

**Original article**

**FOENICULUM VULGARE MILL. AKTAR VE KÜLTÜR  
ÖRNEKLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ AVRUPA  
FARMAKOPESİNE UYGUNLUĞU VE ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTE YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMASI**

COMPARISON OF VOLATILE OIL FROM HERBALIST AND CULTIVAR SAMPLES  
OF *Foeniculum vulgare* MILL. FOR THEIR COMPLIANCE WITH EUROPEAN  
PHARMACOPEA AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

**Ufuk Koca ÇALIŞKAN<sup>\*1</sup>, Berrin ÖZÇELİK<sup>2</sup>, Ahmet SAZLI<sup>1</sup>, Ekrem SEZİK<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Ankara, TÜRKİYE

**ÖZET**

Çalışmamızda, kültürü yapılan tarlalardan ve aktarlardan temin edilen *Foeniculum vulgare* Mill. meyve numunelerinden elde edilen yağ, ilk defa gerek miktar gerekse içerik bakımından Avrupa Farmakopesi (6.0)' ne uygunluğu analiz edilmiştir. Tüm örneklerden elde edilen uçucu yağ miktarı yönünden sadece FV2'nin (%2.2) Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen değerlere uyduğu, fakat diğer örneklerin uymadığı, uçucu yağ içeriği yönünden ise tüm örneklerin Farmakopeye (6.0) uygun olduğu tespit edilmiştir. Tüm uçucu yağ örneklerinin in-vitro antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin değerlendirilmeleri; standart ve izole suşlardan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere ilaveten funguslara karşı mikrodilüsyon metodu ile taranarak yapıldı. Duyarlılık testi CLSI'ya göre yapıldı. Ampisiline, gentamisin, levofloksazin, ketokonazol ve flukonazol kontrol ajan olarak kullanıldı. Tüm ekstreler standart Gram-pozitif bakterilere karşı 16-64 µg/ml, Gram-negatiflere karşı ise 2-16 µg/ml konsantrasyon aralığında antibakteriyel aktivite gösterirken; 8-16 µg/ml konsantrasyon aralığında antifungal aktivite göstermişlerdir. Test edilen izole suşlara karşı ise zayıf aktivite (64-128µg/ml) belirlenmiştir. Tüm örnekler *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026'ye karşı MİK 2-4 µg mL<sup>-1</sup> aralığında ampisilin (2µg/ml) ile kıyaslandığında daha iyi inhibisyon göstermişlerdir. İlaveten, *Candida krusei*'ye karşı 4-16µg/ml konsantrasyon aralığında orta düzeyde aktivite göstermişleridir.

**Anahtar kelimeler:** *Foeniculum vulgare*, Rezene, Uçucu yağ, Avrupa Farmakopesi, Antimikrobiyal

\* **Corresponding author:** Tel: +90(312)2023187, Fax: +90(312)2235018, e-mail: ukoca@gazi.edu.tr

**ABSTRACT**

*In our study, volatile oils, which obtained from *Foeniculum vulgare* Mill. fruit samples, obtained from cultivars and herbalists, were analyzed for the first time for their compliance with European Pharmacopeae 6.0, for their volatile oil amounts and the contents. Among all the samples only the volatile oil yield of sample FV2 (2.2%) meet the standards present in the Pharmacopea 6.0, the others did not, as for volatile oil content, all the samples complied with the Pharmacopea 6.0. All the volatile oil samples were screened for their in-vitro antibacterial, and antifungal activities that were evaluated against both standard and the isolated strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as fungi by microdilution method. Susceptibility testing was performed according to the CLSI. Ampicilline, gentamicin, levofloxacin, ketoconazole, and fluconazole were used as the control agents. All the extracts have shown antibacterial activity against Gram-positive standard bacteria ranging between 16 and 64 µg/ml, against Gram-negative standard bacteria at 2-16 µg/ml concentrations ones, while they demonstrated antifungal activity at 8-16 µg/ml concentration. Slight activities were found against tested isolated strain (64-128µg/ml). All the samples demonstrated better inhibition against *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026 with MICs value of 2-4 µg mL<sup>-1</sup> as compared with the control ampicillin (2µg/ml). Additionally, they have moderate activity against *Candida krusei* at concentration ranges of 4-16µg/ml.*

**Key words:** *Foeniculum vulgare*, Fennel, Volatile oil, European Pharmacopeae, Antimicrobial.

**GİRİŞ**

*Foeniculum vulgare*, Apiaceae familyasına ait 300 cinsten birisi olup bu familya yaklaşık 3000 türü kapsamaktadır (1). Rezene, başta Güney ve Batı Anadolu olmak üzere, Kuzey Anadolu'da da doğal olarak yetişmekte, aynı zamanda batı ve güney'de kültürü yapılmaktadır. Topraküstü kısımları sebze olarak, kökleri ve özellikle meyveleri (*Foeniculi fructus*) hem halk ilacı ve bitkisel ilaç olarak tek başına hem de ilaçların ve farklı ürünlerin terkininde mideyi, gaz giderici, emziren annelerde süt artırıcı, kökleri idrar söktürücü ve yaprakları yara iyileştirici olarak halk arasında kullanılmaktadır (1-4).

Bitkinin iki alt türü vardır. Bunlar; *Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* ve *F. vulgare* Miller subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho'dur. *F. vulgare* Miller subsp. *vulgare*'nin 4 tane alt varyetesi vardır (1). Bunlardan iki tanesi, *F. vulgare* var. *vulgare* (acı rezene) ve *F. vulgare* var. *dulce* (Miller) Thellung (tatlı rezene), farmasötik yönden önemlidir ve bu yüzden farmakope ve monografarda kayıtlıdır (5-7), diğer ikisi ise sebze olarak kullanılan varyetelerdir.

