

Die primêre evaluering van plante met betrekking tot chemiese samestelling en aktiwiteit in ander biologiese sisteme*

L.M. Gerritsma-Van der Vijver, S. Botha en A.M.C. Kruger

Departement Farmaseutiese Chemie, Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, Potchefstroom

UITTREKSEL

In 'n poging om gedokumenteerde gegewens oor planttaksa van Suider-Afrika op te stel, word plante van die Potchefstroomdistrik sistematies ondersoek deur die primêre evaluering van hulle chemiese samestelling en aktiwiteit in 'n aantal biologiese sisteme. Met vars of gevriesde plantmateriaal word chemiese voortoetse op elke morfologiese deel afsonderlik uitgevoer om belangrike tipes sekondêre metaboliete aan te toon; die potensiële fototoksisiteit word gekontroleer; die aktiwiteit teen 'n reeks mikro-organismes word met die direkte plaatmetode getoets; en witrotte word as soogdiermodelle gebruik vir die Hippokratiese evaluering van farmakologiese aktiwiteit. Die toetse wat by die primêre evaluering toegepas word, word kortliks bespreek.

ABSTRACT

Primary evaluation of plants, with regards to chemical composition and activity in other biological systems

With the systematic investigation of plants from the Potchefstroom district an attempt is made to document valuable data of taxa from Southern Africa, concerning the primary evaluation of their chemical constituents and activity in a few biological systems. Fresh or frozen plant material is used and the following tests are performed on each morphological part: chemical screening tests for several important secondary metabolites; tests to determine potential phototoxicity; direct-plate tests to evaluate antimicrobial activity; Hippocratic evaluation of pharmacological activity in mammals with the albino rat as model. These primary tests are briefly discussed.

Die ondersoek van plantmateriaal word deur verskillende dissiplines uitgevoer, byvoorbeeld Botanie, Organiese Chemie, Toksikologie, Farmakologie, Veeartsenykunde en Farmasie. Die motivering vir die ondersoek sal by hierdie verskillende wetenskappe of totaal van mekaar verskil of raakvlakte bevat of die aksent sal op verskillende aspekte val.

In alle gevalle behoort die motivering vir 'n ondersoek baie duidelik omskryf te wees. Ons mening is

dat die motivering vir die ondersoek van plantmateriaal vanuit die farmaseutiese wetenskappe vyf aspekte bevat wat, in volgorde van belangrikheid, soos volg weergegee kan word:

1. die vasstelling van plantsoorte (en hulle morfologiese dele) wat toksiese reaksies by die mens en/of vee veroorsaak;
2. die vasstelling van die struktuur en die verwante werking van metaboliete wat die toksiese effek veroorsaak;
3. die vasstelling van die plantaardige bron van spesifieke koolstofskelette wat as uitgangsmateriaal vir die semisintese van ander belangrike moleküle ge-

*Referaat gelewer tydens die sesde jaarkongres van die Akademie vir Farmaseutiese Wetenskappe in Pretoria, 3 en 4 Mei 1985.

- bruik kan word;
4. die vasstelling van die plantsoorte (en hulle morfologiese dele) wat sonder gevaar in noodtoestande deur mens en dier ingeneem kan word; en
 5. die ontdekking van nuwe prototipegeneesmiddels.

Suid-Afrika het 'n groot skat aan plante waarvan alleen 'n klein persentasie wetenskaplik ondersoek is. Die plante waaroer die meeste chemiese en farmakologiese ondersoek gedoen is, is dié wat van ekonomiese belang is, bv. die aalwyn (*Aloe*-soorte), boegoe (*Barosma*-soorte), rooibostee (*Aspalanthus*-soorte), of dié wat vir veeverliese en/of toksiese reaksies by die mens verantwoordelik is, bv. die gousiektebossie (*Pachystigma pygmaeum*), die tulp (*Homeria*-soorte) en verskillende *Euphorbia*-soorte. Aangesien ons in die toekoms miskien al hoe meer aangewese sal wees op bronne in ons eie land vir voedsel en grondstowwe (bepaalde koolstofskelette), vir die bereiding van geneesmiddels en vir plaagbeheermiddels (sien motivering 1 – 4), is die sistematische ondersoek van die Suid-Afrikaanse flora wenslik.

By die Departement Farmaceutiese Chemie aan die PU vir CHO is daar in die afdeling Fitochemie 'n begin gemaak om die plante van die Potchefstroom-distrik sistematies te ondersoek. Die primêre evaluering, wat chemiese en biologiese eksperimente insluit, is veral geskik vir insluiting by nagraadse studie op Magistergraadvlak, waardeur jong navorsers vertrou gemaak word met die verskillende navorsings-tegnieke.

