

## GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS Y ESPECIES ARBÓREAS MEDIANTE ESCARIFICACIÓN

Adrián Alejandro Ruiz-Sierra<sup>1</sup>, Arturo Alvarado-Segura<sup>2</sup>,  
Orlando Adrián Chan-May<sup>3</sup>, Pedro Rogelio Catzim-Navarrete<sup>4</sup>

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Recibido: 21/11/2023 Aceptado: 07/05/2024

**Resumen.-** La germinación de semillas es un proceso vital de las plantas, pero enfrenta obstáculos como la dormancia y la presencia de sustancias inhibitoras. La escarificación, a través de tratamientos específicos, busca mejorar el porcentaje de germinación. El presente trabajo resume investigaciones recientes sobre diferentes sustancias y técnicas utilizadas en la escarificación de semillas, así como su desarrollo, centrándose en algunas orquídeas y especies arbóreas. En árboles, el uso de medios mecánicos y ácidos para superar la dormancia física acelera la germinación y mejora la propagación. Esto es esencial para la restauración de ecosistemas degradados y la conservación de la biodiversidad. Las condiciones de cultivo, sustratos y factores ambientales como la luz y la temperatura son cruciales en el desarrollo de plántulas. Por otro lado, las orquídeas (Orchidaceae), a pesar de presentar dormancia fisiológica, requieren concentraciones menores de sustancias, como agua desionizada y sacarosa, en lugar de ácidos. Este contraste resalta la diversidad de estrategias adaptativas. Además, las sustancias utilizadas varían según la especie. Aunque la escarificación ha demostrado eficacia, se necesita más investigación sobre el crecimiento a largo plazo y la variabilidad genética. La micropropagación puede ser beneficiosa para una propagación eficiente de plántulas.

**Palabras clave:** Dormancia, escarificación, arbóreas, orquídeas, germinación.

## GERMINATION OF ORCHID AND TREE SPECIES SEEDS THROUGH SCARIFICATION

**Abstract.-** Seed germination is a vital process of plants, but it faces obstacles such as dormancy and the presence of inhibitory substances. Scarification, through specific treatments, aims to improve the germination percentage. This paper summarizes recent research on different substances and techniques used in seed scarification, as well as their development, focusing on some orchids and tree species. In trees, the use of mechanical means and acids to overcome physical dormancy accelerates germination and enhances propagation. This is essential for the restoration of degraded ecosystems and the conservation of biodiversity. Growing conditions, substrates, and environmental factors such as light and temperature are crucial in seedling development. On the other hand, orchids (Orchidaceae), despite exhibiting physiological dormancy, require lower concentrations of substances, such as deionized water and sucrose, instead of acids. This contrast highlights the diversity of adaptive strategies. Furthermore, the substances used vary by species. Although scarification has demonstrated effectiveness, more research is needed on long-term growth and genetic variability. Micropropagation may be beneficial for efficient seedling propagation.

**Keywords:** Dormancy, germination, orchids, scarification, tree.

### Introducción

La germinación de semillas es un proceso fundamental en la vida vegetal; sin embargo, puede afrontar obstáculos que desafían la habilidad de estas especies para reproducirse y persistir en su entorno natural. Los desafíos abarcan desde la dormancia fisiológica y física hasta la presencia de sustancias inhibitoras en los tejidos de las semillas (Burrows et al., 2019; Dessi et al., 2021; Jaganathan, 2018; Salazar y Ramírez, 2019; Šoch et al., 2023; Sugiyama et al., 2021).

La escarificación es esencial para mejorar la tasa de germinación (Deltalab et al., 2023). Lo anterior es importante para restaurar ecosistemas altamente degradados de especies nativas de árboles (Salazar y Ramírez, 2019). No obstante, la baja disponibilidad de semillas y la falta de conocimientos sobre las mejores formas de germinar limitan la

<sup>1</sup> Estudiante del TecNM, campus Sur del Estado de Yucatán. 1.201t0005@suryucatan.tecnm.mx, <https://orcid.org/0009-0002-9543-8592>

<sup>2</sup> Docente del TecNM, perfil deseable PRODEP, campus Sur del Estado de Yucatán. aalvarado@suryucatan.tecnm.mx, <https://orcid.org/0000-0002-7386-2205>

<sup>3</sup> Docente del TecNM, campus Sur del Estado de Yucatán. ochan@suryucatan.tecnm.mx, <https://orcid.org/0000-0002-8120-6945>

<sup>4</sup> Docente del TecNM, campus Sur del Estado de Yucatán. pcatzim@suryucatan.tecnm.mx, <https://orcid.org/0000-0001-6831-2228> (**Autor corresponsal**).

disponibilidad de plántulas de árboles en áreas de reserva (Luera et al., 2021). Por otro lado, algunas especies de árboles se vuelven invasoras al mostrar una amplia plasticidad, germinando en cualquier temperatura, ya sea en condiciones de luz o de oscuridad, una vez que se rompe la dormancia física por escarificación mecánica. Por tanto, la escarificación se vuelve un elemento clave para controlar las especies invasoras, cuando se conocen las condiciones óptimas para su germinación (Dessi et al., 2021). En general, las semillas de las especies arbóreas presentan dormancia física, dado que tienen una capa protectora que las mantiene en estado latente en el suelo hasta que las condiciones ambientales les permiten comenzar a crecer y germinar en el momento adecuado (Jaganathan, 2018).

Las orquídeas, al igual que las especies arbóreas, se han investigado ampliamente, debido a que son plantas ornamentales que poseen diversas formas y colores en sus flores. Asimismo, la germinación de sus semillas no es una excepción, puesto que también requiere de tratamientos específicos para superar la dormancia y garantizar un desarrollo adecuado (Deconninck y Gerakis, 2021). No obstante, la diferencia se presenta en que la escarificación implica el uso de soluciones desinfectantes. Esto es importante en el cultivo *in vitro* para prevenir el crecimiento de microorganismos que reducen la tasa de germinación (Katsalirou et al., 2019). Las orquídeas epífitas y terrestres establecen vínculos con varios hongos a través de sus raíces; al llevar a cabo la escarificación junto con especies de hongos específicos, es posible aumentar la tasa de germinación (Novotná et al., 2018; Quijia-Lamiña et al., 2023; Rasmussen, 1992). Sin embargo, la falta de éxito en algunas evaluaciones puede deberse a que el hongo utilizado no es apropiado para la germinación o el desarrollo de las plántulas (Novotná et al., 2018).

La germinación de semillas no solo es un tema de interés científico, sino que también tiene implicaciones económicas y ambientales (Šoch et al., 2023). En el caso de la producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México, se ha observado una disminución debido a la falta de aplicación de tecnologías adecuadas al cultivo. Un análisis de productividad a nivel internacional y nacional durante el periodo de 2003 a 2014 revela que México no logró aumentar sus exportaciones de vainilla, atribuyendo este estancamiento a la escasa superficie cultivada (Santillán-Fernández et al., 2018). Un ejemplo de los desafíos en la producción de vainilla está relacionado con las dificultades en la germinación de sus semillas, lo cual impacta directamente en la producción final. En este contexto, la escarificación ácida de las semillas se ha explorado como una estrategia para mejorar la germinación (Šoch et al., 2023).