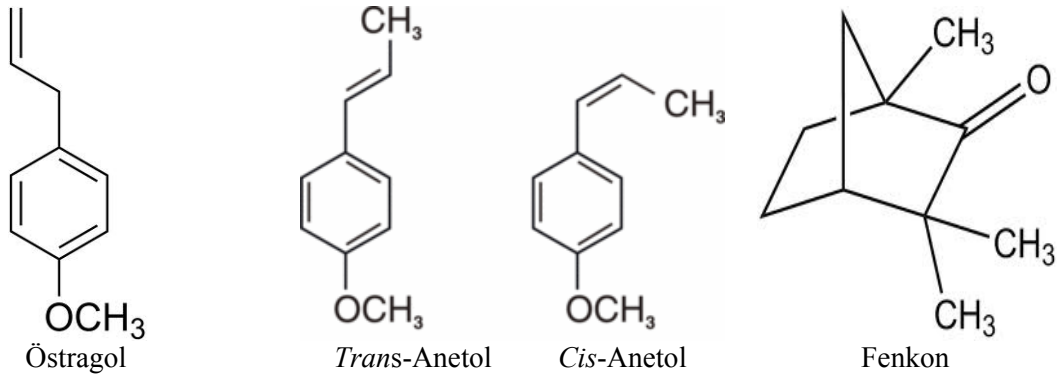
*F. vulgare*'yi en çok üreten ülkeler Almanya, İspanya, İtalya, Hollanda, Fransa, Hindistan, Çin, Fas, Bulgaristan, Yunanistan, Romanya, İsviçre ve Arjantin olarak kaydedilmiştir (8). İhracatı

geliştirme merkezi (İGEME) kayıtlarına göre ülkemizde rezene ihracat rakamları ardıc meyveleriyle birlikte verilmekte olup başta ABD, Almanya, Yunanistan, Fransa, Brezilya, Hollanda, İtalya gibi ülkelere olmak üzere birçok ülkeye ihracatı yapılmaktadır (9). Ülkemizde 2007 yılı verilerine göre 1052,469 ton rezene üretilmiş ve bir kısmı yurt dışı pazarlara satılmıştır. Bu rakam 2008 yılında 1919,778 ton olarak gerçekleşmiştir.

Rezene meyveleri yüzyıllardır karminatif, midevi ve gaz söktürücü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Rezene meyvelerinin gastrointestinal motiliteyi arttırdığı ve yüksek dozlarda antispazmotik etkili olduğu Komisyon E'de belirtilmiş ve aynı komisyon rezene yağı preparatlarının gastrointestinal sistemin spastik bozukluklarında, şişkinlik ve gaz şikayetlerinde kullanılmasını onaylamıştır (7). Infantil kolik rahatsızlığı bulunan 2-12 haftalık bebeklere rezene meyve yağı emülsiyonu verildiğinde bebeklerin %65'inde bu rahatsızlığın geçtiği saptanmıştır (10). *F. vulgare* uçucu yağının bronş mukozası üzerinde etkilerinden dolayı solunum yolları rahatsızlıklarında kullanılmakta ve rezene yağı Avrupa'da özellikle Almanya ve ABD'de öksürük şuruplarının bileşimine ekspektoran etkisinden dolayı girmektedir (11). Rezene meyvesi antimikrobiyal ve mukus sekresyonunu arttırıcı özelliklerinden dolayı solunum rahatsızlıklarında ve boğaz temizleyici olarak içilen çayların bileşimlerine girmektedir (12).

*F. vulgare* üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarının hemen hepsi meyveden hazırlanan ekstreler, uçucu yağ ve uçucu yağın ana bileşenleri üzerine olduğu tesbit edilmiştir. Meyve ekstresi ve meyve uçucu yağlarının antimikrobiyal (13-17), antioksidan (16,17), akarisit (18), antienflamatuvar (19,20), anthirsutizm (21), antiplatelet (22,23), antikoagülan (24), antitromboz (25), hipotansif (26), karaciğer (27,28), kas sistemi üzerine (29), östrojenik (30-33), repellent (34) ve tümör inhibitör (35) etkileri farklı araştırmacılar tarafından tesbit edilmiştir.

Rezenenin tatlı veya acı olmasını bitki varyetesinin meyvelerinin içerdiği bileşiklerin oranı belirlemektedir. Fenkon acı, anetol ise tatlıdır, bu bileşiklerin miktarı yetiştirme yeri ve koşullarına göre değişmektedir (36,37). Yapılan bir çalışmada acı rezene (var. *vulgare*) ve tatlı rezene meyvelerinin ana uçucu yağ bileşenleri aynı olmakla birlikte acı rezenedeki miktarlar *trans*-anetol %50-75, fenkon %12-33 ve östragol %2-5 (Şekil 1) olarak tatlı rezene (var. *dulce*)'de ise *trans*-anetol miktarı daha yüksek %80-90 olarak, fenkon miktarı daha düşük %1-10 olarak ve östragol %3-10 tespit edilmiştir. Hem acı hem tatlı rezene uçucu yağlarında ana bileşiklerin yanında *trans*-anetol'ün otooksidasyonu ile oluşan anisaldehit, terpenoitlerden  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -tuyen,  $\alpha$ -fenken, kamfen, 3-karen, sabinen,  $\alpha$ -felandren, mirsen, limonen, ve  $\gamma$ -terpinen, terpinolen *cis*-osimen, *trans*-osimen, fenkil asetat, apiol, *p*-simen, mirsen,  $\alpha$ -felandren, sabinen,  $\gamma$ -terpinen, ve terpinolen içerir.



