

L263

→ IB bibl.

SEPARAAT
No. 33 420

PROEFSTATION VOOR TUINBOUW ONDER GLAS TE NAALDWIJK

Fenolische verbindingen, groeiremming door planten onderling en door ontledingsprodukten van planten zoals in veen.

Berend J. van Goor
(Gestationeerd door het Instituut voor Bodemvruchtbaarheid in Haren)



Januari 1991.



Intern verslag nr 6

2214996

INHOUDSOPGAVE

Pagina

Inleiding	1
Aard van de stoffen en hun werking	1
Analytisch- chemische bepaling	4
Conclusie	9
Literatuur	10
Bijlage 1 (nagekomen literatuur)	11
Bijlage 2 (testmethoden)	12

~~ISBN = 276278~~

1. INLEIDING

In de uitscheidingsprodukten van wortels van planten komen stoffen voor, die zich bij langdurig telen op dezelfde oplossing kunnen ophopen. Een aantal van deze stoffen zijn fenolische verbindingen. Soms komen ook aldehyde- en carboxylzuurgroepen in de verbindingen voor. In principe kunnen het echter zeer verschillende typen organische verbindingen zijn. Ten opzichte van de gewasgroei kunnen deze stoffen zowel remmend als stimulerend zijn. Ook kan er sprake zijn van stoffen die de opname van spoorelementen beïnvloeden. Deze invloed kan voor sommige positief en voor andere negatief zijn. Hier worden de resultaten van een aantal publikaties op dit gebied vermeld. Dezelfde soort stoffen zijn ook gevonden in waterige extracten van veen-, moeras- of bosgronden. Via spectrofotometrische reacties of gaschromatografie is het mogelijk de fenolische en andere verbindingen te bepalen. Via gewasexperimenten zal het mogelijk zijn de invloed van ophoping bij gesloten teelten beter in te schatten. Als snellere testmethode zijn echter een aantal biotestmethoden ontwikkeld.

In een eerder verslag (PTG '90-62) werd ook aandacht besteed aan uitscheidingsprodukten van plantewortels. Daar ging het meer over stoffen die spoorelementen als Fe^{3+} complex binden en de invloed op de opname. In dat verslag werd ook aandacht geschonken aan enkele gegevens over onderling remmende invloed van planten van dezelfde soort en van verschillende soorten onderling (allelopathie). Zo wordt daar remming van asperge door dezelfde soort vermeld. Hier gaat het meer speciaal om fenolische verbindingen en organische zuren.

2. AARD VAN DE STOFFEN EN HUN WERKING

Zo onderzochten Jalal en Read (1988) een aantal phytotoxische stoffen uit heidegrond, die door *Calluna* uitgescheiden worden. In tabel 1 wordt een aantal door hen vermelde stoffen genoemd.

Tabel 1. Verbindingen aangetoond in de *Calluna*grond. In $\mu\text{g}/100$ g droge grond.

Aromatische zuren		Alifatische zuren	
benzoëzuur	30 - 450	3-hydroxyoctaan zuur	50 - 2000
p-methoxybenzoëzuur	90 - 540	8-hydroxyoctaan zuur	0 - 1250
o-hydroxybenzoëzuur	50 - 1200	hydroxydecaan zuur	15 - 740
vanillinezuur	100 - 550	8-hydroxynonaanzuur	30 - 770
syringinezuur	35 - 520	8-ethoxydecaanzuur	0 - 2500
p-cumarinezuur	0 - 280	8-hydroxydecaanzuur	125 - 3000
ferulinezuur	0 - 800		

Uit Jalal and Read, 1983.

Groeireducties met dit soort stoffen is geconstateerd. Zo is dat het geval voor salicylzuur dat bij een concentratie van 0,01 mM bij tarwe

remming veroorzaakt.

Onder varens kwamen gehalten voor van 0,04; 0,05; 0,04 en 0,004 mM p-hydroxybenzoëzuur, vanillinezuur, cumarinezuur en feruline zuur voor.

Grimvall et al. (1990) citeert onderzoek, waarbij fenolische aldehyden erg fytotoxisch genoemd worden (extracties in water vooral van moerasgrond en coniferenbos bleek sterk groeiremmend in een worteltest).

Paul & Mc Laren (1981?) geven de structuur van een groot aantal fenolen uit veenextracten, waarvan sommige groeiremmend zijn. Enkele structuren worden in figuur 1 weergegeven. Dit soort stoffen kan in potgronden een invloed op planten uitoefenen.

Wang, et al. (1967) geven ook een opsomming van fenolische verbindingen, die de plantegroei remmen.

Ofosu-Budu (1990) noemt ammonia als uitscheidingsprodukt bij sojaboon.