Vir die biologiese evaluering van 'n plant se aktiwiteit kan verskillende biologiese modelle gekies word, vanaf mikro-organismes tot slakke, visse, insekte, voëls, reptiele en diverse soogdiere. Ons het tot nog toe, om praktiese redes, net gebruik gemaak van mikro-organismes en een soogdier. Die moontlikheid om meer modelle in die reeks in te sluit word steeds oorweeg.

1. VERSAMELING EN VOORBEHANDELING VAN PLANTMATERIAAL

Alle plante wat vir ondersoek versamel word, word in die veld deur 'n kundige van die Departement Plantkunde geïdentifiseer en 'n herbariummonster van die materiaal word vir toekomstige verwysing gemaak. Alle morfologiese plantdele word afsonderlik aan die primêre toetsing onderwerp. Indien moontlik, word blomme en groen en/of ryp vrugte, afhangende van die seisoen waarin die versameling plaasvind, ook getoets.

Plante word op die dag van die versameling in morfologiese dele geskei, elke deel word afsonderlik in plastieksakke verpak en met behulp van vloeibare stikstof gevries waarna dit in 'n vrieskas tot met gebruik bewaar word.

2. PRIMÊRE EVALUERING VAN PLANTMATERIAAL

2.1 Chemiese voortoetsing

Behalwe vir die toets vir sianogene verbindings, word alle toetse uitgevoer op toepaslike vars bereide ekstrakte van die plantmateriaal.

2.1.1 Alkaloïede^{1a, 2a}

Hier word gebruik gemaak van 'n presipitasiereaksie tussen 'n wateroplosbare alkaloïedkatioon en sekere wateroplosbare anione om 'n onoplosbare kompleks te vorm. As alkaloïeddreagense word die volgende gebruik:

1. Mayer se reagens: K_2HgI_4 -oplossing.
2. Wagner se reagens: $KI:I_2$ -oplossing.
3. Dragendorff se reagens: $KBil_4$ -oplossing.
4. Hager se reagens: Pikriensinoplossing.

Aangesien sommige ander plantmetaboliete ook met hierdie reagense presipitate kan gee, word daar by 'n aanvanklike positiewe reaksie 'n verdere selektiewe skeiding van die alkaloïede toegepas, waarna daar weer eens met die alkaloïeddreagense getoets word. Indien daar by hierdie tweede toets weer presipitate gevorm word, word dit as 'n bevestigende toets vir alkaloïede aanvaar.

2.1.2 Sianogene verbinding^{2b}

Sekere plantmetaboliete, veral sianogene glikoside, lewer by hidrolise die uiterst giftige hidrosiaansuur HCN. Die vorming van HCN, wat vlugtig is, kan aangetoon word met behulp van natriumpikraat (geel), wat omgesit word in natriumisopurpuraat (baksteenrooi) in die aanwesigheid van HCN.

2.1.3 Triterpene, saponiene en steroïede^{1b}

Die pentasikliese triterpenoïed- en tetrasikliese steroïedkoolstofskelette kan aangetoon word met die Liebermann-Burchardtoets, waarby die kleur wat ontstaan, 'n aanduiding gee van die tipe skelet wat aanwesig is.

2.1.4 Hartglikoside

Hierdie tipe verbindings sal ook 'n positiewe reaksie met die Liebermann-Burchardtoets gee (2.1.3). Aglikone met 'n vyflid laktonring (kardenolide) kan aangetoon word met die Keddereaksie, waarby 'n rooi/violet tot blou verkleuring as positief beskou word.^{1c}

Aangesien sommige hartglikoside 2-deoksiesuikers bevat, kan die aantoning van hierdie suikers (Keller-Kilianreaksie) ook as 'n bydraende positiewe reaksie vir hartglikoside beskou word.^{1c, 2c}

2.1.5 Fenoliese bestanddele

Alle metaboliete met 'n vry fenoliese hidroksiel-groep gee in 'n waterige oplossing 'n swart/blou of diepgroen kleur met 'n ferri-foon.

2.1.6 Peri-hidroksiekinone^{1d, 2d}

Al hierdie tipe metaboliete (naftakinone en antrakinone) gee 'n karakteristieke kleurverandering van geel/oranje (neutraal) tot blou/violet/rooi in 'n alkaliese omgewing (Bornträgerreaksie). Hierdie verbindings sal ook 'n positiewe reaksie met 'n ferri-foon gee (2.1.5).

