مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره اول، پیاپی سی و سوم، تابستان ۱۳۹۹ (۱۳۳-۱۲۳)

مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره‌های مختلف بخش هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* (*Echium italicum*) بر گونه‌های کاندیدا با دو آنتی‌بیوتیک نیستاتین و فلوکونازول

فاطمه نبی‌پور[۱*]، محمد فضیلتی[۲]، بهروز دوستی[۳]، رضا میردریکوند[٤]

۱. دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور اصفهان
۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور اصفهان
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد
٤. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۰)

چکیده

اخیراً به‌علت افزایش عفونت‌های کاندیدیایی و عود مکرر آن‌ها و با توجه به مقاومت گونه‌های کاندیدا به اکثر داروهای ضدقارچی، برای اولین بار خواص ضدقارچی عصاره‌های مختلف از بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه عصاره‌های متانولی، ان-هگزانی و آبی از قسمت‌های مختلف گیاه در غلظت‌های مختلف به روش خیساندن تهیه گردید و روی دو گونه قارچ *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* به روش انتشار دیسک و MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی)، MFC (حداقل غلظت قارچ‌کشی) به‌روش میکرودایلوشن بررسی شد. آنتی‌بیوتیک نیستاتین و فلوکونازول به‌عنوان کنترل مثبت، دی متیل سولفوکساید به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. داده‌ها توسط واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون t تست آنالیز شدند. نتایج نشان داد که عصاره‌های مختلف ریشه فعالیت ضدقارچی بیشتری بر علیه هر دو گونه کاندیدا نسبت به بخش هوایی گیاه نشان داد (P<۰/۰۵). عصاره متانولی ریشه بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد و کمترین MIC (۱۵/٦۲µg/µl) و MFC (۳۱/۲۵µg/µl) علیه کاندیدا گلابراتا نشان داد، به‌طوری‌که میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی ریشه در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۱۸/۵±۰/۵) بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نیستاتین برای کاندیداگلابراتا می‌باشد. نتایج نشان داد که عصاره‌های این گیاه دارای اثرات ضدقارچی روی هر دو گونه کاندیدا می‌باشد و بعد از آزمایش‌های تکمیلی و بالینی می‌تواند به‌عنوان یک داروی ضدقارچی مناسب علیه عفونت‌های ناشی از *کاندیدا گلابراتا* و *تروپیکالیس* استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، گل‌گاوزبان ایتالیایی.

* نویسندهٔ مسئول: فاطمه نبی‌پور Email: nabipor.f@gmail.com

Comparison of the Antifungal effects of various extracts of aerial part and root of *Echium italicum* on Candida species with two antibiotics Nystatin and Fluconazole

Fatemeh Nabipour[1*], Mohammad Fazilati[2], Behroze Dousti[3], Reza Mir derikvand[4]

1. Ph. D., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Isfahan, Iran
2. Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor Univercity, Isfahan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Khorramabad Branch, Lorestan, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Khorramabad Branch, Lorestan, Iran

(Received: Apr. 22, 2019 - Accepted: Nov. 11, 2019)

Abstract

Recently, due to increased Candida infection and frequent recurrence and due to the resistance of Candida species to most antifungal drugs, for the first time, antifungal properties of methanolic, n-hexane and aqueous extracts from different parts of *Echium italicum* were compared with antibiotics. In this study, methanol, n-hexane and aqueous extracts from different parts of the plant were prepared in different concentrations by soaking method And on two species of *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* by disk diffusion method and MIC (minimum inhibitory concentration), MFC (minimum fungicidal concentration of growth) by micro dilution method. Antibiotics Nystatin and Fluconazole were used as a positive control and DMSO was used as a negative control. Data were analyzed by one-way ANOVA and t-test. The results showed that different extracts from the root of the plant showed more antifungal activity than the aerial part of the plant against both species of Candida (P<0/05). The methanolic extract of the root showed the highest mean diameter of growth and the lowest MIC (15.62 µg/µl) and MFC (31.25 µg/µl) against *Candida glabrata* as inhibitory diameter of growth the methanolic extract in concentration of 5mg/ml (18.5±0.5) was higher than Nystatin antibiotic inhibitory diameter of growth for *Candida glabrata*. The results showed that the extracts of this plant have antifungal effects on both Candida species and after supplementary and clinical trials as an appropriate antifungal agent against *Candida glabrata* infection and *Tropicalis* infection.

Keywords: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Echium italicum*, Extract.

مقدمه

گونه‌های کاندیدا قارچ‌های فرصت‌طلب هستند و توانایی ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن دهان، واژن، ریه و دستگاه گوارش را دارند (Malekpour *et al*., 2015).

