



# Conservación de semillas de orquídeas nativas en banco de germoplasma del Jardín Botánico Orquideario Soroa, Cuba

## Conservation of Native Orchid Seeds in the Germplasm Bank from Soroa Orchid Botanical Garden, Cuba

Maydelin Torres-Barrios<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0009-0008-8113-4583>

Alejandro Enrique Pedroso-Reynaldo<sup>2,3</sup> <https://orcid.org/0009-0001-2172-7650> | [alejandropedroso7@gmail.com](mailto:alejandropedroso7@gmail.com)

Esther Lilian Santacruz Cabrera<sup>4</sup> <https://orcid.org/0009-0000-2028-5988> | [lilyscruz@uart.edu.cu](mailto:lilyscruz@uart.edu.cu)

Elaine González Hernández<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7501-6360> | [uart.edu.cu](mailto:uart.edu.cu)

José Lázaro Bocourt Vigit<sup>4</sup> <https://orcid.org/0009-0001-8554-3893> | [uart.edu.cu](mailto:uart.edu.cu)

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medio Ambiente, Universidad de la Frontera. Temuco, IX Región, Chile. C.P: 4811230

<sup>2</sup>Student, PhD Program in Sciences, Mention in Applied Cellular and Molecular Biology, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. C.P: 4811230

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad Santo Tomas, Chile

<sup>4</sup>Jardín Botánico Orquideario Soroa. Candelaria, Artemisa, Cuba. C. P: 22700

\*Autor para correspondencia: [maydetorres1995@gmail.com](mailto:maydetorres1995@gmail.com)

Recibido: 6 de marzo de 2025

Aceptado: 11 de junio de 2025

Publicado: 31 de julio de 2025

### Resumen

**Objetivo.** Conservar a largo plazo semillas de 16 especies de orquídeas nativas de Cuba, mediante su incorporación al banco de germoplasma del Jardín Botánico Orquideario Soroa (JBOS). **Materiales y métodos.** Las semillas fueron recolectadas entre marzo y agosto de 2024 en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, el Parque Nacional Guanahacabibes y la colección del JBOS. Se evaluó la viabilidad celular mediante la prueba de tetrazolio al 1%,

### Abstract

**Objetivo.** This study aimed to ensure the long-term conservation of seeds from 16 native orchid species of Cuba by incorporating them into the Germplasm Bank of the Soroa Orchid Botanical Garden (JBOS). **Materials and methods.** Seeds were collected from March to August 2024 in the Sierra del Rosario Biosphere Reserve, Guanahacabibes National Park, and JBOS. Cellular viability was assessed using a 1% tetrazolium test, with viable and

cuantificando semillas viables e inviables. Se aplicó un modelo lineal generalizado mixto para analizar diferencias entre especies. **Resultados.** Revelaron una alta variabilidad interespecífica: cinco especies superaron el 85 % de viabilidad, mientras que otras siete presentaron valores por debajo del 70 %. En total, 11 especies fueron incorporadas al banco. La mayoría de las especies con alta viabilidad provinieron de la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, confirmando su importancia como fuente de germoplasma. **Conclusión.** Este estudio valida el uso de la prueba de tetrazolio como herramienta efectiva para evaluar la viabilidad celular en semillas de orquídeas nativas de Cuba, aportando criterios técnicos para su conservación *ex situ*. Resalta el valor de las reservas naturales como fuente clave de germoplasma viable.

### Palabras clave

Germoplasma, viabilidad, almacenamiento, tetrazolio.

non-viable seeds counted. A generalized linear mixed model was used to evaluate interspecific differences. **Results.** Showed notable variability: five species exceeded 85 % viability, while seven fell below 70 %. In total, 11 species were incorporated into the bank. Most highly viable species originated from the Sierra del Rosario, highlighting its relevance as a germplasm source. The tetrazolium test proved to be an effective tool for viability assessment and seed selection. **Conclusion.** This study validates the use of the tetrazolium test as an effective tool for assessing cell viability in seeds of native Cuban orchids, providing technical criteria for their *ex situ* conservation. It highlights the value of natural reserves as key sources of viable germplasm.

### Keywords

Germplasm, viability, storage, tetrazolium.