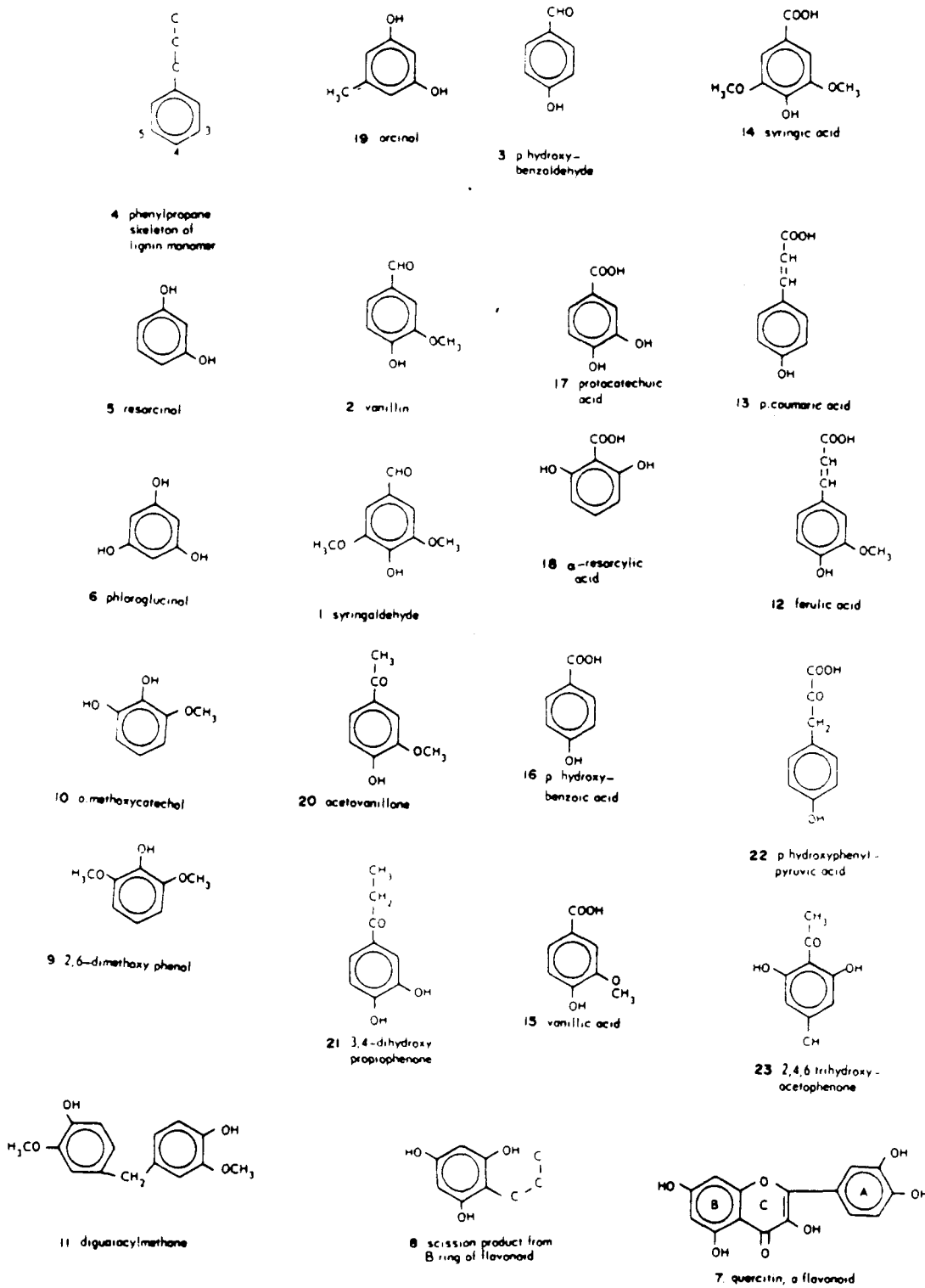
Wojcik-Wojtkowiak et al (1990) noemen ook een aantal fenolen als toxische uitscheidingsprodukten bij vertering van weefsels van rogge. Van deze stoffen wordt een sterk remmende invloed beschreven.

Scehovic (1990) beschrijft fenolen in weideplanten. In sommige planten zijn de gehalten aan oplosbare fenolen en polymere fenolen erg hoog (meer dan 10 g/kg). Als deze planten vergaan komen deze fenolen in het organisch materiaal. De fenolische verbindingen die door deze auteur vermeld wordt zijn ligninen, tannine en eenvoudige fenolen.

Göhler beschreef reeds in 1967 remming bij langdurige teelt van tomaat en komkommer. In de gebruikte grindcultuur trad bij tomaat wortelschade op. De remming werd gevonden bij toevoeging van verse wortels en van extracten. Toevoeging van verdund waterstofperoxyde kon de remming grotendeels teniet doen. Ook chloorkalk (CaOCl_2) had een dergelijk effect.

Wortellexudaten van planten bevatten een groot aantal stoffen, waaronder remmende kunnen zijn. Zo beschrijft Vancura et al (1972) stoffen in wortellexudaten. Naast een vrij groot aantal plantevoedende stoffen als aminozuren en suikers, zijn er ook organische zuren. Sommige hiervan zoals oxaalzuur dat in wortellexudaat van komkommer in relatief hoge concentraties voorkomt, kunnen in principe de gewasgroei remmen. Uren en Reisenauer (1988) beschrijven in wortellexudaten van planten organische zuren, siderophoren en allelopathische verbindingen.

Young et al. (1989) beschrijft een aantal fenolische verbindingen - meest reeds eerder genoemd - in gronden waarop tarwestro is toegepast.



