



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

ISSN: 1909-8758

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

Moreira-Palacios, Maximo O; Cabrera, Henry; Armijos, Rosa; Cueva-Agila, Augusta
Germinación y multiplicación *in vitro* de *Matricaria*
recutita L: los fenoles totales determinan su germinación
Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XXI, núm. 2, 2019, Julio-Diciembre, pp. 6-11
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.68509>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77662596002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Germinación y multiplicación *in vitro* de *Matricaria recutita* L.: los fenoles totales determinan su germinación

Germination and *in vitro* multiplication of *Matricaria recutita* L.: total phenols determine their germination

Moreira-Palacios Máximo O. *, Cabrera Henry**, Armijos Rosa *** y Cueva-Agila Augusta ****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.68509

RESUMEN

La manzanilla (*Matricaria recutita* L., *Chamomilla recutita* L. y *Matricaria chamomilla* L.), es conocida por su alto contenido de compuestos fenólicos que le confieren propiedades antiinflamatorias, antisépticas y antimutagénicas. En este estudio se evaluó el porcentaje de fenoles totales y la germinación en cinco periodos de almacenamiento de semillas de *M. recutita* (5, 31, 75, 96 y 128 días). Además, se evaluó el efecto de citoquininas (6-Benzil Amino Purina, BAP y Kinetina) y auxinas (α -Ácido Naftalen Acético, ANA) en la brotación *in vitro* de esta especie. Se evidenció que la concentración total de fenoles disminuyó de 13.8% a 1.9% en los cinco periodos de almacenamiento evaluados y que los porcentajes de germinación aumentaron de 2.2% a los cinco días a 8,9% a los 128 días de almacenamiento, mostrándose evidencia de una correlación de -0.989 entre la germinación y el contenido de fenoles totales. Los mejores resultados para inducir brotación (5 brotes/explante) fueron obtenidos en el medio de cultivo MS con citoquininas.

Palabras clave: Manzanilla, micropropagación, almacenamiento de semillas, compuestos fenólicos.

ABSTRACT

Chamomile (*Matricaria recutita* L., *Chamomilla recutita* L., and *Matricaria chamomilla* L.) is known for its high content of phenolic compounds that confer anti-inflammatory, antiseptic and antimutagenic properties. This study evaluated the percentage of total phenols and germination in five storage periods of *M. recutita* seeds (5, 31, 75, 96 and 128 days). In addition, the effect of cytokinins (6-Benzyl Amino Purine, BAP and Kinetin) and auxins (α -Naphthalene Acetic Acid, ANA) on *in vitro* sprouting of this species was evaluated. It was evidenced that the total concentration of phenols decreased from 13.8% to 1.9% in the five storage periods evaluated and that the germination percentages increased from 2.2% at five days to 8.9% at 128 days of storage, showing evidence of a correlation of -0.989 between the germination and the content of total phenols. The best results to induce sprouting (5 shoots/explant) were obtained in the MS culture medium with cytokinins.

Key words: Chamomile, micropropagation, seeds storage, phenolic compounds.

Recibido: agosto 12 de 2018

Aprobado: agosto 28 de 2019

* Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. P.O. Box 608, Loja, 1101 Ecuador. Fax: 0059372584893. momoreira@utpl.edu.ec. <http://orcid.org/0000-0002-1833-2674>.

** Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. P.O. Box 608, Loja, 1101 Ecuador. Fax: 0059372584893.

*** Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. P.O. Box 608, Loja, 1101 Ecuador. Fax: 0059372584893. momoreira@utpl.edu.ec

INTRODUCCIÓN

El epíteto específico para la manzanilla, *Matricaria recutita* L., fue acuñado por Xifreda (1985). Esta especie es una Asteraceae originaria de Europa y Asia occidental. Es una de las herbáceas medicinales de mayor importancia económica que ha sido utilizada por centenares de años y está incluida en la farmacopea de 26 países (Singh *et al.*, 2011). La manzanilla es usada en infusiones, por sus propiedades como antiinflamatorio y antiséptico. Además, su aceite esencial es usado en perfumería, aromaterapia, en la industria cosmética y alimenticia (Singh *et al.*, 2011; Stanojevic *et al.*, 2017; Al-Dabbagh *et al.*, 2019). La manzanilla se cultiva en muchos países de Sudamérica; en Ecuador, ha sido introducida y es cultivada en varias provincias como Carchi, Pichincha, Azuay y Loja (Jørgensen and León-Yáñez, 1999; Jerves-Andrade *et al.*, 2014; Tinitana *et al.*, 2016; Morales, Padilla and Falconí, 2017).