## Introducción

La familia Orchidaceae es una de las más diversas dentro del reino vegetal, con más de 27 800 especies distribuidas en 880 géneros (Givnish *et al.*, 2016), representando aproximadamente el 8 % de la flora mundial (Zhang *et al.*, 2018). Su distribución abarca gran variedad de ecosistemas, excluyendo únicamente los polos y desiertos extremos, con mayor diversidad en regiones tropicales, donde se encuentra el 56 % de las especies (Perez-Tarazona, 2024). Aproximadamente la mitad de las orquídeas son epífitas, mientras que el resto son lianas o terrestres (Martija-Ochoa, 2019). Presentan semillas ortodoxas sin endospermo (Pritchard *et al.*, 1999), lo que las hace dependientes de hongos micorrízicos en la naturaleza o de medios de cultivo en condiciones de laboratorio (Bermeo-Criollo y Sari-Cumbe, 2018). Su ciclo de vida es complejo y frecuentemente asociado a relaciones coevolutivas para su polinización; además, de su valor ecológico, las orquídeas tienen gran importancia económica en los sectores de la horticultura, ornamentación, farmacéutica y perfumería (Carrodeguas-González *et al.*, 2022).

En Cuba, Orchidaceae está representada por 93 géneros con una notable diversidad en *Pleurothallis*, *Lepanthes*, *Epidendrum*, *Encyclia* y *Vanilla*. Se reportan aproximadamente 311 especies, de las cuales el 31 % son endémicas (Mújica y González, 2015). A pesar de su riqueza biológica, muchas de estas especies están amenazadas debido a la actividad humana (Testé *et al.*, 2017). La destrucción y alteración de hábitats, junto con la extracción indiscriminada de individuos para el comercio, son las principales causas de su disminución poblacional (Álvarez

*et al.*, 2023). Estos factores han provocado el aumento de la frecuencia de orquídeas en listas de especies amenazadas y se considera una de las familias de angiospermas más amenazadas por la actividad humana (Ackerman, 2013; Mújica *et al.*, 2013).

Las estrategias de conservación de las orquídeas suelen enfocarse en la propagación, con el objetivo de reducir la recolección de ejemplares silvestres, reintroducir plantas en poblaciones naturales y asegurar su resguardo en bancos de semillas especializados (Dulic *et al.*, 2020; Seaton *et al.*, 2013). En este contexto, los bancos de germoplasma desempeñan un papel fundamental en la conservación *ex situ* segura de la biodiversidad, al garantizar la preservación segura y a largo plazo de especies en riesgo (Merritt *et al.*, 2014). Además, proporcionan recursos genéticos valiosos para programas de mejoramiento genético, programas de reproducción, reintroducción de especies, restauración de hábitats, disminución de la presión sobre las poblaciones silvestres y uso sostenible en el futuro (Cárdenas-Guarín *et al.*, 2022).

Las orquídeas ejemplifican la difícil situación de los recursos vegetales globales y, por lo tanto, proporcionan especies modelo ideales para el seguimiento ecológico y la focalización de los programas de conservación. Los jardines botánicos de todo el mundo han sido tradicionalmente importantes centros de excelencia en la horticultura, la investigación y la conservación de las orquídeas, ya que generan un amplio atractivo público y educativo (Swarts y Dixon, 2009).

Dada la relevancia de las orquídeas para la biodiversidad y la necesidad de su conservación, el presente estudio se centra en la conservación de semillas de 16 especies nativas de Cuba mediante su introducción en el banco de germoplasma del Jardín Botánico Orquideario Soroa (JBOS). Esta investigación tiene como objetivo principal resguardar el material genético de estas especies a largo plazo, contribuyendo a su preservación, reproducción y posible reintroducción en su hábitat natural.

## Materiales y métodos

### *Colección de semillas*

La colección de frutos de orquídeas se llevó a cabo entre marzo y agosto de 2024, abarcando las estaciones de primavera y verano. Este período coincide con la época de floración de la mayoría de las especies de orquídeas cubanas, lo que favorece la obtención de material reproductivo en estado óptimo (Mújica y González, 2015). Para ello se utilizó el Manual de recolección de semillas de plantas silvestres (Gold *et al.*, 2004) junto a una Guía de Colecta de Campo (Rosas *et al.*, 2009.) que incluye: nombre de la especie, descripción, caracteres que la distinguen, localidades de colecta de especímenes de herbario, mapa con puntos de colecta, información de cómo llegar a los puntos de colecta seleccionados, fechas de floración y fructificación y fotografía o imagen de la especie. Basado en esta Guía, se realizaron expediciones orientadas a recolectar semillas de orquídeas en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario (RBSR) y el Parque Nacional Guanahacabibes. Ambas zonas protegidas presentan una notable diversidad de formaciones vegetales que incluyeron bosques semidecíduos, siempreverdes, matorrales xerófitos y vegetación costera o de montaña (Aránega *et al.*, 2009; Fernández y Díaz, 2013; González *et al.*, 2016; Ricardo-Nápoles y Echeverría-Cruz, 2019). Esta heterogeneidad ecológica fa-

vorece una alta riqueza florística y endemismo, especialmente de orquídeas terrestres y epífitas, lo que convierte a ambos sitios en áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad en el occidente cubano. Se realizaron prospecciones para detectar plantas en flor, identificar la especie, georeferenciación del lugar y marcar en terreno con una etiqueta para reconocer las plantas con semillas maduras, para luego regresar después de 30 a 50 días (según la especie) a recolectar las semillas. También se colectaron semillas de la colección de orquídeas del JBOS.