**Şekil 1:** *Foeniculum vulgare* Mill. meyve uçucu yağının majör bileşikleri

Avrupa Farmakopesi'nde (6.0) *F. vulgare* Miller subsp. *vulgare* var. *vulgare* (Fennel, bitter, Feoeniculi amari fructus) acı rezene ve *F. vulgare* Miller sp. *vulgare* var. *dulce* (Fennel, sweet, Feoeniculi dulcis fructus) tatlı rezene olmak üzere 2 varyeteye ait monograf bulunmaktadır (5). Avrupa farmakopesinde (6.0) uçucu yağ alt sınır değerleri acı rezenede 40 ml/kg (%4) , tatlı rezenede ise 20 ml/kg (%2) olarak belirtilmiştir. Farmakope'ye (6.0) uygun acı rezene yağının en az %60 anetol, en az %15 fenkon ve tatlı rezenenin en az %80 anetol içermesi gerekir

Bu çalışmanın amacı, kültürü yapılan farklı bölgelerden toplanan ve aktarlardan temin edilen *F. vulgare* (Foeniculi dulcis fructus) örneklerinden uçucu yağ elde etmek, tüm örnekleri taşıdıkları uçucu yağ miktarı ve uçucu yağ içeriği açısından birbiriyle karşılaştırmak ve Avrupa Farmakopesi'ne uygunluğunu araştırmak. Bu yönüyle çalışmamız, tatlı rezene (Fennel, Sweet) uçucu yağlarının ilk farmakope analiz çalışmasıdır. Ayrıca, tüm uçucu yağ örneklerinin antibakteriyal ve antifungal aktivitelerini tayin ederek, uçucu yağ ve aktivite yönünden değerlendirmektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda materyal olarak tarafımızdan tarlalardan toplanan 5 kültür tohum örneği ve piyasadan satın alınan 5 aktar örneği kullanılmıştır. Bu numuneler FV1: Tarla Isparta, FV2: Tarla Antalya, FV3: Tarla Aydın, FV4: Tarla Manisa, FV5: Tarla Konya, FV6: Aktar İstanbul, FV7: Aktar Ankara, FV8: Aktar İzmir (Ödemiş), FV9: Aktar Kayseri, FV10: Aktar Antalya

### Uçucu yağ elde edilmesi ve Gaz Kromatografisi (GK)/Kütle Spektrometresi (KS) Analizi

Avrupa Farmakopesi (6.0)'ne uygun cihazlar, yuvarlak altlı-şilifli 500ml'lik cam balon,

elektrikli ısıtıcı, soğutucu, ksilen (Merck) kullanıldı. Şilifli balona 250 ml su konularak elektrikli ısıtıcıya yerleştirildi, soğutucu taşıyan toplama büretine bağlandı. Bir pipet yardımıyla belirli ölçüde ksilen R ilave edildi. Kaynayınca kadar ısıtıldı ve distilasyon hızı dakikada 2-3 ml olacak şekilde ayarlandı, 30 dk distillendi, ısıtma kesildi ve en az 10 dk sonra dereceli tüpe bulunan ksilen miktarı okundu. Tam olarak tartılan meyveler öğütüldü balonun içine ilave edildi ve distilasyona uçucu yağ miktarı değişmeyinceye kadar, en az 3 saat, devam edildi. Distilasyon işleminin sonunda sistemin soğuması için 10 dk beklendikten sonra uçucu yağ ve ksilen miktarı okundu, ilk ölçülen ksilen miktarı çıkarılarak sonuç % hacim/ağırlık cinsinden hesaplandı. İşlem her numune için 3 kez tekrarlanmış, ortalama değerleri alınmıştır.

GK/KS analizleri Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Agilent 6890 N Network GK Sistemi ile birlikte FID dedektör ve Agilent 19091N-136 (HP Innovax Capillary; 60.0 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kolon ve 1ml/dk akış hızında helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Enjektör ve FID dedektör sıcaklığı 250 °C'de tutulmuştur. Kolon için kullanılan sıcaklık programı tablo'da gösterilmiştir. Kütle spektrometresi analizi için ise GK sistemi ile birlikte Agilent 5975 C VL MSD (Mass Selective Detektör), akış hızı 1.2 ml/dk, helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılmış enjektör sıcaklığı 250 °C, kolon sıcaklığı FID dedektörün kullanıldığı sıcaklık programı ile aynı tutulmuş, örnekler 1 µl olarak 50:1 split oranında enjekte edilmiştir. Mass detektör için tarama aralığı (m/z): 35-450 atomik kütle ünitesi, Elektron bombardmanı iyonizasyonu: 70 eV, Cihaz Kütüphane türü ise 'Wiley ve Nist Mass Spektral'dır.

#### **GK Analizi sıcaklık programı**

Sıcaklık	Artış Oranı	Tutulma Zamanı dk	Toplam Zaman dk
60 °C	-	10	10
220 °C	4	10	60
240 °C	1	-	80

#### **Antimikrobiyal aktivite testi**

Uçucu yağ örnekleri (1-7) dimetilsülfoksit (80%) ve EtOH (20%) içerisinde son konsantrasyonları; 256 µg/mL olacak şekilde çözünmeleri sağlanmış ve stok solüsyon olarak kullanılmıştır. Kontrol antimikrobiyaller (ampisilin, gentamisin, levofloksazin, ketokonazol ve flukonazol; Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, USA) uygun çözücülerde (ampisilin, pH: 8.0; 0.1 mol/ml), dimetilsülfoksit (ketokonazol), veya suda (gentamisin, levofloksazin, flukonazol) çözünmesi sağlandıktan sonra standart antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak kullanılmıştır (38-41). Antibakteriyel aktivite testinde standart (ATCC; American type culture collection, RSKK;

