


Fraksies en geïsoleerde verbinding uit *Tecoma stans* (Bignoniaceae), 'n indringerplant, het belowende aktiwiteit teen fungus fitopatogene

**Authors:**

Moraba M. Meelah^{1,2}
Ladislav K. Mdee^{1,3}
Jacobus N. Eloff¹ 

Affiliations:

¹Phytomedicine Programme,
Department of Paraclinical
Sciences, University of
Pretoria, South Africa

²Health Sciences Research
Office, Faculty of Health
Sciences, University of the
Witwatersrand, South Africa

³Department of Pharmacy,
University of Limpopo,
South Africa

Corresponding author:

Jacobus Eloff,
kobus.eloff@up.ac.za

Dates:

Received: 23 Oct. 2017
Accepted: 06 Nov. 2017
Published: 12 Dec. 2017

How to cite this article:

Meelah, M.M., Mdee, L.K. &
Eloff, J.N., 2017, 'Fraksies en
geïsoleerde verbinding uit
Tecoma stans (Bignoniaceae),
'n indringerplant, het
belowende aktiwiteit teen
fungus fitopatogene',
*Suid-Afrikaanse Tydskrif vir
Natuurwetenskap en
Tegnologie* 36(1), a1496.
[https://doi.org/10.4102/
satnt.v36i1.1496](https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1496)

Copyright:

© 2017. The Authors.
Licensee: AOSIS. This work
is licensed under the
Creative Commons
Attribution License.

Read online:

Scan this QR
code with your
smart phone or
mobile device
to read online.

Fungi wat plante aanval, lei tot groot verliese in plantproduksie en ook tot verliese in opbrengs nadat die produkte geoes is. Die beheer van hierdie fungi deur chemiese fungisiede lewer komplikasies vanweë menslike en omgewingstoksiseit. Die koste en die ontwikkeling van weerstand deur plantpatogeniese fungi teen fungisiede lewer ook probleme. Sekondêre plantmetaboliete het 'n goeie potensiaal as antifungusverbindings. Die doel van die studie was om die aktiwiteit van *Tecoma stans*-ekstrakte en -fraksies te bepaal en om die aktiewe verbinding te isoleer deur die bioaktiwiteit van fraksies gedurende die fraksionering te bepaal. Die dichlorometaanfraksie het die hoogste aktiwiteit gehad en die geïsoleerde verbinding se struktuur is bepaal as oleanolsuur. Die antifungusaktiwiteit is teen tien belangrike plantfunguspatogene bepaal (*Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Collectotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium janthinellum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora nicotiana*, *Trichoderma harzianum* en *Rhizoctonia solani*). Die gemiddelde minimum inhiberende konsentrasie was 130 µg/mL. Die DCM-ekstrak en oleanolsuur was minder toksies as die positiewe kontrole berberien teen Vero-selle met LC₅₀ waardes van 0.413 mg/mL, 0.129 mg/mL en 15.48 µg/mL onderskeidelik. Die selektiwiteitsindeks van 20 met verskeie fungi dui op moontlike relatiewe veiligheid om onder gekontroleerde toestande selfs vir eetbare produkte te gebruik. Die groot massa plantmateriaal wat van hierdie indringerplant beskikbaar is, mag tot 'n kommersieel bruikbare produk lei in die bekamping van fitopatogeniese fungi.

Navorsing korrelasie: Hierdie artikel is die vertaalde weergawe en is beskikbaar gestel om 'n breër lesersgroep te bereik. Die oorspronklike Engelse artikel is beskikbaar hier: <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1489>

***Tecoma stans* (Bignoniaceae), leaf extracts, fractions and isolated compound have promising activity against fungal phytopathogens.** Plant pathogenic fungi are a major cause of reduced plant production and post-harvest losses of plant produce. The control of these fungi by some synthetic fungicides is complicated by human and environmental toxicity, the development of resistance by some fungi and high costs, thus prompting the investigation of other means of fungal control. Plant secondary metabolites have a good potential as antifungal agents. The aim of this study is to investigate the potential use of *Tecoma stans* as a plant-derived fungicide by determining the antifungal activity of extracts, isolating the bioactive compound and testing the toxicity of both the extract and the isolated compound. In bioassay-guided fractionation of the leaves of the *T. stans* dichloromethane (DCM) extract contained one major compound that was isolated and characterised as oleanolic acid. The DCM extract and oleanolic acid were active against 10 tested plant fungal pathogens (*Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Collectotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium janthinellum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora nicotiana*, *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*) with an average minimal inhibitory concentration of 130 µg/mL. The DCM extract and oleanolic acid were toxic to Vero cells with an LC₅₀ of 0.413 mg/mL and 0.129 mg/mL respectively, when compared with berberine, a toxic compound with LC₅₀ of 15.48 µg/mL. Oleanolic acid was more toxic than the crude extract, supporting the potential use of plant extracts for controlling plant fungal pathogens. The selectivity indices of 20 with several fungi indicated that extracts could possibly be used under controlled conditions against infections of certain fungal pathogens, even on edible plants. The large quantities available of this invasive plant species could lead to a commercially useful product in controlling plant fungal pathogens.

Research correlation: This article is the translated version, made available to provide access to a larger readership, of which the original English article is available here: <https://doi.org/10.4102/satnt.v36i1.1489>

Note: This article is partially based on the author's dissertation to the Phytomedicine Programme in the Department of Paraclinical Sciences, for the degree of Magister Scientiae at the University of Pretoria, South Africa, with supervisors Prof. J.N. Eloff and L.K. Mdee, received December 2008, available here: <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/23195/dissertation.pdf?sequence=1>

Inleiding

Patogeniese fungi in plante bedreig voedselsekureitêit wêreldwyd terwyl meer as 800 miljoen mense nie genoeg kos het nie en ten minste 10% van die kos wat geproduseer word as gevolg van aanvalle deur mikroorganismes verlore gaan (Strange & Scott 2005). Een belangrike oorsaak van plantsiektes is patogeniese fungi (Prescott, Harley & Klein 1996). Wanneer oeste deur sekere patogeniese fungi geïnfecteer word, stel hulle mikotoksiene vry wat vir sowel mense as lewendende hawe skadelik is (Awuah & Kpodo 1996).