### Especies colectadas

Se colectaron un total de 16 especies de orquídeas (cuadro 1), colectando cinco individuos con sus respectivos frutos por especie, las cuales se detallan a continuación:

Cuadro 1

Especies de orquídeas recolectadas en áreas protegidas del occidente de Cuba: Reserva de la Biósfera Sierra del Rosario, Parque Nacional Guanahacabibes y colección del Jardín Botánico Orquideario Soroa

Especie	Lugar de colecta	Hábito	Categoría*	Distribución	Referencias
<i>Coelia triptera</i> (Sm.) G. Don ex Steud.	RBSR	Epífita/litófita	NE	Distribución amplia regional	Pérez-Márquez <i>et al.</i> , 2010
<i>Epidendrum strobiliferum</i> Rchb.f.	RBSR	Epífita	NE	Poco común	Pérez-Márquez <i>et al.</i> , 2010
<i>Encyclia × brevifolia</i> (Jenn.)	PNG	Epífita	NE	Híbrido natural	Clavo <i>et al.</i> , 2016
<i>Encyclia bocourtii</i> Múj. Benítez & Pupulin	RBSR	Epífita	VU	Endémica, distribución limitada	Pupulin y Benítez, 2005
<i>Tolumnia lucayana</i> (Nash) Braem	JBOS	Epífita	EN	Endémica	Seijo <i>et al.</i> , 2010
<i>Cyrtopodium punctatum</i> (L.) Lindl.	RBSR	Terrestre	NE	Distribución amplia	Llamacho y Larramendi, 2005
<i>Prosthechea pygmaea</i> (Hook.)	RBSR	Epífita	NE	Distribución amplia	Pérez-Márquez <i>et al.</i> , 2010
<i>Laelia undulata</i> (Lindl.) L.O.Williams	JBOS	Epífita	NE	Distribución amplia	Mayo-Mosqueda <i>et al.</i> , 2022
<i>Encyclia gravida</i> (Lindl.) Schltr.	JBOS	Epífita	VU	Endémica	Llamacho y Larramendi, 2005
<i>Dendrophyllax porrectus</i> (Rchb. f.) Carlswald & Whitten	JBOS	Epífita	EN posible	Rara, riesgo local	Ackerman <i>et al.</i> , 2025
<i>Macradenia lutescens</i> R.Br.	PNG	Epífita	NE	Poco común	Dietrich, 1984
<i>Lepanthes dressleri</i> Hespénh.	RBSR	Epífita	EN	Endémica, muy restringida	García-González y Pérez-Márquez, 2011
<i>Nidema ottonis</i> (Rchb. f.) Britton & Millsp.	RBSR	Epífita	NE	Distribución amplia	Llamacho y Larramendi, 2005
<i>Broughtonia cubensis</i> (Lindl.) Cogn.	PNG	Epífita	EN	Endémica	Llamacho y Larramendi, 2005
<i>Encyclia cajalbanensis</i> Múj. Benítez & al.	JBOS	Epífita	VU	Endémica, distribución limitada	Benítez <i>et al.</i> , 2004
<i>Basiphyllaea wrightii</i> (Acuña) Nir	RBSR	Terrestre	VU	Endémica, distribución limitada	Pérez-Márquez <i>et al.</i> , 2010

Siglas: JBOS = Jardín Botánico Orquideario Soroa; RBSR = Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario; PNG= Parque Nacional Guanahacabibes. NE: No evaluada; EN: En peligro; VU: Vulnerable; \*Información proporcionada por la Lista Roja de la Flora de Cuba, 2016 (González-Torres *et al.*, 2016).

### *Almacenamiento de semillas*

Previamente al almacenamiento, se desinfectaron las cápsulas cerradas con hipoclorito al 30% y alcohol al 70% (Cerna *et al.*, 2014) y se depositaron en envases de plástico sellados con sílica gel previamente identificados. Cuando las cápsulas se abrieron se procedió a colocar las semillas en tubos de ensayos rotulados con el respectivo código y fecha. Posteriormente se desecaron las semillas en una campana de desecación durante dos días, para lo cual, se utilizó sílica gel como agente adsorbente de la humedad. El almacenamiento se realizó por tiempo indefinido.