Este trabajo sintetiza la información de publicaciones científicas recientes sobre la escarificación de semillas, explorando enfoques y tratamientos utilizados para superar los desafíos en la germinación de 20 especies de orquídeas y 23 especies arbóreas. Además, se explica la importancia de la escarificación como herramienta esencial en la propagación *in vitro* de orquídeas y se analizan los desafíos y avances en este campo en constante evolución.

#### Materiales y métodos

Esta revisión documental presenta información sobre los tratamientos de escarificación de semillas en especies de orquídeas y especies arbóreas. En su elaboración se utilizaron artículos pertenecientes a revistas científicas enlistadas en el Journal Citation Reports (JCR). Además, se incluyen algunos artículos fundamentales publicados entre 1990 y 2015 para establecer una base sólida y conocer la evolución del tema en las últimas décadas. Esta revisión siguió las pautas del estilo APA 7, respecto a la forma de realizar las citas, la creación de tablas y figuras. A partir del análisis de datos y establecimiento de relaciones presentadas en tablas, se determinaron cuáles son los tratamientos más comunes y con mayor tasa de germinación. En un primer momento se abordaron algunas especies arbóreas del mundo, con énfasis en especies del continente americano; posteriormente, se presentaron las especies de la familia Orchidaceae. El objetivo fue proporcionar una visión integral y actualizada de la escarificación de semillas en estas plantas, beneficiando a la comunidad científica y público con interés en este campo de estudio.

#### Resultados y discusión

##### Especies arbóreas del mundo

En general, las especies de la familia Fabaceae presentan latencia física, caracterizada por una capa impermeable al agua en las semillas, lo que puede dificultar la germinación (Kuswanto y Li'aini, 2022; Nourmohammadi et al., 2019). Se exploraron diversos métodos para superar la dormancia física en las semillas de *Gleditsia caspica*, que pertenece a dicha familia. Se probaron 20 tratamientos centrándose en dos aspectos: la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas. Se descubrió que la inmersión en ácido sulfúrico concentrado al 98% durante 60 minutos fue el tratamiento más efectivo para mejorar tanto la germinación como el crecimiento de las plántulas, lo que permitió que el 99-100% de las semillas germinara con éxito (Tabla 1). Además, se observaron mejoras en diferentes aspectos de las plántulas, como su altura, peso de raíces y brotes, tamaño de las raíces, cantidad y tamaño de las hojas,

y grosor del cuello de las plántulas. Otros tratamientos, como la exposición al agua fría, agua hirviendo y  $\text{KNO}_3$ , no mostraron mejoras significativas en la germinación o el crecimiento de las plántulas (Nourmohammadi et al., 2019).

En el caso de la especie *Gleditsia assamica*, que también pertenece a la familia Fabaceae, se estudió la escarificación mecánica, que implica la realización de una incisión en un lado de la semilla con un cortador de uñas. Se llevaron a cabo pruebas de tinción con tetrazolio en las semillas tratadas y en las no tratadas (grupo de control), encontrando una mejora en la absorción del 88.42%, al paso de 48 horas, en contraste con el grupo de control sin escarificación de 13.24%. De esta manera, se obtuvo un 96.8% en el porcentaje de germinación final de las semillas y un aumento significativo en el índice de velocidad de germinación. Estos hallazgos son de importancia para la conservación y domesticación de esta especie (Kuswanto y Li'aini, 2022).

La mayoría de las acacias australianas presentan dormancia física pronunciada (Burrows et al., 2019; Dessi et al., 2021; Sugiyama et al., 2021), la cual varía entre una población de semillas producidas por una sola planta (Dessi et al., 2021). Estas semillas con dormancia física pueden permanecer en el suelo durante mucho tiempo sin comenzar a crecer. Sin embargo, de acuerdo con las temporadas climáticas, las condiciones ambientales como la humedad y la temperatura apropiadas rompen la dormancia de las semillas para comenzar a germinar y crecer (Jaganathan, 2018). A pesar de que diversos tratamientos con fuego y agua caliente eliminan la dormancia física rápidamente, la germinación es tardada. Debido a que alguna parte de la cubierta de las semillas impide el acceso de agua al embrión, lo cual explica por qué no todas las semillas de una población germinan cuando se presenta lluvia leve. Es decir, parece que una parte de la semilla sirve como “medidor de fuego” y en otra parte como “medidor de lluvia”. Entonces podría estudiarse el elemento que retarda el acceso del agua al embrión después de que se rompe la dormancia física (Burrows et al., 2019). En contraste, se investigó cómo la ubicación de las semillas de *Cassia roxburghii* en diferentes micrositios afecta la pérdida de la dormancia física. Se descubrió que las semillas enterradas en un sitio abierto perdían la dormancia en mayor cantidad en comparación con las semillas bajo una capa de vegetación, debido a las diferencias de temperatura entre los micrositios. Esto sugiere que la variación en las temperaturas y las condiciones ambientales específicas de cada micrositio influye en la capacidad de germinación de las semillas de *C. roxburghii* para romper la dormancia y formar bancos de semillas en el suelo (Jaganathan, 2018).

Para lograr la germinación de semillas de *Acacia dealbata* y *Acacia mearnsii*, en hábitats mediterráneos, se evaluaron semillas escarificadas (las cubiertas fueron cortadas manualmente con un bisturí) y no escarificadas en diferentes condiciones de temperatura y luz. Ambas especies germinaron mejor a 25 °C en semillas no escarificadas, con diferencias entre poblaciones. En el caso de *A. dealbata* alcanzó un máximo de 55% y *A. mearnsii* un 40%. Por su parte, las semillas escarificadas germinaron más del 95% a diferentes temperaturas, excepto a 5 °C en oscuridad. La escarificación fue crucial para eliminar la latencia física, contribuyendo al entendimiento de su comportamiento invasivo y con ello planificar estrategias de control. Además, la disponibilidad de agua y las introducciones intencionales aumentan su invasividad en la región mediterránea (Dessi et al., 2021). Por otro lado, se observó que las semillas de *Acacia koa*, que provenían de fuentes de menor altitud, requieren de tratamientos de escarificación más intensos para superar la dormancia física. Por lo tanto, hervir las semillas a 100°C fue efectivo para la imbibición, aunque fue perjudicial para la tasa de germinación. La repetida exposición al agua no reduce el porcentaje, pero sí afecta negativamente el rendimiento de las plántulas, aumentando la mortalidad temprana. Sin embargo, las semillas que se imbibieron sin ningún tratamiento tenían porcentajes de germinación similares a las semillas limadas manualmente, pero producían plántulas de menor calidad. Se concluyó que los métodos de escarificación deberían adaptarse a la fuente de semillas específica para maximizar el éxito en la restauración (Sugiyama et al., 2021).