عفونت‌های سیستمیک ناشی از گونه‌های کاندیدا در دهه‌های اخیر به‌علت افزایش بیماری‌های سرکوب‌کننده ایمنی مانند ایدز، انواع مختلف بدخیمی‌های خونی و مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها و کورتیکواستروئیدها به‌عنوان یک عامل اصلی مرگ‌ومیر، به‌ویژه در بیماران بستری در بیمارستان‌ها مطرح شده است (Patterson, 2007). عفونت‌های کاندیدیای در دهه‌های اخیر افزایش یافته و در حال حاضر یکی از رایج‌ترین عفونت‌های خون در بخش مراقبت‌های ویژه است (Soliman *et al*., 2017). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که اخیراً، شیوع عفونت‌های ناشی از گونه‌های غیرآلبیکنس افزایش یافته است که در میان آن‌ها *کاندیدا گلابراتا* (*Candida glabrata*) شایع‌ترین و سپس *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (*Candida parapsilosis*) و *کاندیدا تروپیکالیس* (*Candida tropicalis*) شایع هستند (Parra-Sánchez *et al*., 2017). مقاومت به داروهای ضدقارچی گروه آزول به‌خصوص فلوکونازول در میان گونه‌های غیرآلبیکنس مانند *کاندیدا گلابراتا* (AL-Snafi, 2017) و کاندیدا تروپیکالیس افزایش یافته است، به‌طوری‌که میزان مرگ‌ومیر ناشی از عفونت‌های ایجادشده توسط *کاندیدا تروپیکالیس* بیشتر از *کاندیدا آلبیکنس* است و این امر باعث می‌شود درمان عفونت‌های ایجادشده توسط این ارگانیسم پیچیده‌تر شود (Choi *et al*., 2016). داروهای ضدقارچی که قبلاً مورد استفاده قرار گرفته‌اند، متعلق به گروه آزول (فلوکونازول) و پلی‌ان (نیستاتین) هستند. اما به‌علت سمیت بالا، عوارض جانبی، پاسخ ناکافی به درمان و عود مکرر به‌ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mengltoh & Dhanashree, 2017). از این‌رو، توسعه داروهای ضدقارچی جدید و مؤثر در طبیعت ضروری است (Iosif *et al*., 2017).

گیاهان دارای طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه هستند که مسئول خواص ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی بوده و به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی شده است (Nayan & Bholodia, 2011).

گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* با نام علمی *Echiumi talicum* از خانواده گل‌گاوزبان (Boraginaceae) گیاهی علفی دو ساله یا پایا به ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر تمامی پوشیده از کرک‌های سفید گسترده، تک شاخه و ساقه آن ایستاده، بلند، ضخیم، برگ‌های بیضوی نوک‌تیز، گل‌آذین مخروطی و گل‌های صورتی متمایل به آبی یا سفید متمایل به قرمز می‌باشد (Eruygur *et al*., 2012; AL-Snafi, 2017). جنس *Echium* اغلب در اروپا، ترکیه، ایران و قفقاز رویش دارد و چهار گونه آن در ایران انتشار دارد (Kretschmer *et al*., 2012). گیاهان این خانواده دارای متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئید، فلاونوئید، پلی فنول، فیتواسترول و ترپنوئیدها می‌باشند که خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بیوتیکی را نشان می‌دهند (Sousa *et al*., 2015). هم‌چنین عصاره این گیاه دارای ۲۲ ترکیب می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها، آلفا–لینولئیک اسید، گاما–لینولنیک اسید می‌باشد که دارای ارزش تغذیه‌ای و دارویی است (Ozcan, 2013) و ریشه گونه‌های جنس *Echium* غنی از مشتقات نفتاکینون مانند آلکانین و شیکونین می‌باشند (Albreht *et al*., 2009)، به‌طوری‌که بیشترین میزان مشتقات شیکونین در ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* نسبت به سایر گونه‌های این جنس مشاهده شد (Eruygur *et al*., 2016). که علاوه بر این، مشتقات شیکونین شامل: داکسی شیکونین، استیل شیکونین، ایزووالریل شیکونین و ۲–متیل–بوتیریل شیکونین از ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* شناسایی شد (Eruygur, 2018) که دارای اثرات ضدسرطانی، ضدویروسی، ضدمیکروبی و ضدقارچی (Futuro *et al*., 2018)، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی (DeOliveira *et al*., 2013) و ترمیم‌کننده زخم

می‌باشند (Nikita *et al*., 2015). هم‌چنین بخش هوایی گیاهان این خانواده دارای آلکالوئید پیرولیزیدین و ترکیبات فنول و فلاونوئید و اسیدهای چرب می‌باشند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند (Abbaszadeh *et al*., 2013; Lucchetti *et al*., 2016).

گونه‌های این جنس خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان (AdelPilerood & Prakash, 2019)، تنظیم کننده چربی، ضد افسردگی، ضد انعقاد (Alsanie *et al*., 2018)، ضد ویروسی (Farahani *et al*., 2013)، ضدمیکروبی (Shariatifar *et al*., 2016) و ترمیم‌کننده زخم می‌باشند (Alias *et al*., 2015).

با توجه به این‌که مطالعات قبلی در زمینه اثرات ضدقارچی گونه‌های مختلف این جنس صورت پذیرفته و هم‌چنین مردم استان لرستان بر این باورند که این گیاه دارای اثرات ضدمیکروبی است، اما تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیرات ضدقارچی این گونه انجام نشده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر که برای اولین بار صورت گرفته، بررسی اثرات ضدکاندیدایی عصاره‌های مختلف متانولی، آبی، ان–هگزانی بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* روی *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* پس از جمع‌آوری توسط گیاه‌شناس به‌عنوان گونه *Echium italicum* از خانواده گل‌گاوزبان شناسایی شد. بخش هوایی و ریشه گیاه پس از خشک‌کردن در سایه با آسیاب برقی، آسیاب و پودر حاصله برای عصاره‌گیری استفاده شد. سپس عصاره متانولی، ان–هگزانی و آبی بخش هوایی و ریشه گیاه با روش خیساندن تهیه شدند. به ازای هر گرم پودر بخش‌های مختلف گیاه ۱۰ میلی‌لیتر از حلال‌های فوق اضافه گردید. بعد از ۷۲ ساعت با عبور دادن از کاغذ صافی واتمن صاف گردید. با کمک دستگاه حذف حلال در خلأ (روتاری) عصاره‌ها تغلیظ شده و برای خشک شدن به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس ازخشک شدن، عصاره‌ها تا زمان انجام آزمایش در ظروف در بسته، دور از نور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Zarghami Moghaddam, 2012).

