



Investigation of Antimicrobial and Antifungal Activities of Regenerated Plantlets of the Medicinal Plant *Primula veris* L.

Farah Farahani^{1*}, Zahra Sabouri², Mohsen Zargar¹

¹Department of Biology, Institute of Quantum Science and Social Biology, Qo. C., Islamic Azad University, Qom, Iran

²Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University (East Tehran Branch), Tehran, Iran

Article Info

Article History:

Received 2025.10.27

Revised 2025.12.13

Accepted 2025.12.14

KeyWords:

antibacterial

antifungal

methanolic extract

alkaloid

primrose (*Primula veris*)

*Corresponding author:

E-mail address:

Fa.farahani@iau.ac.ir

Abstract

Introduction: The family Primulaceae includes the flowering plant *Primula veris* L., which is recognized as a medicinal plant due to its rich content of secondary metabolites. Seed germination of this species under greenhouse or field conditions is difficult. One alternative approach for obtaining medicinal raw materials is in vitro culture and plant regeneration.

Methods: Seeds of *P. veris* were collected from the Mahallat and Amol regions of Iran and cultured on hormone-free Murashige and Skoog (MS) medium. Dried powders of regenerated plantlets were used to prepare methanolic extracts from leaves and alkaloid extracts from roots. To evaluate antimicrobial activity, 24-hour cultures of bacterial and fungal strains were grown on Mueller–Hinton agar, and wells containing extracts at a concentration of 100 µL were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).

Results: The results showed that 30–35% of seeds from the Amol genotype germinated after 12–14 days, whereas 20–25% of seeds from the Mahallat genotype germinated after 3–4 days. In all treatments, plantlets were regenerated from seedlings. The methanolic leaf extract of the Amol genotype inhibited the growth of all tested microorganisms, while the Mahallat genotype produced inhibition zones against some microorganisms. Alkaloids extracted from the roots of the Amol genotype exhibited both antibacterial and antifungal activities. Compared with other plant extracts, the methanolic root extract of the Amol genotype showed the lowest MIC values and the highest antibacterial and antifungal activities.

Conclusion: : Given its rich chemical composition and diverse biological activities, *P. veris* has high potential for the development of herbal medicines and novel pharmaceutical products.

Cite this article: F Farahani, Z Sabouri, M Zargar. Investigation of Antimicrobial and Antifungal Activities of Regenerated Plantlets of the Medicinal Plant *Primula veris* L.. Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (2): 39-50



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by Islamic Azad University, Varamin.

This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X



بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قارچی گیاهچه‌های باززایی شده گیاه دارویی پامچال (*L. Primula veris*)

فرح فراهانی^۱، زهرا صبوری^۲، محسن زرگر^۱

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

^۲ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور (مرکز تهران شرق)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: خانواده پامچال (Primulaceae) شامل گیاه گلدار *Primula veris* L است که باوجود متابولیت‌های ثانویه بعنوان گیاه دارویی شناخته می‌شود. جوانه‌زنی بذرهای این گیاه در گلخانه یا مزرعه دشوار است. یکی از روش‌های جایگزین برای به‌دست آوردن مواد اولیه دارویی، کشت درون‌شیشه‌ای و باززایی گیاه است

مواد و روش‌ها: بذرهای *P. veris* از مناطق محلات و آمل ایران جمع‌آوری شدند و بر روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog) بدون هورمون قرار گرفتند. پودر خشک گیاهچه‌های باززایی شده برای تهیه عصاره متانولی (برگ) و آلكالوئیدها (ریشه) استفاده گردید. برای سنجش فعالیت ضد میکروبی، کشت ۲۴ ساعته سویه‌های باکتریایی و قارچی روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد و چاهک‌های حاوی عصاره با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر، جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که ۳۰ تا ۳۵ درصد از بذرهای ژنوتیپ آمل پس از ۱۲ تا ۱۴ روز و ۲۰ تا ۲۵ درصد از بذرهای ژنوتیپ محلات پس از ۳ تا ۴ روز جوانه زدند. در تمام تیمارها، گیاهچه‌ها از دانه رست‌ها باززایی شدند. عصاره متانولی برگ ژنوتیپ آمل توانست رشد کلبه میکرواورگانیزم‌ها را مهار کند و ژنوتیپ محلات بر ضد برخی میکرواورگانیزم‌ها هاله عدم رشد ایجاد کند. آلكالوئید استخراج‌شده از ریشه ژنوتیپ آمل دارای اثرات ضدباکتری و ضدقارچ بود. در مقایسه با سایر عصاره‌های گیاهی، عصاره متانولی ریشه ژنوتیپ آمل کمترین MIC و بیشترین فعالیت ضدباکتری و ضدقارچی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ترکیب شیمیایی غنی و فعالیت‌های زیستی متنوع، گونه *P. veris* می‌تواند پتانسیل بالایی برای توسعه داروهای گیاهی و فرآورده‌های دارویی نوین داشته باشد

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۸/۰۵

بازنگری ۱۴۰۴/۰۹/۲۲

پذیرش ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

کلمات کلیدی

آنتی باکترال

ضدقارچ

عصاره متانولی

آلكالوئید

پامچال

* مسئول مکاتبات:

Fa.farahani@iau.ac.ir

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ف. فراهانی، ز. صبوری، م. زرگر. بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قارچی گیاهچه‌های باززایی شده گیاه دارویی پامچال (*L. Primula veris*). مجله دانش زیستی ایران. ۲۰:۱۴۰۴ (۲): ۵۰-۳۹



مقدمه

گیاه پامچال (*Primula veris* L) از گونه‌های شناخته‌شده جنس *Primula* و خانواده پامچالیان (*Primulaceae*) است که به دلیل ارزش‌های دارویی و زینتی، اهمیت ویژه‌ای دارد. این گونه دارای دامنه پراکنش جغرافیایی گسترده‌ای بوده و به‌طور طبیعی در بیشتر کشورهای اروپایی، نواحی مرکزی و جنوب شرقی روسیه، شبه جزیره کریمه، رشته کوه اورال، قفقاز، ترکیه، ایران و کوه‌های آلتای رویش دارد. گستره پراکنش آن از سراسر سیبری تا منطقه آمور و شمال منچوری امتداد می‌یابد (۱، ۲). این گیاه علفی چندساله و کوتاه قامت معمولاً در مناطق نیمه سایه، چمنزارها و حاشیه جنگل‌ها رشد می‌کند. در یک قرن گذشته، جمعیت‌های طبیعی آن به دلیل تخریب زیستگاه، توسعه کشاورزی و برداشت بی‌رویه به‌ویژه در فصل گلدهی کاهش یافته است. گل‌های آن در فصل بهار به‌طور گسترده برداشت و در صنایع دارویی و غذایی به‌کار می‌روند (۳، ۴). اندام‌های زیرزمینی این گیاه شامل ریشه‌ها و ریزوم‌ها حاوی حدود ۱۰٪ ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی به‌ویژه پرایمولا ساپونین A (پرایمولا اسید) و پرایمولا ساپونین B هستند. همچنین، گلوکوزیدهای فنولی از جمله پرایمولا وروزید و ریوروزید در این گیاه شناسایی شده‌اند (۵). تاکنون ده فلاون لیپوفیلیک از کشت‌های درشیشه (*In vitro*) گیاه *P. veris* (۶)، دو گلوکوزید فلاونوئیدی جدید از نمونه‌های ایتالیایی این جنس (۷) و مقادیر قابل توجهی متابولیت‌های آلکانی بلندزنجیر گزارش شده است (۸).