Refik Saydam Kültür Koleksiyonu) ve klinik izolatlar (Tıbbi Mikrobiyoloji, Tıp Fakültesi, Gazi Üniversitesi) denenmiştir. Gram-negatif standart suşlardan; *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 574, *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026 ve Gram-pozitif suşlardan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 antibakteriyel aktivitede denenmiştir. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde gram negatif izolatlardan; *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* (genişletilmiş spectrumlu  $\beta$ -laktamaz; GSBL enzimi pozitif), *P. aeruginosa* (gentamisin dirençli), *A. baumannii* (sefalosporin dirençli) ve gram-pozitif izolatlardan; *S. aureus* (MRSA, metisilin dirençli), *E. faecalis* (sefalosporin dirençli), *B. subtilis* (seftriakson dirençli) izole suşları denenmiştir. *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 6258 antifungal aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Mueller Hinton Broth (MHB; Difco) ve Mueller Hinton Agar (MHA; Oxoid) bakterilerin üretimi ve kültür süspansiyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. Fungusların üretim ve kültür süspansiyonları ise RPMI-1640 (L-glutamine) pH: 7 de 3-[N-morpholino]-propansulfonic acid ile tamponlanmış ortamda hazırlanmıştır. Mikroorganizma kültür süspansiyonları McFarland 0.5 density ( $10^8$ cfu/ml)'ye göre hazırlanmış kültür süspansiyonunun  $10^5$  cfu (colony forming unite/ml) yoğunluğunda taze kültürü hazırlanarak kullanılmıştır. Bakteri ve fungus kültürleri mikrodilüsyonu yapılmış olan tüm kuyulardaki örnekler üzerine  $10^5$ cfu/ml yoğunlukta bakteri kültür süspansiyonları ve spektrofotometrik metod ile hazırlanmış fungus kültür süspansiyonları ilave edilmiştir. Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Besi yeri ilave edilmiş 96 kuyulu mikroplyete örnekler ilk kuyudan başlanılarak çift katlı dilüsyonları yapılmıştır ( $128-0.125 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Tüm kuyucuklara  $10\mu\text{l}$  kültür süspansiyonu ilave edilmiştir. DMSO (80%) ve EtOH (20%), mikroorganizma, besiyeri kontrolleri testde dahil edilmiş ve test üç paralel olacak şekilde  $37^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyon sonrası üremenin inhibe edildiği minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) makroskopik olarak değerlendirilmiştir (38-41).

## BULGULAR

### Uçucu Yağların Elde Edilmesi ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi ile Analizleri

Numuneler tam olarak tartılarak değirmende öğütüldü, Avrupa Farmakopesi'ne göre uçucu yağlar elde edildikten sonra 100 g numune'de hacim cinsinden uçucu yağ miktarı hesaplandı (Tablo 1). Uçucu yağ numunleri uçucu yağı en yüksek içeren numuneden en aza doğru

sıralandığında FV2>FV8>FV6>FV5>FV7>FV3>FV4>FV1>FV10>FV9 olduğu, en yüksek içeriğin tarladan temin edilen örnekte olduğu görülmekle birlikte ikinci sırada ise aktar örneği göze çarpmaktadır. Elde edilen uçucu yağ numuneleri ana bileşikleri; *trans*-anetol, *cis*-anetol, östragol,  $\alpha$ -fenkon, limonen, karvon, anisaldehit yönünden GK/KS ile analiz edilmiş ve sonuçlar numune içerisinde yüzde miktarları olarak tabloya yazılmıştır (Tablo 2).

**Tablo 1.** Rezene uçucu yağ numunelerine ait Avrupa Farmakopesi analiz sonuçları

Yapılan Analiz	FV1	FV2	FV3	FV4	FV5	FV6	FV7	FV8	FV9	FV10
Uçucu yağ (en az 20ml/kg -%2)	1,46*	<b>2,15</b>	1,50*	1,49*	1,64*	1,73*	1,60*	1,82*	1,14*	1,24*
<i>t</i> -Anetol (en az %80)	85.601	87.334	83.009	85.334	85.079	86.086	83.586	85.648	80.176	77.829*

(\*): Avrupa Farmakopesi (6.0)'ya uygun değildir

**Tablo 2.** Rezene numunelerinin major uçucu yağ bileşikleri (%)

Rezene Meyve Örnekleri	% Limonen	% $\alpha$ -Fenkon	% Estragol	% Karvon	% <i>cis</i> -Anetol	% <i>trans</i> -Anetol	% Anisaldehit	% Teşhis
FV1	4.840	1.889	4.603	0.205	0.130	85.601	0.559	<b>99.998</b>
FV2	4.585	1.210	3.963	0.163	0.117	<b>87.334</b>	0.246	<b>99.925</b>
FV3	5.512	2.100	4.920	0.439	0.124	83.009	1.303	<b>99.999</b>
FV4	5.015	1.548	4.152	1.002	0.011	85.334	0.664	<b>99.997</b>
FV5	5.025	1.528	4.591	0.052	0.116	85.079	1.638	<b>99.999</b>
FV6	4.835	1.752	4.303	0.356	0.116	86.086	0.398	<b>99.999</b>
FV7	6.089	1.717	4.307	0.498	0.122	83.586	1.404	<b>100</b>
FV8	4.486	1.771	4.511	0.796	0.121	85.648	0.665	<b>100</b>
FV9	6.663	2.165	5.022	0.593	0.122	80.176	1.986	<b>99.998</b>
FV10	<b>7.665</b>	<b>2.721</b>	<b>5.224</b>	<b>1.524</b>	<b>0.131</b>	77.955	<b>2.316</b>	<b>100</b>

Numuneler en yüksek *t*-anetol içeren numuneden en aza doğru sıralandığında FV2>FV6>FV8>FV1>FV4>FV5>FV7>FV3>FV9>FV10 olduğu, en yüksek içeriğin tarladan temin edilen örnekte olduğu görülmekle birlikte ikinci ve üçüncü sıralarda da ise aktar örneği göze çarpmaktadır. Ayrıca, uçucu yağ numunelerinden tarladan alınan, ve en yüksek uçucu yağ içeriğine sahip FV2 ve en düşük yağ içeriğine sahip aktar örneklerinden biri olan FV10 numuneleri daha detaylı olarak GK/KS ile içerikleri bakımından karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Tablo 3).