Figuur 1. Structuur van enkele aromatische verbindingen uit veen Paul & Mc Laren, 1981.

In figuur 2 en 3 zijn resultaten weergegeven van de toxiciteit van een aantal fenolische carbonzuren en de remming in de groei van een aantal gewassen. Concentraties van 100 mg.kg^{-1} in watercultuur gaven een aanzienlijke remming te zien. Het onderling verschil in de invloed van de stoffen is niet groot.

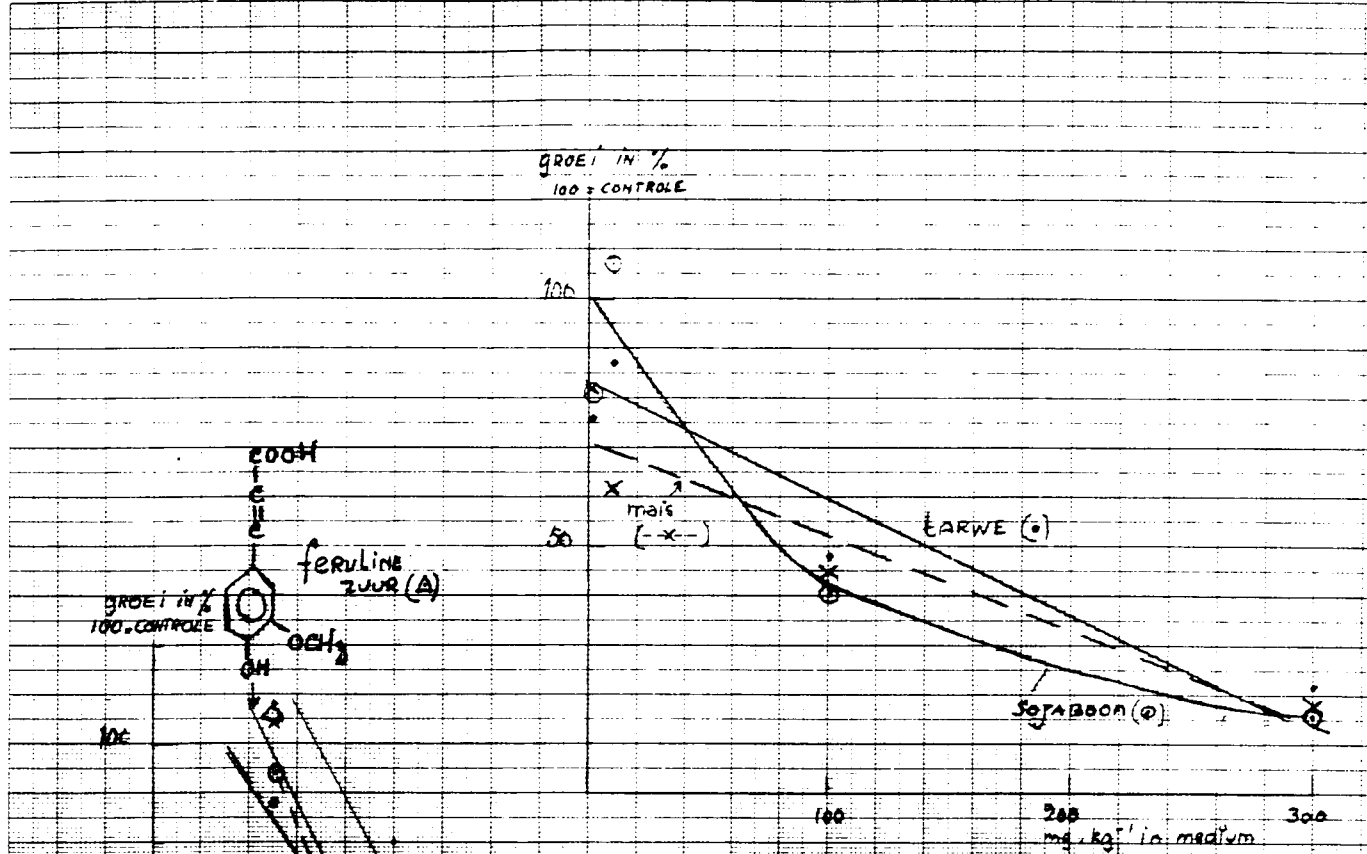
3. ANALYTISCH-CHEMISCHE BEPALING VAN FENOLEN EN ORGANISCHE ZUREN

Indien oriënterend onderzoek als resultaat zou hebben dat in gesloten teelt in bepaalde gevallen remming optreedt dan heeft het zin om analyses te doen in de geconcentreerde voedingsoplossingen.