از نظر تاریخی، پامچال در پزشکی سنتی عربی، فارسی و اروپایی برای درمان نفرس و بیماری‌های ریوی استفاده شده است (۹). در طب سنتی، ترکیب آویشن و گل پامچال به دلیل وجود پریمولین با خواص ضدویروسی، در درمان برونشیت حاد کاربرد داشته است (۱۰ و ۱۱). همچنین در یونان باستان برای درمان مارگزیدگی از آن استفاده می‌کردند (۱۲).

عصاره‌های گل *P. veris* غنی از گلوکوزیدهای فنولی و ساپونین‌ها هستند و مطالعات فارماکولوژیک خواص ضدآسم، ضدالتهاب، ضدویروس، آنتی‌اکسیدان، مهارکننده آنزیم‌ها، پیش‌ساز ترکیبات سمی و تنظیم‌کننده فرآیندهای متابولیکی در پستانداران را برای آن‌ها گزارش کرده‌اند (۱۳-۱۹).

عصاره‌های *P. macrophylla* در حلال‌های مختلف

فعالیت‌های ضدقارچی و سمیت علیه برخی باکتری‌ها نشان داده‌اند (۱۷). عصاره‌های گونه *P. veris* نیز اثر مهاری علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌هایی مانند *S. pneumoniae*، *S. epidermidis* و *Candida parapsilosis* داشته‌اند (۲۰ و ۲۱). همچنین، عصاره متانولی و آبی برخی گونه‌ها توانایی مهار رشد *E. coli* و *P. aeruginosa* را نشان داده‌اند (۴). خواص ضدباکتریایی عصاره متانولی گل‌های *P. auriculata* نیز گزارش شده است (۲۲-۲۵). Skopinska و همکاران (۲۰۱۰) اثرات مفید و عوارض احتمالی مصرف خوراکی اسانس *Evening Primrose* را بر سلول‌های سیستم ایمنی بررسی کردند (۳۶). ترکیب پی-سایمن (p-Cymene) به‌عنوان جزء اصلی اسانس بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی از جمله پامچال، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد درد، ضد اضطراب، ضد سرطانی و ضد میکروبی دارد (۲۷). حدود صد ترکیب طبیعی با منشأ باکتری‌ها، جلبک‌ها، قارچ‌ها، اسفنج‌ها و گیاهان از جمله پامچال دارای فعالیت‌های ضدقارچی هستند که از نظر ساختاری شامل پلی‌کتیدها، متابولیت‌های مسیر شیکیمات، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و پپتیدها می‌شوند (۲۸-۳۳).

پامچال ایرانی (*P. heterochroma*) گیاهی کمیاب و بومی شمال ایران است. Noroozi Sharaf و همکاران (۲۰۱۱) پروتکل کارآمد تکثیر این گیاه به روش کشت نوک شاخه‌ها را ارائه کردند (۳۴). سرده *Primula* بزرگ‌ترین جنس خانواده *Primulaceae* بوده و به‌دلیل محدودیت‌هایی مانند جوانه‌زنی نامنظم یا کم، روش‌های فناوری کشت بافت برای اصلاح نژاد، گسترش تنوع ژنتیکی، انتقال ژن و حفاظت منابع ژنتیکی به‌کار می‌رود (۳۵).

با توجه به ارزش دارویی *P. veris* و نقش متابولیت‌های ثانویه آن در ایجاد فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی، و همچنین محدودیت برداشت از رویشگاه‌های طبیعی، استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای به‌عنوان رویکردی پایدار و کنترل‌شده اهمیت ویژه دارد. هدف اصلی پژوهش حاضر بررسی و تعیین فعالیت‌های ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف گیاهچه‌های *P. veris* حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

جوانه‌زنی بذر و باززایی گیاهچه

بذرهای *Primula veris* مربوط به ژنوتیپ‌های شهرستان محلات (استان مرکزی) و شهرستان آمل (استان مازندران) جمع‌آوری شدند. بذرهای ابتدا به مدت هفت تا ده روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تحت تیمار سرمادهی قرار گرفتند و سپس برای چهل و هشت ساعت در آب و دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد خیس‌انده شدند تا فرآیند آبیگری کامل شود. برای ضدعفونی بذرهای مجموعه‌های صد عددی بذر از هر ژنوتیپ ابتدا به مدت سی ثانیه در محلول هفتاد درصد اتانول و سپس به مدت بیست و پنج تا سی دقیقه در صد میلی‌لیتر محلول تجاری آب ژاول با غلظت سی درصد قرار گرفتند. پس از شست‌وشوی مکرر با آب مقطر استریل، بذرهای روی محیط جامد 35 (MS) بدون هورمون کشت داده شدند تا جوانه‌زنی کامل شود

قطعات انتهایی ساقه به طول تقریبی سه میلی‌متر از دانه رست‌های استریل چهار هفته‌ای ژنوتیپ‌های محلات و آمل به‌عنوان جداکشت اولیه انتخاب و بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون 2.5 BAP میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. گیاهچه‌های متعدد حاصل از هر جداکشت تفکیک شده را به مدت چهار تا پنج هفته روی همان محیط کشت، مجدداً واکشت نمودند

تهیه عصاره متانولی و آلکالوئیدها از گیاهچه‌های باززایی شده

اندام‌های هوایی و ریشه‌های به‌دست‌آمده از گیاهچه‌های باززایی‌شده ژنوتیپ‌های محلات و آمل با دقت برداشت، شست‌شو و در محل سایه و دمای محیط خشک شدند. اندام‌های گیاهی خشک‌شده با استفاده از آسیاب پودر شده و نمونه‌های پودر برگ و ریشه به‌طور جداگانه در ظروف دربسته نگهداری شدند. اندام‌های گیاهچه‌های باززایی‌شده را در ارلن مایر ریخته و به آن متانول (نسبت معمول ۱:۱۰، یعنی برای ۵۰ گرم پودر حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول) اضافه کنید. ارلن را روی شیکر قرار دهید و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق با سرعت مناسب تکان دهید تا مواد مؤثره در متانول حل شوند. محلول حاصل را از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف کنید تا ذرات جامد جدا شوند. در صورت نیاز، می‌توان فرآیند استخراج را ۲ تا ۳ بار تکرار