La manzanilla contiene un amplio grupo de compuestos con actividad terapéutica, entre los cuales se encuentran once compuestos fenólicos bioactivos (Fonseca, Tavares and Horváth, 2007; Gupta *et al.*, 2010; Avula *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos pueden tener efectos positivos o negativos en el crecimiento y el desarrollo vegetal. Compuestos como el ácido ferúlico, precursor de derivados fenólicos, son responsables de la inhibición de la germinación en *Baccharis boliviensis* (Cazón, de Viana and Gianello, 1999), también se ha encontrado reportes de sales o contaminantes que afectan la germinación de otras especies de *Matricaria* (Pasquale *et al.*, 1988; Bijeh, 2012; Joneidi-Jafari *et al.*, 2013), sin embargo, no se ha evaluado la influencia de compuestos fenólicos en la germinación de *M. recutita*.

En contraste, la propagación *in vitro* de *M. recutita* ha sido documentada, con estudios realizados principalmente hasta el año 2000. Algunas investigaciones reportan el cultivo de células en suspensión (Bisson, Beiderbeck and Reichling, 1983) y la mayoría, formación de callos para la obtención de aceites esenciales. La formación de callos se ha reportado utilizando segmentos nodales (Sato *et al.*, 2006), explantes de hojas y tallos (Reichling and Becker, 1976; Reichling, Bisson and Becker, 1984), y semillas (Passamonti *et al.*, 1998). La mayoría de los efectos farmacológicos de la manzanilla se han atribuido al aceite esencial extraído de las flores (Pirzad *et al.*, 2006), por este motivo son varios los estudios realizados con diversos órganos florales como explantes de partida en la producción de callos en esta especie (Szoke, Shavarda and Kuzovkina, 1979; Čellárová, Repčáková and Hončariv, 1986), así como en la inducción de embriones somáticos (Kintzios and Michaelakis, 1999). Son pocos los estudios que reportan la inducción a la formación de brotes *in*

vitro en esta especie. Takano *et al.* (1991), reportan el uso de ANA y BAP para la inducción de brotes con resultados que oscilan entre 5.5-14 brotes por primordio después de las 12 semanas de cultivo. Sato *et al.* (2006), con el uso de 2,4-D reportaron la formación de 3,31 brotes por explante, utilizando segmentos nodales, después de ocho semanas de cultivo.

El objetivo del estudio fue evaluar si el contenido total de fenoles disminuye con el almacenamiento y si este determina la germinación de semillas de manzanilla y, por otra parte, determinar la influencia de una auxina y dos citoquininas en la inducción de brotes *in vitro* de *M. recutita*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación y determinación de fenoles totales

Semillas de *M. recutita* fueron recolectadas del sector Amable María (Loja), ubicado a una altitud promedio de 2000 m.s.n.m. en las coordenadas 3°57'15.78"S, 79° 12' 54,68" O y puestas a secar a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Se evaluaron cinco periodos de almacenamiento: 5, 31, 75, 96, 128 días. Al final de cada periodo se determinó el contenido de fenoles totales y el porcentaje de germinación de las semillas.

Los análisis de fenoles totales se realizaron por el método de Folin-Ciocalteu, citado por Jordán, (1975), utilizando ácido tánico como estándar (Rosales-Castro and González-Laredo, 2003). Por cada periodo de almacenamiento se evaluó el contenido de fenoles totales de 30 semillas por repetición, con un total de dos repeticiones.

Para las pruebas de germinación se realizó una desinfección de las semillas con alcohol al 70% durante 30 segundos, seguido de inmersión en hipoclorito de sodio comercial al 1% por 5 minutos. Las semillas desinfectadas se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con ácido nicotínico (0.5 mg·L⁻¹), piridoxina (0.5 mg·L⁻¹), myo-inositol (0.5 mg·L⁻¹), 7 g·L⁻¹ de agar y 20 g·L⁻¹ de sacarosa; el pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.80 ± 0.02 y se autoclavó durante 20 minutos a 121°C y 1.5 kg/cm² de presión. Las respuestas de germinación se evaluaron hasta los 128 días. Se observó la formación de la radícula para considerar la semilla como germinada (Bewley *et al.*, 2013). Se realizaron 3 repeticiones, cada repetición con 3 frascos y en cada frasco se pusieron 10 semillas.