Con relación al ácido giberélico, se ha observado que su aplicación puede ser beneficiosa para superar la dormancia en diferentes especies vegetales (Nicolás et al., 1996; Rehman y Park, 2000; Samuel et al., 2009). En un estudio sobre la escarificación de la especie *Givotia rottleriformis* Griff, se descubrió que la degradación de la cubierta con ácido sulfúrico y el uso de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) en combinación con un medio de cultivo específico de Murashige y Skoog (MS) permitieron alcanzar una alta tasa de germinación, a pesar de que esta planta tiene semillas con una larga dormancia física. Además, las plántulas generadas *in vitro* y las plantas multiplicadas por micropropagación se trasplantaron con una tasa de éxito del 70% y el 60%, respectivamente (Samuel et al., 2009). Por otro lado, las semillas de *Fagus sylvatica* presentan dormancia física y endógena (influenciada por factores internos) que se supera eliminando la cubierta de la semilla y aplicando un tratamiento en frío a 4°C durante un periodo de más de 8 semanas, junto con ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ). La aplicación de ácido abscísico (ABA) en combinación con un tratamiento en frío reduce la síntesis de proteínas, pero aumenta ligeramente la de ARN, evitando la liberación de la dormancia y manteniendo las semillas en estado no germinativo. La aplicación de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) rompe la dormancia y

contrarresta los efectos del ABA en el ADN y proteínas, lo que indica que ABA y GA<sub>3</sub> regulan el metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas durante la dormancia, actuando de manera antagónica (Nicolás et al., 1996).

Las semillas de *Koelreuteria paniculata* Laxm sin escarificar no germinan debido a una cubierta dura e impermeable (Rehman y Park, 2000). La eliminación de esta cubierta ayuda a superar la dormancia física (Nicolás et al., 1996). La aplicación de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en concentraciones de 100, 200 y 300 ppm mejoró la germinación de las semillas escarificadas mecánicamente al perforar las semillas con una aguja en el extremo del cotiledón (Tabla 1). Además, el preenfriamiento en agua destilada durante 60 días aumentó la germinación al 44%. Las semillas enfriadas con GA<sub>3</sub> también mostraron una mejora significativa en la germinación, alcanzando tasas máximas después de 30 días. Sin embargo, se observó que un enfriamiento prolongado en GA<sub>3</sub> tenía efectos negativos en la germinación. Es importante destacar que las semillas fueron esterilizadas en su superficie en una solución al 5% de NaOCl durante 10 min, seguido de un enjuague con agua esterilizada antes del pretratamiento. En resumen, las semillas de *K. paniculata* tienen latencia tanto exógena como endógena, y la combinación de GA<sub>3</sub> y el enfriamiento ayudó a superar esta latencia en un período relativamente corto (Rehman y Park, 2000).

En otro estudio, se recolectaron frutos de *Prosopis juliflora* en la región de la Caatinga, Brasil, y se almacenaron las semillas. Luego, se realizaron tratamientos de escarificación en dos grupos de semillas: aquellas con endocarpos intactos y aquellas sin endocarpos. Los tratamientos consistieron en escarificación química con ácido sulfúrico en diferentes tiempos y escarificación mecánica con papel de lija. Las semillas con endocarpo se sumergieron en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 30, 60 o 90 minutos, y las semillas sin endocarpo se sumergieron en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 5, 20 o 40 minutos. Después de cada tratamiento, se enjuagaron las semillas y se esterilizaron. Las semillas se colocaron en cajas de germinación y se evaluó a lo largo del tiempo, registrando el tiempo de germinación y la sincronización. Las plántulas germinadas se trasladaron a bolsas con tierra y arena. Se observó que la escarificación con ácido sulfúrico aceleró el proceso, pero tratamientos prolongados dieron lugar a plántulas deformes (Miranda et al., 2011).

Con el objetivo de mejorar la germinación de las semillas de *Robinia pseudoacacia*, *Ailanthus altissima* y *Fraxinus excelsior*, se probaron diferentes tratamientos con ácido sulfúrico y agua caliente (Tabla 1). Los resultados indicaron que el tratamiento con un 50% de ácido sulfúrico tenían las tasas de germinación más alta para las semillas de *R. pseudoacacia*, *A. altissima* y *F. excelsior*, mientras que el control y los tratamientos con un 95% de ácido sulfúrico tenían las tasas más bajas, en especial en *F. excelsior* (Figura 1). Reducir la concentración de ácido sulfúrico mejoró la germinación al dañar menos los embriones de las semillas y reducir la latencia, especialmente en *R. pseudoacacia*. En general, el tratamiento óptimo fue utilizar un 50% de ácido sulfúrico a 3°C durante 20 días (Deltalab et al., 2023).

Figura 1. Efecto de la escarificación con ácido sulfúrico en *Fraxinus excelsior*.



Nota. Elaboración propia con base a Deltalab et al. (2023).

Otro estudio describe tratamientos previos a la siembra atribuidos a la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de diversas especies, incluyendo *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica*, *Pongamia pinnata*, *Santalum album* y *Tamarindus indica*. Se investigaron diferentes métodos de escarificación para determinar el porcentaje, la tasa y el período de germinación. Los resultados mostraron que el tratamiento con ácido sulfúrico proporcionó la germinación más rápida y el mayor porcentaje, seguido del tratamiento con agua de coco, mientras que la escarificación mecánica retrasó la germinación. De esta manera, se recomienda el tratamiento con ácido sulfúrico concentrado al 10% durante una hora para la producción a gran escala de plántulas en viveros debido a su practicidad y bajo costo (Priyadharshini y Lekha, 2021). Sin embargo, es importante destacar que el uso de ácido sulfúrico concentrado tiene impactos ambientales adversos y debe tomarse precaución (Nourmohammadi et al., 2019).

Alrededor del 10% de las especies de árboles a nivel mundial enfrentan riesgo de extinción, y los patógenos desempeñan un papel creciente en dichas amenazas. La coextinción y las amenazas a los organismos asociados, resultantes de la pérdida o deterioro de sus árboles huéspedes, son fenómenos que deben ser evaluados con mayor profundidad (Jönsson y Thor, 2012). Un caso de esta situación es el marchitamiento del fresno europeo (*Fraxinus excelsior*), provocado por el hongo *Hymenoscyphus fraxineus*. Sin embargo, su extinción podría evitarse con el uso de los embriones cigóticos (semillas) para la organogénesis auxiliar indirecta que ha demostrado ser el tipo de explante más efectivo para la micropropagación. Lo anterior permite obtener muchas plántulas a partir de poco material vegetal, con la capacidad de aclimatarse de manera exitosa por el enraizamiento (Nawrot-Chorabik et al., 2023).

La luz y agua son factores importantes para la aclimatación de plantas, tanto silvestres y como cultivadas en invernaderos. El estudio de estos aspectos aporta conocimientos para la conservación de plantas en peligro de extinción. Las plántulas silvestres demuestran una mayor resistencia a la deficiencia de agua, mientras que la intensidad lumínica afecta la fotosíntesis. En contraste, en las plántulas cultivadas ocurre lo opuesto, ya que requieren una elevada luminosidad para su saturación, dado que han sido expuestas a altas intensidades de luz. De esta manera, las plántulas cultivadas son capaces de realizar ajustes fotoquímicos para sobrevivir y tolerar condiciones de deficiencia de agua y exceso de luz (Hernández-González et al., 2020).