کرد و محلول‌های صاف‌شده را با هم ترکیب نمود. عصاره صاف‌شده را در دستگاه روتاری اواپراتور در دمای حدود ۴۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد تحت فشار کاهش‌یافته تبخیر کنید تا متانول جدا شود و عصاره غلیظ باقی بماند. عصاره‌های متانولی با غلظت‌های متفاوت را در ویال شیشه‌ای در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری کنید تا برای آزمون‌های بعدی (مثل آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و...) آماده باشد (۳۷). غلظت محلول مادر عصاره با فرمول 1 تعیین شده است

فرمول ۱:

غلظت عصاره = وزن عصاره (میلی گرم) / حجم حلال (میلی لیتر)

غلظت محلول مادر عصاره = 50 mg/mL

پس از استخراج عصاره متانولی اندام هوایی گیاهچه‌های باززایی‌شده، مقدار ۵ گرم عصاره خشک به‌دست آمد که با حل کردن آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال، غلظت محلول مادر 50 mg/mL محاسبه شد. بازده استخراج نسبت به پودر اولیه (۵۰ گرم) برابر ۱۰٪ بود.

روش استخراج آلکالوئید از نمونه‌های پودر شده مطابق با پروتکل Adebayo و Ishola (۲۰۰۹) انجام شد (۳۸). به این صورت که یک دهم گرم از پودر برگ و ساقه گیاهچه‌های باززایی‌شده در ده میلی‌لیتر متانول در ارلن پنجاه میلی‌لیتری قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و با دور rpm 150 تکان داده شدند. سپس عصاره با پارچه تنظیف صاف و به مدت 7 دقیقه با سرعت rpm 4400 سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل جمع‌آوری و رسوب حذف گردید. این فرآیند سه بار تکرار شد. استخراج آلکالوئید از ریشه گیاهچه‌های باززایی‌شده بر اساس روش Djiliani و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت (۳۹). برای انجام فرآیند عصاره‌گیری، از دستگاه سوکسله شیشه‌ای ساخته‌شده از بروسلیکات، شامل بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری، محفظه استخراج استاندارد و کندانسور ریفلاکس با جریان آب سرد استفاده شد. برای این منظور، ۱۰ گرم پودر ریشه با ۱۵۰ میلی‌لیتر آمونیوم هیدروکسید (۲۵٪ وزنی) خیس و سپس با ۳۰۰ میلی‌لیتر استات اتیل در دمای محیط به مدت ۷۲ ساعت استخراج شد. عصاره صاف‌شده تحت خلأ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سوکسله تغلیظ گردید. رسوب حاصل را در آب حل کرده و با اسیدسولفوریک تا pH ۴-۳ اسیدی شد. برای حذف اجزای باز دوست، اسیدی و خنثی، نمونه با حلال اترنفت و دی‌اتیل‌اتر استخراج گردید

سپس با محلول سود (۲۵٪ وزنی) تا pH حدود ۹-۱۰ قلیایی و با کلروفرم استخراج شد. عصاره کلروفرمی با آب مقطر شسته شد تا pH خنثی حاصل شود، سپس با محلول سولفات سدیم خشک و تحت خلأ تا رسیدن به آلکالوئید خام تبخیر شد

درصد آلکالوئید و غلظت محلول آلکالوئید به ترتیب با فرمول های ۲ و ۳ تعیین شده است

فرمول ۲:

تعیین درصد آلکالوئید کل = وزن آلکالوئید (میلی گرم) / وزن پودر اولیه (گرم)

درصد آلکالوئید کل ۰٫۱ درصد

فرمول ۳: غلظت محلول آلکالوئید = مقدار آلکالوئید (میلی گرم) / مقدار حلال (میلی لیتر)

مقدار آلکالوئید کل جدا شده ۵۰ میلی گرم بود که معادل ۰٫۱٪ وزن خشک نمونه است. محلول آلکالوئید تهیه شده در حجم ۱۰۰ میلی لیتر، دارای غلظت 0.5mg/mL می باشد و برای آزمون های زیستی مورد استفاده قرار گرفت

آزمون فعالیت ضد میکروبی

برای آزمون ضدباکتریایی و ضدقارچی به ترتیب از دیسک های استاندارد کلرامفنیکل و وریکونازول استفاده شد. آزمون ها بر روی سویه های استاندارد انجام شد (۴۰). سویه های مرجع شامل باکتری های گرم منفی، گرم مثبت و پاتوژن های قارچی بودند سویه های استاندارد باکتریایی و قارچی طبق جدول ۱ از مجموعه American Type Culture Collection (ATCC) تهیه شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها با روش انتشار دیسک بر روی محیط مولر-هینتون آگار و مطابق دستورالعمل های استاندارد انستیتو CLSI تعیین شد. قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری و مقاومت، حساسیت یا حدواسط بودن هر سویه بر اساس جداول CLSI طبقه بندی شد. سویه های باکتریایی و قارچی مطابق روش Cheesbrough (2006) بر روی محیط مولر-هینتون آگار کشت داده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، از کلونی های خالص برای تهیه تعلیق استفاده شد. تعلیق میکروبی در سالین استریل یا محیط مایع مناسب تهیه و کدورت آن با استاندارد 0.5 مک فارلند تنظیم گردید (8×10^8 CFU/mL). از این تعلیق برای تلقیح سطحی پلیت ها استفاده شد (۴۱). محلول مادر عصاره متانولی با غلظت 50mg/mL تهیه شد و محلول مادر آلکالوئید

با غلظت 0.5mg/mL آماده گردید. رقت های مورد آزمون به صورت خالص (stock) و رقت های ۱/۱، ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ (غلظت عصاره متانولی و مقدار ماده موجود در هر چاهک) تهیه شدند. هر چاهک با حجم ۵۰ μ L پر گردید. بنابراین مقدار ماده ای که در هر چاهک اعمال می شود به صورت زیر است:

مقدار حجم عصاره متانولی مورد استفاده در هر چاهک به ترتیب ۰٫۵، ۰٫۰۵ و ۰٫۰۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر که دارای مقادیر ۰٫۲۵، ۰٫۰۲۵ و ۰٫۰۰۲۵ میلی گرم ماده مورد نظر در محلول عصاره بوده است.