Sintetiese swamdoders is die belangrikste manier om plantpatogene te beheer. Veiligheidsrisiko's, die hoë koste, nuwe-effekte en die ontwikkeling van weerstandigheid jeens die gebruik van hierdie fungisiede wek egter ernstige kommer (Tripathi & Dubey 2004). Hierdie nadeel het aanleiding gegee tot die ondersoek na ander maniere om fungi te beheer.

Plante is goeie kandidate vir die soektog na swamdodende verbindings aangesien hulle soms onder moeilike omstandighede bestaan en deur verskillende organismes, veral fungi, aangeval word (Hostettman et al. 2000). Daar is 'n toenemende motivering om sintetiese antimikrobiële middels met natuurlike middels te vervang (Sharma & Tripathi 2006). Plantekstrakte of plant sekondêre metaboliete uit plante wat nie giftig is nie en spesifiek is in hulle werking kan dus as alternatiewe vir sintetiese swamdoders oorweeg word. Op grond van die beskikbare materiaal het ons besluit om *T. stans* te ondersoek.

Tecoma stans, wat ook as die floridavlier bekend staan, is 'n lid van die Bignoniaceae-familie. Hierdie aantreklike tropiese struik kom hoofsaaklik in Sentraal- en Suid-Amerika voor hoewel die natuurlike verspreiding vanaf die suidelike state van die Verenigde State van Amerika (VSA) tot in die noorde van Argentinië strek. *T. stans* het egter ook in ander tropiese en subtropiese streke in Afrika, Asië, die Stille-Oseaan-eilande en Australië as indringerplant gevestig geraak. *T. stans* is 'n droogtebestande struik wat redelik weerstandig is teen peste (<http://cloudbridge.org/trees/tecomastans.html>).

Die blare, bas en wortels van *T. stans* word vir 'n verskeidenheid medisinale doeleindes as kruiegeneesmiddel aangewend (<http://cloudbridge.org/trees/tecomastans.html>). In Meksiko word die plant tradisioneel dikwels in die beheer van diabetes gebruik. Blaarekstrak van die plant het vastende hase se bloedsuiker verlaag (Hammouda, Rashid & Amer 1964). Die plant bevat monoterpeen alkalioïede en twee van hierdie verbindings (tekomen en tekostanien) is vir die plant se hipoglisemiese aktiwiteit verantwoordelik (Hammouda & Amer 1966). Ons kon geen inligting in die literatuur kry oor die plant se antifungus aktiwiteit nie. Dit laat dus ruimte vir hierdie studie om inligting oor die moontlike antifungus gebruik te bied.

Ons het in hierdie studie die belangrikste antifungus verbinding in die plant geïsoleer en gekarakteriseer. Ons het

ook die antifungus aktiwiteit teen belangrike patogene in plantfungi bepaal, asook die sitotoksiteit van die verbinding.

Materiaal en metode

Plantversameling

Blare van *T. stans* is in die somer by die Laeveld Nasionale Botaniese Tuin in Mbombela, Suid-Afrika, versamel. Die blare is gedroog deur hulle in die skaduwee met goeie ventilasie in oop maassakkies, waarin lemoene verkoop word, op te hang. Die identiteit van die spesie is bevestig deur 'n herbariumeksemplaar.

Ekstraksie

Verpoëerde gedroogde blare van *T. stans* is drie keer met asetoon in 'n verhouding van 10:1 ge-ekstraheer. Die asetoon is by kamertemperatuur onder 'n stroom lug in 'n dampkas verwyder. Die ekstrak is geberg in gemerkte houers wat vooraf geseël is om die effektiwiteit van die ekstraksie te kwantifiseer. Asetoon is as ekstraktant gebruik op grond van die effektiwiteit daarvan om 'n groot hoeveelheid en verskeidenheid verbindings te ekstraheer, die gemak om dit te verwyder uit die ekstrak, veiligheid en lae toksiteit teen bioessasieorganismes (Eloff 1998a).

Oplosmiddel-oplosmiddel fraksionering van opgesuiwerde ekstrak

Oplosmiddel-oplosmiddel ekstraksie is 'n gewilde tegniek wat gebruik word om monsters vir kwalitatiewe en kwantitatiewe ontleding voor te berei. Dit is 'n proses waar een bestanddeel van 'n mengsel geskei word deur dit op te los in 'n oplosmiddel waarin dit oplosbaar is, terwyl ander konstituentie nie oplosbaar is nie of ten minste minder oplosbaar is (Holden 1999). Die opgesuiwerde ekstrak van *T. stans* in asetoon is afsonderlik in metanol en 20% gedistilleerde water in 'n skeidingstregter (2000 mL) opgelos en toe met heksaan (Heks), dichlorometaan (DCM), etielasetaat (ETOAC) en n-butanol (BuOH) geskei, in hierdie volgorde. Hierdie oplosmiddels het wisselende polariteite om verskillende bestanddele van die plant met verskillende polariteite te skei. Die chemiese samestelling (deur dunlaagchromatografie), die aantal antifungus verbindings (deur bio-outografie), die antifungus aktiwiteit (deur reeksverdunding op 'n mikroplaat) en die sitotoksiteit teen Vero-selle van die vier fraksies is bepaal.