La mejora de la germinación de semillas de especies nativas es esencial para apoyar la restauración de ecosistemas degradados. En este contexto, las semillas de la especie *Schizolobium parahyba* tienen baja germinación por su dormancia física, impidiendo su propagación. Se evaluaron los efectos de tratamientos de escarificación mecánica y ácida. Se encontró que las semillas sometidas a escarificación mecánica tuvieron una alta germinación, superando a las semillas tratadas con ácido. En particular, las soluciones de ácido clorhídrico al 50% y 75% mostraron resultados prometedores para mejorar la propagación a gran escala de *Schizolobium parahyba* (Tabla1), lo que puede ser fundamental para la conservación en ecosistemas degradados (Salazar y Ramírez, 2019).

Tabla 1. Comparación de tratamientos de escarificación en especies arbóreas en el mundo.

Especie	Tratamiento	Porcentaje de germinación
<i>R. pseudoacacia</i>	Control (Agua destilada)	34
	Ácido sulfúrico al 95%	28
	Ácido sulfúrico al 50%	72
	Agua caliente a 95°C	48
<i>A. altissima</i>	Control (Agua destilada)	26
	Ácido sulfúrico al 95%	20
	Ácido sulfúrico al 50%	60
	Agua caliente a 95°C	40
<i>F. excelsior</i>	Control (Agua destilada)	18
	Ácido sulfúrico al 95%	12
	Ácido sulfúrico al 50%	56
	Agua caliente a 95°C	32
<i>S. Parahyba</i>	Control	17.5
	Disrupción mecánica	92.5
	Ácido sulfúrico al 10% durante 5 min	50
	Ácido clorhídrico al 50% durante 10 min	61
	Ácido clorhídrico al 75% durante 5 min	64
<i>G. caspica</i>	Control	4
	Ácido sulfúrico 98% durante 60 min	99
	KNO <sub>3</sub> al 1% durante 48 h	7
	Agua caliente a 100°C	77
<i>K. paniculata</i>	Control	0
	Perforación con aguja + GA 100 ppm	17
	Perforación con aguja + GA 200 ppm	18
	Perforación con aguja + GA 300 ppm	15

Nota. Elaboración propia con datos tomados de Deltalab et al. (2023), Salazar y Ramírez (2019), Nourmohammadi et al. (2019) y Rehman y Park (2000).

**Especies arbóreas en América**

Un estudio se centró en tres especies importantes con tasas de germinación o supervivencia de plántulas variables: *Ebenopsis ebano*, *Cordia boissieri* y *Zanthoxylum fagara*. Se evaluaron los efectos de diferentes tratamientos químicos de semillas (ácido sulfúrico, ácido giberélico y ácido indol-3-butírico) en la germinación, así como los efectos en el crecimiento de las plántulas. Se evidenció que la germinación de *E. ebano* mejoró con el tratamiento de ácido sulfúrico, la de *C. boissieri* con ácido giberélico, mientras que *Z. fagara* fue baja en todos los tratamientos (Tabla 2). Estos resultados sugieren que la mejora de las prácticas de germinación podría aumentar la germinación de *E. ebano* en un 10 a 20% y potencialmente duplicar la germinación de *C. boissieri*. No obstante, el ácido indol-3-butírico (IBA) no promovió la germinación en ninguna de las especies estudiadas (Luera et al., 2021).

En el ámbito de la investigación, se ha sugerido que la escarificación mecánica es una estrategia eficaz para estimular la germinación de semillas (Kuswanto y Li'aini, 2022; Miranda et al., 2011; Rehman y Park, 2000; Salazar y Ramírez, 2019). En un estudio, se emplearon tratamientos de escarificación mecánica y choques con agua hirviendo durante diferentes duraciones para promover la germinación de las semillas de *Enterolobium cyclocarpum* y *Piscidia piscipula* (Tabla 2). La escarificación mecánica resultó eficaz para mejorar la germinación de las semillas de *Enterolobium cyclocarpum*, alcanzando una tasa del 92%. Respecto a las semillas de *Piscidia piscipula* (Figura 2), el tratamiento de choque con agua hirviendo durante 10 segundos resultó en una tasa de germinación del 76% (Arceo-Gómez et al., 2022). Otras metodologías respaldan la idea de que el agua a 100°C acelera la emergencia y favorece la obtención de un mayor número de plántulas en *P. piscipula* (Castillo et al., 2020). Por otro lado, es posible emplear la escarificación ácida para lograr la germinación *in vitro* en *Piscidia piscipula*, debido a las características de sus semillas (Figura 2).

Tabla 2. Comparación de tratamientos de escarificación en especies arbóreas en América

Especies	Tratamiento	Porcentaje de germinación
<i>E. ebano</i>	Control	0
	Ácido sulfúrico durante 50 min	100
	Ácido giberélico a 100 mg/L	15
	Ácido indol-3-butírico	0
<i>C. boissieri</i>	Control	0
	Ácido sulfúrico a 120 min	3
	Ácido giberélico a 500 mg/L	20
	Ácido indol-3-butírico	0
<i>Z. fagara</i>	Control	0
	Ácido sulfúrico	0
	Ácido giberélico	0
	Ácido indol-3-butírico	0
<i>E. Cyclocarpum</i>	Control	9
	Escarificación mecánica con bisturí	92
<i>P. piscipula</i>	Agua hirviendo durante 10 s	61
	Control	23
<i>P. piscipula</i>	Escarificación mecánica con bisturí	38
	Agua hirviendo durante 10 s	76

Nota. Elaboración propia basado en Luera et al. (2021) y Arceo-Gómez et al. (2022).

Los tratamientos de escarificación y choques térmicos aplicados representan una prometedora solución para superar la dormancia física, lo cual podría tener un impacto significativo en la agricultura sostenible, la restauración de ecosistemas degradados, la investigación botánica y la conservación de la biodiversidad en la región de la Península de Yucatán. Estos métodos no solo facilitan la germinación de estas especies de árboles, sino que también abren nuevas posibilidades a la comprensión y el fomento de la propagación de plantas nativas en este ecosistema.

Figura 2. *Piscidia piscipula*: a) Fruto tipo vaina b) Semillas sin tratamiento, c) Germinación *in vitro* de semillas después de un tratamiento ácido.



Nota. Elaboración propia.

### Escarificación de semillas de orquídeas

#### Orquídeas terrestres

En el ámbito de la germinación de semillas de orquídeas (familia Orchidaceae) se han explorado diversos enfoques y tratamientos para superar los desafíos relacionados con la dormancia (Deconninck y Gerakis, 2021; Katsalirou et al., 2019; Pierce et al., 2018; Rasmussen, 1992; Zale et al., 2022). Se ha observado que la relación de los hongos y las raíces de diversas orquídeas terrestres pueden influir en el proceso de germinación (Pierce et al., 2018; Rasmussen, 1992). En *Epipactis palustris* las semillas necesitan ser incubadas con un hongo y sometidas a una escarificación con  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  (Tabla 3). Este proceso implica la incubación a temperatura de  $20^\circ\text{C}$ , seguida de una estratificación en frío a  $4\text{-}8^\circ\text{C}$  durante 8-12 semanas. A pesar de que la tasa de germinación es baja, se considera un éxito, ya que es complicado cultivarla en condiciones *in vitro*. La escarificación de la testa con hipoclorito incrementa la germinación, pero la mayoría de las semillas requieren incubación a  $20^\circ\text{C}$  antes de responder a temperaturas frías. La presencia de un hongo compatible resulta importante para la germinación, lo cual coincide con el hábitat natural donde las semillas permanecen húmedas en el suelo durante meses antes del frío invernal. Las bajas temperaturas activan procesos esenciales para el desarrollo de plántulas y micorrizas (Rasmussen, 1992). En la germinación, las condiciones ambientales y los hongos específicos del hábitat de las orquídeas asociadas desempeñan un papel fundamental (Quijía-Lamiña et al., 2023; Rasmussen, 1992).