مقدار آلکالوئید ۰٫۲۵، ۰٫۰۲۵ و ۰٫۰۰۲۵ میکروگرم ماده در چاهک است. پس از قرار دادن ۵۰ μ L نمونه در هر چاهک، پلیت ها به صورت ایستاده به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شدند و قطر هاله عدم رشد (mm) اندازه گیری شد. به عنوان کنترل مثبت و برای مقایسه، از دیسک های آنتی بیوتیک استاندارد تجاری مطابق دستورالعمل های CLSI استفاده شد. نمونه هایی از این دیسک ها عبارت بودند از: آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم) و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم). دیسک ها روی ظروف کشت مولر هینتون آگار تلقیح شده قرار داده شدند و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت، قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری شد تا حساسیت سویه های مورد آزمایش به آنتی بیوتیک ها تعیین گردد. قطر هاله عدم رشد بدون قطر چاهک ها محاسبه گردید

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)

برای نمونه هایی که در مرحله غربالگری اولیه فعالیت ضد میکروبی نشان دادند، حداقل غلظت مهارکننده (MIC) با استفاده از روش چاهک آگار (agar well diffusion) تعیین شد. برای این منظور، رقت های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره تهیه شد. این رقت ها با حل کردن به ترتیب ۰٫۰۰۱، ۰٫۰۰۱ و ۰٫۰۱ گرم عصاره در ۱ میلی لیتر آب مقطر به دست آمدند. محیط کشت مولر هینتون آگار با سویه های باکتری تلقیح شدند و هر چاهک با ۵۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره پر شد. ظروف کشت به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند تا عصاره ها به محیط کشت نفوذ کنند، سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. کمترین غلظتی که رشد باکتری را به طور واضح مهار کرد به عنوان MIC ثبت شد

هدف تعیین MIC اولیه و تخمینی عصاره های مورد استفاده بود، پس از شناسایی عصاره های فعال، در مطالعات بعدی می‌توان از رقت‌های دوبرابر (two-fold serial dilutions) برای تعیین دقیق MIC استفاده کرد. سویه‌های باکتریایی و قارچی به صورت تعلیق میکروبی آماده شدند و کدورت آن‌ها با استاندارد ۰.۵ مک فارلند تنظیم گردید، که معادل تقریباً 10^8 CFU/mL است. این تراکم سلولی یکنواخت تضمین می‌کند که جمعیت کافی و یکسان میکروبی روی ظروف کشت مولر هینتون آگار برای آزمون چاهک فراهم شده است (۴۲)

آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد به عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی گزارش شد. از طرفی عصاره‌های گیاهی ترکیبی از مواد مختلف هستند که ممکن است در محیط مایع به خوبی حل نشوند یا با محیط واکنش دهند. روش چاهک آگار امکان انتشار بهتر ترکیبات تقریباً غیرقطبی و قطبی در آگار و مشاهده واضح هاله مهار را فراهم می‌کند. بنابراین برای ارزیابی اولیه مناسب‌تر است. در آزمایش‌ها رقت‌های mg/mL 10، 100 و 1000 بر اساس نتایج غربالگری اولیه و تخمین حدود غلظت مؤثر انتخاب شدند تا احتمال مشاهده MIC در محدوده آزمایش افزایش یابد.

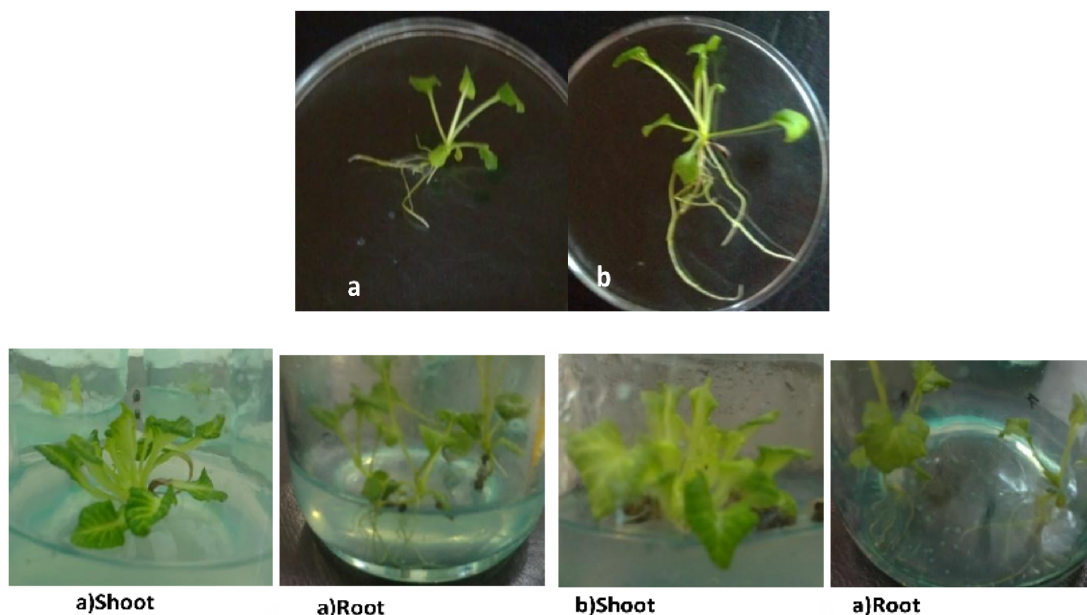
جدول ۱. میکرواورگانیزم های باکتری ها و قارچ مورد آزمایش

نوع	میکرواورگانیزم
باکتری های گرم مثبت	<i>Bacillus subtilize</i> (ATCC 233857) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
باکتری های گرم منفی	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>Klebsiella pneumonia</i> (ATCC 13883)
قارچ	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)

نتایج

فرآیند جوانه‌زنی را به طور مؤثر تحریک کند، اگرچه سرعت و درصد جوانه‌زنی همچنان به ویژگی‌های ژنوتیپی وابسته است. در این پژوهش، به منظور ارزیابی توان ضد میکروبی گونه *Primula veris*، تیمارها شامل: ژنوتیپ‌های (محلات و آمل)، عصاره (متانولی) برگ، آلکالوئید و اندام گیاهی (برگ و ریشه) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های ضد میکروبی نشان داد که عصاره متانولی برگ ژنوتیپ آمل دارای بالاترین فعالیت مهار در برابر طیف وسیعی از میکرواورگانیزم‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ است. این عصاره توانست به طور قابل توجهی رشد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و قارچ *Candida albicans* را مهار کند. بیشترین دامنه مهار مربوط به عصاره متانولی بود؛ به طوری که بزرگترین قطر هاله عدم رشد *C. albicans* (۱۲ میلی‌متر) مشاهده شد

برای شکستن خواب بذرهای *Primula veris*، آنها به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار سرمادهی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذرهای تحت تأثیر ژنوتیپ و محل جمع‌آوری قرار دارد. در استان مازندران، ۳۰ تا ۳۵ درصد از بذرهای ژنوتیپ آمل (*P. veris*) پس از ۱۲ تا ۱۴ روز کشت روی محیط MS فاقد هورمون جوانه زدند، در حالی که ۲۰ تا ۲۵ درصد از بذرهای ژنوتیپ محلات از استان مرکزی، جوانه‌زنی خود را در مدت کوتاه‌تر، یعنی ۳ تا ۴ روز پس از کشت آغاز کردند (شکل‌های ۱a و ۱b). این یافته‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در پاسخ جوانه‌زنی میان ژنوتیپ‌های مختلف است. تأخیر در شروع جوانه‌زنی برای ژنوتیپ آمل حدود ۱۴ روز و برای ژنوتیپ محلات حدود ۴ روز ثبت شد. این تفاوت‌ها احتمالاً ناشی از اختلافات ژنتیکی بین جمعیت‌ها، شدت خواب بذر و نیازهای محیطی خاص هر ژنوتیپ است. همچنین داده‌ها بیانگر آن است که تیمار سرمادهی می‌تواند



شکل ۱. دانه رست حاصل از جوانه زنی دانه بر روی محیط کشت MS بدون هورمون (a) ژنوتیپ آمل (b) ژنوتیپ محلات، باززایی ساقه و ریشه پامچال (ژنوتیپ های آمل و محلات) پس از ۴ هفته کشت بر روی محیط کشت MS.