Inducción de brotes *in vitro*

En muchas especies la aplicación de citoquininas genera un estímulo similar tanto en yemas axilares como apicales (Taiz *et al.*, 2015), en este caso la inducción de bro-

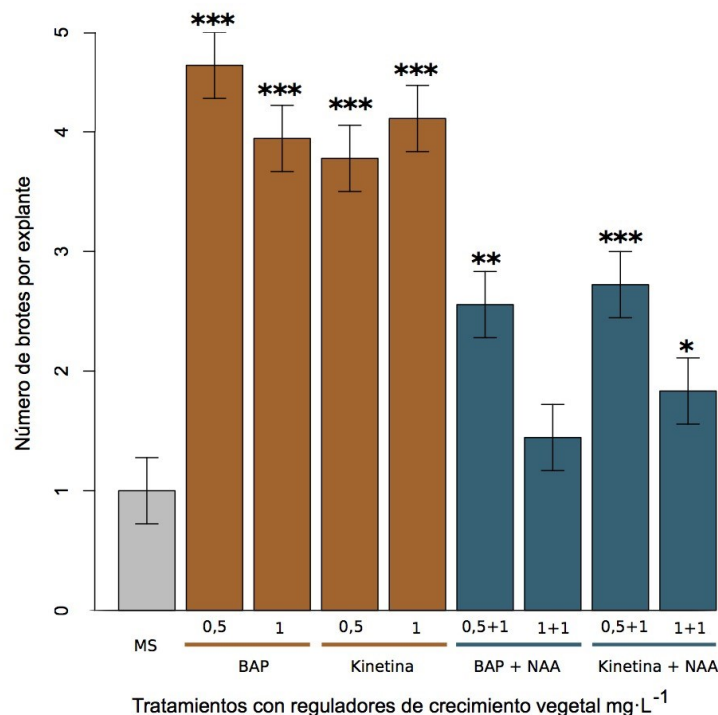


Figura 1. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la producción de brotes en *M. recutita* a los 25 días de cultivo. Los asteriscos muestran la significancia de cada uno de los tratamientos según el análisis con el Modelo Linear Generalizado, con una distribución binomial. $p > 0$ '****'; $p > 0.001$ '***'; $p > 0.01$ '**'.

tes se realizó a partir de yemas provenientes de plantas de un mes de edad que germinaron *in vitro* en medio de cultivo MS (Passamonti *et al.*, 1998; Wesolowska, Grzeszczuk and Kulpa, 2015) luego de ser desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial al 5%.

Se evaluó la formación de brotes en medio de cultivo MS con la adición de dos citoquininas: 6-Bencil Aminopurina (BAP: 0,5 y 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y kinetina (Kin: 0,5 y 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) solas o en combinación con Ácido Naftalen Acético (ANA: 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), en un total de ocho tratamientos (figura 1). Para cada tratamiento se utilizaron frascos de 210 cm^3 de volumen total con 30 cm^3 de medio de cultivo. Seis frascos (réplicas) con 4 explantes fueron evaluados para cada tratamiento y el experimento se repitió 3 veces. Después de 25 días de cultivo se registró el número de brotes por cada explante.

Para los dos ensayos se mantuvo una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad provisto con lámparas fluorescentes de 40 W con intensidad de $57\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El análisis de datos se realizó en el programa R (R Develo-

pment Core Team, 2012). Los resultados de germinación *in vitro* y cuantificación de fenoles totales se analizaron usando la correlación con el test de Spearman. El número promedio de brotes por cada réplica se analizó usando los Modelos Lineales Generalizados (GLMs) apropiados para datos biológicos que no tienen una varianza constante. Se utilizó la Distribución Binomial Negativa que describe de mejor manera datos de conteos (Crawley, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación y determinación de fenoles totales

La concentración total de fenoles en las semillas de *M. recutita* disminuye al aumentar el periodo de almacenamiento. A los cinco días, el contenido total de fenoles fue de 13.8% y luego de 128 días disminuyó a 1.9%. Por el contrario, la germinación al primer periodo de almacenamiento (5 días) fue de 2,2% y aumentó a 8,9% a los 128 días (tabla 1). Según el test de Spearman existe una correlación de -0.989 entre la germinación y la concentración total de fenoles con un $p=0,016$, confirmando la influencia del contenido de fenoles totales sobre la germinación de semillas en esta especie.