Bio-outografie

'n Bio-outografiese metode wat in ons laboratorium ontwikkel is (Masoko & Eloff 2005), is gebruik om aktiwiteit te bepaal. Dunlaagchromatografieplate is voorberei en gelaai met ekstrak en oleanolsuur wat in 'n finale konsentrasie van 10 mg/mL en 1,0 mg/mL onderskeidelik opgelos is. Tien mikroliter daarvan is aangewend en die plate is in 'n mobiele fase ontwikkel, gedroog en met swamorganismes gespuit totdat dit net-net nat was. Die plate is oornag geïnkubeer en toe met 'n oplossing van

2 mg/mL p-jodonitrotetrasolium violet (Sigma®) (INT) gespuit. Dit is weer oornag of langer by 35 °C in 100% relatiewe humiditeit en in die donker geïnkubeer. Wit areas het aangedui waar die reduksie van INT na die gekleurde formasaan nie plaasgevind het nie omdat daar verbindings was wat die groei van die fungi in die toets geïnhibeer het. Ten einde die verspreiding van en infeksie met fungi in ons laboratorium te beperk, is die bio-outogramme in deurskynende plastiekkoevertse verseël voordat dit vir 'n permanente rekord inskandeer is. Die R_f -waarde van aktiewe verbindings is bereken deur die volgende formule te gebruik:

$$R_f = \frac{\text{afstand deur verbinding beweeg}}{\text{afstand deur oplosmiddelfront beweeg}}$$

Die bepaling van antifungus aktiwiteit deur 'n reeksmikroverdundingstoets

Die mikroverdundingsmetode wat deur Eloff (1998b) ontwikkel en deur Masoko, Picard en Eloff (2005) gewysig is, is gebruik om die minimum inhiberende konsentrasie (MIK)-waardes van *T. stans* ekstrakte, fraksies en geïsoleerde verbindings teen 10 patogeniese plantfungi te bepaal, naamlik *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Collectotrichum gloeosporoides*, *Frinoderma wallianum*, *Cyathium optimum* en *Phytophthora nicotiana*. Die metode is soos volg toegepas.

Die gedroogde DCM-ekstrak van *T. stans*, fraksies en oleanolsuur is in asetoon opgelos teen 'n konsentrasie van 10 mg/mL en 1 mg/mL onderskeidelik. Die DCM-ekstrak van *T. stans* en oleanolsuur (100 µL) is in 'n reeksverdunding met 50% water in 'n 96-bron mikrotiterplaat verdun (Eloff 1998b). Swamkulture is in 'n vars dekstroose aartappel groeimedium oorgeplaas en 100 µL hiervan is by elke bron gevoeg. Amfoterisien B is as die verwysingsantibiotikum en positiewe kontrole gebruik en die negatiewe blanko kontrole vir die oplosmiddel, asetoon is ingesluit. As groei-aanduider is 40 µL 0.2 mg/mL INT wat in water opgelos is by elk van die mikroplaatputjies gevoeg. Die eksperiment is in tripikaat uitgevoer en drie maal herhaal. Die minimum inhiberende konsentrasie (MIK) is aangeteken as die laagste konsentrasie-ekstrak wat antifungus groei na 24 h se inkubasie geïnhibeer het. Asetoon is as oplosmiddel en negatiewe kontrole gebruik omdat fungi nie deur asetoonkonsentrasies van laer as 50% beïnvloed word nie (Eloff, Picard & Masoko 2007). Die hoogste asetoonkonsentrasie waaraan die fungi in hierdie prosedure blootgestel is, was 25% in die eerste putjie.

Sitotoksiteit bepaling

Die monsters se sitotoksiteit teen die Vero-niersellyn in ape (wat van die Departement Tropiese Dieresiektes, Universiteit van Pretoria, verkry is) is getoets. Die selle is in minimale noodsaaklike medium (Highveld Biological, Johannesburg, Suid-Afrika) onderhou. Dit is met 0.1% gentamisien (Virbac

en 5% fetale kalfserum (Adcock-Ingram) aangevul. Die selle is vir die toets voorberei deur selsuspensies uit samevloeiende monolaagkulture voor te berei en dit teen 'n digtheid van 0.5×10^3 selle in elke putjie in die 96-put mikrotiterplaat te plaas. Nadat dit oornag teen 37 °C in 'n 5% CO₂-inkubeerder inkubeer is, is die subsamevloeiende selle in die mikrotiterplaat in die sitotoksiteitstoets gebruik. Verdunnings van die plantekstrak is in groeimedium (1 µg/mL tot 1000 µg/mL) voorberei. Die lewensvatbare selgroei na 120 h se inkubering met plantekstrakte/monsters is bepaal deur die tetrasoliumgebaseerde kolorimetrie toets (MTT-toets) wat deur Mosmann (1983) beskryf is, te gebruik. Die absorpsie is op 'n Titertek Multiscan MCC/340 mikroplaatleser teen 'n toetsgolf lengte van 540 nm en 'n verwysingsgolf lengte van 690 nm gemeet. Berberienchloried (Sigma Chemical Company) is as positiewe kontrole gebruik. Toetse is in viervoud uitgevoer en elke eksperiment is vier maal herhaal.