سوش استاندارد قارچی جهت انجام مطالعات فوق *کاندیدا گلابراتا* (PTCC۵۲۹۷) و *کاندیدا تروپیکالیس* (ATCC۱۳۸۰۳) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. برای تعیین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی، ان–هگزانی و آبی بخش هوایی و ریشه گیاه از روش انتشار دیسک و از روش میکرودایلوشن به‌منظور تعیین MIC و MFC آن‌ها استفاده گردید.

بررسی قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک

غلظت‌های مختلف (۵ تا ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از عصاره‌های متانولی، ان–هگزانی و آبی در حلال دی‌متیل سولفوکساید ۵٪ تهیه و با استفاده از فیلترهای به قطر ۰/۴۵ میکرون استریل گردید. سپس سوسپانسیونی از کشت فعال و شبانه کاندیدا تهیه و کدورت آن با نیم‌مک فارلند تنظیم، و روی محیط سابرو دکستروز آگار تلقیح گردید. حال دیسک‌های استریل حاوی ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف از عصاره‌های مختلف از بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* و نیز دیسک‌های حاوی حلال دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان شاهد منفی و آنتی‌بیوتیک نیستاتین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم) و فلوکونازول (غلظت ۱۰ میکروگرم) به‌عنوان شاهد مثبت روی محیط کشت قرار داده شدند. سپس پلیت‌های قارچی به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۰۱ برحسب دهم میلی‌مترقطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متراندازه‌گیری و هر آزمایش سه بار تکرار گردید (Nabipour & Dousti, 2017).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی

با استفاده از روش میکرودایلوشن حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی عصاره‌های متانولی، ان–هگزانی و آبی بخش‌های هوایی و ریشه گیاه تعیین گردید. بدین منظور سری رقتی از ۱۰۰۰ تا ۱/۹۵میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف بخش هوایی و ریشه گیاه در محیط سابرو دکستروز براث در میکروپلیت ۹۶ خانه تهیه گردید. پس از تهیه سری رقت‌ها، ۵ میکرولیتر از هر سوسپانسیون قارچی Cfu/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$ تلقیح شد، به‌طوری‌که چاهک شماره ۱۱ هر میکروپلیت حاوی محیط کشت حاوی قارچ‌ها بدون عصاره به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک شماره ۱۲ هر میکروپلیت حاوی محیط کشت و عصاره بدون قارچ‌ها به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت برای قارچ‌ها انکوبه گردیدند. آن‌گاه کمترین رقتی از عصاره‌های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* که در آن هیچ کدورتی مشاهده نگردید به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. از چاهک‌های فاقد کدورت به‌منظور تعیین حداقل غلظت قارچ‌کشی عصاره‌های مختلف گیاه، به کمک لوپ استریل روی محیط سابرو دکستروز آگار کشت داده شد. محیط کشت‌های تلقیح شده به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کمترین غلظتی از عصاره‌های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه گیاه که قارچ در آن رشد نکرده بود به‌عنوان حداقل غلظت قارچ‌کشی در نظر گرفته شد. در این مطالعه به‌منظور تائید نتایج حاصل از آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید (Mirrezaee *et al*., 2017).

تجزیه و تحلیل آماری

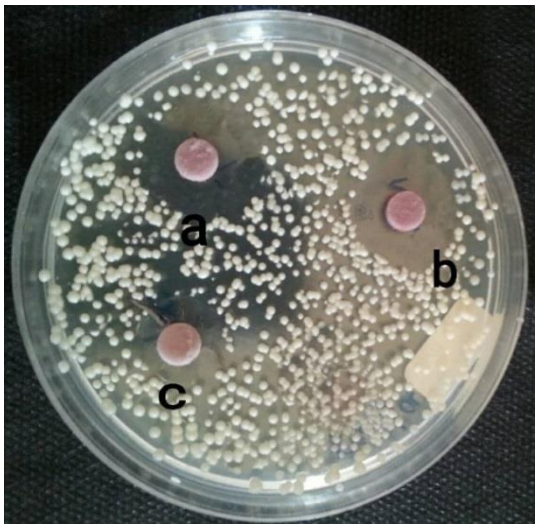
به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ برای آنالیز آماری و Excel برای رسم نمودار استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار انجام شد و مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شد. آزمون‌های آماری آنالیز واریانسیک طرفه ANOVA و آزمون تی‌تست درسطح احتمال ($P<۰/۰۵$) روی داده‌ها انجام شد.

نتایج

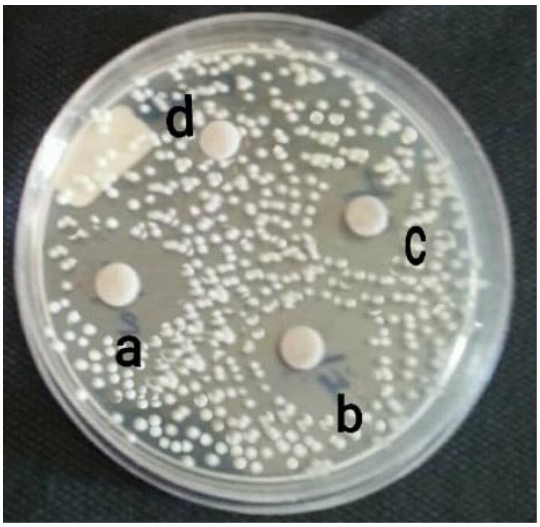
نتایج فعالیت ضدقارچی عصاره‌های متانولی، ان–هگزانی و آبی بخش‌های هوایی و ریشه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* در غلظت‌های مختلف روی دو قارچ *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین به‌عنوان کنترل مثبت و دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان کنترل منفی با استفاده از روش انتشار دیسک در جدول‌های ۱ و ۲ و میکرودایلوشن در جدول‌های ۳ و ۴ آمده است.