Tabla 1. Influencia del periodo de almacenamiento sobre la germinación y el contenido total de fenoles en semillas de *Matricaria recutita*.

Tiempo de almacenamiento (días)	Germinación. Porcentaje promedio \pm error estándar	Contenido total de Fenoles Porcentaje promedio \pm error estándar
5	2,2 \pm 1,4	13,8 \pm 0,8
31	5,6 \pm 2,4	8,72 \pm 0,2
75	6,7 \pm 2,4	5,04 \pm 0,2
96	7,8 \pm 4,2	2,9 \pm 0,4
128	8,9 \pm 2,8	1,9 \pm 0,01

M. recutita contiene una extensa variabilidad de compuestos fenólicos que han sido ampliamente estudiados (Lim, 2014). Según Chiapusio *et al.* (1997), cantidades aparentemente insignificantes de compuestos fenólicos individuales influyen en la germinación de semillas. Estos fenoles inhiben la actividad de las enzimas en la glucólisis y la vía oxidativa de la fosfato pentosa (Muscolo, Panuccio and Sidari, 2000) que son enzimas primordiales para iniciar el proceso de germinación (Rosental, Nonogaki and Fait, 2015).

En contraste a los porcentajes bajos de germinación reportados en este estudio, otros autores obtuvieron altos porcentajes de germinación para la misma especie o para otras especies del mismo género (Zohreh and Zarinkamar, 2012; Timothy and Mwangi, 2015). Se ha reportado que en una misma especie pueden existir diferencias marcadas en la germinación en función de la época de colección y de su proveniencia (Mullins and Marks, 1987). Para el género, esto quedó evidenciado por Bochenek *et al.* (2007), en *Matricaria maritima*, ya que encontraron variaciones que fluctuaron de 7,3% hasta 100% según la época de colección. Los datos que se presentan se podrían ampliar en futuras investigaciones que utilicen varios genotipos colectados en distintas épocas del año, de esta forma se verificaría la influencia de estos factores sobre el contenido de fenoles totales y la germinación.

Inducción de brotes *in vitro*

El mejor rango de proliferación, 4-5 brotes/explante se obtuvo en medio de cultivo MS con citoquininas (figura 1). Respecto al tratamiento control, los tratamientos que mejoraron la producción de brotes con mayor significancia son medio de cultivo MS con 0.5 mg·L⁻¹ o 1 mg·L⁻¹ de Kinetina o BAP y en medio de cultivo MS con la combinación de 0,5 mg·L⁻¹ de Kinetina y 1 mg·L⁻¹ ANA (figura 1).

El número de brotes por explante que se obtuvo como resultado en este estudio es menor al reportado por Takano *et al.* (1991), utilizando ANA y BAP para inducir la formación de brotes a partir de meristemas apicales.

En dicho estudio reportaron resultados del uso de medio de cultivo MS, ½MS y ¼MS, con varias concentraciones de BAP y ANA solos o combinados, obtuvieron resultados de entre 6-10 brotes por explante. Con el uso de 0,02 mg·L⁻¹ de BAP en medio de cultivo MS, consiguieron 9,5 brotes por explante. Cuando combinaron BAP y ANA, en la misma concentración, el número de brotes por explante disminuye a 6,5, sin embargo, ninguno de éstos formó raíces. En MS sin hormonas se consigue 10 brotes por explante. Cuando usan más auxinas que citoquininas (0,20 comparado con 0,02) hay solo 6 brotes por explante. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el tiempo de registro de datos difiere, siendo de 3 semanas en el presente estudio y de 12 semanas en el estudio de Takano *et al.* (1991).