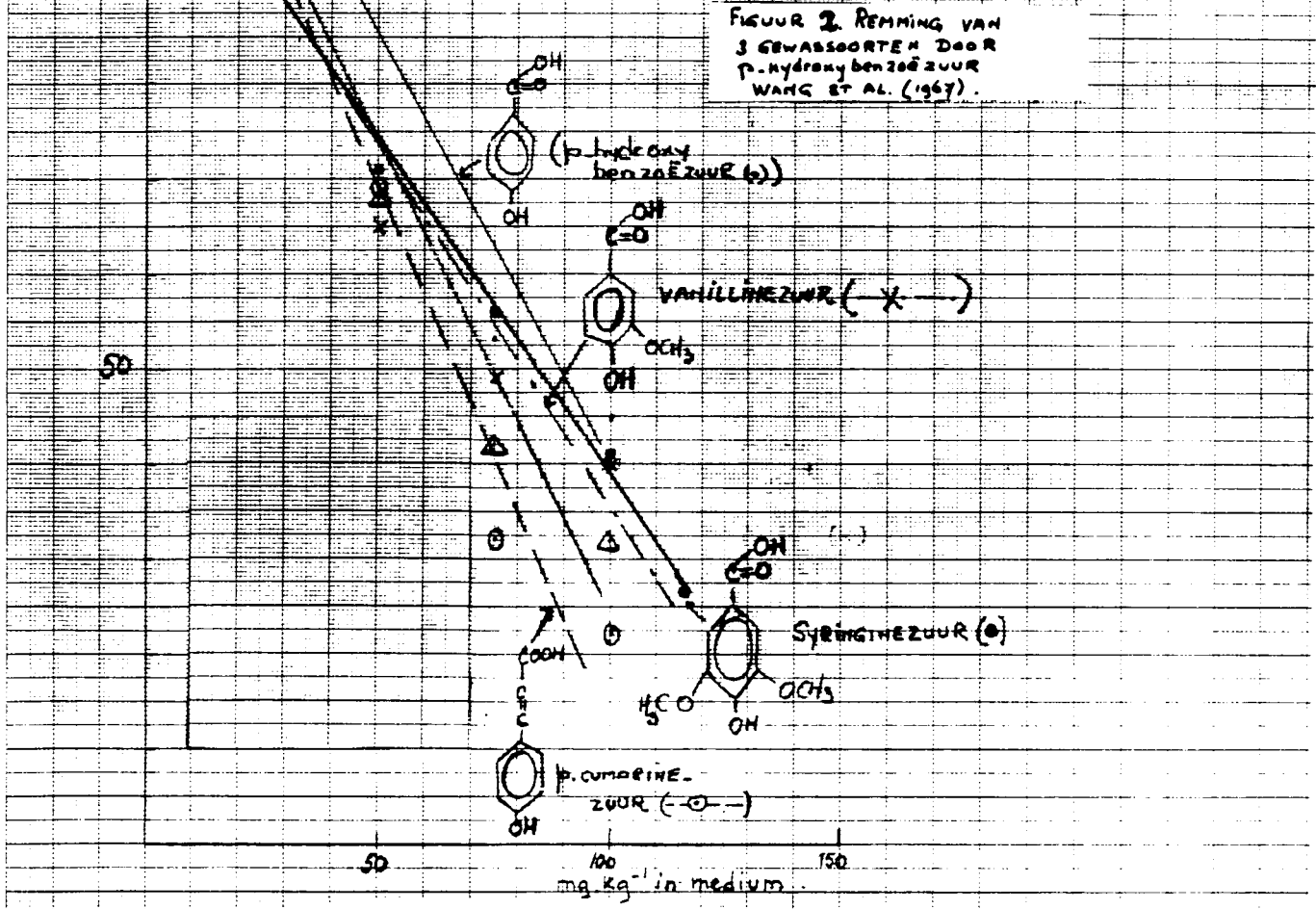
Het zal belangrijk zijn om methoden ter beschikking te hebben die met eenvoudige middelen een beeld geven van de fenolen en organische zuren. Aangezien het zure stoffen betreft kan een eerste stap zijn aan zuren van de voedingsoplossing en extractie met een organisch oplosmiddel. Substraten als veen kunnen het beste met NaOH-oplossingen geëxtraheerd worden. Scheiding kan plaatsvinden via gaschromatografie, vloeistofchromatografie, papierchromatografie en dunne-laagchromatografie. Ook kan een totaalfractie 'fenolische verbindingen' nuttig zijn om te bepalen. Detectie kan bijvoorbeeld gebeuren via uv-absorptie en via kleuring met een reagens en meting van de lichtabsorptie. Infraroodabsorptie kan informatie geven over fenolgroepen, carboxylzuurgroepen, enzovoort.

Een vrij uitgebreid schema voor extractie en globale scheiding van fenolen, zoals beschreven door Schehovic (1990), is in figuur 4 weergegeven. Voor de detectie wordt hier gebruik gemaakt van kleurreacties. Jalal en Read (1983) beschrijven een methode die toegepast wordt op heidegrond. Extractie gebeurt met alcoholische loog. Zuivering kan plaatshebben door overbrengen in een organisch oplosmiddel, extractie met NaHCO_3 -oplossing en opnieuw extractie met een organisch oplosmiddel na aanzuren. Dunne-laagchromatografie wordt toegepast om te scheiden. De detectie gebeurt hier met uv-licht. Bij kwantitatieve scheidingen wordt gaschromatografie toegepast.

Vancura et al. (1972) bepalen een reeks organische zuren, waaronder oxaalzuur met papierchromatografie.



FIGUUR 2. REMMING VAN 3 GEWASOORTEN DOOR P-HYDROXYBENZOE ZUUR WANG ET AL. (1967).