گونه باکتری گرم منفی مورد آزمایش به‌طور قابل‌توجهی کمتر بود

حداقل غلظت مهارکننده (MIC) عصاره‌ها

حداقل غلظت مهارکننده (MIC) برای یک عصاره به‌عنوان کمترین غلظتی تعریف شد که قادر به توقف کامل رشد باکتری باشد. نتایج نشان داد که مقادیر به‌دست‌آمده در غلظت ۰/۰۰۱ به دلیل رقت بسیار زیاد عصاره در این پژوهش، برآورد شده است.

بر اساس داده‌های جدول ۲، مقادیر MIC عصاره‌ها در محدوده ۱۰:۱ (۱۰-۲) تا ۱۰۰۰:۱ (۱۰-۴) متغیر بودند. به‌طور خاص، عصاره‌های متانولی ریشه ژنوتیپ آمل دارای مقادیر MIC برابر با ۱۰۰:۱ (۱۰-۳) و ۱۰۰۰:۱ (۱۰-۴) بودند و علیه *K. pneumonia* (قطر هاله‌های عدم رشد ۶ و ۸ میلی‌متر بدون محاسبه قطر چاهک) و *C. albicans* (قطر هاله‌های عدم رشد ۱۱ و ۱۲ میلی‌متر) فعالیت مهاری نشان دادند

این یافته‌ها نشان می‌دهند که قدرت مهاری عصاره‌ها علاوه بر نوع ژنوتیپ، به غلظت و میزان رقت نیز وابسته است و رقت‌های بسیار بالا می‌توانند باعث کاهش دقت در برآورد واقعی MIC شوند

در مقابل، عصاره متانولی برگ ژنوتیپ محلات فعالیت مهاری ضعیف‌تری نشان داد و تنها در برابر برخی از باکتری‌ها اثرگذار بود؛ به‌طوری که قطر هاله‌های عدم رشد برای *K. pneumoniae* و *B. subtilis*، *P. aeruginosa* به‌ترتیب ۱۲، ۷ و ۱۰ میلی‌متر ثبت گردید. هیچ‌گونه فعالیت مهاری در برابر سایر میکروارگانیسم‌های آزمون‌شده در این ژنوتیپ گیاهان مشاهده نشد

فعالیت ضد میکروبی آلکالوئید استخراج‌شده از ریشه ژنوتیپ آمل (*Primula veris*)

آلکالوئید استخراج‌شده از ریشه ژنوتیپ آمل (*P. veris*) بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در میان تمامی عصاره‌های مورد بررسی نشان داد. این ترکیب توانست قطر هاله عدم رشد قابل‌توجهی را علیه باکتری‌های *Escherichia coli* (۳۶ میلی‌متر)، *Pseudomonas aeruginosa* (۳۰ میلی‌متر)، *Klebsiella pneumoniae* (۲۶ میلی‌متر) و قارچ *Candida albicans* (۲۶ میلی‌متر) ایجاد کند. آزمایش‌های ضدباکتریایی همچنین نشان داد که هر دو فرم ژنوتیپ و عصاره ریشه به‌طور ویژه علیه باکتری‌های گرم‌مثبت، به‌ویژه *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* فعال بودند. در مقابل، فعالیت مهاری علیه چهار

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی ریشه پامچال (ژنوتیپ آمل و ژنوتیپ محلات) بر روی میکرواورگانیزم ها

(حداقل غلظت بازدارندگی : MIC)							
بر حسب غلظت ها (mgml ⁻¹)							
	1: 1000 (10 ⁻⁴)		1: 100 (10 ⁻³)		1: 10 (10 ⁻²)		
میکرواورگانیزم	ژنوتیپ	ژنوتیپ	ژنوتیپ	ژنوتیپ	ژنوتیپ	ژنوتیپ	آنتی بیوتیک
	آمل	محلات	آمل	محلات	آمل	محلات	(کنترل)
<i>B. subtilis</i>	3	0	4	12	6	8	35
<i>S. aureus</i>	7	0	5	0	5	6	23
<i>E. coli</i>	5	0	7	0	3	0	22
<i>P. aeruginosa</i>	4	0	7	7	7	0	10
<i>K. pneumonia</i>	8	0	6	10	6	0	31
<i>C. albicans</i>	12	0	11	0	12	0	37

در مقایسه اثر آنتی بیوتیک ها با عصاره ها مشخص شد در همه موارد، آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و تتراسیکلین (کنترل) بیشترین هاله عدم رشد را ایجاد کرده‌اند. بزرگترین هاله مهار در کنترل‌ها مربوط به *Klebsiella pneumoniae* (قطر ۳۷ میلی‌متر) و *B. subtilis* (قطر ۳۵ میلی‌متر) بود. در مقابل، کمترین قطر هاله مهار در کنترل مربوط به *E. coli* (۱۰ میلی‌متر) و *S. aureus* (۲۳ میلی‌متر) است.

ژنوتیپ محلات در بیشتر موارد هاله مهار بزرگتری نسبت به ژنوتیپ آمل ایجاد کرده است. به عنوان مثال، در *B. subtilis* در غلظت ۱:۱۰، ژنوتیپ محلات هاله عدم رشد ۸ میلی‌متر و ژنوتیپ آمل ۶ میلی‌متر ایجاد کردند. در بعضی موارد مثل *S. aureus* و *E. coli*، تفاوت زیاد نیست ولی باز هم محلات کمی بهتر عمل کرده. بیشترین حساسیت به عصاره‌ها: *B. subtilis* و *K. pneumoniae* در غلظت‌های بالاتر و کمترین حساسیت: *S. aureus* و *E. coli* که حتی در غلظت‌های بالاتر هم قطر هاله کمی دارند *P. aeruginosa* هم مقاومت نسبتاً زیادی نشان داده، ولی در غلظت بالا کمی اثر مهاری دیده شده است

عصاره متانولی به دست آمده از ژنوتیپ آمل بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان دادند. نتایج آزمون محیط مایع (broth assay) با یافته‌های آزمون چاهک آگار همخوانی داشت و هر دو روش نشان دادند که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌ها حساس‌تر و باکتری‌های گرم منفی به طور قابل توجهی مقاوم‌تر هستند. در میان باکتری‌های گرم مثبت، سویه *Bacillus subtilis* حساسیت بیشتری به عصاره متانولی داشت، در حالی که *Staphylococcus aureus* مقاومت نسبی بیشتری از خود نشان داد