**Tablo 3.** FV2 (tarla) ve FV10 (aktar) numunelerinin uçucu yağ bileşiklerinin karşılaştırması

BİLEŞİK ADI	FV2 %	FV10 %	BİLEŞİK ADI	FV2 %	FV10 %
<i>Trans</i> -anetol	87.334	77.829	Isopentil isopentanoat	0.009	0.008
Östragol	3.963	5.224	$\beta$ -osimen	0.021	0.008
Fenkon	1.210	2.721	Kamfor	0.026	0.072
$\alpha$ -pinen	0.379	0.519	3-metil-4-brenden	-	0.017
Kamfen	0.012	0.030	1,3 siklohegzadien-1-metanol	0.013	-
$\beta$ -pinen	0.038	0.029	Germasren	0.057	0.030
Sabinen	0.238	0.180	Cis-anetol	0.117	0.131
$\beta$ -mirsen	0.185	0.097	Anisaldehit	0.246	2.316
$\alpha$ -felandren	0.036	0.015	Anisil aseton	0.035	0.097
Benzen metanol	0.004	0.008	<i>p</i> -Menta-E-2,8(9)-dien-1-ol		0.076
Limonen	4.585	7.665	3-( <i>p</i> -methoxyphenyl) karbonilamin 1-diazo-propan-2-on	0.005	-
Ökalyptol	0.228	0.156	1-propanon	-	0.106
$\beta$ -felandren	0.127	0.031	Dihidrokarvon	-	0.014
<i>p</i> -Menta-6,8-dien-2-ol	-	0.013	$\beta$ -fenkil alkol	-	0.014
1,3,6-Oktatrien	0.708	0.255	<i>c</i> -Limonen oksit	-	0.070
$\gamma$ -terpinen	0.124	0.111	<i>t</i> -Limonen oksit	-	0.065
Simen	0.055	0.322	Fenkil asetat	-	0.044
Alloosimen	0.007	0.012			
Toplam				99.925	100

Analiz edilen bileşiklerden 1,3 siklohegzadien-1-metanol ve 3-(*p*-methoxyphenyl) karbonilamin 1-diazo-propan-2-on 1-propanon yalnızca FV2 numunesinde görülürken, *p*-Menta-6,8-dien-2-ol, *p*-Menta-E-2,8(9)-dien-1-ol, Dihidrokarvon,  $\beta$ -fenkil alkol, *c*-Limonen oksit, *t*-Limonen oksit ve Fenkil asetat ise yalnızca FV10 numunesinde tesbit edilmiş, FV2’de görülmemiştir.

Çalışmamızda uçucu yağ numuneleri Gram-negatif *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. mirabilis* ATCC 7002, *K. pneumonia* RSKK 574, *A. baumannii* RSKK 02026 standart bakteri suşlarına (2-16  $\mu$ g/ml) karşı izole suşlardan (64-128  $\mu$ g/ml ) daha etkili bulunmuştur (Tablo 4). FV2 numunesi RSKK 02026 standart suşuna karşı (2  $\mu$ g/ml) ise, kontrol Ampisiline (2  $\mu$ g/ml) eşdeğer etkili bulunmuştur. Uçucu yağ örnekleri ayrıca Gram-pozitif *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *B. subtilis* ATCC 6633 standart bakteri suşlarına (16-64  $\mu$ g/ml) karşı izole suşlardan (64-128  $\mu$ g/ml) daha etkili bulunmuştur (Tablo 5). Antibakteriyel etkinin yanında, uçucu yağ örnekleri *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis*



ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 6258 standart funguslarına karşı analiz edilmiş (Tablo 6), *C. krusei* suşuna karşı (8-16 µg/ml) kontrol flukanazol'den (64 µg/ml) daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.** Rezene uçucu yağ numunelerinin ve referansların Gram-negatif bakterilere karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK;µg/ml) değerleri.

Rezene Uçucu Yağ Numuneleri	Gram-negatif bakteriler									
	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>	
	ATCC 35218	İzole suşlar	ATCC 10145	İzole suşlar	ATCC 7002	İzole suşlar	RSKK 574	İzole suşlar	RSKK 02026	İzole suşlar
FV1	8	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV2	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV3	16	128	16	64	8	128	128	128	2	128
FV4	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV5	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV6	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV7	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV8	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV9	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
FV10	16	128	16	64	8	128	128	128	4	128
AMP	2	>128	-	-	2	>128	2	>128	2	>128
LFX	0.12	0.5	1	64	<0.12	1	0.12	1	0.12	64
GM	-	-	0.5	2	-	-	-	-	-	-

AMP: ampicilin; LVX: levofloksazin, GM: gentamisin, *E. coli* izolatu (+GSβL), *P. aeruginosa* izolatu (gentamisin dirençli), *P. mirabilis* izolatu (+GSβL), *K. pneumoniae* izolatu (+GSβL), *A. baumannii* izolatu (sefalosporin dirençli).