نتایج هر دو روش نشان داد که عصاره‌های مختلف بخش هوایی و ریشه گیاه در تمامی غلظت‌ها فعالیت ضدقارچی روی هر دو گونه کاندیدا را نشان دادند (جدول‌های ۱ و ۲). به‌طوری که *کاندیدا گلابراتا* حساسیت بیشتری نسبت به *کاندیدا تروپیکالیس* نشان داد. هم‌چنین عصاره‌های مختلف ریشه در تمامی غلظت‌ها فعالیت ضدقارچی بیشتری بر علیه هر دو گونه کاندیدا نسبت به بخش هوایی گیاه نشان دادند ($P<۰/۰۵$) و از میان عصاره‌های مختلف، عصاره متانولی ریشه و بخش هوایی گیاه با داشتن قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر و مقدار MIC کوچک‌تر در تمامی غلظت‌ها میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به عصاره ان–هگزانی و آبی روی *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* نشان داد (شکل‌های ۱ تا ۴). نتایج هم‌چنین نشان داد که اندازه‌ی قطر هاله عدم رشد با مقدار غلظت عصاره‌های مورد نظر نسبت مستقیم داشت ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که با افزایش غلظت هر کدام از عصاره‌ها به‌طور معنی‌داری قطر هاله عدم رشد بیشترمی‌شود عصاره متانولی ریشه و بخش هوایی گیاه کمترین MIC و MFC بر علیه *کاندیدا گلابراتا* نسبت به *کاندیدا*

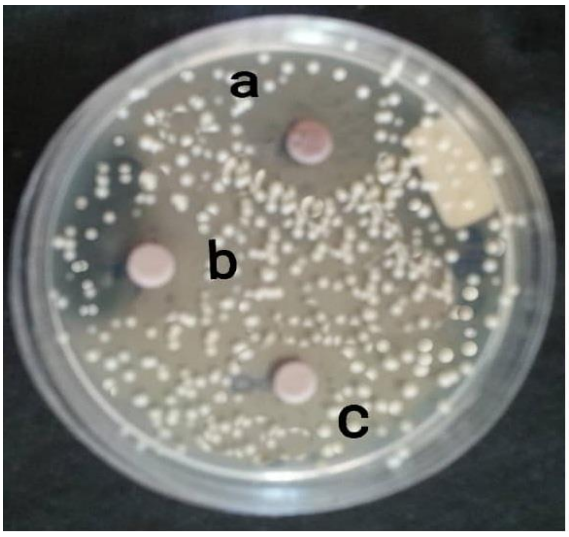
تروپیکالیس نشان داد (جدول‌های ۳ و ۴). هم‌چنین میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی ریشه در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی *کاندیدا گلابراتا* بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک آنتی‌بیوتیک نیستاتین (غلظت ۱۰۰ میکروگرم) می‌باشد ولی البته میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف ریشه و بخش هوایی *گل‌گاوزبان ایتالیایی* کمتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک فلوکونازول می‌باشد که قدرت بیشتر آن را در مهار رشد کاندیدا *گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با عصاره‌های مختلف گیاه را نشان می‌دهد.



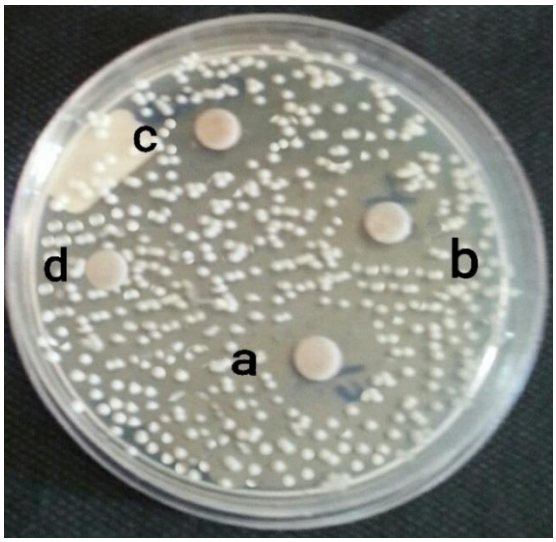
شکل ۱. هاله عدم رشد غلظت ۵mg عصاره‌های مختلف ریشه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* بر رشد *کاندیدا گلابراتا*.
a) عصاره متانولی، b) عصاره ان–هگزانی، c) عصاره آبی



شکل ۲. هاله عدم رشد غلظت ۵mg عصاره‌های مختلف بخش هوایی *گل‌گاوزبان ایتالیایی* بر رشد *کاندیدا گلابراتا*.
a) عصاره متانولی، b) عصاره ان–هگزانی، c) عصاره آبی، d) دی متیل سولفوکساید



شکل ۳. هاله عدم رشد غلظت ۵mg عصاره‌های مختلف ریشه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* بر رشد *کاندیدا تروپیکالیس*.
a) عصاره متانولی، b) عصاره ان–هگزانی، c) عصاره آبی



شکل ٤. هاله عدم رشد غلظت ۵mg عصاره‌های مختلف بخش هوایی *گل‌گاوزبان ایتالیایی* بر رشد *کاندیدا تروپیکالیس*.
a) عصاره متانولی، b) عصاره ان–هگزانی، **c**) عصاره آبی، d) دی متیل سولفوکساید

جدول ۱. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف انواع عصاره‌های بخش‌های مختلف گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* با آنتی‌بیوتیک‌ها بر *کاندیدا گلابراتا* (بر حسب میلی‌متر)