FIGUUR 3. GROEI VAN SUIKERRIET IN AANWEZIGHEID VAN REMMENDE FENOLEN OP WATERCULTUUR WANG ET AL (1967)

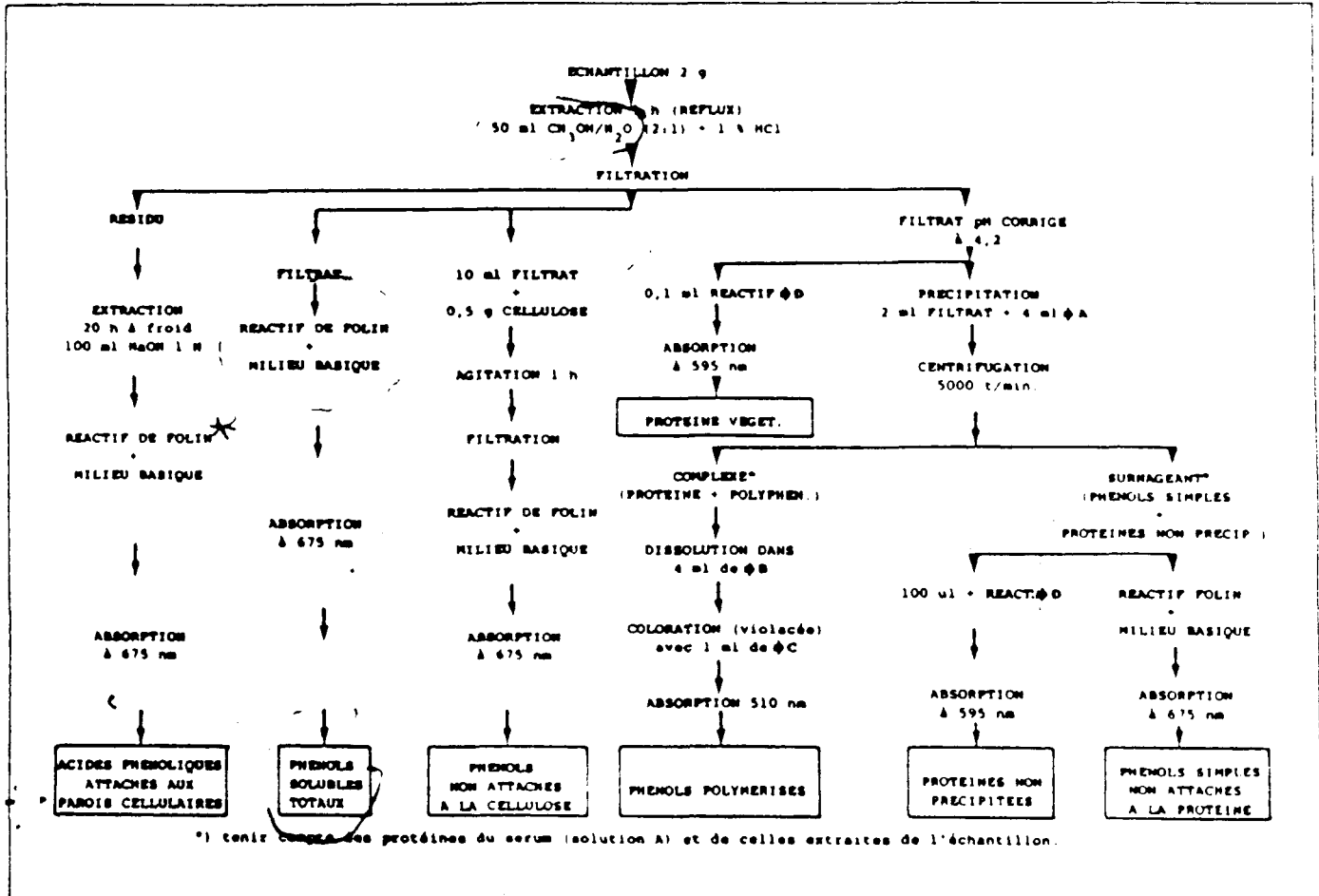


Fig. 1. Procédé analytique de détermination des différentes fractions phénoliques
 A = Solution d'albumine de sérum bovin (1,5 g/l dans tampon pH5 + NaCl)
 B = Solution de dodécylhydrogénosulfate de sodium (1%) et de triéthanolamine (5%) dans l'eau déionisée
 C = Solution 0,01 M de FeCl₃ (III) dans 0,01 N HCl
 D = Réactif DYE (BIO-RAD) dilué (1+4) avec l'eau Millipore

Figuur 4. Analyseschema voor de bepaling van een aantal fenolfracties.
 Scehovic (1990).

Young et al. (1989) analyseren tarwe en rijstgronden in verband met fytotoxiciteit. Het door hen toegepaste schema is in figuur 5 weergegeven. Vooral met de extractie bij pH = 8 worden fenolen meegeëxtraheerd. De detectie die in dat onderzoek wordt gebruikt is een biotest.