Otro estudio realizado por Sato *et al.* (2006), con el principal objetivo de producir plantas sin inducir la formación de callo, reporta que luego de 8 semanas el mayor número de brotes por explante fue de 3,31 utilizando 1 mg·L⁻¹ de 2,4-D. Los segmentos nodales cultivados en MS produjeron únicamente 2,35 brotes/explante. En un estudio reciente Harras & Lamarti (2014) reportan la utilización de diversos medios de cultivo en la propagación *in vitro* de una manzanilla silvestre de Morocco, *Cladanthus mixtus* (L.). Con el medio de cultivo MS obtuvieron un promedio de 2,6 brotes por explante a los 30 días de cultivo.

CONCLUSIONES

Aunque el porcentaje de germinación alcanzado en este estudio es bajo, los datos demuestran que existe una correlación negativa entre el contenido total de fenoles y el porcentaje de germinación de *M. recutita*; a menor contenido total de fenoles la germinación aumenta. El uso de citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *M. recutita* mejora significativamente la producción de brotes por explante; datos que pueden mejorar la multiplicación *in vitro* de esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Dabbagh, B., Elhaty, I. A., Elhaw, M., Murali, C., Al Mansoori, A., Awad, B., & Amin, A. (2019). Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *BMC Research Notes*, 12(3), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3960-y>.
- Avula, B., Wang, Y.-H., Wang, M., Avonto, C., Zhao, J., Smillie, T. J., ... Khan, I. A. (2014). Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/*Chrysanthemum* flower heads. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.037>.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Seeds. Physiology of development, germination and dormancy. (S. S. & B. Media, Ed.) (3rd Edition). USA: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>.
- Bijeh, M. (2012). The effect of different NaCl concentration on germination and early seedling growth of *Artemisia annua* L. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(3), 135–140.
- Bisson, W., Beiderbeck, R., & Reichling, J. (1983). Die Produktion ätherischer Öle durch Zellsuspensionen der Kamille in einem Zweiphasensystem. *Planta Medica*, 47(03), 164–168. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969978>.
- Bochenek, A., Golaszewski, J., & Górecki, R. J. (2007). The seasonal dormancy pattern and germination of *Matricaria maritima* subsp. *Inodora* (L.) dostal seeds in hydrotime model terms. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(4), 299–307.
- Cazón, A., de Viana, M., & Gianello, J. (1999). Identificación de un compuesto alelopático de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) y su efecto en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae). *Revista de Biología Tropical*, 47–51(1).
- Čellárová, E., Repčáková, K., & Hončariv, R. (1986). Salt tolerance of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert tissue cultures. *Biologia Plantarum*, 28(4), 275–279. <https://doi.org/10.1007/BF02902293>.
- Chiapusio, G., Sánchez, M., Reigosa, M. J., González, L., & Pellissier, F. (1997). Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *Journal of Chemical Ecology*, 23(11), 2445–2453. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006658.27633.15>.
- Crawley, M. (2014). Statistics: An introduction using R. London, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Fonseca, F. N., Tavares, M. F. M., & Horváth, C. (2007). Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. *Journal of Chromatography A*, 1154(1–2), 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.106>.
- Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S. L., & Kaushik, D. (2010). Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A Review. *Medical Economics*, 2(1), 12–16.
- Harras, N., & Lamarti, A. (2014). *In vitro* germination and plantlet establishment of wild chamomile of Morocco *Cladanthus mixtus* (L.) Oberpr. and Vogt. *American Journal of Plant Sciences*, 5(18), 2623–2632. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.518277>.
- Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., ... Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(45), 1310–1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>.
- Joneidi-Jafari, H., Azarnivand, H., Sadeghipour, A., & Malekian, A. (2013). Effect of salinity stress on germination of *Matricaria comomilla* and *Thymus deanensis*. *Desert*, 17, 305–307.
- Jordán, M. (1975). Histologische und physiologische Untersuchungen zur Kapazität der Androgenese bei *in vitro* kultivierten *Prunus*, *Pyrus*, *Ribes* und *Nicotiana* Antheren. In Gieben (p. 113). Gieben, Germany: Liebig-Universität., Justus.
- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). Catálogo de plantas vasculares de Ecuador. (P. M. Jørgensen & S. León-Yáñez, Eds.) (75: I-VIII). Missouri: Missouri Botanical Garden.
- Kintzios, S., & Michaelakis, A. (1999). Induction of somatic embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescences of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). *Plant Cell Reports*, 18(7–8), 684–690. <https://doi.org/10.1007/s002990050643>.
- Lim, T. K. (2014). Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants (Vol. 7).
- Morales, F., Padilla, S., & Falconí, F. (2017). Medicinal plants used in traditional herbal medicine in the Province of Chimborazo, Ecuador. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 10–15. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.2>.
- Mullins, P., & Marks, T. (1987). Flowering phenology and seed production of *Spartina anglica*. *British Ecological Society*, 75(4), 1037–1048. <https://doi.org/10.2307/2260312>.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Muscolo, A., Panuccio, M. R., & Sidari, M. (2000). The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with