غلظت*	ریشه			بخش هوایی		
(mg/ml)	متانولی	ان-هگزانی	آبی	متانولی	ان-هگزانی	آبی
۵	۱۸/۵ ±۰/۵	۱۷ ±۰/۲۸	۱۵/۳ ±۰/۷	۱۵/۲ ±۰/۴	۱۴/۵ ±۰/۵	۱۲/۴ ±۰/۶
۲/۵	۱۷ ±۰/۶	۱۶ ±۰/۷	۱۳/۷ ±۰/۴	۱۴ ±۰/۴۲	۱۳ ±۰/۳	۱۱/۲ ±۰/۵
۱/۲۵	۱۴/۷ ±۰/۴	۱۴±۰/۵	۱۲/۵±۰/۳	۱۳±۰/۷	۱۲±۰/۲	۱۰±۰/۷۵
۰/۶۲۵	۱۴±۰/۶	۱۳±۰/۳	۱۱/۶±۰/۲۵	۱۱/۵±۰/۵	۱۰/۶±۰/۲۴	۹±۰/۵
۰/۳۲۵	۱۲/۶ ±۰/۲۱	۱۱/۷ ±۰/۵	۹/۶ ±۰/۲۸	۱۰ ±۰/۷	۹/۵ ±۰/۵	۸ ±۱
۰/۱۵۶	۱۰/۷ ±۰/۱۲	۱۰ ±۰/۳۴	۹ ±۰/۶	۹ ±۰/۶۵	۸/۳ ±۰/۱۹	۷/۵ ±۰/۶
فلوکونازول (۱۰µg/ml)	۲۳ ±۰/۶	۲۳ ±۰/۶	۲۳ ±۰/۶	۲۳ ±۰/۶	۲۳ ±۰/۶	۲۳ ±۰/۶
نیستاتین (۱۰۰µg/ml)	۱۷/۳ ±۰/۳	۱۷/۳ ±۰/۳	۱۷/۳ ±۰/۳	۱۷/۳ ±۰/۳	۱۷/۳ ±۰/۳	۱۷/۳ ±۰/۳
*DMSO	–	–	–	–	–	–

*: ۳۰ میکرولیتر به ازای هر دیسک، DMSO: دی متیل سولفوکساید.

جدول ۲. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف انواع عصاره‌های بخش‌های مختلف گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* با آنتی‌بیوتیک‌ها بر*کاندیدا تروپیکالیس* (بر حسب میلی‌متر)

غلظت*	ریشه			بخش هوایی		
(mg/ml)	متانولی	ان-هگزانی	آبی	متانولی	ان-هگزانی	آبی
۵	۱۷/۷ ±۰/۷	۱۶ ±۰/۴	۱۴ ±۰/۷	۱۳/۷ ±۰/۲۶	۱۳ ±۰/۵	۱۱/۶ ±۰/۹
۲/۵	۱۵/۴ ±۰/۳	۱۴/۷ ±۰/۲۱	۱۳ ±۰/۵	۱۳ ±۰/۶۲	۱۲ ±۰/۷۳	۱۱ ±۰/۲
۱/۲۵	۱۴ ±۰/۲۵	۱۳±۰/۸	۱۱/۶±۰/۶	۱۱/۵±۰/۷	۱۱±۰/۶	۱۰±۱/۰۲
۰/۶۲۵	۱۳±۰/۶	۱۲±۰/۵	۱۰/۵±۰/۴۳	۱۱±۰/۵	۱۰±۰/۲۴	۹±۰/۲۴
۰/۳۲۵	۱۱/۷ ±۰/۳	۱۱ ±۰/۱۲	۹ ±۰/۷۵	۹/۶ ±۰/۴	۹ ±۰/۱۹	۷/۵±۰/۷۵
۰/۱۵۶	۱۰ ±۰/۵	۹/۴ ±۰/۱۹	۸/۷ ±۰/۴	۸/۵ ±۰/۲۶	۸ ±۰/۶۸	۷ ±۰/۲۸
فلوکونازول (۱۰µg/ml)	۲۴/۵ ±۰/۸	۲۴/۵ ±۰/۸	۲۴/۵ ±۰/۸	۲۴/۵ ±۰/۸	۲۴/۵ ±۰/۸	۲۴/۵ ±۰/۸
نیستاتین (۱۰۰µg/ml)	۱۸/۵ ±۰/۴	۱۸/۵ ±۰/۴	۱۸/۵ ±۰/۴	۱۸/۵ ±۰/۴	۱۸/۵ ±۰/۴	۱۸/۵ ±۰/۴
DMSO	–	–	–	–	–	–

*: ۳۰ میکرولیتر به ازای هر دیسک، DMSO: دی متیل سولفوکساید.

جدول ۳. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی عصاره‌های مختلف ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* بر سویه‌های قارچی (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

سویه قارچی	عصاره متانولی		عصاره ان-هگزانی		عصاره آبی	
	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت قارچ کشی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت قارچ کشی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت قارچ کشی
کاندیدا گلابراتا	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵
کاندیدا تروپیکالیس	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰

جدول ٤. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی عصاره‌های مختلف بخش هوایی گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* بر سویه‌های قارچی (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

سویه قارچی	عصاره متانولی		عصاره ان-هگزانی		عصاره آبی	
	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت قارچ کشی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت قارچ کشی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت قارچ کشی
کاندیدا گلابراتا	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵
کاندیدا تروپیکالیس	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰

بحث و نتیجه‌گیری

اخیراً کاربرد وسیع و طولانی مدت آنتی‌بیوتیک‌ها، کورتیکو استروئیدها و داروهای سرکوب کننده ایمنی و هم‌چنین بیماری‌ها مانند دیابت و ایدز و غیره باعث افزایش میزان عفونت‌های قارچی به‌خصوص گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*)، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با گذشته شده است (Fayemi Scott & Osho, 2012; Camacho-Cardoso *et al*., 2017). با توجه به افزایش روز افزون گونه‌های کاندیدای غیر آلبیکنس و ایجاد مقاومت دارویی، نیاز به داروهای ضدقارچی با منشأ طبیعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گیاهان و ترکیبات فعال آن‌ها به‌طور گسترده‌ای برای فعالیت ضدقارچی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sadri *et al*., 2016). ریشه گونه‌های خانواده گل‌گاوزبان از جمله جنس *Echium* غنی از مشتقات نفتاکینون از جمله شیکونین و آلکانین است (Albereht *et al*., 2009) به‌طوری که بیشترین میزان مشتقات شیکونین در ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* نسبت به سایر گونه‌های این جنس مشاهده شد (Eruygur *et al*., 2016). که این ترکیبات دارای خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان، ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشند (DeOliveira *et al*., 2017).

نتایج این مطالعه برای اولین بار فعالیت ضدقارچی عصاره‌های متانولی، ان–هگزانی و آبی از بخش هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* در غلظت‌های تست‌شده با هر دو روش انتشار دیسک و میکرودایلوشن روی *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* را نشان داد. به‌طوری‌که نتایج نشان داد که عصاره متانولی بخش‌های مختلف با داشتن قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر در غلظت‌های مختلف و مقدار MIC کوچک‌تر نسبت به عصاره‌های آبی و ان–هگزانی بخش هوایی و ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* خواص ضدقارچی بیشتری نشان داد به‌طوری‌که عصاره متانولی ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* در غلظت ۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بیشترین فعالیت ضدقارچی را با میانگین قطر هاله عدم رشد ۰/۵±۱۸/۵ و MIC و MFC به‌ترتیب برابر ۱۵/۶۲ و ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر علیه قارچ *کاندیدا گلابراتا* را نشان داد که بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک نیستاتین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم می‌باشد. در کل مطالعاتی چندانی در زمینهٔ بررسی اثر ضدقارچی گونه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* تاکنون صورت نگرفته است، در پژوهشی که در زمینه اثرات ضدقارچی عصاره‌های متانولی ریشه و بخش هوایی گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* انجام گرفت نتایج نشان داد که عصاره‌های مختلف ریشه فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به بخش هوایی بر کاندیدا آلبیکنس نشان داد (Nabipour *et al*., 2019). اسانس گل‌گاوزبان ایتالیایی اثرات ضدقارچی بر علیه کاندیدا آلبیکنس با MIC برابر با ۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد که این اثرات وابسته به غلظت بود (Morteza-Semnani *et al*., 2006). در یک پژوهش فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی گونه *Echium arabicum* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد که عصاره متانولی این گیاه روی سویه‌های قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*)، *آسپرژیلوس اکراسئوس* (*Aspergillus ochraceus*)، *فوزاریوم* مونیلیفورم (*Fusarium moniliform*) و *کاندیدا آلبیکنس* اثرات ضدقارچی خوبی را نشان داد (Shahat *et al*., 2017). هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که ریشه گیاه *Onosma chlorotricum* دارای اثرات ضدقارچی بر علیه *کاندیدا گلابراتا* می‌باشد (Nabipour & Dousti, 2017). نتایج مطالعات Okusa *et al*. (2007) نشان داد که عصاره متانولی گونه *Cordia gilletii* از خانواده گل‌گاوزبان خواص ضدقارچی بیشتری نسبت به عصاره ان–هگزانی و آبی نشان داد که با نتایج پژوهش ما که عصاره متانولی بخش‌های مختلف گیاه خواص ضدقارچی بیشتری

نسبت به عصاره‌های آبی و ان-هگزانی نشان داد، مطابقت دارد. هم‌چنین در پژوهشی که در زمینه بررسی اثرات ضدقارچی کالوس گیاه *Arnebia euchroma* از خانواده گل‌گاوزبان صورت گرفت نتایج نشان داد که عصاره ان-هگزانی کالوس این گیاه خواص ضدقارچی بیشتری بر *کاندیدا گلابراتا* نسبت به *کاندیدا تروپیکالیس* نشان داد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Damianakos *et al*., 2012). نتایج مطالعات Binzet *et al*. (2019) در زمینه بررسی اثرات ضدقارچی اسانس و عصاره متانولی گونه *Onosma siheana* از خانواده گل‌گاوزبان نشان داد که عصاره متانولی ریشه دارای فعالیت ضدقارچی با حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با ۱۲۵ میگروکرم بر میلی‌لیتر بر قارچ *کاندیدا گلابراتا* می‌باشد که در مطالعه حاضر عصاره متانولی ریشه گیاه *گل‌گاوزبان ایتالیایی* حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با ۱۵/۶۲ میگروکرم بر میلی‌لیتر بر قارچ *کاندیدا گلابراتا* را نشان داد. نتایج مطالعات Sasaki *et al*. (2002) نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی داکسی شیکونین، استیل شیکونین، بتا هیدروکسی ایزووالریل شیکونین و شیکونین برای *کاندیدا گلابراتا* به‌ترتیب برابر با ۱۶، ۱۶، ۳۲ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای *کاندیدا تروپیکالیس* به‌ترتیب برابر با ۳۲، ۱۶،۳۲و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد. نتایج یک پژوهش نشان داد که مشتقات نفتاکینون اثرات ضدقارچی قوی با MIC برابر با ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتربر قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* را نشان داد. بنابراین مشتقات نفتاکینون ترکیبات قابل‌توجه برای عوامل ضدقارچی جدید هستند (Errant *et al*., 2006).