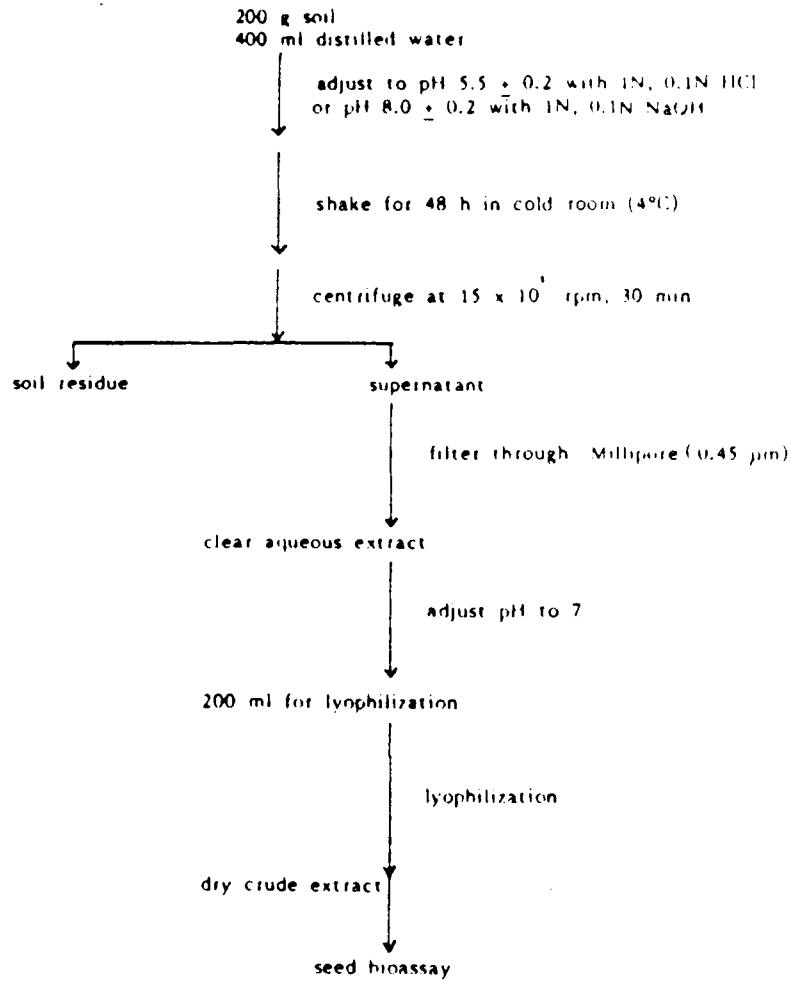


Fig. Soil extraction procedure for rice paddy and wheat-rice rotation soils

Figuur 5. Extractiemethode voor de bepaling van fytotoxische verbindingen in rijst en tarwegronden. Young et al. 1989.

Wang, Yang, Chuang (1967) beschrijven een papierchromatografische methode. Identificatie heeft plaats via bestraling met ultraviolet licht of bespuiting met gediazoteerd p-nitraline of gediazoteerd sulfanylzuur.

Ook Wojcik-Wojtkowiak (1990) tonen fenolen op papier onder uv-licht aan.

Bauer en Treutter (1990) gebruiken vloeistofchromatografie voor scheiding. Dit is een vrij bewerkelijke methode. Bij papierchromatografie gebruiken ze onder andere diphenylboorzuur-3-amino-ethylester 1% in methanol plus 5% polyethyleenglycol 400.

Het is dus mogelijk door extracties die gebruik maken van de zure eigenschappen van fenolen een ruwe afscheiding te krijgen. Detectie kan gebeuren door kleurreacties als de *) Folin-Cioaltea-reactie. Verder kan gebruik worden gemaakt van de specifieke adsorptie in het uv van de fenolgroep. Door het grote aantal stoffen in dergelijke extracten is deze methode echter niet erg selectief. De enige methode is dan een verdere zuivering. Met selectieve absorptiekolommen kan dit nog vrij eenvouding, verdergaande scheiding met gas- of vloeistofchromatografie is vrij bewerkelijk.

*) Het reagens volgens Folin-Ciocaltea is een reagens op fenolen, dat berust op oxydatie. De fenolen worden daarbij omgezet van fenol in chinon. De kleur gaat van geel naar blauw. Het is phosphowolfram molybdeen reagens.

4. CONCLUSIE

In dit verslag worden gegevens vermeld over fenolische verbindingen. Dit zijn aromatische verbindingen met een -OH groep, vaak in combinatie met aldehydegroepen ($-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}$) of carboxylzuurgroepen (-COOH). Deze verbindingen kunnen de plantegroei remmen, voorbeelden hiervan zijn vermeld.

De fenolische kunnen vrij gemakkelijk geïsoleerd worden gebruikmakend van de zure eigenschappen van de fenolgroep. Extractie kan gebeuren met verdunde alkali, bijvoorbeeld verdunde NaOH-oplossing. Hieruit kunnen de fenolen weer geïsoleerd worden na aanzuren door extractie met een organisch oplosmiddel als ether.

De fenolen kunnen met hier vermelde kleurreacties worden bepaald.

De remming kan worden getest met kiemtesten, groei van zaailingen of worteltestmethoden.

De praktische betekenis hiervan bij het langdurig telen op dezelfde oplossing is nog niet duidelijk. Met eenvoudige biologische testmethoden en globale isolatie zou hier echter gemakkelijk een beeld van verkregen worden. Indien werkelijk effecten zouden worden gevonden, zou uitgebreider onderzoek zinvol zijn.

