA

#### 3.1. Klorofil Tayin Yönteminin Değerlendirilmesi.

Parçalanmamış olan bütün bir yaprakta uygulanan ekstraksiyon yöntemi ile klorofilin hemen hemen tamamına yakın bir kısmı tayin edilebilir. Bu yaprakların öğütülerek ikinci bir ekstraksiyona tabi tutulmaları sonucu elde edilen klorofil miktarı ise çok düşüktür. Parçalanmamış bütün bir yaprağın ekstraksiyona tabi tutulması ile elde edilen klorofil miktarı, sağlam yapraklarda kombine (sağlam ve öğütülmüş yaprakların ekstraksiyonlarından elde edilen toplam klorofil miktarı) ekstraksiyon metodu ile elde edilen miktardan % 99'u oranındadır. Aşırı derecede zarara uğramış yapraklarda ise elde edilen bu miktar çok az düşüş gösterir (% 96).

Klorofilin ekstraksiyonu amacıyla kullanılan aseton, etanol kadar etkili değildir. Zira çözücü olarak aseton kullanıldığında, sıhatli yapraklardaki toplam klo-

rofilin sadece % 92'si ölçülebilir. Aseton aynı zamanda çok uçucu olduğundan bununla çalışmak çok zor olmaktadır.

72 saat karanlıkta bekletilen şişelerdeki yaprak-etanol örneklerinde önemli derecede klorofil parçalanması görülmemiştir. Ancak, ışıkta 72 saatten fazla tutulan örneklerde, klorofilin % 54'ü parçalanmıştır. Karanlıkta, gerek buzdolabında ve gerekse oda sıcaklığında 72 saatten fazla tutulan örnek şişelerin içerdikleri solusyonlardaki klorofil miktarında önemli bir parçalanma görülmemiştir.

Etanol-klorofil solusyonlarının stabilitesi üzerinde yapılan analizler, örnek şişelerin 6 haftaya kadar karanlıkta muhafaza edilmesi halinde, klorofilde % 3'den daha az parçalanma olduğunu ortaya koymuştur.

Yaprakların içerdikleri klorofil miktarını saptamak için hazırlanan ekstraksiyonlarla ilgili formüller, klorofili tam olarak ekstraksiyona uğratan % 96'lık etanola göre geliştirilmiştir (9). Bu çalışmada, % 100'lük veya % 96'lık etanol ilave edilen örnek şişelerdeki (yaprak-etanol) solusyonların klorofil absorbans ölçümleri arasında bir fark görülmemiştir. Ancak, su absorpsiyonundan doğabilecek ölçüm hatalarını önlemek açısından ekstraksiyon işlemlerinde % 100'lük etanol kullanılması öğütlenelir.

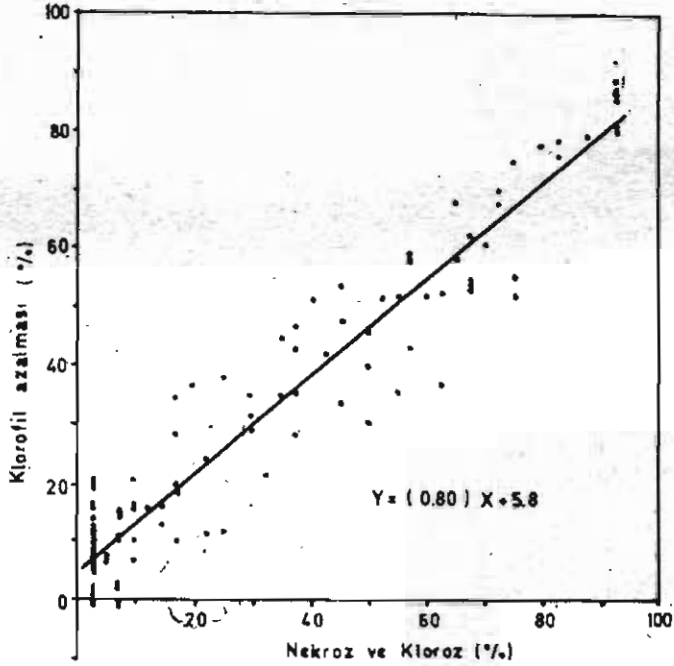
Yaprakların içerdikleri klorofil miktarını saptamak amacıyla uygulanan işlemlerde toplam çalışma süresi, her bir örnek için 15 dakika olarak hesap edilmiştir.