نتایج این مطالعه مانند مطالعات دیگر نشان داد که نوع عصاره می‌تواند در استخراج ترکیبات مؤثر این گیاه و سایر گیاهان مهم باشد. هم‌چنین می‌توان خاصیت ضدقارچی عصاره‌ها را به وجود متابولیت‌های ثانویه از قبیل فنول، فلاونوئید (Gharib & Godarzee, 2016)، ترکیبات آنتراکینون مانند شیکونین و مشتقات آن‌ها نسبت داد که در گونه‌های جنس *Echium* وجود دارند و دارای فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی هستند و احتمالاً روی غشاهای زیستی از طریق مهار سنتز پروتئین تأثیر می‌گذارند (Shameem *et al*., 2015).

به‌طورکلی، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره‌های مختلف بخش‌های هوایی و ریشه اثر بازدارندگی بر رشد قارچ کاندیداگلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس دارد و در ادامه لازم است مطالعات بیشتری انجام شود تا غلظت مؤثر این عصاره‌ها بر جدایه‌های بالینی و اثرات درمانی آن‌ها در مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد تا درنهایت بتوان به فراورده جدید ضدقارچی دست یافت.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی ازپایان نامه دوره دکتری می‌باشد و در دانشگاه پیام نور واحد اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCES

Abbaszadeh, S.; Radjabian, T.; Taghizadeh, M. (2013). Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents of *Echium* Species from Different Geographical Locations of Iran. Journal of Medicinal plants and By-product; 1: 23-31.

Adel Pilerood, S.; Prakash, J. (2019). Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valerian officinalis*). J Food Sci Technol; 1-10.

Albreht, A.; Vovk, I.; Simonovska, B.; Srbinoska, M. (2009). Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L.. J Chromatogr A; 1216:3156-3162.

Alias, J.; Barikbin, B.; Khoshzaban, F.; Naseri, M.; Sedaghat, R.; Kamalinejad, M.; *et al*. (2015). Effect of *Arnebia euchroma* ointment on post-laser wound healing in rats. J Cosmet Laser Ther; 17: 41-45.

Al-Snafi, A.E. (2017). Phytochemical constituents and medicinal properties of *Digitalis lanata* and *Digitalispurpurea*-A review. Indo Am J P Sci; 4(02): 225-234.

Alsanie, W.F.; El-Hallous, E.I.; Dessoky, E.S.; Ismail, I.A. (2018). Viper's Bugloss (*Echium vulgare* L.) Extract as A Natural Antioxidant and Its Effect on Hyperlipidemiae. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research; 8(1): 81-89.

Binzet, R.; Binzet, G.; Gumus, I.; Turunc, E.; Solmaz, U.; Keskin, A.; *et al*. (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Activityof Essential Oil and Various Extracts of *Onosmasieheana* Hayek Roots. J Essent *Oil* Bear PL; 1-12.

Camacho-cardoso, J.; Martínez-Rivera, M.; Manzano-Gayosso, P.; Méndez-Tovar, L.J.; López-Martínez, R.; Hernández, F. (2017). Molecular detection of *Candida* species from hospitalized patients' specimens. Gac Med Mex; 153: 528-536.

Choi, M.J.;Won, E.J.; Shin, J.H.; Kim, S.H.; Lee, W.G.; Kim, M.N.; *et al*. (2016). Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. Antimicrob Agents Chemother; 60: 3653-3661.

Daminakos, H.; Kretschmer, N.; Katarzyna, S.B.; Pietrosiuk, A.; Bauer, R.; Chinou, L. (2012). Antimicrobial and Cytotoxic Isohexenyl naphthazarins from *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. (Boraginaceae) Callus and Cell Suspension Culture. Molecules; 17: 14310-14322.

DeOliveira, A.S.; Brighente, I.M.C.; Lund, R.G.; Llanes, L.C.; Nunes, R.J.; Bretanha, L.C.; *et al*. (2017). Antioxidant and Antifungal Activity of Naphthoquinones Dimeric Derived from Lawsone. J Biosci Med; 5: 39-48.

Errante, G.; Motta, G.L.; Lagana, C.; Wittebolle, V.; Sarciron, M-E.; Barret, R. (2006). Synthesis and evalution of antifungal activity of Naphthoquinone derivatives. Eur J Med Chem; 41:773-778.

Eruygur, N.; Yilmaz, G.; Analgesic, O.U. (2012). Antioxidant activity of some Echium species wildgrowing in Turkey. Fabad J Pharm Sci; 37(3): 151-159.

Eruygur, N.; Yılmaz, G.; Kutsal, O.; Yucel, G.; Ustün, O. (2016). Bioassay-guided isolation of wound healing active compounds from Echium species growing in Turkey. J Ethnopharmacol; 185: 370-37.

Eruygur, N. (2018). A Simple Isocratic High-perfomance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Shikonin Derivatives in Some Echium Species Growing Wild in Turkey. Turk J Pharm Sc*;* 15(1): 38-43.

Farahani, M. (2013). Antiviral Effect Assay of Aqueous Extract of Echium amoenum-L against HSV-1. Zahedan. J Res Med Sci; 15: 46-48.

Fayemiscott, O.; Osho, A. (2012). Comparison of Antimicrobial Effects of *Mezoneuron benthamianum*, *Heliotropium indicum* and *Flabellaria paniculata* on *Candida* species. J Med Microbiol; 2(1): 18-23.

Futuro, D.O.; Ferreira, P.G.; Nicoletti, C.D.; Borba-santos, L.P.; Dasilva, F.C.D.; Rozental, S.; *et al*. (2018). The Antifungal Activity of Naphthoquinones. Integrative Review. An Acad Bras Cienc; 90(2): 1187-214.