Die isolering van bioaktiewe verbindings

Die DCM-ekstrak wat uit die oplosmiddel-oplosmiddel ekstraksie verkry is, is op silikajel 60 aan kolomchromatografie onderwerp. Die kolom is met 100% DCM uitgelooë en die polariteit van die loogmiddel is daarna deur die byvoeging van metanol (MeOH) verhoog. Aanvanklik is 1000 mL 100% DCM gebruik, gevolg deur mengsels van 10% MeOH, 20% MeOH, 30% MeOH, 40% MeOH, 50% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, almal in DCM. Laastens is die kolom met 100% MeOH uitgewas. Altesaam nege fraksies van 1000 mL is versamel. Fraksies is volgens die in samestelling op dunlaagchromatogramme saamgegroepeer. Die fraksies is gekonsentreer en gechromatografeer om onsuiverhede te verwyder ten einde die aktiewe verbinding te verkry. Ten einde te bevestig dat die isolering van die antifungus verbinding in die ekstrak nie 'n artefak van die isoleringprosedure was nie, is bio-outografie op die geïsoleerde verbinding en die ongesuiverde ekstrak in DCM uitgevoer.

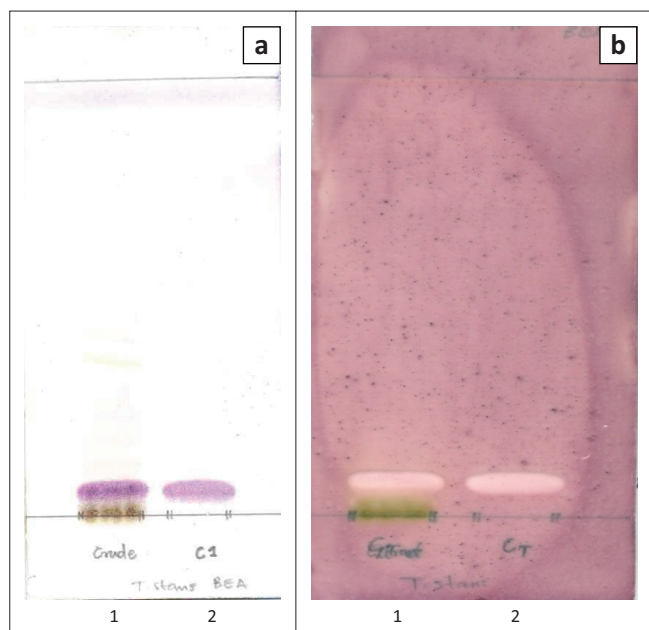
Kernmagnetiese resonansiespektroskopie

Kernmagneetresonansiespektroskopie (1H NMR en 13C NMR) is met 'n Varian Inva 400 MHz-spektrometer gedoen om die struktuur van die verbinding te bevestig. Die geïsoleerde verbinding uit *T. stans* is gedroog en c. 15 mg is in NMR-buise in 2 mL gedeuteerde chloroform opgelos. Die analise is in die Departement Chemie aan die Universiteit van Botswana ontleed.

Resultate en bespreking

Die hoeveelheid *Tecoma stans* wat onttrek is deur oplosmiddel-oplosmiddel ekstraksie te gebruik

Die 46, 67 g, asetoonekstrakte van verpoëerde *T. stans*-blare is aan oplosmiddel-oplosmiddel ekstraksie onderwerp. Dit het tot vier fraksies met toenemende polariteit gelei, naamlik



FIGUUR 1: Chromatogram en bio-outogram van die dichlorometaan-fraksie wat met benseen:etanol:amoniumhidroksied 90/9/1 (1) ontwikkel is en die verbinding wat uit die ekstrak (2) geïsoleer is, wat met vaniliensuur-swaawelsuur(a) en 'n konidia suspensie van *Penicillium expansum* gevolg deur p-iodonitrotetrasolium violet (b) gespuit is.

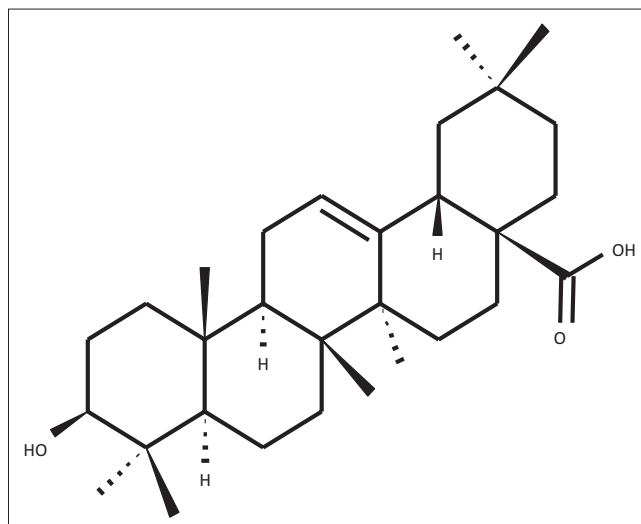
heksaan, DCM, EtOAc en BuOH. Heksaan was die beste ekstraktant wat betref die hoeveelheid wat onttrek is met 46, 23% (21, 58 g), gevolg deur DCM met 16, 75% (7, 82 g), EtOAc met 1, 79% (0.84 g) en BuOH met 0.64% (0.3 g) onderskeidelik. Dit dui aan dat blare van hierdie spesie hierdie baie ryk is aan nie-polêre verbindings.

Die dichlorometaan(DCM)-fraksie, wat die hoogste aktiwiteit gehad het, is gekies om aktiewe verbindings deur 'n bio-toetsgerigte fraksionering te isoleer. Fraksies wat in 'n oopkolom silikajelchromatografie uit die DCM-ekstrak gewas is, is volgens hulle DLC-samestelling sgekombinaar, gekonsentreer en gechromatografeer om onsuierhede te verwyder. Dit het 'n wit suiwer presipitaat gelewer. Die aantal aktiewe van antifungus verbindings is ondersoek deur 'n bio-outografie van dunlaag chromatogramme met 'n suspensie *P. janthelium* konidia te spuit (Figuur 1).