Por otro lado, se examinó el impacto de la enzima lacasa fúngica en la germinación de las semillas de *Anacamptis morio*. Se encontró que la lacasa estimula de manera más efectiva la germinación de sus semillas en comparación con el método convencional de escarificación química mediante lejía ( $\text{NaClO}$ ) (Tabla 3). La acción de la lacasa se centra en descomponer la lignina presente en la cubierta de la semilla, facilitando así la absorción de agua. Este descubrimiento sugiere que la técnica enzimática de escarificación puede ser una alternativa eficaz y menos invasiva para mejorar la germinación de las semillas de esta especie de orquídea (Pierce et al., 2018). La descomposición de la lignina por parte de la lacasa resalta la importancia de entender los procesos bioquímicos implicados en la dormancia de las semillas y señala posibles innovaciones en las estrategias de propagación y cultivo de orquídeas terrestres.

En la propagación sexual *in vitro* de orquídeas terrestres, la desinfección de las semillas es crucial para prevenir infecciones y estimular la germinación. Se llevó a cabo una comparación de tres métodos de desinfección/escarificación para semillas de *Anacamptis laxiflora* (Tabla 3). Primero, las semillas se remojaron en solución desinfectante de 5 a 85 minutos. Después, se sembraron en Malmgren, un medio de cultivo modificado. Se encontró que un tratamiento químico prolongado mejora la germinación y reduce infección, la centrifugación no afecta, pero ralentiza la germinación y el pretratamiento con sacarosa y  $\text{NaClO}$  fue superior al uso de  $\text{NaClO}$  solo, ya que estimula la germinación de esporas en las semillas (Deconninck y Gerakis, 2021).

En otra investigación en orquídeas se evaluaron los tiempos óptimos de escarificación para especies con capas de semillas delgadas semipermeables (*Anacamptis laxiflora*) y gruesas impermeables (*Himantoglossum robertianum*). Se encontró que cuanto más dura el tratamiento químico, menor es el porcentaje de infección y mayor es el porcentaje de germinación en el rango de tiempos probados (Tabla 4). Un tratamiento químico de 85 minutos con solución de  $\text{NaClO}$  al 0.5% resulta en una germinación satisfactoria para ambos tipos de semillas (Katsalirou et al., 2019).

Tabla 3. Comparación de tratamientos de escarificación en especies de la familia Orchidaceae

Especies	Tratamiento	Porcentaje de germinación
<i>A. morio</i>	Control (NaClO al 10% durante 10 min)	23.7
	Lacasa 1 U durante 6 meses	49.8
<i>A. laxiflora</i>	NaClO al 0.5% durante 85 min	50
	NaClO al 0.5% + centrifugación durante 85 min	19
	Sacarosa + NaClO al 0.5% durante 85 min	55
<i>V. planifolia</i>	Control (Cal clorada 66 g/L durante 30 min)	30
	0.1 M HCl durante 30 min	62
	50% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> durante 3 min	5
<i>E. elongatum</i>	Control durante 48 h	14.6
	Cloro 0.5% durante 6 h	58.6
	Cloro 1% durante 6 h	1.3
	Agua desionizada durante 24 h	100
	Sacarosa 10% durante 48 h	97.3
<i>E. fimbriatum</i>	Control durante 48 h	9.3
	Cloro 0.5% durante 6 h	2.6
	Cloro 1% durante 6 h	12
	Agua desionizada durante 48 h	96
	Sacarosa 10% durante 24 h	98.6
<i>E. elongatum</i>	Control durante 48 h	81.3
	Cloro 0.5% durante 24 h	96
	Cloro 1% durante 24 h	82.6
	Agua desionizada durante 48 h	98.6
	Sacarosa 10% durante 48 h	96
<i>E. palustris</i>	Ca(OCl) <sub>2</sub> por 0.5 h	9.2
	Ca(OCl) <sub>2</sub> por 1 h	19.8
	Ca(OCl) <sub>2</sub> por 2 h	28.2
	Ca(OCl) <sub>2</sub> por 4 h	24
	Ca(OCl) <sub>2</sub> por 8 h	21.8

Nota. Elaboración propia con datos tomados de Pierce et al. (2018); Deconninck y Gerakis (2021); Šoch et al. (2023); Salazar Mercado et al. (2020).

En el caso de *Spiranthes ochroleuca* se resalta la importancia de un breve periodo de escarificación debido a las estrategias particulares desarrolladas por esta especie para lograr la germinación. Estas estrategias están relacionadas con su delgada cubierta de semillas, la presencia de aire entre las capas, la composición química específica y su capacidad de absorber agua. Por lo tanto, las semillas de *S. ochroleuca* requieren de una esterilización rápida (3 minutos) con hipoclorito de sodio al 10%, ya que un tiempo prolongado podría resultar en daño o muerte de las semillas. Para mejorar la germinación de las semillas de *S. ochroleuca*, se sugiere probar diversos métodos de preparación. Esto incluye considerar el tratamiento ultrasónico después de una limpieza química inicial o el cultivo de embriones jóvenes (Zale et al., 2022). Estas estrategias alternativas podrían ofrecer enfoques más efectivos y menos perjudiciales para optimizar el proceso de germinación de esta especie en particular.

En el proceso de crecimientos de las plántulas de *S. ochroleuca* se ha comprobado la importancia de la iluminación y se han identificado los sustratos óptimos para la aclimatación de estas. Las observaciones realizadas durante este proceso indican que las plántulas que crecen en completa oscuridad presentan signos de etiolación, un fenómeno caracterizado por un crecimiento anormal y alargado debido a la falta de luz (Figura 3). En plántulas cultivadas en la oscuridad, la etiolación se relaciona con la escotomorfogénesis. La exposición a la luz induce la desetiolación, marcada por la transición de etioplasto a cloroplasto y un cambio a crecimiento fotomorfogénico (Armarego-Marriott et al.,