Gharib, A.; Godarzee, M. (2016). Determination of secondary metabolites and antioxidant activity of some Boraginaceae species growing in Iran. Trop J Pharm Res; 15(11): 2464.

Iosif, L.; Preoteasa, C.T.; Murariu-Maqurean, u.; Preoteasa, C.E. (2016). "Clinical study on thermography, as modern investigation method for Candida-associated denture stomatitis". Romanian Journal of Morphology and Embryology; 57(1): 191-195.

Kretschmer, N.; Rinner, B.; Deutsch, A.J.; Lohberger, B.; Knausz, H.; Kunert, O.; *et al*. (2012). Melanoma Cells. J Nat Prod; 75(5): 865-9.

Lucchetti, M.A.; Glauser, G.; Kilchenmann, V.; Dübecke, A.; Beckh, G.; Praz, C.; Kast, C. (2016). Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium vulgare* in Honey Originate Primarily from Floral Nectar. J Agric Food Chem; 64(25): 5267-73.

Malekpour, A.; Delnavaz, H.; Hashemlouian, B. (2015). Evaluation of the Antimicrobial Effects of the Alcoholic and Aqueous Extracts of Chenopodium Album and Chenopodium Botrys against Candida Albicans. Tabari J Prev Med; 1(3): 33-40.

Mengltoh, Y.; Dhanashree, B. (2017). Antifungal effect of cow urine distillate on Candida species. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine; 8: 233-237.

Mirrezaee, N.; Dakhili, M.; Mehrpour, S.h.; (2017). Effects of antifungal Rue on the candidaalbicans isolated from patients withvaginitis on in vitro during spring andwinter seasons and comparison with two antibiotics. Yafte; 19(2): 50-59. (in Persian)

Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M.; Akbarzadeh, M. (2006). Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential oil of *Echium italicum* L. Jeobp; 55(8): 999-1008.

Nabipour, F.; Dousti, B. (2017). The comparison of the antifungal effects of various extracts *Onosma Chlorotricum* on Candida albicans and Candida glaberata with two antibiotics fluconazole and nystatin. Yafte; 19(2): 75-84. (in Persian)

Nabipour, F.; Fazilati, M.; Dousti, B.; Mir derikvand, R. (2019). Evaluation of the antifungal effects of different extracts of aerial part and root of *Echium italicum* on Candida albicans and comparison them with two common antibiotics. Yafte; 21(2): 9-18. (in Persian)

Nayan, R.; Bholodia, V.J. (2011). Antibacterial and antifungal activities from leaf extract of *cassia fistula*. J Adv pharm Technol Res; 2(2): 104-109.

Nikita, G.; Vivek, P.; Chhaya, G. (2015). Wound-healing activity of an oligomer of alkannin/shikonin, isolated from root bark of *Onosma echioides*. Nat Prod Res; 37-41.

Okusa, P.N.; Penge, O.; Devleeschouwer, M.; Duez, P. (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gilletii* De Wild (*Boraginaceae*). J Ethnopharmacol; 112: 476-481.

Ozcan, T. (2013). Molecular(PAPDS and Fatty acid) and micro morphological variation of Echium italicum population from turkey. Plant systematics Evolution; 299(3): 631-641.

Parra-Sánchez, M.; Zakariya-Yousef, B.I.; Castro Méndez, C.; *et al*. (2017). Candida albicans Germ-Tube Antibody: Evaluation of a New Automatic Assay for Diagnosing Invasive Candidiasis in ICU Patients Mycopathologia; 182(7-8): 645-652.

Patterson, T. (2007). Treatment and Prevention of Fungal Infections. Focus on Candidemia. New York: Applied Clinical Education; 23: 7-80.

Sadri, A.; Khodavandi, A.; Alizadeh, F. (2016). Quorum-sensing quenching compounds Allium sativum, Allium hirtifolium and Allium cepa: the probable quorum- sensing quenching compounds against Candida albicans. Biosci Biotechnol Res Asia; 13: 1457-1468.

Sasaki, K.; Abe, H.; Yoshizaki, F. (2002). In vitro antifungal activity of Naphthaquinon derivatives. Bio Pharm Bull; 25(5): 669-670.

Shahat, A.A.; Mahmoud, E.A.; Al-Mishari, A.A.; Alsaid, M.S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Saudin Arabian Herbal Plants. Afr J Tradit Complement A ltern Med; 14(2):161-165

Shameem, N.; N.Kamli, A.; A.parray, J.;

Hamid, R.A.; Bandh, S. (2015). Antimicrobial and antioxidant activity of methanol extracts of Arnebia benthamii (Wall ex. G. Don) Johnston a critically endangered medicinal plant of North western Himalaya. Journal of Analytical Science and Technology; 6:36.

Shariatifar, N.; Ebadi Fathabad, A.; Madihi, S. (2016). Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of Echium amoenum on food-borne pathogens. J Food Safe & Hyg; 2(3-4): 63-66.

Soliman, S.M.; Semreen, M.H.; El-Keblaway, A.A.; Abdullah, A.; Uppuluri, P.; Ibrahim, A.S.; *et al*. (2017). Assesment of herbal drugs for promising anticandida activity. BMC Complem Altern M; 17:257.

Sousa, C.; Moita, E.; Valentão, P.; Fernandes, F.; Monteiro, P.; Andrade, P.B. (2015). Effects of colored and non-colored phenolics of *Echium plantagineum L*. bee pollen inCaco-2 cells under oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. J Agric Food Chem; 63: 2083-2091.

Zarghami Moghaddam, P.; Mazandarani, M.; Zolfaghari, M.R.; *et al*. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of root extract of *Onosma dichroanthum Boiss*. in north of Iran. African Journal of Microbiology Research; 6(8): 1776-1781.