Literatuur

- Bauer, H. en D. Treutter (1990). Identification of Pelargonium genotypes by phenolic "fingerprints". I. Separation and identification of phenolic compounds in leaves. *Gartenbauwissenschaft* 55: 113 - 118.
- Göhler, F. (1967). Untersuchungen über die Ursachen von Wachstumsschäden bei mehrjähriger Durchführung. *Archiv für Gartenbau* XV: 17 - 30.
- Goor, B.J. van, (1990). Exudaten van plantewortels en microben in de rhizosfeer. Samenstelling en werking bij de opname. Intern Verslag PTG, Naaldwijk, nr. 62.
- Glass, A.D.M. (1976). The allelopathic potential of phenolic acids associated with the rhizosphere of *Pteridium aquilinum*. *Can. J. Bot.* 54: 2440 - 2444.
- Grimvall, A., M.B. Bengtsson, H. Borén en D. Wahlström, (1990). Phytotoxic substances in runoff from forested catchment areas. Proceedings of "International symposium on humic substances in the aquatic and terrestrial environment". Springer Verslag, Berlijn, in bewerking.
- Jalal, M.A.F. en D.J. Read, (1983). The organic acid composition of Calluna heathland soil with special reference to phyto- and fungitoxicity. I. Isolation and identification of organic acid and II. Monthly quantitative determination of the organic acid content of Calluna and spruce dominated soils. *Plant and Soil* 70: 257 - 272 and 273 - 286.
- Ofosu-Budu, K.G., K. Fujita en S. Ogata, (1990). Excretion of ureide and other nitrogenous compounds by the root system of soybean at different growth stages. *Plant and Soil* 128: 135 - 142.
- Paul, E.A. en A.D. Mc Laren, (?) *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker Inc., N.Y.: 167 - 183.
- Scehovic, J., 1990. Tanines et autres polymères phénoliques dans les plantes de prairies: détermination de leur teneur et de leur activité biologique. *Revue Suisse Agric.* 22: 179 - 184.
- Uren, N.C. en H.M. Reisenauer, (1988). The role of root exudates in nutrient acquisition. In: B. Tinker and A. Läuchli, *Advances in plant nutrition* 3, Praeger N.Y., Westport, p. 79 - 114.
- Vancura, V. and A. Hanzlikova, (1972). Root exudates of plants. IV. Differences in chemical composition of seed and seedlings exudates. *Plant and Soil* 36: 271 - 282.
- Wang, T.S., T.K. Yang and T.T. Chuang, (1966). Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Science* 103: 239 - 246.
- Wojcik-Wojtkowiak, D., B. Politycka, M. Schneider and J. Perkowski, (1990). Phenolic substances as allelopathic agents arising during the degradation of rye (*Secal cereale*) tissues. *Plant and Soil* 124: 143 - 147.
- Young, C.C., L.R. Zhue Thorne and G.R. Waller, (1989). Phytotoxic potential of soils and wheat straw in rice rotation cropping systems of subtropical Taiwan. *Plant and Soil* 120: 95 - 101.

Bijlage 1

Nagekomen literatuur

- Carballeira, A., (1980). "Phenolic inhibitors in *Erica australis* L. and in associated soil". *Journal of Chemical Ecology* 6: 593 - 596.
- Leather, G.R. and F.A. Einhellig (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1821 - 1828.
- Lundin, P., B. Wibrandt and K.O. Jönsson (1989?). Biologisk test av bevattnings vatten. *Jordbruk* 49: 191 - 197.
- Putnam, A.R. en C.S. Tang (1986). *The science of allelopathy*. John Wiley & Sons, N.Y., 317 pp.

Bijlage 2

Testmethoden voor de remmende of stimulerende stoffen.

Carballeira (1980)

Uit Leather & Einhellig (1988)

Uit Grimvall, et al. (1990)

Samples of plant material and the associated soil were repeatedly extracted with methanol. The extracts were concentrated to dryness under vacuum, redissolved in distilled water, acidified to pH 2.5 with 2 N HCl, and extracted with sulfuric ether. The ether fraction was then reextracted using a saturated aqueous sodium acetate solution. After acidification, organic compounds were separated with ether.

Chromogenic reactions on paper and thin-layer chromatography as well as UV spectrophotometry were used to isolate and identify phenolic compounds, comparing the results obtained with those of standards of the pure samples.

CARBALLEIRA (1980)

Seed Germination Bioassays. The inhibition (or stimulation) of seed germination has been the most widely used bioassay for the determination of allelopathic activity. However, the seed germination process is probably the least understood of all plant functions (Leather, 1987). Seed germination begins with imbibition of water and ends with the protrusion of the radicle through the testa. Radicle elongation is by cell extension only and does not involve cell division. The biochemical events associated with germination are not well defined and may only be preparatory for the mobilization of reserves for seedling growth. Thus, definitive conclusions of allelopathic mechanisms in seed germination bioassays are limited but may involve membrane alteration, resulting in loss of metabolites and the ability to establish the necessary osmotic potential for cell elongation (Koller and Hadas, 1982). Other processes, such as alteration of the phytochrome control of germination, may also be effected. We found that some naturally occurring volatile compounds stimulated the dark germination of *Rumex* sp. that normally require postimbibitional light (French and Leather, 1979). Other perturbations from allelochemicals of seed germination processes may be involved, but we must await further knowledge of the biochemical events that occur during seed germination that are directly related to the germination process.