Die R_f -waarde van aktiewe verbindings kan dalk help om die isolering van antifungus verbindings uit ander plantekstrakte te derepliseer. Die R_f -waarde van die ekstrak- en geïsoleerde verbindings was 0.08 met BEA (benseen:etanol:amoniumhidroksied 90/9/1) (Kotze & Eloff 2002) as loopmiddel (Figuur 1). Dit bevestig dat die verbinding wat geïsoleer is waarskynlik die antifungus verbinding was wat in die riekstrak teenwoordig was en nie 'n artefak van die isolasieproses nie.

Die identifisering van die verbinding

Die verbinding is as 'n wit presipitaat geïsoleer. NMR-spektroskopie het die verbinding as oleanolsuur geïdentifiseer (Figuur 2 en Figuur 1-A1). Oleanolsuur is 'n triterpenoïed



FIGUUR 2: Die struktuur van oleanolsuur wat uit die dichlorometaanfraksie van *Tecoma stans* blare geïsoleer is.

verbinding wat in die blare en bas van baie plantsoorte teenwoordig is. Hierdie isomeer van ursolsuur is bekend daarvoor dat dit lewerbeskerende, anti-inflammatoriese en antihyperlipidemiese eienskappe het. Daar is ook onlangs bevind dat dit die bevordering van tumors teenwerk. Dit word in Sjina as 'n orale geneesmiddel vir menslike leweringesteldhede bemark (www.alibaba.com/product-gs/203129384/Oleanolicacid.html). Die verbinding is baie bekend, maar die literatuur bied min inligting oor die antifungus aktiwiteit daarvan. Dit is nog nie vantevore uit *T. stans* geïsoleer nie.

Antifungusaktiwiteit en bepaling van sitotoksiteit

Bio-outografie

Wanneer 'n mens bioaktiewe verbindings uit plantekstrakte isoleer, is dit altyd moontlik dat die belangrikste aktiewe verbindings deur die isoleringsproses onaktief gemaak kan word en dat 'n minder aktiewe verbinding op die ou einde geïsoleer kan word. Om hierdie moontlikheid uit te skakel, is bio-outografie op die riekstrak en die geïsoleerde oleanolsuur gedoen.

Die resultate van die bio-outografie (Figuur 1) dui aan dat die swamgroeie deur die ekstrak en die oleanolsuur deur verbindings met dieselfde R_f -waarde geïnhibeer is. Dit is aangedui deur 'n helder sone wat die gevolg is van INT wat nie deur die aktief-groeiende organismes tot die rooi produk gereduseer is nie. Die twee identiese bande wat in die chromatografie van die riekstrak en oleanolsuur waargeneem is, toon dat die aktiewe verbinding onveranderd uit die ekstrak geïsoleer is omdat albei dieselfde R_f -waarde van 0.08 in BEA gehad het. Dit bevestig die teenwoordigheid van oleanolsuur uit die riekstrak.

Mikroverdundingstoets

Om die mate waartoe die aktiwiteit toegeneem het deur die oleanolsuur te isoleer asook die sensitiwiteit

jeens verskillende swampatogene te evalueer, is die MK teen verskeie patogene bepaal (Tabel 1).

Daar was verskeie gevalle waar die *T. stans* se riekstrak dieselfde MIK's of selfs laer MIK's as oleanolsuur gehad het (Figuur 1). Die mikro-organismes het verskillend op die ekstrakt en die geïsoleerde verbinding reageer. *P. janthinellum* en *C. glaucosporioides* was relatief weerstandig, terwyl *T. harzianum*, *R. solani*, *F. oxysporium* en *P. expansum* relatief sensitief was. Die ekstrakt se aktiwiteit teen van die fungi met MIK-waardes van 20 µg/mL en 60 µg/mL was goed. In die geval van *P. expansum* was die ekstrakt se aktiwiteit beter as die van die positiewe kontrole, amfoterisien B. Die verskil in aktiwiteit teen verskillende fungi kan betekenisvol wees en selektiwiteit aandui omdat verskillende teikens aangespreek is.

Omdat die aktiwiteit van die ekstrakt vergelykbaar was met die aktiwiteit van die verbinding beteken dit dat die aktiwiteit nie honderdvoudig vermeerder het nie, ten spyte van die feit dat ongeveer 99% van die 'sogenaamde onaktiewes' uit die riekstrakt verwyder is. Die analise is deur bio-outografie van dieselfde massa gedoen. Die mees waarskynlike verduideliking hiervoor is dat daar 'n groot mate van sinergisme moes plaasgevind het. Die verbindings wat sinergisties optree, was nie as sodanig aktief nadat hulle tydens bio-outografie van ander verbindings geskei is nie. 'n Ander moontlike verduideliking is dat ander vlugtige verbindings in die riekstrakt teenwoordig kon gewees het en dat hulle verdamp het tydens die lang tydperk waartydens die oplosmiddel van die chromatogramme verwyder is voordat dit met die fungi gespuut is. Alternatiewelik kon van die antifungus verbindings tydens die isoleringsproses vernietig gewees het.

Amfoterisien B was aktief met 'n gemiddelde MIK-waarde van 18 µg/mL, maar in sommige gevalle het die onsuier ekstrakt 'n hoër aktiwiteit teenoor sekere fungi getoon as amfoterisien B. Dit dui daarop dat riekstrakt moontlik gebruik kan word om plante teen sekere fungi te beskerm.