### 3.2. Ozon Uygulamaları ve Zarar Ölçümleri.

Ozon uygulamalarından sonra, farklı aralıklarla hasat edilen yapraklarda saptanan klorofil miktarındaki azalma, fumigasyondan sonra 4. günde hasat edilen yapraklarda maksimum seviyede olmuştur. Toplam klorofil miktarı (klorofil a-klorofil b), fumigasyondan sonra 2,4 ve 6. günlerde hasat edilen yapraklarda, kontrol bitkilerden alınan yapraklara göre sırasıyla % 58, 49 ve 64 oranlarında daha az bulunmuştur.

Uygulanan farklı ozon konsantrasyonlarının bitkilerin yapraklarında meydana getirdikleri zarar, toplam klorofil miktarında % 0 ila % 88.4 oranlarında, gözle görülebilir nekroz veya kloroz içeren yapraklarda ise % 3 ila % 93 oranlarında azalmaya neden olmuştur. Şekil: 1'de, 116 yaprakta saptanan görünebilir yüzde nekroz veya kloroz miktarı, yüzde klorofil azalmasına karşılık olarak işaretlenmiştir. Veriler "en küçük kareler" metoduna göre analiz edilmiştir. Her iki metod için korrelasyon katsayısı (r), 0.92 ve standart sapma (Sy.x), 7.20 olarak bulunmuştur. Şekil: 1'de görülen doğru ise  $y: (0.80)x + 5.8$  denklemi ile uygunluk göstermiştir. Bu grafikte y'nin 5.8 değeri ile çakışması, farklı seviyelerde ozonla fumige edilen bitkilerin yapraklarında bazen gözle görülebilir nekroz veya kloroz saptanamamasına karşın, bu yaprakların içerdikleri klorofil miktarında bir azalmanın meydana geldiğini göstermektedir.



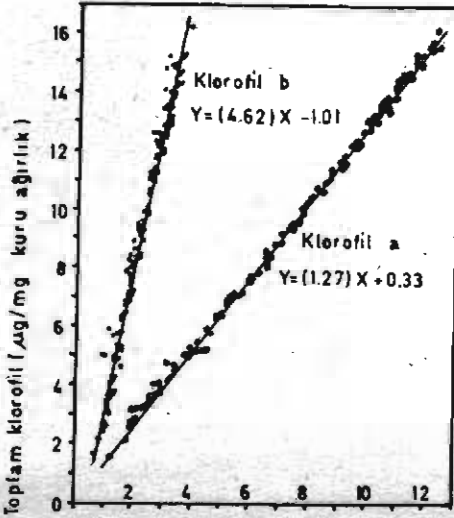


ŞEKİL:2. Farklı ozon konsantrasyonları ile fumige edilen Pinto fasülyesi yapraklarında gözle görülebilir nekroz ve kloroz ile klorofil azalması arasındaki korelasyonu;  $r=0.92$ ,  $n=116$  ve  $S_{y.x}=7.20$ .

Gerek gözlemlenilen ölçüm değerleri ve gerekse klorofil ekstraksiyon metodu yardımıyla elde edilen değerler üzerinde analizler yapılmıştır. Bu çalışmada 10 farklı ozon fumigasyonu uygulanmıştır. Her bir fumigasyona 10 ar bitki iştirak ettirilmiş ve ozon zararına uğramış bulunan her bir bitkiden 2 şer örnek yaprak alınmış ve elde edilen neticeler varyans analizine tabi tutulmuştur. Örnek yapraklardaki yüzde klorofil kaybı için yapılan varyans analizi neticesinde standart hata 7.1, gözlemler neticesinde ölçülen yüzde nekroz veya klorozda ise 10 olarak saptanmıştır. Bir bitki üzerinde bulunan yapraklardaki klorofil kaybı için ölçülen değişkenlik (variability), bitkiler arasında saptanan klorofil kaybı için ölçülen değişkenliğin 1/7 si olmuştur. Böylece, her bir bitkide her bir yaprağı ayrı ayrı analiz etmekte ise, her iki yaprağı kombine halde analize tabi tutmak daha kesin netice vermekte ve zamandan kazanılmaktadır. 6 bitki ile gerçekleştirilen bir uygulamada ise, örnek olarak alınan 2 yaprağın ayrı ayrı veya birlikte analizinde, iki işlem ortalamaları arasındaki fark klorofil kaybında % 15, görülebilir nekroz veya kloroz arasındaki fark da ise % 20 olup, klorofil kaybı bakımından yapılan her iki analiz arasındaki mukayesede ise % 5 seviyesinde önemli farklılık bulunmuştur.