2.1.7 Flavonoïede verbindings^{1e}

Behalwe die reaksie met ferri-ione (2.1.5), wat vry fenoliese hidroksielgroepe sal aantoon, is daar ook nog 'n aantal reaksies wat gekleurde of fluoresceren-

de produkte lewer wat karakteristiek is vir spesifieke tipes flavonoïede, byvoorbeeld die Wilson-Tauböckreaksie, Shinodareaksie en Pewreaksie.

2.1.8 Aminosure en amiene^{2e}

Hierdie tipe metaboliete, wat vry in die plantsel voorkom, kan aangetoon word met die ninhidrienreagens, waarby die kleure geel, pienk, rooi, blou of pers kan ontstaan as dié verbindings aanwesig is.

2.1.9 Koolhidrate^{2c}

Die aantoning van reduserende suikers geskied met die bekende reagens van Fehling, waarby 'n oplosbare kupri-foon (blou) gereduseer word tot die swak oplosbare kupro-oksied (baksteenrooi). Toetse om verskillende tipes suiker aan te toon kan ook uitgevoer word.

2.1.10 Stysel

Die bekende reaksie van stysel met 'n jodiumoplossing om 'n donker blou/swart kleur te gee, is 'n eenvoudige metode om hierdie tipe koolhidraat aan te toon.

2.1.11 Tanniene^{2f}

Die toets met 'n ferrisout sal hier ook 'n positiewe reaksie gee (2.1.5). Verskillende ander toetse om sekere soorte tanniene aan te toon is ook bekend.

2.2 Toetsing vir antimikrobiese aktiwiteit

Die direkte plaatmetode word gebruik, waarby die verskillende morfologiese plantdele direk in aanraking gebring word met 'n reeks mikro-organismes wat op voedingsagarplate uitgesprei is.³ Ongeveer agt verskillende bakteriesoorte word gebruik wat sowel Grampositiewe as Gramnegatiewe organismes insluit. Verder word ongeveer drie skimmels en die gis *Candida albicans* as toets-organismes gebruik. Plantdele met metaboliete wat antimikrobiese aktiwiteit besit, toon duidelike groei-inhibisiesones na inkubering.

2.3 Toetsing vir fototoksiese aktiwiteit

Die toets vir fototoksiese aktiwiteit word uitgevoer met *Candida albicans* as toetsorganisme volgens 'n

gewysigde metode van Weimarck en Nilsson.⁴ Hier word weer van die direkte plaatmetode (2.2) gebruik gemaak, waarby twee eenderse plate voorberei word. Die een plaat word onder bestraling van UV-lig van 365 nm geïnkubeer, terwyl die ander as 'n kontrole dien en in die donker geïnkubeer word. Indien meer uitgesproke groei-inhibisiesones by die bestraalde plaat voorkom, is dit te wyte aan die fototoksiteit van die plantmetaboliet(e).

2.4 Hippokratiese evaluering van farmakologiese aktiwiteit met 'n soogdiermodel

Die gebruik van 'n enkele, gestandaardiseerde, veeldoelige prosedure as 'n primêre toets vir die farmakologiese aktiwiteit van ru plantmateriaal word sterk aanbeveel.^{5,6} Die Hippokratiese evaluering uitgevoer met witrotte, soos deur Malone en Robichaud in 1962⁷ beskryf, is deur ons toegepas vir die primêre evaluering van farmakologiese aktiwiteit met 'n soogdiermodel.

Die apparaat wat gebruik en die eksperimentele prosedure wat gevvolg word, word volledig deur Malone en Robichaud⁷ beskryf. Enkele belangrike punte oor die toets, soos deur ons uitgevoer, word hier genoem:

1. *Proefdiere*: witrotte, mannetjies, 100-150 gram.
2. *Monster vir ondersoek*: 'n spesifieke morfologiese plantdeel word gehomogeniseer (ca. 200 maas) in 'n 0,25% waterige agaroplossing.
3. *Roete van toediening en volume*: intra-peritoneale inspuiting, tot 2 ml.
4. *Dosis*: ten minste drie logdosisse, gebaseer op die aanvanklike bepaling van 'n letale dosis ($\leq 1\ 778$ mg/kg).
5. *Aantal proefdiere*: ten minste drie per dosis.