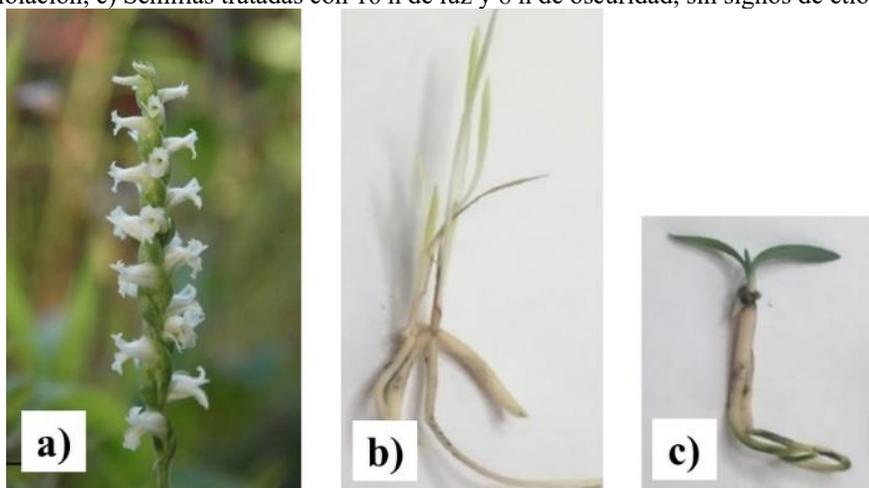
2019). Por lo tanto, se evidencia que las plántulas expuestas a la luz experimentan un crecimiento más saludable (Zale et al., 2022). La conexión entre estos fenómenos destaca la importancia crucial de las condiciones lumínicas en el desarrollo adecuado de las plántulas.

Tabla 4. Porcentajes de germinación del tratamiento con NaClO al 0.5% en las especies de *A. laxiflora* y *H. robertianum*

Duración (min)	<i>A. laxiflora</i>	<i>H. robertianum</i>
5	9.5	25
15	15	31
25	23	40
35	34	49
45	48	57
55	60	65
65	75	72
75	85	79
85	90	84

Nota. Elaboración propia con datos tomados de Katsalirou et al. (2019).

Figura 3. *Spiranthes ochroleuca*: a) Flor, b) Semillas tratadas con 0 h de luz y 24 h de oscuridad, mostrando signos de etiolación, c) Semillas tratadas con 16 h de luz y 8 h de oscuridad, sin signos de etiolación.



Nota. Elaboración propia a partir de Zale et al. (2022).

En el proceso de aclimatación ex vitro, se debe prestar especial atención a la selección de sustratos adecuados para asegurar la supervivencia de las plantas en ambientes naturales, como un invernadero o hábitat natural (Zale et al., 2022; Kang et al., 2020). Se ha observado que diferentes sustratos tienen un impacto significativo en las tasas de supervivencia de *Spiranthes ochroleuca*, siendo el musgo de Nueva Zelanda (NZ) el que presenta la tasa más alta de supervivencia (95%) y flores (20%), mientras que la mezcla de componentes de Jardines de Longwood (LWG) muestra la tasa más baja de supervivencia (55%) y flores (10%) (Zale et al., 2022).

#### Orquídeas epífitas

A medida que las semillas de *Vanilla planifolia* maduran, la capa exterior de la cubierta se vuelve impermeable debido a la acumulación de lignina y compuestos fenólicos, que inducen dormancia en las semillas (Yeh et al., 2021). Utilizando *V. planifolia* como caso de estudio debido a las características de sus semillas (Figura 4), se emplea una combinación de ácido y soluciones de hipoclorito para romper la dormancia física y fisiológica de sus semillas (Tabla 3), logrando una mejora significativa en el porcentaje de germinación (Šoch et al., 2023; Yeh et al., 2021). Sin embargo,

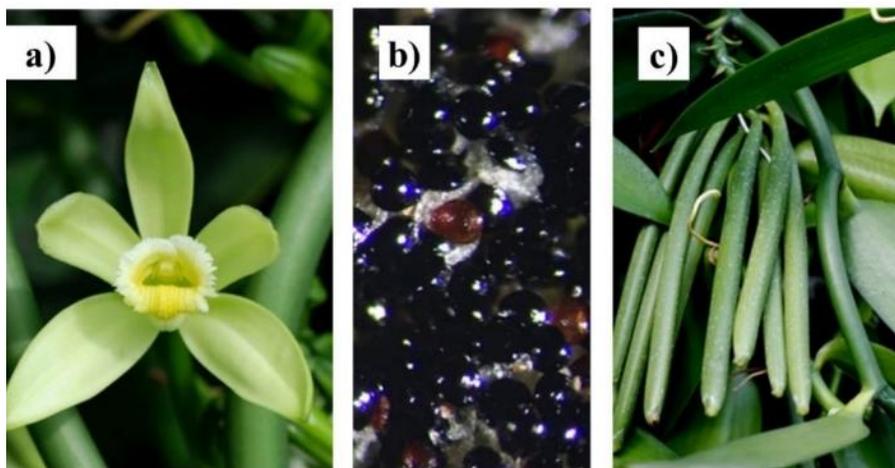
es preciso tener en cuenta que no se deben utilizar concentraciones fuertes de ácido sulfúrico, ya que esto podría causar daño a las semillas, impidiendo su germinación (Yeh et al., 2021). Además, se ha observado que remojar las semillas maduras de *V. planifolia* en una solución de hipoclorito de sodio al 4% durante un tiempo de 80 minutos incrementa la tasa de germinación. Durante el desarrollo, se aprecian cambios anatómicos en las semillas que influyen en el proceso de germinación (Yeh et al., 2021).

Este enfoque revela una adaptación de este tipo de semillas a la dispersión por animales, fenómeno conocido como dispersión endozoocórica (Šoch et al., 2023). En un estudio anterior, se demostró por primera vez la endozoocoria en *Vanilla*, y se destacó la importancia de la escarificación química de las semillas para sincronizar la germinación. Esto se debe a que las semillas son consumidas por aves y las capas duras de las semillas requieren la acción de los ácidos digestivos de estas (Pansarin, 2021).

En contraste, la implementación del sistema de inmersión temporal (SIT) en explantes de *V. planifolia* permitió que los tejidos vegetales absorban nutrientes, la cual fue evaluada mediante la variación de frecuencias y tiempos de inmersión para optimizar la micropropagación. Se observó que el SIT facilitó la iniciación de raíces con un éxito del 90% y demostró resultados positivos en trasplante y aclimatización, alcanzando una tasa de supervivencia del 90%. Estos hallazgos presentan opciones para la multiplicación a gran escala de vainilla después del proceso de escarificación (Ramos-Castellá et al., 2014).

Las necesidades nutricionales varían entre distintas especies de orquídeas, como en las semillas de *Gastrochilus matsuran*, que prosperan óptimamente en un medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) sin vitaminas. La adición de agua de coco (CW) al medio de cultivo MS propició un incremento del 95.4% en la germinación de las semillas de *Gastrochilus japonicus*, así como un aumento del 72.8% en las de *G. matsuran*. Para obtener la tasa de germinación más favorable del 93% en *G. matsuran*, se ha utilizado una combinación de 5% de CW, 1  $\mu\text{M}$  de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (NAA) y 1.5  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ). Además, la inclusión de tiazurón (TDZ) en el medio de cultivo mejora la formación de protocormos y protocormos secundarios (Kang et al., 2020).

Figura 4. *Vanilla planifolia*: a) Flor, b) Morfología de las semillas, c) Vainas en desarrollo.



Nota. Elaboración propia a partir de Yeh et al. (2021).