Farklı ozon konsantrasyonları ile fumige edilen yapraklarda saptanan klorofil a ve b miktarları, toplam klorofil miktarına karşı işaretlenmiştir (Şekil: 2). Sonuçlar

"en küçük kareler" metodu ile analiz edilmiştir. Şekil: 2'de klorofil a'yı işaretleme y:  $(1.27)x + 0.33$ , r: 1.00 denklemine, klorofil b'yi işaretleme ise y:  $(4.62)x - 1.01$ , r: 0.99 denkelemlerine uygunluk göstermiştir. Toplam klorofil konsantrasyonu azaldıkça, klorofil a/b oranı da azalmıştır. Örneğin, 14 µ gr. toplam klorofil / mgr. kuru ağırlıkta klorofil a/b oranı 3.31 olup, 8 µ gr. toplam klorofil/m gr. kuru ağırlıkta bu oran 3.10 ve 2 µ gr. toplam klorofil / m gr. kuru ağırlıkta ise bu oran 2.02 dir. Kontrol bitkilerinde, ortalama klorofil a ve b konsantrasyonları tam olarak noktalanmış çizgilere düşer (14.23 µ gr. toplam klorofil / m gr. kuru ağırlık ve klorofil a/b oranı ise 3.34).



ŞEKİL:2- Farklı ozon konsantrasyonları ile fumigasyon edilen Pinto fasulyesi yapraklarındaki toplam klorofil (Klorofil a+b) miktarına karşılık, Klorofil a ve b'nin ayrı ayrı dağılımı. Klorofil a için  $r=1.00$ ; Klorofil b için  $r=0.99$ ;  $n=142$ .

Klorofil a/b oranlarındaki azalmanın mümkün görülen iki izahı vardır. Birincisi, klorofil a ozon ile klorofil b'ye göre daha süratle parçalanabilmektedir. İkincisi, ozon gazı yeni klorofil sentezine sebep olabilmektedir. Şöyleki, klorofil a sentezi azalmakta veya klorofil b sentezi artmaktadır. Şu anda, ozonun parçalanma veya dolaylı olarak yeni klorofil sentezine neden olmak suretiyle klorofile etki ettiği bilinmemektedir. Ozon zararının klorofil a/b oranında meydana getirdiği azalmanın sebebini saptamak için, bu konu üzerinde daha çok araştırma yapmak icap etmektedir.

#### 4. SONUÇLAR

Bu çalışmada anlatılan klorofil tayin işlemi, fasulye yapraklarında meydana gelen ozon zararını ölçmede kesin ve pratik bir metottur. Burada açıklanan me-

tod, insan hatası olmaksızın gözle yapılan metoda göre daha kesin zarar ölçümünü saptamada faydalı görülmektedir. Bu işlem, ölçümleri yapan kişi için fazla bir tecrübe ve ihtisaslaşmaya gerek göstermez. Gözleme göre, daha fazla zamana ihtiyaç gösterir, fakat karanlıkta etanol-klorofil solusyonunun birkaç hafta stabilitesini kaybetmeden kalabilmesi, spektrofotometrik analizler için insana zaman esnekliği verebilir.

Klorofil ekstraksiyon işlemi, özellikle görülebilir nekroz veya klorozu tahmin etmede zorluk çekilen çeşitler arasındaki farklılıkları ölçmek için önemli olmaktadır. Mısır, sorgum, bezelye, tütün, arpa ve buğday dahil diğer çeşitlerle yapılan araştırmalar, bu işlemin geniş çapta benimsenebileceğini göstermektedir. Bu metod aynı zamanda, diğer hava kirletici maddelerin oluşturduğu zararı ölçmede de faydalı görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. ADEDİPE, N. O. ve ark., 1972. Effects of sulfur nutrition on phytotoxicity and growth responses of bean plants to ozone. *Can. J. Bot* 50: 1789-93.
2. ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
3. CHESTER, K. S., 1959. How sick is the plant. In JG Horsfall, AE Dimond eds, *Plant Pathology, Vol 1, The Diseased Plant*. Academic Press, New York pp 100-142.
4. CRAKER, L. E., 1971. Effects of mineral nutrients on ozone susceptibility of *Lemna minor*. *Can. j. Bot.* 1411-1414.
5. ERICKSON, L. C., ve Wedding, R. T., 1956. Effects of ozonated hexene on photosynthesis and respiration of *Lemna minor*. *Am. J. Bot.* 43: 32-36.
6. FLETCHER, R. A. ve ark., 1972. Abscisic acid protects leaves from ozone induced phytotoxicity. *Can. J. Bot.* 50: 2389-2391.
7. THOMPSON, C. R. ve ark., 1969. Effects of photochemical air pollutants on Zinfandel grapes. *Hort. Sci.* 4: 222-224.
8. TODD, G. W. ve Arnold, W. N., 1961. Anevaluation of methods used to determine injury to plant leaves by air pollutants. *Bot. Gaz.* 123: 151-154.
9. WINTERMANS, JF. GM., ve DeMOTS, A., 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and band their phenophytins in ethanol. *Bi-ochim. Biophys. Acta* 109: 448-453.