Die ingespuite rot word saam met 'n onbehandelde rot (kontrole) in die arena geplaas, waar 'n reeks simptome met vasgestelde tussenposes (wat strek oor sewe dae) gekontroleer en die bevindings op 'n gestandaardiseerde werkskaart ingevul word. Die evaluering van simptome behels of 'n spesifieke meting (bv. pupilgrootte in mm, gewig in gram) of 'n subjektiewe waardetoekenning (0, +, ++, +++, ++++) volgens die riglyne wat vooraf gestel is.⁷ Die toets berus dus op 'n kwalitatiewe en semikwantitatiewe

TABEL 1

Voorkant van werkskaart ingevul vir die evaluering van *Atropa belladonna*-blare
(Na analogie van die werkskaart gebruik deur Malone en Robichaud⁷)

Datum:	11/02/1985	Dosis:	10 mg/kg (1.46 mg)
Toetsbeampte:	AMCK	Dosisvolume:	0,73 ml
Toetsbestanddeel/ plant:	<i>Atropa belladonna</i> -blare	Toedieningsroete:	IP
Proefdier: Witrot	Geslag: M	Doseertyd:	10h56
	Massa: 146,3 g	Tyd voedsel weerhou:	10h55
	Identifikasie: 1 kol	Tyd voedsel weer verskaf:	13h00
	Respirasietempo: 88/min	Konsentrasie van toets-	
Ander simptome:	+ 10 min:) verhoogde motoriek	suspensie:	0,2% g/V
	+ 15 min:) tydens hantering	+ 30 min:) vokalisasie met	
	+ 2h: mikturisie = donkergeel	+ 60 min:) hantering	
Sterfte:	Nee.	+ 2 dae: bloed by neus	

TABEL 2

Agterkant van werkskaart ingeval vir die evaluering van *Atropa belladonna*-blare.
(Na analogie van die werkskaart gebruik deur Malone en Robichaud⁷)

Sintoom	Kon-trole	Reaksie na dosering											
		+ 5 min	+ 10 min	+ 15 min	+ 30 min	+ 60 min	+ 2 uur	+ 4 uur	+ 6 uur	+ 24 uur	+ 2 dae	+ 4 dae	+ 7 dae
Verlaagde motoriek		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ataksie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Regopspringrefleksverlies		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kornearefleksverlies		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pinnarefleksverlies		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roostergreepverlies		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paralise: nek		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
voorpote		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
agterpote		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Verlaagde respirasie – diepte		0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+
– tempo	88	0	0	0	74	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispnee		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cheyne Stokes-respirasie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Verhoogde motoriek		+	+	±	±	±	+	±	0	+	+	±	0
Liggaamstremore: effens		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hewig		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
Skrikreaksie		±	±	±	+	+	+	+	+	±	+	+	+
Konvulsies: klonies		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tonies		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fassikulasie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Verhoogde respirasie – diepte		+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0
– tempo	88	90	126	116	0	88	104	114	108	112	114	124	126
Enoftalmos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eksoftalmos		0	±	±	+	+	0	0	0	0	±	0	0
Ptose		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pupilgrootte (mm)	0,5	2	2,5	3	3	2,5	2	1	1	0,5	0,5	0,5	1,5
Nistagmus		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lakrimasie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chromodakryorree		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oor: velverbleking		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hiperemie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sianose		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
metachrose		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivasie		0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
Stert: ereksie		+	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0
slanery		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
grypaksie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pilomotoriese ereksie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Robichaudtoets		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mikturisie		0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Diarree		0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Priapisme/Kolpektasie		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abdominale krampe		0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Kop tik: aggressief		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
passief		+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0
beangs		0	0	0	0	0	±	+	0	+	0	0	+
Liggaamsgreep: aggressief		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
passief		+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+
beangs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0
Sirkelbewegings		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liggaamshouding		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oormatige nuuskierigheid		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Massa (g)		146,3				150,6	150,3	149,9	150,2	153,8	158,2	169,3	173,9
Massa: kontrole (g)		164,1				168,9	167,0	171,3	170,2	176,0	186,2	199,5	206,6

waarnemingstegniek (Hippokratiese evaluering). In Tabel 1 en 2 word beide kante van 'n werkskaart getoon wat ons voltooi het in 'n toetslopie vir die evaluering van 'n ou voorraad (ca. 20 jaar) van *Atropa belladonna*-blare.