As die gevolgtrekking waartoe ons in die vorige paragraaf gekom het, korrek is, naamlik dat daar substansiële aktiwiteit in die verbinding buite oleanolsuur geleë moet wees, kan 'n mens die algehele aktiwiteit van die riekstrakt en die

geïsoleerde verbinding bereken (Eloff 2004) (Tabel 2). Dit bring nie net die antimikrobiële aktiwiteit in berekening nie, maar ook die massa daarvan en word bereken deur die MIK in mg/mL te deel met die totale massa in mg. Die waarde in mL dui aan die volume waartoe die massa verdun kan word en steeds die patogeen se groei inhibeer. As al die aktiwiteit van die geïsoleerde verbinding afkomstig is, behoort die twee waardes dieselfde te wees. Die waarde vir die ekstrakt was egter 6.5 maal groter as die van die geïsoleerde verbinding. Selfs as net 50% van die aktiewe verbinding uiteindelik geïsoleer is van die res wat in rufraksies geleë is, verteenwoordig dit net 'n derde van die aktiwiteit wat in die riekstrakt plaasgevind het. Daar kan twee verduidelikings hiervoor wees. Moontlik, het die ander aktiewe verbindings tydens die isoleringsproses verdamp, ontbind of is dit onaktief gemaak. Aan die ander kant, en meer waarskynlik, omdat die bio-outografie aangetoon het dat daar net een antifungus verbinding in die riekstrakt was, het meer as een verbinding wat nie as sodanig aktief was nie deur sinergisme 'n rol gespeel om die antifungus aktiwiteit te bepaal.

Bepaling van sellulêre toksisiteit

Die rede waarom ons die sitotoksiteit van die ekstrakt en oleanolsuur wou bepaal, is omdat, as die sitotoksiteit laag is, daar 'n moontlikheid is dat dit gebruik kan word om swampatogene op eetbare plante te behandel. As die toksisiteit hoog is, is daar egter steeds 'n moontlikheid dat dit nuttig in die tuinboubedryf gebruik kan word (Eloff, Angh & McGaw 2018).

Die selsitotoksiteit van *T. stans* se DCM-ekstrakt en verbinding is met die toksiese alkaloid berberien as positiewe kontrole bepaal. Die sellewensvatbaarheid het toegeneem met 'n afname in konsentrasies van DCM-ekstrakt, verbinding en berberien. Die hoogste konsentrasie van sowel DCM-ekstrakt en verbinding het al die Vero-selle teen konsentrasies van hoër as 150 µg/mL doodgemaak. Berberien was toksies teen konsentrasies van hoër as 10 µg/mL.

Seltoksiteit kan ook deur die LK_{50} -waardes uitgedruk word. Die letale konsentrasie 50 is die konsentrasie wat tot die afsterwe van 50% van die selle lei. Dit word uit die regressiekurve bereken. *T. stans* se DCM-ekstrakt het 'n LK_{50} van 0.413 mg/mL gehad, die verbinding 0.129 mg/mL en berberien 15.48 mg/mL. Dit beteken dat die riekstrakt en oleanolsuur verskeie kere minder toksies was as berberien. Oleanolsuur was egter meer toksies teenoor Vero-selle as die ekstrakt.

Die moontlike gebruik van *Tecoma stans* in plantproduksie

Baie antifungus verbindings is toksies omdat daar heelwat meer ooreenstemmende metaboliese weë tussen fungi en

TABEL 1: MIK-waarde in µg/mL van *Tecoma stans* se dichlorometaan rufraksie en oleanolsuur wat teen 10 patologiese fungi in plante getoets is.

Mikro-organisme	<i>Tecoma stans</i> onsuier	Oleanolsuur	Amfoterisien B
<i>Aspergillus parasiticus</i>	160	250	0.78
<i>Aspergillus niger</i>	120	250	0.31
<i>Phytophthora nicotiana</i>	120	190	7.5
<i>Penicillium janthinellum</i>	470	250	40
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	8	7.5
<i>Rhizoctonia solani</i>	20	2	25
<i>Fusarium oxysporium</i>	20	50	20
<i>Penicillium expansum</i>	20	20	40
<i>Pythium ultimum</i>	60	16	40
Gemiddelde	130	130	18.1

TABEL 2: Totale aktiwiteit van die dichlorometaanfraksie en oleanolsuur van *Tecoma stans* teen 10 swampatogene.

Monsters	Massa in mg	Gemiddelde minimum inhibisie-konsentrasie in mg/mL	Totale aktiwiteit in mL
DCM-ekstrakt	7820	0.13	60 154
Oleanolsuur	1204	0.13	9 262

DCM, dichlorometaan

TABEL 3: Die selektiwiteitsindeks van riekstrak en oleanolsuur teen 10 fungi.

Mikro-organismes	Riekstrak se LC ₅₀ (µg/mL)	Riekstrak se minimum inhibisiekonsentrasie (µg/mL)	Selektiwiteitsindeks (Riekstrak)	Oleanolsuur LC ₅₀ (µg/mL)	Oleanolsuur se minimum inhibisiekonsentrasie (µg/mL)	Selektiwiteitsindeks (oleanolsuur)
<i>Collectotrichum glaeosporioides</i>	413	310	1.0	129	250	0.5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	413	160	2.5	129	250	0.5
<i>Aspergillus niger</i>	413	120	3.0	129	250	0.5
<i>Phytophthora nicotiana</i>	413	120	3.0	129	190	0.7
<i>Penicillium janthinellum</i>	413	470	0.9	129	250	0.5
<i>Trichoderma harzianum</i>	413	20	21	129	8	16
<i>Rhizoctonia solani</i>	413	20	21	129	2	64
<i>Fusarium oxysporium</i>	413	20	21	129	50	2.6
<i>Penicillium expansum</i>	413	20	21	129	20	6.5
<i>Pythium ultimum</i>	413	60	7.0	129	16	8.0

soogdiere is as tussen bakterieë en soogdiere. Daar is dus minder spesifieke teikens wat aangespreek kan word. Die belangrike vraag is hoe die toksisiteit van die teikenorganismes met die seltoksiseit verband hou. Die selektiwiteitsindeks kan bereken word deur LC₅₀ in (µg/mL)/MIK in (µg/mL). Hoe hoër hierdie waarde, hoe veiliger kan die produk onder beheerde toestande gebruik word (Tabel 3).