در آزمون محیط مایع، عصاره متانولی، صرف نظر از غلظت مورد استفاده در استخراج، اثر مهاری قابل توجهی بر رشد باکتری‌ها داشتند و مقادیر MIC آن‌ها در محدوده ۵ تا ۰.۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر متغیر بود. برای باکتری‌های گرم منفی، مقادیر MIC مشابه مقادیر متانول خالص به دست آمد که نشان می‌دهد اثر مهاری مشاهده شده در برابر این باکتری‌ها احتمالاً بیشتر ناشی از حلال متانول بوده است. با این حال، متانول خالص به تنهایی فعالیت مهاری علیه تمام باکتری‌ها نشان نداد

بحث

۱۰۰٪) علیه سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی فعال بودند و افزایش غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد را به صورت وابسته به دوز افزایش داد (۲۵) در برخی مطالعات، تمام عصاره‌های آزمایش شده (آبی، متانولی و دی‌اتیل‌اتری) فعالیت بالاتری علیه بیوفیلیم باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت داشتند (۴۷). Thuwaini (۲۰۲۳) مکانیسم‌های متعددی را برای اثرات ضدباکتریایی گیاهان دارویی معرفی کرد، از جمله مهار سنتز دیواره سلولی، جلوگیری از تشکیل غشای سلولی، تخریب غشای سیتوپلاسمی، مهار سنتز پروتئین‌ها و اسیدهای

عصاره‌های گیاهی که حاوی مقادیر بالای ترکیبات فعال با دامنه وسیع فعالیت مهاری هستند، در درمان بیماری‌های عفونی کاربرد گسترده دارند (۲۰ و ۴۳ و ۴۴). در برخی مطالعات، عصاره خام بخش‌های هوایی *Primula longipes*، مقدار MIC پایینی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده است (۴۵)، هرچند نتایج حاضر با آن متفاوت بود. عصاره برگ و گل *Primula vulgaris* Huds. subsp. *Sibthorpii* علیه *Mycobacterium tuberculosis* مؤثر بوده و ۴۱٪ مهار رشد این باکتری را نشان داده است (۴۶). Lodhia (۲۰۰۹) گزارش کرد که تمامی غلظت‌های اسانس گل‌ها (از ۱۰٪ تا

نوکلئیک، اختلال در فرآیندهای انرژی و مهار فعالیت سموم باکتریایی هستند (۴۹)

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های گیاهی انتخاب شده پس از فرآیند فیلتراسیون، فعالیت ضد *Candida* دارند (۵۰). Erzsébet و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که عصاره اتانولی ریشه *P. veris* قوی‌ترین اثر مهاری را نشان داد، در حالی که عصاره برگ اثر کمتری داشت (۵۱). Alo و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که عصاره‌های متانولی *P. veris* فعالیت ضدباکتریایی قوی علیه *E. coli* دارند که حتی از برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج بیشتر است (۵۲). یافته‌های حاضر با گزارش Oliver و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی دارد که ترکیبات فنولی برگ‌های فندق را آنتی‌اکسیدان و ضدباکتری معرفی کردند (۵۳). Khan و همکاران (۲۰۲۲) نیز تأیید کردند که عصاره‌های مختلف *Primula* اثرات ضدباکتریایی قوی علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی دارند و MIC بسیار پایینی علیه *Bacillus cereus* 0.0625 mg/ml نشان داده‌اند (۵۴). این تفاوت در حساسیت میکروارگانیسم‌ها احتمالاً ناشی از ساختار متفاوت دیواره و غشای سلولی آن‌هاست. باکتری‌های گرم‌منفی دارای لایه خارجی لیپیدی ساکاریدی هستند که به‌عنوان سد نفوذی عمل کرده و مانع ورود بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی می‌شود، در حالی که باکتری‌های گرم‌مثبت فاقد این لایه بوده و نفوذپذیری بیشتری نسبت به ترکیبات فعال دارند

در مطالعه حاضر یافته‌ها نشان می‌دهند که ترکیب‌های فعال زیستی در اندام‌های مختلف گیاه و همچنین تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در فعالیت‌های ضد میکروبی دارند. به نظر می‌رسد برگ گیاه *P. veris*، به‌ویژه ژنوتیپ آمل، دارای ترکیبات متابولیتی ثانویه‌ای است که می‌تواند به‌عنوان منبع بالقوه برای توسعه عوامل ضد میکروبی طبیعی مورد توجه قرار گیرد. این امر اهمیت بررسی دقیق‌تر ترکیبات شیمیایی و شناسایی مولکول‌های فعال در مطالعات آینده را برجسته می‌سازد همچنین نتایج حاصل از آزمون‌های تکمیلی، شامل آزمون

چاهک آگار، تأیید کرد که عصاره متانولی ریشه ژنوتیپ آمل دارای فعالیت ضدباکتریایی بالایی است. در میان تمامی عصاره‌های مورد مطالعه، آلکالوئید ریشه بالاترین قدرت مهاری را نشان داد و در بالاترین سطح کارایی قرار گرفت. این یافته‌ها نشان می‌دهند که ریشه *P. veris*، به‌ویژه ژنوتیپ آمل، منبع بالقوه‌ای از ترکیبات زیست‌فعال با اثرات قوی علیه پاتوژن‌های مهم انسانی، به‌ویژه گونه‌های گرم‌مثبت و برخی قارچ‌ها، است. علاوه بر این، نتایج حاکی از آن است که آلکالوئیدهای ریشه می‌توانند به‌عنوان الگوهایی برای توسعه داروهای ضدباکتری و ضدقارچ طبیعی مورد استفاده قرار گیرند و اهمیت مطالعه ترکیبات شیمیایی فعال در اندام‌های مختلف گیاه برای کشف داروهای جدید را برجسته می‌کند

با مشاهده اثر غلظت عصاره‌های گیاهان با ژنوتیپ‌های (محلات و آمل) بر باکتری‌ها نتیجه گرفته شد، با کاهش غلظت عصاره‌ها، قطر هاله عدم مهار بطور کلی کاهش یافته و در بسیاری از موارد به صفر رسیده، که نشان می‌دهد اثر مهاری وابسته به غلظت است. غلظت ۰.۵ میلی گرم بر میلی لیتر رشد بیشترین اثر را در بین عصاره‌ها داشته و به‌خصوص در ژنوتیپ محلات نسبت به آمل قوی‌تر بود. در غلظت ۰.۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر، تقریباً هیچ اثر مهاری مشاهده نشده (بیشتر داده‌ها صفر هستند). همچنین نتایج نشان داد عصاره متانولی ریشه *P. veris* دارای خاصیت ضدباکتریایی قوی علیه تمامی میکروارگانیسم‌های آزمایش شده است. آلکالوئیدهای موجود در این عصاره فعالیت مهاری بسیار بالایی علیه هر چهار گونه باکتری گرم‌مثبت و نیز قارچ‌های مورد بررسی در بخش‌های مختلف گیاه نشان دادند. در مقابل، فعالیت ضدباکتریایی سایر عصاره‌های گیاه به میزان و نوع حلال مورد استفاده در فرآیند استخراج وابسته بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که قدرت مهاری عصاره‌ها علاوه بر نوع ژنوتیپ، به غلظت و میزان رقت نیز وابسته است و رقت‌های بسیار بالا می‌توانند باعث کاهش دقت در برآورد واقعی MIC شوند