Op grond van die resultate wat verkry word, kan die aktiwiteit in nege verskillende farmakologiese klasse ingedeel word. Volgens Malone, Tyler en Brady⁸ berus die kwalitatiewe evaluering van die aktiwiteit op die volledige logeffekprofiel, wat al die proefdiere asook die verskillende logdoseringen insluit. Slegs simptome wat 'n dosisefek toon, word by die evaluering gebruik. Indien geen uitgesproke dosisefeksimptome waargeneem word nie, word die plant as „algemeen onaktief“ geklassifiseer. Die farmakologiese klasse met hulle verwante dosisefeksimptome word deur Malone, Tyler en Brady⁸ soos volg aangegee:

1. *Centraalsenuweestelselonderdrukkend*: gelyktydige afname van respirasiesnelheid en -diepte; afname van spontane motoriese aktiwiteit; ataksie.
2. *Diureties*: konsekwente noterings van mikturisie; omkeerbare verlaging (met verloop van tyd) in liggaamsmassa; toenemende velplastisiteit wat weergegee word deur 'n positiewe Robichaudtoets.
3. *Metabolies giftig*: onomkeerbare gewigsverlies; afname van spontane motoriese aktiwiteit; ano-reksie; velplastisiteit; pilomotoriese erekse; diarree.
4. *Psigotropies*: stereotipie; disoriëntasie; algemene beangste reaksies op koptik- en liggaamsreceptoete; midriase; lakrimasie; hiperemie; hiperrefleksie (wanneer waargeneem); katatonie (wanneer waargeneem).
5. *Perifeervaatverwydend*: hiperemie van die vel.
6. *Skeletspierverslappend*: verlies van roostergreep deur voor- en agterpote; velplastisiteit; ataksie; verlies van regopspringrefleks sonder verlies van bewyssyn; onderdrukking van respirasie.
7. *Simpaties-stimulerend*: toename van spontane motoriese aktiwiteit; midriase; dik salivasie; pilomotoriese erekse; ekssoftalmos; verhoogde skeletspiertonus; aggressiewe reaksiepatrone.
8. *Parasimpaties-stimulerend*: lakrimasie; chromodakriorree; dun salivasie; hiperemie van die vel; enoftalmos; pilomotoriese erekse; diarree.
9. *Kalmerend*: passiwiteit tydens koptik- en lig-

gaamsreceptoete sonder 'n belangrike effek of respirasie of skeletspiere; afname van spontane motoriese aktiwiteit; hipotermie; aktiewe of passiewe verkleining van die ooglidopening.

Dit is van belang om te onthou dat vir die indeling in 'n farmakologiese klas, die afwesigheid van sekere dosisefeksimptome net so 'n belangrike rol speel as die teenwoordigheid van sekere ander dosisefeksimptome. Dit is ook van belang om te onthou dat die simptome wat waargeneem word ná intraperitoneale toediening, minder uitgesproke of selfs afwesig by orale inname van dieselfde toetsmonster mag wees.

Die resultate van 'n Hippokratiese evaluering moet slegs beskou word as 'n aanduiding van 'n sekere aktiwiteit en nie as 'n volledige diepgaande farmakologiese evaluering van aktiwiteit nie.

SLOTOPMERKING

Die resultate wat met hierdie primêre evaluering van plante verkry word, stel ons in staat om 'n goeie beeld saam te stel van die potensiële biologiese aktiwiteit van die totale plant en om in sommige gevalle hierdie aktiwiteit aan moontlike metabolietstrukture te koppel.

BIBLIOGRAFIE

1. Wichtl, M. (1971). *Die pharmakognostisch-chemische analyse* (Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt)
 - a. p. 102
 - b. p. 145
 - c. p. 139
 - d. p. 92
 - e. pp. 153-155
2. Trease, G.E. & Evans, W.C. (1983). *Pharmacognosy*. 12th Edition (Baillière Tindall, London)
 - a. p. 539
 - b. p. 529
 - c. p. 344
 - d. p. 387
 - e. p. 286
 - f. p. 378
3. Van der Vijver, L.M. & Lötter, A.P. (1971). The constituents in the roots of *Plumbago auriculata* Lam. and *Plumbago zeylanica* L. responsible for antibacterial activity, *Planta Medica*, 20, 8-13.
4. Weimarck, G. & Nilsson, E. (1980). Phototoxicity in *Heracleum sphondylium*, *Planta Medica*, 38, 97-111.
5. Malone, M.H. (1977). In: *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*, Wagner, H. & Wolff, P. (eds.). (Springer Verlag, Berlin) pp. 23-53.
6. Malone, M.H. (1983). The pharmacological evaluation of natural products – general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals, *Journal of ethnopharmacology*, 8, 127-147.
7. Malone, M.H. & Robichaud, R.C. (1962). A Hippocratic screen for pure or crude drug materials, *Lloydia*, 25, 320-332.
8. Malone, M.H., Tyler, V.E. & Brady, L.R. (1967). Hippocratic screening of sixty-six species of higher fungi, *Lloydia*, 30, 250-257.