- phenols extracted from different forest soils. *Plant Growth Regulation*, 35, 31–35.
- Pasquale, R. De, Ragusa, S., Iauk, L., Barbera, R., & Galati, E. M. (1988). Effect of cadmium on germination, growth and active principle contents of *Matricaria recutita* L. *Pharmacological Research Communications*, 20, 151–154. [https://doi.org/10.1016/S0031-6989\(88\)80861-0](https://doi.org/10.1016/S0031-6989(88)80861-0)
- Passamonti, F., Piccioni, E., Standardi, A., & Veronesi, F. (1998). Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Acta Horticulturae*, 457, 303–309.
- Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., & Mohammadi, A. (2006). Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. *Journal Agronomy*, 5(3), 451–455. Retrieved from %5C%5CRobsrsv-05%5Creference manager%5CArticles%5C11304.pdf.
- R Development Core Team, R. (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.r-project.org/>
- Reichling, J., & Becker, H. (1976). Tissue Culture of *Matricaria chamomilla* L. *Planta Medica*, 30, 258–268.
- Reichling, J., Bisson, W., & Becker, H. (1984). Comparative study on the production and accumulation of essential oil in the whole plant and in the callus culture of *Matricaria chamomilla*. *Planta Med*, 50(4), 334–337. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969724>.
- Rosales-Castro, M., & González-Laredo, R. F. (2003). Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques*, 9(2), 41–49. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61790204>.
- Rosental, L., Nonogaki, H., & Fait, A. (2015). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1017/S0960258513000391>.
- Sato, A., de Lima, S. S., Affonso, V. R., Esquibel, M. A., & Lage, C. L. S. (2006). Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert: A shock treatment model with growth regulators. *Scientia Horticulturae*, 109(2), 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.03.004>.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., & Srivastava, M. K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 82. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79103>.
- Stanojevic, L. P., Marjanovic-Balaban, Z. R., Kalaba, V. D., Stanojevic, S., & Cvetkovic, D. J. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chamomile flowers essential oil (*Matricaria chamomilla* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(8), 2016–2028. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1224689>.
- Szoke, E., Shavarda, A., & Kuzovkina, J. (1979). Effect of culturing conditions on essential oil formation in callus tissue of wild chamomile inflorescences. *Soviet Plant Physiol*, 25, 579 – 584.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moler, I., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (Sinauer As). Sunderland, MA, USA.
- Takano, H., Hirano, M., Taniguchi, K., Tanaka, R., & Kondo, K. (1991). Rapid clonal-propagation of *Matricaria chamomilla* by tissue-cultures shoot primordia. *Bioscienci Biotechnology Biochemistry*, 41, 421–426. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>.
- Timothy, K. K., & Mwangi, M. (2015). Studies on german chamomile (*Matricaria recutita* L.) propagation and the effect of light and age on seed viability. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(2), 3781–3786. Retrieved from <http://www.m.elewa.org/JAPS>.
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>.
- Wesolowska, A., Grzeszczuk, M., & Kulpa, D. (2015). Propagation method and distillation apparatus type affect essential oil from different parts of *Matricaria recutita* L. plants. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(1), 179–194. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895210>.
- Xifreda, C. (1985). Sobre el nombre científico correcto de la manzanilla, (*Matricaria recutita* L., Asteraceae). *Darwiniana*, 26, 373–375.
- Zohreh, S., & Zarinkamar, F. (2012). The effect of different Pb and Cd concentrations on seed germination and seedling growth of *Matricaria chamomilla*. *Advances in Environmental Biology*, 6(7), 1940–1943.