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌های برگ و ریشه *P. veris* فعالیت ضد میکروبی متفاوتی دارند و میزان حساسیت و مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر آن‌ها متغیر است. اثر عصاره‌ها کاملاً به غلظت وابسته است. ژنوتیپ محلات معمولاً عملکرد بهتری نسبت به ژنوتیپ آمل دارد. باکتری‌های گرم مثبت

این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌های برگ و ریشه *P. veris* فعالیت ضد میکروبی متفاوتی دارند و میزان حساسیت و مقاومت میکروارگانیسم‌ها در برابر آن‌ها متغیر است. اثر عصاره‌ها کاملاً به غلظت وابسته است. ژنوتیپ محلات معمولاً عملکرد بهتری نسبت به ژنوتیپ آمل دارد. باکتری‌های گرم مثبت

با نقش محافظت‌کننده از سلامت انسان باشد و به تحقیقات مرتبط با عفونت‌ها و بیماری‌های باکتریایی کمک کند.

نتایج این تحقیق پتانسیل *P. veris* را برای مهار سویه‌های پاتوژن مختلف تأیید می‌کند و این گیاه می‌تواند منبعی برای توسعه داروها یا ترکیبات ضدباکتریایی جدید

تقدیر و تشکر

نویسندگان از ریاست و پرسنل پژوهشکده مهندسی بافت و پزشکی بازساختی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی تشکر می‌نمایند.

در دسترس بودن

داده‌های به‌کاررفته در این پژوهش در حال حاضر به‌صورت عمومی در دسترس نیستند، اما در صورت درخواست معقول، از طریق نویسنده مسئول قابل دریافت می‌باشند

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع شخصی یا سازمانی در انجام این پژوهش وجود ندارد.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از سوی نهادهای دولتی، خصوصی یا دانشگاهی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی مطالعه و نظارت و هدایت پژوهش توسط نویسنده مسئول انجام شده و سایر نویسندگان در جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز نتایج و بازبینی نهایی مقاله مشارکت داشته‌اند

References

1. Alam F, Muhammad Din K, Sarfraz M, Qudoos A, Malik S. Genus *Primula* and its role in phytomedicine; a systematic review. *Phytomedicine Plus*. 2024;4:100510. doi: 10.1016/j.phyplu.2023.100510.
2. Richards AJ. *Primula*. Portland: Timber Press; 2003. ISBN 10: 0881922285 / ISBN 13: 9780881922288.
3. Jager AK, Guquin B, Adersen A, Gudiksen L. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat epilepsy and convulsions. *J Ethnopharmacol*. 2006;105:294-300. doi: 10.1016/j.jep.2005.10.015.
4. Majid A, Hassan S, Hussain W, Khan A, Hassan A, Khan A, et al. In vitro Approaches of *Primula vulgaris* Leaves and Roots Extraction against Human Pathogenic Bacterial Strains. *World Appl Sci J*. 2014;30(5):575-80.
5. Draxler L, Gohler I, Franz C. Cultivation and breeding of Cowslip (*Primula veris*) for producing medicinal drugs. *Rev Fitoter*. 2002;2(Suppl 1):327.
6. Budzianowski J, Morozowska M, Wesolowska M. Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and in vitro cultures. *Phytochemistry*. 2005;66:1033-9. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.03.024.
7. Fyco G, Rodondy G, Flamyny G, Passarella D, Tome F. Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species. *Phytochemistry*. 2007;68:1683-91. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.019.
8. Radulović NS, Stojić MZ. Long-chain syn-1-phenylalkane-1,3-diyl diacetates, related phenylalkane derivatives, and sec-alcohols, all possessing dominantly iso-branched chain termini, and 2/3-methyl-branched fatty acids from *Primula veris* L. (Primulaceae) wax. *Phytochemistry*. 2021;186:112732.
9. Winston D, Kuhn MA. *Herbal Therapy & Supplements: A Scientific & Traditional Approach* (rev. ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
10. Kemmerich B. Evaluation of efficacy and tolerability of a fixed combination of dry extracts of thyme herb and primrose root in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. *Arzneimittelforschung*. 2007;57:607-15.
11. Glatthaar-Saalmüller B, Rauchhaus U, Rode S, Haunschild J, Saalmüller A. Antiviral activity in vitro of two preparations of the herbal medicinal product Sinupret® against viruses causing respiratory infections. *Phytomedicine*. 2011;19:1-7.