**Table 5.** Rezene uçucu yağ numunelerinin ve referansların Gram-pozitif bakterilere karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/ml) değerleri.

Rezene Uçucu Yağ Numuneleri	Gram-pozitif bakteriler					
	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>B.subtilis</i>	
	ATCC 25923	İzole suşlar	ATCC 29212	İzole suşlar	ATCC 6633	İzole suşlar
FV1	16	128	16	128	16	64
FV2	16	128	16	128	16	64
FV3	16	128	16	128	16	64
FV4	16	128	16	128	16	64
FV5	64	128	16	128	16	64
FV6	64	128	32	128	16	64
FV7	32	128	32	128	16	64
FV8	32	128	32	128	16	64
FV9	32	128	32	128	16	64
FV10	32	128	32	128	16	64
AMP	<0.12	>128	0.5	>128	0.12	0.5
LFX	0.25	128	0.5	32	-	-

AMP: ampicilin; LVX: levofloksasin, izole suş *S. aureus* (metisilin dirençli; MRSA), izole suş *E. faecalis* (sefalosporin dirençli), izole suş *B. subtilis* (seftriakson dirençli).

**Tablo 6.** Rezene uçucu yağ numunelerinin maya benzeri funguslara karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK; µg/ml) değerleri.

Rezene Uçucu Yağ Numuneleri	<i>Fungi</i>			
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
FV1	16	16	16	8
FV2	16	16	8	8
FV3	16	16	16	8
FV4	16	16	16	8
FV5	16	16	16	8
FV6	16	16	8	16
FV7	16	16	8	16
FV8	16	16	16	16
FV9	16	16	16	16
FV10	16	16	16	8
KET	0.5	1	2	4
FLU	2	4	4	64

KET: ketokonazol, FLU: flukonazol.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamızda tarafımızdan toplanan (FV1, FV2, FV3, FV4, FV5) ve aktardan alınan (FV6, FV7, FV8, FV9, FV10) 10 numune'den uçucu yağ elde edilmiş ve Türkiye'de ilk defa Avrupa Farmakopesi (6.0)'ne uygun olup olmadığı deneysel olarak araştırılmıştır. Bu analizlerin sonucu Tablo 2 de verilmiştir. Farmakope standartlarına uyması için örnek en az %2 veya 20ml/kg uçucu yağ taşınmalıdır. Örneklerden elde edilen uçucu yağ miktarları %1.14-%2.15 olarak tespit edilmiş (Tablo 1) olup yalnızca Antalya'da tarladan temin edilen FV2 numunesinin uçucu yağ miktarının (%2.2) bu kriterlere uyduğu tespit edilmiştir. FV8 aktar numunesi (%1.82) ise bu değre yakın olmakla birlikte, %2 nin altında kalmıştır. Bu sonuçlara göre tarladan veya aktardan alınan numunelerin uçucu yağ verimi bakımından farklı olduklarını söylemek mümkün değildir. Rezene varyetelerinin, yetiştiği bölgenin ekolojik koşulları ve özellikle yetiştirme şartlarına göre uçucu yağ verimi ve içeriği değişmektedir. Daha önce Türkiye'de yapılan çalışmalardan birinde uçucu yağ verimi kullanılan gübreleme sistemine göre %1.93-%2.28 tespit edilmiş (42), Kan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise artan dozlarda azotlu gübre kullanımı ile uçucu yağ verimi

%2.9-3.2 arasında bulunmuştur (38). Yukardaki çalışmalar uçucu yağ verimini artırmak için gübreleme sistemi uygulanarak araştırma bahçelerinden alınmış sonuçlardır. Örneklerimizin hepsi hemen tarladan alınıp analiz yapılmadığından, numunenin toplanma tarihi, laboratuara analizi için gelene kadar ne kadar beklediği veya depolama şartları da uçucu yağ verimini etkilemiş olabilir.

Uçucu yağ içeriği de Farmakope standartlarına uyması için örnek uçucu yağın en az %80 *t*-anetol taşıması gerekmektedir. Hem tarla hem aktar örnekleri %80 üzerinde *t*-anetol taşımakla birlikte, yalnızca FV10 (%77.995) aktar örneğinin %80'in altında *t*-anetol içerdiği tespit edilmiştir (Tablo 1, 2). Uçucu yağ örneklerinin ana bileşenleri analiz edilmiş *t*-anetol %77.995-87-334, *c*-anetol 0.011-0.131, östragol 3.963-5.522,  $\alpha$ -fenkon 1.210-2.721, limonen 4.486-7.665, karvon 0.052-1.524, anisaldehit 0.246-2.316 değerleri arasında bulunmuştur. Daha önce Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada incelenen 16 ayrı örnekte ve ana bileşenleri *trans*-anetol %60.6-87.0, *cis*-anetol %0.2-0.9, östragol %3.2-11.7, fenkon %0.7-3.2, limonen %0.3-2.5, karvon %0.3-1.0, anisaldehit %6.1-21.3, ve olarak gösterilmiştir (37). Diğer bir çalışmada Türkiye'nin 8 farklı bölgesinden alınan tatlı rezene meyvelerinden uçucu yağ elde edilmiş başlıca *t*-anetol (%75.68-86.52), östragol (%3.25-5.21), fenkon (%1.05-2.80), limonen (%4.25-9.15),  $\gamma$ -terpinen (0.86-1.57) ve  $\alpha$ -pinen (%0.47-1.14) taşıdığı tespit edilmiştir (37).