The greatest problem that affects the veracity of seed germination bioassays results from the manner in which the bioassay is conducted. Anderson and Loucks (1966) emphasized the importance of the solution osmotic potential when testing plant extracts; however, few reports on allelopathic effects consider this precaution (Leather and Einhellig, 1986). Weidenhamer et al. (1987)

reported that the number of seeds relative to the solution volume used in a seed germination bioassay was a factor in the results obtained. They found that the amount of ferulic acid available to each seed influenced the germination, rather than the concentration of chemical in the test solution. In conducting this research, care was taken to prevent anaerobic conditions by submersion of the seeds in water. We have found reports in the literature of allelopathic action where the investigators germinated the test species in volumes of solution that were 20 times the amount required for optimum germination without anaerobiosis.

Blum et al. (1984) offer recommendations for the standardization of germination bioassays. However, their results are based on radicle growth subsequent to germination and perturbations at any of the stages of germination and growth may have effects on any subsequent stage. Nonetheless, their observations regarding pH, microbial contamination, photolability of allelochemical, and loss of test compound are very important when conducting germination bioassays. Our recent review on this subject outlines additional precautions that should be observed when conducting seed germination bioassays (Leather and Einhellig, 1986).

Radicle Elongation Bioassays. Radicle elongation is a more sensitive assay for allelochemicals than seed germination (Leather and Einhellig, 1985; Einhellig, 1986). Like seed germination, radicle elongation is extremely sensitive to high (100 mosmol) osmotic potentials of solutions, and concentrations of purified extracts must be evaluated prior to assay (Bell, 1974). Generally, the radicle is completely dependent upon the seed (cotyledon) reserves for growth in the dark, and precautions must be taken to separate effects upon the seed and the mobilization of storage material by the allelochemical during or immediately following germination. Blum et al. (1984) reported that surface sterilization of seeds with sodium hypochloride modified radicle growth. Thus, as previously noted, care must be taken to minimize early effects of the allelochemical upon the seed that may alter subsequent radicle growth.

The accuracy of results obtained from the measurement of radicles elongating in Petri dishes is questionable. Few such radicles elongate on a straight course, and precise measurements are difficult. We have found that removing the radicle from seed germinated in Petri dishes and thoroughly drying to a constant weight gives accurate results with small statistical error (Leather and Hurtt, unpublished). Parker (1966) described a method to determine herbicide uptake and effects on radicle elongation. We modified this method to use pre-germinated seed placed between chromatography sandwich plates that are maintained at a 45° angle, thus having straight radicles for measurement. Additionally, this method allows only the radicle to be in contact with the test chemical solution (Leather and Einhellig, 1985).

Radicle elongation does afford greater possibilities for mechanism studies than seed germination. It is particularly suited for determining effects of allelochemicals on hormones responsible for cell growth. Radicle elongation also allows evaluation of allelochemical effects on respiration and cell division.

Seedling Growth Bioassays. Seedling growth bioassays are extremely versatile but require a greater quantity of chemical than is usually available during initial isolation and identification of allelochemicals. These bioassays usually have greater sensitivity and provide the basis for a variety of mechanism studies, such as nutrient uptake, water relations, and photosynthesis, but here again, it is difficult to determine the primary sites and mechanisms of action of the allelochemical.

Blum and colleagues (Blum and Dalton, 1985; Blum et al. 1985a,b), used leaf expansion of cucumber seedlings grown in nutrient culture to determine the mechanism of action of ferulic acid and its microbial metabolic products. In these reports, they stress the importance of monitoring the loss of allelochemical through absorption, microbial breakdown, or other mechanisms, including dissociation of the chemical in solutions of changing pH values.

Using a sorghum (*Sorghum*) seedling bioassay, we found that [¹⁴C]salicylic acid was rapidly taken up from the nutrient solution in which the seedling was growing, and it was distributed throughout the seedling within 24 hr after treatment (unpublished results). Such rapid, widespread translocation severely limits the utility of seedling growth bioassays for pinpointing primary sites or mechanisms of allelochemical action.

Uit LEATHER & EINHELLIG (1986)

The Cucumber Root Bio-assay

Seeds of field cucumber (Weibull Favör) were placed in a Petri dish on a piece of filter paper (Munktell 1410) moistened with the water to be tested. After 3 days in darkness at 22°C and 70% humidity, 10 seedlings of average size were selected and rolled into wet filter paper. The paper roll was put into a 300 ml beaker with 50 ml of the water sample, and the seedlings were grown for 4 days at 24°C and 70% humidity. Photoperiod (10,000 lux) was 10-12 h per day. After 2 days in the climate room, another 50 ml of the water sample was added. At the end of the bioassay, the paper roll was unrolled and the root length was measured for each seedling. Root discolouration, absence of root hairs and other visible root injuries were noted. Each water sample was tested in two of the described seedling paper rolls.

Vit GRIMVALL, ET AL (1990)