12. Luma M, Faslia N. Diversity of Cowslip (*Primula veris* L.) natural populations in Kosovo assessed by morphological and chemical markers. *Eur J Sci Res*. 2018;149:15-23.
13. Huck CW, Huber CG, Onganya KH, Bonn GK. Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;870:453-62.
14. Muller A, Ganzera M, Stuppner H. Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1112:218-23. doi: 10.1016/j.chroma.2005.10.067.
15. Sufka KJ, Roach JT, Chamblyss JRWG, Brom SL, Feltensteyn MW, Wyandt CM, et al. Anxiolytic properties of botanical extracts in the chick social separation-stress procedure. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;153:219-24. doi: 10.1007/s002130000571.
16. Bhatt H, Saklani S, Upadhyay K. Anti-oxidant and anti-diabetic activities of ethanolic extract of *Primula Denticulata* Flowers. *Indones J Pharm*. 2016;27:74.
17. Najmus-Saqib Q, Alam F, Ahmad M. Antimicrobial and cytotoxicity activities of the medicinal plant *Primula macrophylla*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009;24:697-701.
18. Ahmad VU, Shah MG. Macrophyllcinin, a saponin from *Primula macrophylla*. *J Nat Prod*. 1993;56:1580-5.
19. Brondani D, Nascimento C, Moreira DdM, Leite AL, De Souza I, Bieber L. Synthesis and antitumour activity of the primin (2-methoxy-6-n-pentyl-1,4-benzoquinone) and analogues. *Med Chem*. 2007;3:369-72.
20. Bas, bülbül G, Özmen A, Halil Biyik H, Sen O. Antimitotic and antibacterial effects of the *Primula veris* L. flower extracts. *CARYOLOGIA*. 2008;61(1):88-91. doi: 10.1080/00087114.2008.10589614.
21. Deliorman Orhan D, Ozcelik B, Hosbasi S, Vural M. Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turk J Biol*. 2012;36:672-86. doi: 10.3906/biy-1203-33.
22. Jaberian H, Piri K, Nazari J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chem*. 2013;136:237-44.
23. Tokalov SV, Kynd B, Wollenweber E, Gutzeyt HE. Biological Effects of Epicuticular Flavonoids from *Primula denticulata* on Human Leukemia Cells. *J Agric Food Chem*. 2004;52:239-45.
24. Saharanavard S, Mojab F, Boluki Naseri P, Behzad S, Parsa Khankandi H. Chemical compounds isolated from aerial part of *Primula auriculata* L. *Iran J Pharm Sci*. 2018;14:63-70.
25. Lodhia MH, Bhatt KR, Thaker VS. Antibacterial Activity of Essential Oils from Palmarosa, Evening Primrose, Lavender and Tuberose. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(2):134-6. doi: 10.4103/0250-474X.54278.
26. Skopińska-Rózewska E, Siwicki AK. Immunotropic and anti-tumor effects of plant adaptogens. II. *Oenothera* L. (Evening primrose). *Cent Eur J Immunol*. 2010;35(2):111-3.
27. Marchese A, Arciola CR, Barbieri R, Silva AS, Nabavi SF, Tsetegho Sokeng AJ, et al. Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene. *Materials (Basel)*. 2017;10(8):947. doi: 10.3390/ma10080947.
28. Aldholmi M, Marchand P, Ourliac-Garnier I, Le Pape P, Ganesan A. A Decade of Antifungal Leads from Natural Products: 2010–2019. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(4):182. doi: 10.3390/ph12040182.
29. Khodeer DM, Mehanna ET, Abushouk BI, Abdel-Daim MM. Protective Effects of Evening Primrose Oil against Cyclophosphamide-Induced Biochemical, Histopathological, and Genotoxic Alterations in Mice. *Pathogens*. 2020;9(2):98. doi: 10.3390/pathogens9020098.
30. Abd Rashed A, Gunasegavan Rathi D, Ahmad Nasir NAH, Abd Rahman AZ. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Compounds for Application in Skin Fungal Infections: Conventional and Nonconventional Approaches. *Molecules*. 2021;26(4):1093. doi: 10.3390/molecules26041093.
31. Ahmadi S. Antibacterial and antifungal activities of medicinal plant species and endophyte. *Cell Mol Biomed Rep*. 2022;2(2):109-15. doi: 10.55705/cnbr.2022.340532.1042.
32. Sarropoulou V, Sarrou E, Angeli A, Martens S, Maloupa E, Grigoriadou K. Species-specific secondary metabolites from *Primula veris* subsp. *veris* obtained in vitro adventitious root cultures: an alternative for sustainable production. *Sustainability*. 2023;15(3):2452.
33. Mostafa FA, Gamal MA, Sabrin IR, Ehab ES. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Primula elatior* L. aerial part. *IJPPR*. 2014;6:74-8.

34. Noroozi Sharaf AR, Hamidoghli Y, Zakizadeh H. In vitro seed germination and micropropagation of primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) an endemic endangered Iranian species via shoot tip explants. *Res Rep.* 2011;52:298-302.
35. Tütüncü M. In vitro culture of *Primula*: a review. *Int J Agric Nat Sci.* 2020;13:118-25.
36. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue culture. *Physiol Plant.* 1962;15:473-97. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
37. Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants.* 2015;4(3):196. doi: 10.4172/2167-0412.1000196.
38. Adebayo EA, Ishola OR. Phytochemical and antimicrobial screening of crude extracts of *Terminalia gaucescens*. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2009;3:217-21.
39. Djilani A, Legseir B, Soulimani R, Dickob A, Younosb C. New Extraction Technique for Alkaloids. *J Braz Chem Soc.* 2006;17(3):518-20.
40. Ibraheem IBM, Abd-Elaziz BEE, Saad WF, Fathy WA. Green biosynthesis of silver nanoparticles using marine red algae *Acanthophora specifera* and its antimicrobial activity. *J Nanomed Nanotechnol.* 2016;7(409):1-4. doi: 10.4172/2157-7439.1000409.
41. Cheesbrough M. District laboratory practice in tropical countries. Part 2. Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 137-50.
42. Razzouk S, Mazri MA, Jeldi L, Mnasri B, Ouahmane L, Alfeddy MN. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Three Mediterranean Plants against Eighteen Pathogenic Bacteria and Fungi. *Pharmaceutics.* 2022;14:1608. doi: 10.3390/pharmaceutics14081608.
43. Mahady GB. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Curr Pharm Des.* 2005;11:2405-27. doi: 10.2174/1381612054367481.
44. Wendakoon A. Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. *J Med Act Plants.* 2012;1(2):6-5.
45. Buruk K, Sokmen A, Aydin F, Erturk M. Antimicrobial activity of some endemic plants growing in the Eastern Black Sea Region, Turkey. *Fitoterapia.* 2006;77:388-91. doi: 10.1016/j.fitote.2006.03.002.
46. Tosun F, Akyuz C, Sener B, Vural M. The evaluation of plants from Turkey for in vitro antimycobacterial activity. *Pharm Biol.* 2005;43:58-63. doi: 10.1080/13880200590903372.
47. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.* 2002;95(Suppl 41):22-6.
48. Trendafilova A, Raykova D, Ivanova V, Novakovic M, Nedialkov P, Paunova-Krasteva T, et al. Phytochemical Characterization and Anti-Biofilm Activity of *Primula veris* L. Roots. *Molecules.* 2025;30:1702. doi: 10.3390/molecules30081702.
49. Thuwaini MM. Antibacterial spectrum of medicinal plants: A review. *GSC Biol Pharm Sci.* 2023;24(02):239-84. doi: 10.30574/gscbps.2023.24.2.0338.
50. Höfling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IAT, Furletti VF, Foglio MA, et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz J Biol.* 2010;70(4):1065-8. doi: 10.1590/S1519-69842010000500022.
51. Erzsébet V, Dorottya L, Anna M. Investigation of the phytochemical and antimicrobial activity of *Primula veris* L. extracts. *Orvostudományi Értesítő.* 2020;93(2):102-10. doi: 10.2478/orvtudert-2020-0013.
52. Alo MN, Anyim C, Igwe JC, Elom M, Uchenna DS. Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina* and *Aframomum melegueta*. *Adv Appl Sci Res.* 2012;3(2):844-8.
53. Oliver BG, Silver PM, Marie C, Hoot SJ, Leyde SE, White TC. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Microbiology (Reading).* 2008;154(Pt 3):960-70. doi: 10.1099/mic.0.2007/013805-0.
54. Khan S, Shaheen H, Mehmood A, Nasar S, Khan T. Ethnobotanical and antibacterial study of *Primula* plants traditionally used in the indigenous communities of Western Himalaya, Pakistan. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29:3244-54. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.01.048.