*F. vulgare*'nin uçucu yağında bulunan ve tüm miktarın % 96.4' ünü oluşturan toplam 35 bileşik tespit edilmiştir (19). Uçucu yağ oranı %3-7 arasında tespit edilen bu çalışmada içerik %60-80 *trans*-anetol, %5-10 fenkon, limonen, metil kavikol,  $\alpha$ -fellandren, anisaldehit, *cis*-anetol, anizik asit, anisketon, monoterpenler ve çeşitli alkollerden oluşmuştur. Çalışmamız sonucunda bulunan değerler şimdiye kadar uçucu yağ örneklerinde yapılan analizlerin sonuçlarıyla uyum içerisindedir. Yalnız anisaldehit bizim çalışmalarımızda daha düşük değerlerde bulunmuştur. Bu da istenmeyen bir sonuç değildir.

Çalışmamızda, uçucu yağ örneklerinin antimikrobiyal etkileri çeşitli bakteriyel suşlar kullanılarak analiz edilmiştir. Daha önce yapılan *F. vulgare* ve *Coriandrum sativum* L. uçucu yağları üzerine karşılaştırmalı bir çalışmada, *Escherichia coli* ve *Bacillus megaterium* ile birlikte 27 fitopatojen ve mantar hastalığına neden olan 2 mikopatojen'e karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmış (13), *C. sativum*'a göre *F. vulgare*'nin etkisinin biraz daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada iki bitki yağının da organik tarımda bakteriyel hastalıkların kontrolünde doğal bakterisit olarak kullanılacağı bildirilmiştir. Agar dilüsyon yöntemi kullanılarak rezene yağı üzerinde yapılan başka bir çalışmada *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium* üzerinde bakteriyostatik etki göstermiştir *Brevibacterium linens*, *Clostridium perfringens*, *Leuconostoc cremoris* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı belirgin antibakteriyel etki

göstermiştir (14). Ayrıca rezene yağının *Phytophthora infestans*'a karşı antifungal etki gösterdiği rapor edilmiştir (44). Yapılan başka bir çalışmada, aktarlarda ticari olarak satılan ve halk arasında özellikle çay, baharat ve tıbbi amaçlı tüketilen *Teucrium polium* L., *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, *Ocimum basilicum* L., ile birlikte *F. vulgare* Miller'in uçucu yağlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri (15) *in vitro* olarak disk difüzyon metodu'na göre *Micrococcus luteus* LA 2971, *Bacillus megaterium* NRS, *Bacillus brevis* FMC 3, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Pseudomonas pyocyaneus* DC 127, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Escherichia coli* DM, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Yersinia enterocolitica* AÜ 19, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Streptococcus faecalis* DC 74, bakterileri, *Saccharomyces cerevisiae* WET 136 ve *Kluyveromyces fragilis* DC 98 mayaları üzerinde test edildi. Uçucu yağların Gentamisin (10µg), Sefalotin (30µg), Seftriakson (10µg) antibiyotikleriyle beraber kullanıldığında uçucu yağların adı geçen deney mikroorganizmaları üzerine farklı değerlerde antibakteriyel veya antifungal aktiviteleri olduğu tespit edilmiştir.

Biyolojik aktivite çalışmaları hem uçucu yağın hem de yağ bileşenlerinin ayrı ayrı etkili olabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda Türkiye'de yetiştirilen, hem tarladan hem de aktarlardan alınan rezene meyvelerinin uçucu yağ verimi ve içerik bakımından birbirlerinden çok farklı olmadığı, uçucu yağ verimi yönünden Avrupa Farmakopesi (6.0)'ne sadece bir örneğin uygun olduğu, fakat içerik bakımından bir örnek hariç diğer tüm örneklerin uygun olduğu gösterilmiştir. Hasat edilen rezene örnekleri doğru depolama koşullarında saklanırsa bu sorun da kolayca aşılabilir, ayrıca devam eden zirai çalışmalarla tamamıyla Avrupa Farmakopesi standartlarında rezene meyvesi üretilmesi hiç zor değildir. Ayrıca, antimikrobiyal ve antifungal etkilerinin de olduğu referans ve izole suşlarla kıyaslanarak gösterilmiştir.

**KAYNAKLAR**

1. Davis PH, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 4. Edinburgh University Press, Edinburgh, 352-377, 1978.
2. Baytop T, Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, 2.baskı, s. 320, 1999.
3. Tamkoç A, Tıbbi Bitkilerimizi Değerlendirelim, Akgün Yayınevi, 365, 1984.
4. Tabata M, Honda G, Sezik E, Yeşilada E, A report on traditional medicine and medicinal plants in Turkey, Faculty of Pharmaceutical Sciences Kyoto University, 1993.
5. European Pharmacopoeia, 4th edition, Council of Europe, Strasbourg 2002.
6. ESCOP, Escop Monographs, 2nd edition, Thieme, New York, 162-168, 2003.
7. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J, Herbal Medicine Expanded Commission E Monographs, Integrative Medical Communications, Boston, 2000.
8. Yalçın S, Türkiye’de uçucu yağlar üretimi ve dış pazarlama imkanları, Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Yayınları Ankara, 1988.
9. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve İhracatı Geliştirme Merkezi Kayıtları, Ankara, 2005.
10. Alexandrovic I, Rakovitskaya O, Kolmo E, Sidorova T, Shushunov S, The effect of fennel (*F. vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized, placebo-controlled study, Alternative Therapies In Health And Medicine, 9(4) 58-61, 2003.
11. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, PDR for Herbal Medicines, 3rd edition. Medical Economics Company, New Jersey, 316-317, 2004.
12. Puodziuniene G, Janulis V, Milasius A, Budnikas M, Development of throat clearing herbal teas, Medicina (Kaunas), 40(8), 762-7, 2004.
13. Lo Cantore P, Iacobellis N, Demarco A, Capasso F, Senatore F, Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. vulgare (Miller) essential oils, Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 52(26) 7862-7866, 2004.
14. Khaldun A, Antibacterial action of ether oils of some plants, Zh. Microbiology Epidemiology. Immunobiology, (3) 92-93, 2006.
15. Toroğlu S, Dığrak M, Kocabaş YZ, Çay veya baharat olarak tüketilen *Teucrium polium* L., *Thymbra spicata* L. var. spicata, *Ocimum basilicum* L. ve *Foeniculum vulgare* Miller’in