Die riekstrak se selektiwiteitsindeks teen die mikro-organismes *T. harzianum*, *R. solani*, *F. oxysporium* en *P. expansum* was hoog, naamlik 21. Dit beteken dat riekstrak teen infeksie met hierdie fungi gebruik kan word en dat dit min toksisiteit oplewer as dit onder beheerde toestande gebruik word. Dit is interessant om daarop te let dat *P. expansum*, wat 'n groot probleem in die bederf van vrugte is, deur die riekstrak teen 'n baie lae doseringsvlak en lae toksisiteit gebruik kan word. *Fusarium*-spesies, wat 'n groot probleem in die besmetting van mielies en die dood van saailinge kan wees, kan ook met 'n lae dosis en toksisiteit beheer word.

Oleanolsuur se hoë selektiwiteitsindeks van 16 en 64 teen *T. harzianum* en *R. solani* onderskeidelik het uitgestaan as die mees belowende vir die gebruik van oleanolsuur teen infeksies wat deur hierdie twee fungi veroorsaak word – as dit teen die korrekte dosis gebruik word. By baie ander fitopatogene was die ekstrak of oleanolsuur meer toksies teen Vero-selle as teen die fungus.

Gevolgtrekking

Dit lyk asof daar 'n groter potensiaal vir die gebruik van plantekstrakte is as vir die geïsoleerde oleanolsuur. Dit sal baie minder kos om die ruplantekstrak te produseer. Daar was groot verskille in die verskillende patogene se sensitiwiteit teenoor die riekstrak. Dit kan waardevol wees omdat dit daarop dui dat die aktiwiteit teen 'n basiese metaboliese middel is wat in al die fungi teenwoordig is.

Omdat baie swamdodende middels ook hoogs toksies is, was dit belangrik om die seltoksiseit en die selektiwiteitsindeks te bepaal. Onder beheerde toestande kan die riekstrak en oleanolsuur gebruik word teen infeksies wat deur sekere van die patogene veroorsaak word met 'n redelik goeie selektiwiteitsindeks. Dit bied dus 'n relatiewe lae toksiseitsbedreigings. In die geval van ander patogene sal

nóg die riekstrak nóg die oleanolsuur van enige waarde wees omdat dit toksies is. 'n Mens moet egter in gedagte hou dat die seltoksiseit nie noodwendig met toksiseit deur ander roetes toegedien aan diere verband hou nie. As die toksiese komponent ingeneem word en dit teen die lae pH in die ingewande vernietig word, of nie uit die ingewande in die bloed opgeneem word nie of vinnig ontgiftig word, kan die toksiseit baie later wees. Dit is ook moontlik dat 'n meer toksiese verbinding ná die opname van die ekstrak kan ontwikkel, wat die belang van *in vivo*-eksperimente op diere beklemtoon. Dit val egter buite die bestek van hierdie werk.

Erkennings

Ons is dankbaar teenoor die kurator van die Laeveld Nasionale Botaniese Tuin wat ons toegelaat het om plantmateriaal te versamel. Prof. Lise Korsten (Departement van Plant Pathologie, Universiteit van Pretoria), wie die plant kultivar van die fitopatogene wat gebruik is, voorsien het. Hierdie navorsing is deur die Nasionale Navorsingstigting (NNS) en die Universiteit van Pretoria ondersteun.

Mededingende belange

Die outeurs verklaar dat hulle geen finansiële of persoonlike verbintenisse met enige party wat hom nadelig of voordelig kon beïnvloed het in die skryf van hierdie artikel nie.