Para mejorar la germinación de semillas de *Vanilla planifolia*, se propone el uso de un medio de cultivo denominado BM-1, en conjunto con una temperatura de 30°C para obtener resultados positivos (Šoch et al., 2023). Las semillas de *V. bahiana*, *V. aff. odorata*, *V. phaeantha*, *V. planifolia* y *V. pompona* se desinfectaron y escarificaron con ácido sulfúrico durante 60 segundos, comparándolas con un grupo de control de semillas no escarificadas. Posteriormente, todas las semillas se introdujeron en frascos esterilizados que contenían el medio de cultivo MS y se supervisó el crecimiento de las plántulas a lo largo de un año. En todas las especies evaluadas, el proceso de germinación inició 3 meses después de la inoculación en las semillas escarificadas, mientras que, en las semillas no escarificadas, el proceso se retrasó y comenzó 9 meses después de la inoculación. Se observaron diferencias significativas en la germinación entre las semillas escarificadas y las no escarificadas, pero no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes especies en el grupo de semillas escarificadas (Pansarin, 2021).

Se realizaron diversos tratamientos en semillas de *Epidendrum* para mejorar la prueba de tetrazolio (Tabla 3), una técnica para evaluar la viabilidad de semillas. Se observó que el uso de agua desionizada mejoró la eficacia de la prueba de tetrazolio (0.25%) en ciertas especies de *Epidendrum*: *Epidendrum elongatum*, *Epidendrum fimbriatum* y *Epidendrum microtum*. Además, se identificó una alta correlación entre la viabilidad y la germinación al emplear agua desionizada y sacarosa al 10%. Aunque los resultados fueron consistentes en ambas sustancias, se sugiere el uso de agua destilada por consideraciones económicas (Salazar Mercado et al., 2020).

En un estudio donde se replicaron las fluctuaciones diarias de temperatura que ocurren en el hábitat de *Dracula felix*, una orquídea tropical ecuatoriana, las semillas maduras de una población nativa de esta especie perdieron su viabilidad con el tiempo y en temperaturas extremas. Aunque la germinación fue baja en todos los tratamientos, mejoró a 17/22 °C en comparación con temperaturas constantes. Sin embargo, las etapas tempranas del desarrollo de las plántulas solo se observaron en ciertos medios y condiciones de temperatura y luz. A pesar de probar hongos simbióticos, no se mejoró la germinación ni el desarrollo de las plántulas (Quijia-Lamiña et al., 2023).

En orquídeas epífitas tropicales de Ecuador, como *Cyrtochilum myanthum*, *Scaphyglottis punctulata* y *Stelis superbiens*, se observa una diversidad de hongos similar a las especies terrestres. La falta de éxito en el estudio de Quijia-Lamiña et al. (2023) sugiere que no se seleccionaron los hongos apropiados para la germinación o el desarrollo de las plántulas. La corrección de esta elección podría resultar en una tasa de germinación más alta (Novotná et al., 2018). Con respecto a los factores que determinan la estructura de la comunidad micorrízica, el conocimiento que se tiene es limitado. Se ha sugerido que las poblaciones de orquídeas epífitas examinadas poseen comunidades micorrízicas específicas para cada sitio, estructuradas en torno a especies fúngicas clave (Cevallos et al., 2016). Esta información es crucial para encontrar la manera de conservar especies en peligro bajo diferentes condiciones climáticas y mediante el uso de soluciones esterilizantes como hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio (Quijia-Lamiña et al., 2023). Además, otra opción se encuentra en la micropropagación, ya que ha demostrado ser una herramienta valiosa para conservar especies en peligro. En este contexto, la propagación controlada en condiciones de laboratorio facilita la producción eficiente de plántulas, un elemento relevante para su preservación (Kang et al., 2020).

Las especies arbóreas tienen mejor respuesta al ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, contrario, a las orquídeas, que tienen mejores respuestas de germinación empleando agua desionizada y sacarosa (Figura 5).

Figura 5. Factores determinantes de la germinación con base en el porcentaje de germinación obtenido con las sustancias empleadas para la escarificación.



Nota. Elaboración propia.

### Conclusiones

En muchas especies arbóreas las semillas están protegidas por cubiertas duras que impiden su germinación, al evitar la entrada de agua y nutrientes. Para eliminar esta barrera, se usan medios mecánicos o sustancias degradantes como el ácido sulfúrico o el ácido clorhídrico. En cambio, en las orquídeas, con semillas pequeñas y vulnerables a infecciones durante la germinación, se emplean soluciones desinfectantes para protegerlas y facilitar el rompimiento de la cubierta de la semilla. Se ha sugerido que el agua desionizada y la sacarosa, junto a la adecuada selección de un hongo compatible, son efectivas para la germinación. El desarrollo exitoso de las plántulas en especies arbóreas depende de

condiciones luminosas ideales, mientras que, para las orquídeas, tanto la luz como la temperatura son factores clave para el desarrollo de las plántulas. No obstante que la mayoría de las investigaciones se enfocan en la germinación inicial después de la escarificación, faltan estudios diseñados a largo plazo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. La influencia de la variabilidad genética en la eficacia de la escarificación y la adaptación de los procedimientos a diferentes poblaciones de plantas son áreas poco exploradas. También se plantea la posibilidad de combinar la escarificación con técnicas como la micropropagación para producir plántulas a gran escala.