- uçucu yağlarının in vitro antimikrobiyal aktivitesi ve bazı antibiyotiklerle etkileşimleri Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2) 36-42, 2005.
16. Roberto, G, Baratta, B, Deans, S, Dorman H, Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils, *Planta Medica* 66(8), 687-93, 2000.
  17. Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, İ., Determination of in vitro antioxidant activity of fennel seed extracts, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36(2) 263-271, 2003.
  18. Lee HS, Acaricidal activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit oil against dermatophagoides spp, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52(10), 2887-2889, 2004.
  19. Choi EM, Hwang JK, Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*, *Fitoterapia*, 75(6), 557-65, 2004.
  20. Özbek H, The antiinflammatory activity of the *Foeniculum vulgare* L. Essential oil and investigation of its median lethal dose in rats and mice, *International Journal of Pharmacology*, 1(4), 329-331, 2005.
  21. Javidnia K, Dastgheib, L, Mohammadi Samani S, Nasiri A, Antihirsutism activity of Fennel (fruits of *Foeniculum vulgare*) extract, a double-blind placebo controlled study, *Phytomedicine*, 10, 455-458, 2003.
  22. Yoshioka M, Tamada T, Aromatic factors of anti-platelet aggregation in fennel oil, *Biogenic Amines*, 19, 89-96, 2005.
  23. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini, M, Impicciatore M, Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity, *Life Sciences*, 78(13) 1419-1432, 2006.
  24. Lee HS, Anticogulant properties of compounds derived from fennel (*Foeniculum vulgare* Gartner) fruits, *Food Sciences Biotechnology*, 15, 763-767, 2006.
  25. Tognolini M, Ballabeni V, Bertoni S, Bruni R, Impicciatore M, Barocelli E, Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis, *Pharmacological Research* 56, 254-260, 2006.
  26. El Bardai S, Lyoussi B, Wibo M, Morel N, Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *F. vulgare* in spontaneously hypertensive rat, *Clinical and Experimental Hypertension*, 23(4) 329-343, 2001.

27. Gershbein LL, Regeneration of rat liver in the presence of essential oils and their components, *Food and Cosmetics Toxicology*, 15(3) 173-181, 1977.
28. Özbek H, Ugras S, Dülger H, Bayram İ, Tuncer İ, Öztürk G, Öztürk A, Hepatoprotective effect of *F. vulgare* essential oil, *Fitoterapia* 74(3) 317-319, 2003.
29. Saleh M, Hashem, F, Grace M, Volatile oil of Egyptian sweet fennel (*Foeniculum vulgare* var. dulce. Alef.) and its effects on isolated smooth muscles, *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 6(1) 5-7, 2005.
30. Albert-Puleo M, Fennel and anise as estrogenic agents, *Journal of Ethnopharmacology* 2(4) 337-344, 1980.
31. Malini T, Vanithakumari G, Megala N, Anusya S, Devi K, Elango V, Effect of *F. vulgare* Mill. seed extract on the genital organs of male and female rats, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 29(1) 21-26, 1985.
32. Liu Z, Lu C, Chen J, Correlation comparison of uterotrophic assay and ESCREEN assay for estrogenic activities, *Wei Sheng Yan Jiu* 33(4) 458-460, 2004.
33. Namavar J, Tartifizadeh A, Knabnadideh S, Comparison of fennel and mefenamic acid for the treatment of primary dysmenorrhea, *International Journal Of Gynaecology And Obstetrics* 80(2) 153-7, 2003.
34. Traboulsi A, El-Haj S, Tuen M, Taoubi K, Nader N, Murad A, Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae), *Pest Management Science*, 61(6) 597-604, 2005.
35. Chainy GB, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB, Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis, *Oncogene* 19(25) 2943-2950, 2000.
36. Kan Y, Kartal M, Aslan S, Yıldırım N, Composition of essential oil of Fennel fruits cultivated at different conditions, Ankara University, *Journal of Faculty of Pharmacy*, 35(2) 95-101, 2006.
37. Akgul A, The chemical constituents of essential oils of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) grown in Turkey, *Doğa: Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 10, 301-307, 1986.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI; formerly NCCLS), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for Antimicrobial

Susceptibility Testing; 16th Informational supplement. CLSI document M7-A7, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania 19087, 2006.

39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard, third edition. CLSI document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania USA, 2008.
40. Özçelik B, Koca U, Kaya DA, Şekeroğlu N, Evaluation of the in vitro bioactivities of Mahaleb Cherry (*Prunus mahaleb* L), Romanian Biotechnological Letters, 17(6) 7863-7872, 2012.
41. Koca U, Özçelik B, Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities of *Centaurea tchihatcheffii* Extracts, Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(2) 125-134, 2009.
42. Özkan F, Tatlı rezene (*Foeniculum vulgare* Mill. var *dulce*)’de bitki sıklığının verim ve verim öğeleri üzerine etkileri, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, 1999.
43. Singh G, Maurya S, Lampasona, MP, Catalan C, Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract, Food Control, 17, 745-752, 2006.
44. Soylu E, Soylu S, Kurt S, Antibacterial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*, Mycopathologia 161(2) 119-28, 2006.

Received = 28.02.2013

Accepted = 22.07.2013