Outeursbydrae

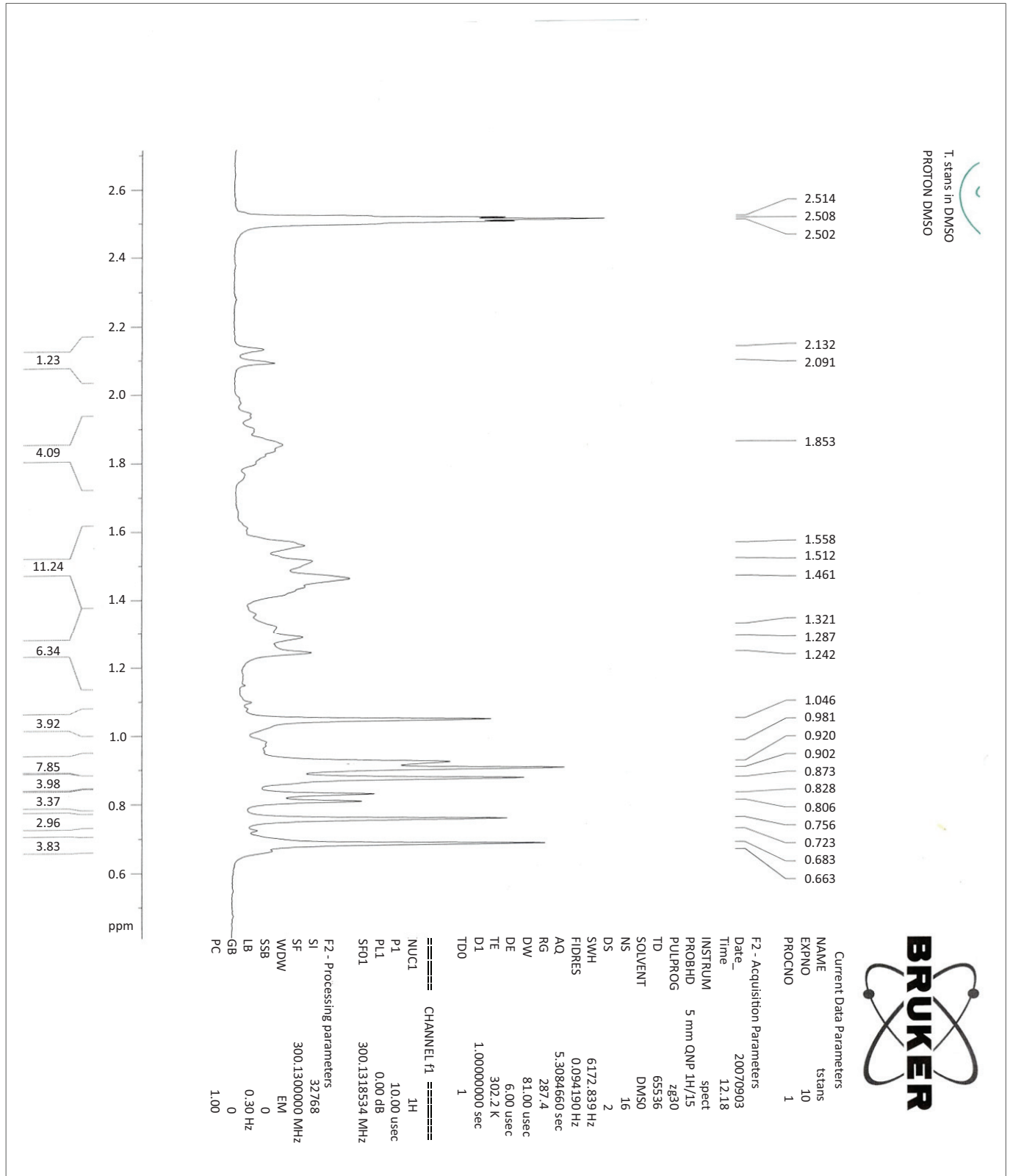
M.M. het die werk as deel van 'n MSc-studie gedoen. L.M. het gehelp om die aktiewe verbinding te isoleer en die struktuur op te klaar. J.N.E. het die projek geïdentifiseer, die studieleiding gedoen en die manuskrip hersien en dit ingedien.

Literatuurverwysings

- Awuah, R.T. & Kpodo, K.A., 1996, 'High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effects of plant extracts on aflatoxin synthesis', *Mycopathologia* 134, 109–114. <https://doi.org/10.1007/BF00436873>
- Eloff, J.N., 1998a, 'Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?', *Journal of Ethnopharmacology* 60, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00123-2)
- Eloff, J.N., 1998b, 'A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts of bacteria', *Planta Medica* 64, 711–714. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957563>

- Eloff, J.N., 2004, 'Quantification of the bioactivity of plants extracts during screening and bioassay guided fractionation', *Phytomedicine* 11, 370–371. <https://doi.org/10.1078/0944711041495218>
- Eloff, J.N., Angeh, I.E. & McGaw, L.E., 2018, 'Solvent-solvent fractionation can increase the antifungal activity of a *Melanthus comosus* (Melianthaceae) acetone extract to yield a potentially useful commercial antifungal product', *Industrial Crops and Products* 111, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.050>
- Eloff, J.N., Picard, J. & Masoko, P., 2007, 'Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays', *South African Journal of Botany* 73, 667–669. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.06.002>
- Hammouda, Y. & Amer, M.S., 1966, 'Antidiabetic effect of Tecomine and Tecostanine', *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55, 1452–1454. <https://doi.org/10.1002/jps.2600551228>
- Hammouda, Y., Rashid, A.K. & Amer, M.S., 1964, 'Hypoglycaemic properties of Tecomine and Tecostanine', *Journal of Pharmacology* 16, 833–835. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1964.tb07420.x>
- Holden, A.J., 1999, 'Solvent and membrane extraction in organic analysis', in A.J. Handely (ed.), *Extraction methods in organic analysis*, pp. 5–53, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hostettman, K., Marston, A., Ndjoko, K. & Wolfender J.L., 2000, 'The potential of African plants as a source of drugs', *Current Organic Chemistry* 4, 973–1010. <https://doi.org/10.2174/1385272003375923>
- Kotze, M. & Eloff, J.N., 2002, 'Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae)', *South African Journal of Botany* 68, 62–67. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(16\)30456-2](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)30456-2)
- Masoko, P. & Eloff, J.N., 2005, 'The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography', *African Journal of Biotechnology* 12, 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.061>
- Masoko, P., Picard, J. & Eloff, J.N., 2005, 'Antifungal activities of six *Terminalia* species (Combretaceae)', *Journal of Ethnopharmacology* 99, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.061>
- Mosmann, T., 1983, 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay', *Journal of Immunological Methods* 65, 263–271. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Oleanolic acid, viewed 04 December 2008, from www.alibaba.com/product-gs/203129384/Oleanolic_acid.html
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A., 1996, *Microbiology*, 3rd edn., W. C. Brown Publishers, Dubuque, IA.
- Sharma, N. & Tripathi, A., 2006, 'Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens', *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 587–593. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9075-3>
- Strange, R.N. & Scott, P.R., 2005, 'Plant disease: A threat to global food security', *Annual Review Phytopathology* 43, 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Tecoma stans, viewed 04 December 2008, from http://cloudbridge.org/trees/tecoma_stans.htm
- Tripathi, P. & Dubey, N.K., 2004, 'Exploration of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables', *Postharvest Biology and Technology* 32, 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005>

Bylaag 1:



FIGUUR 1-A1: Kernmagnetiese resonansiespektrum van geïsoleerde verbindinge.