#### Referencias bibliográficas

- Arceo-Gómez, T. M., Robles-Díaz, E., Manrique-Ortega, M., Martínez-Campos, Á. R., Aragón-Gastélum, J. L., Aguirre-Crespo, F., Ramírez-Albores, J. E., Pérez-Suárez, M., Robles, R., Reyes-Trujeque, J., Can-Estrada, A. A., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Sánchez-Soto, B. H., y Zamora-Crescencio, P. (2022). Pre-Germinative treatments and morphophysiological traits in *Enterolobium cyclocarpum* and *Piscidia piscipula* (Fabaceae) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Plants*, *11*(21), 1-14. <https://doi.org/10.3390/plants11212844>
- Armarego-Marriott, T., Sandoval-Ibáñez, O., y Kowalewska, Ł. (2019). Beyond the Darkness: Recent lessons from etiolation and de-etiolation studies. *Journal of Experimental Botany*, *71*(4), 1215-1225. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz496>
- Burrows G. E., Alden R., y Robinson W. A. (2019). Markedly different patterns of imbibition in seeds of 48 *Acacia* species. *Seed Science Research*, *29*(4), 270-282. <https://doi.org/10.1017/S0960258519000242>
- Castillo, B. B. D., Valdivia, N. A. G., y Hernández, J. I. C. (2020). Emergencia y crecimiento de plántulas de *piscidia piscipula* (L.) sarg. en condiciones de vivero. *Acta Universitaria*, *30*, 1-9. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2595>
- Cevallos, S., Sánchez-Rodríguez, A., Decock, C., Declerck, S., y Suárez, J. P. (2016). Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids? *Mycorrhiza*, *27*(3), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0746-8>
- Deconninck, G., y Gerakis, A. (2021). Influence of scarification method on seed germination of the terrestrial orchid *Anacamptis laxiflora* (Lam.). *The eurobiotech journal*, *5*(1), 15-23. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0004>
- Deltalab, B., Naziri Moghadam, N., Khorrami Raad, M., y Kaviani, B. (2023). The effect of cold and acid scarification on seed germination of three green space tree species, *Journal of Ornamental Plant*, *13*(2), 85-97. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.28210093.2023.13.2.2.5>
- Dessi, L., Podda, L., Brundu, G., Lozano, V., Carrouée, A., Marchante, E., Marchante, H., Petit, Y., Porceddu, M., y Bacchetta, G. (2021). Seed germination ecophysiology of *Acacia dealbata* link and *Acacia mearnsii* de Wild.: two invasive species in the Mediterranean Basin. *Sustainability*, *13*(21), 1-15. <https://doi.org/10.3390/su132111588>
- Hernández-González, O., Romo-Campos, R. L., Muñoz-Castro, M. A., y Flores, J. (2020). Light and irrigation effects on chlorophyll fluorescence depend on seedling provenance in *Magnolia pugana* endemic of Mexico. *Flora*, *271*, 151684. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151684>
- Jaganathan, G. K. (2018). Physical dormancy alleviation and soil seed bank establishment in *Cassia Roxburghii* is determined by soil microsite characteristics. *Flora*, *244-245*, 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.06.004>
- Jönsson M. T., y Thor, G. (2012). Estimating Coextinction risks from epidemic tree death: Affiliate lichen communities among diseased host tree populations of *Fraxinus excelsior*. *PLOS ONE*, *7*(9), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045701>
- Kang, H., Kang, K., Kim, D. H., y Sivanesan, I. (2020). *In vitro* propagation of *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., an endangered epiphytic orchid. *Plants*, *9*(4), 524. <https://doi.org/10.3390/plants9040524>
- Katsalirou, E., Gerakis, A., y Haldas, X. (2019). Optimal scarification times for seeds of two Mediterranean orchids. *European Journal of Environmental Sciences*, *9*(1), 47-52. <https://doi.org/10.14712/23361964.2019.6>
- Kuswanto, F., y Li'aini, A. S. (2022). Mechanical scarification influence on *Gleditsia assamica* BOR water uptake and germination. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *14*(2), 160-167. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v14i2.36348>
- Luera, P., Wahl-Villarreal, K., Christoffersen, B. O., Treviño, A., Soti, P., y Gabler, C. A. (2021). Effects of scarification, phytohormones, soil type, and warming on the germination and/or seedling performance of three Tamaulipan thornscrub forest species. *Plants*, *10*(8), 1-40. <https://doi.org/10.3390/plants10081489>
- Miranda, R. Q., Oliveira, M. T. P., Correia, R. M., Almeida-Cortez, J. S., y Pompelli, M. F. (2011). Germination of *Prosopis juliflora* (SW) DC seeds after scarification treatments. *Plant Species Biology*, *26*(2), 186-192. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2011.00324.x>
- Nawrot-Chorabik, K., Pluciński, B., y Latowski, D. (2023). Indirect auxiliary organogenesis of *Fraxinus excelsior* L. as a tool for ash dieback control. *New Forests*. <https://doi.org/10.1007/s11056-023-09981-x>

- Nicolás, C., Nicolás, G., y Rodríguez, D. (1996). Antagonistic effects of abscisic acid and gibberellic acid on the breaking of dormancy of *Fagus sylvatica* seeds. *Physiologia Plantarum*, 96(2), 244-250. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00209.x>
- Nourmohammadi, K., Kartoolinejad, D., Naghdi, R., y Baskin, C. C. (2019). Effects of dormancy-breaking methods on germination of the water-impermeable seeds of *Gleditsia caspica* (Fabaceae) and seedling growth. *Folia Oecologica*, 46(2), 115-126. <https://doi.org/10.2478/foecol-2019-0014>
- Novotná, A., Benítez, Á., Herrera, P., Cruz, D., Filipczyková, E., y Suárez, J. P. (2018). High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience*, 59(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.07.007>
- Pansarin, E. R. (2021). Unravelling the enigma of seed dispersal in *Vanilla*. *Plant Biology*, 23(6), 974-980. <https://doi.org/10.1111/plb.13331>
- Pierce, S., Spada, A., Caporali, E., Ceriani, R., y Buffa, G. (2018). Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination. *Plant Biology*, 21(3), 409-414. <https://doi.org/10.1111/plb.12694>
- Priyadarshini, R., y Lekha, K. (2021). Effect of scarification methods on different forest seeds. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 6(3), 226-234. <https://doi.org/10.22161/ijeab.63.24>
- Quijia-Lamiña, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., y Zettler, L. W. (2023). *In vitro* seed germination and seedling development of *Dracula Felix* (Luer) Luer—An orchid native to Ecuador. *Diversity*, 15(6), 732. <https://doi.org/10.3390/d15060732>
- Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J. J., y Lee-Espinosa, H. E. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 50(5), 576-581. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9602-8>
- Rasmussen, H. N. (1992). Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum*, 86(1), 161-167. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01325.x>
- Rehman, S. U., y Park, I. (2000). Effect of scarification, GA and chilling on the germination of goldenrain-tree (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) seeds. *Scientia Horticulturae*, 85(4), 319-324. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00126-6)
- Salazar Mercado, S. A., Quintero Caleño, J. D., y Moreno Rozo, L. Y. (2020). Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae). *Journal of Seed Science*, 42, 1-8. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v42231028>
- Salazar, A., y Ramírez, C. (2019). Effects of mechanical and acid scarification on germination performance of *Schizolobium parahyba* (Fabaceae - Caesalpinioideae) seeds. *Journal of Tropical Biology & Conservation (JTBC)*, 16, 213-227. <https://doi.org/10.51200/jtbc.v16i0.2040>
- Samuel, K., Debashish, D., Madhumita, B., Padmaja, G., Prasad, S. R., Ramana Murthy, V. B., y Rao, P. S. (2009). *In vitro* germination and micropropagation of *Givotia rottleriformis* Griff. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 45(4), 466-473. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9181-7>
- Santillán-Fernández, A., Zúñiga, A. S., y Bautista, N. V. (2018). La productividad de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en México de 2003 a 2014. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(47), 050-069. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i47.165>
- Šoch, J., Šonka, J., y Ponert, J. (2023). Acid scarification as a potent treatment for an *in vitro* germination of mature endozoochorous *Vanilla planifolia* seeds. *Botanical Studies*, 64(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40529-023-00374-z>
- Sugiyama, A., Friday, J. B., Giardina, C. P., y Jacobs, D. F. (2021). Intraspecific variation along an elevational gradient alters seed scarification responses in the polymorphic tree species *Acacia koa*. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.716678>
- Yeh, C. H., Chen, K., y Lee, Y. I. (2021). Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies*, 62(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00311-y>
- Zale, P. J., Clayton, A., Nix, J., y Taylor, M. (2022). Asymbiotic *in vitro* seed germination, *in vitro* seedling development, and ex vitro acclimatization of *Spiranthes*. *Applications in Plant Sciences*, 10(5), 1-8. <https://doi.org/10.1002/aps3.11494>