### *Viabilidad celular*

La viabilidad de las semillas fue evaluada al iniciar el experimento, a través de la prueba de Tetrazolio [2, 3, 5- cloruro trifeníl tetrazolio (CTT)] al 1%; para ello se tomaron 10 mg de semillas de cada especie en tubos eppendorf de 2 ml, se añadió 1.5 ml de agua destilada durante 24 horas (imbibición) a temperatura ambiente, luego se retiró el agua destilada con una micropipeta y se añadió 1.5 ml de solución de sacarosa al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente, después se retiró la solución de sacarosa y se añadió la solución de CTT al 1% (1 g en 100 ml de buffer fosfato, pH 6.5); a continuación, se incubó en baño María a 40 °C, durante 24 horas, en total oscuridad. Los resultados se observaron en un microscopio (Wolfe, Japón) realizando el conteo de 100 semillas por réplica, de acuerdo con los estándares de viabilidad (Mercado *et al.*, 2020). Durante el conteo se anotan dos categorías: semillas viables: presenta una tinción roja uniforme y profunda del embrión (trifenilformazan rojo intenso) y semillas inviables: sin tinción o con tinción débil e irregular. Las semillas viables se tiñeron de rojo debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células (Salazar-Mercado y Gélvez-Manrique, 2015). La técnica fue adaptada con base en (Ossenbach *et al.*, 2007).

### *Almacenamiento en banco de germoplasma*

Estas muestras se almacenaron en frascos de vidrio de 5 ml en una nevera horizontal Royal a -18 °C en completa oscuridad por tiempo indefinido.

### *Análisis estadístico*

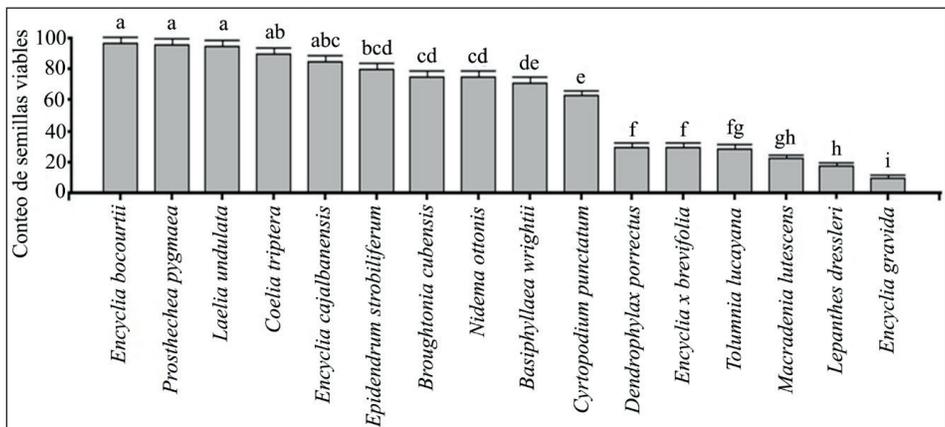
Las diferencias en el conteo de semillas viables entre especies de orquídeas fueron evaluadas mediante un modelo lineal generalizado mixto (MLGM), seguido de una prueba de comparación de medias utilizando el test de rango múltiple LSD Fisher. Para la estimación del modelo se asumió una distribución de Poisson, adecuada para datos de conteo, y se realizó una prueba de hipótesis marginales sobre los efectos fijos del modelo. El nivel de significancia se estableció en  $p \leq 0.05$ , salvo que se indique lo contrario. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software InfoStat versión 2020 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## Resultados

La figura 1 y el cuadro 2 muestran el conteo de semillas viables y la evaluación de viabilidad celular (%), respectivamente, mediante la prueba de tetrazolio [2, 3, 5- cloruro trifenil tetrazolio (CTT)] aplicada a semillas de 16 especies de orquídeas colectadas en la RBSR, el Parque Nacional Guanahacabibes y la colección del JBOS con la finalidad de incorporarlas al banco de germoplasma del JBOS. Las semillas destinadas a conservación en bancos de germoplasma deben presentar una viabilidad celular o germinativa igual o superior al 85 %, considerada óptima para almacenamiento a largo plazo. Viabilidades entre 70-84 % son aceptables en colecciones activas o para especies raras, mientras que valores inferiores al 70 % generalmente no se conservan, salvo en casos de especies críticas o escasas.

Figura 1

Conteo de semillas viables en 16 especies de orquídeas nativas de Cuba, colectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, el Parque Nacional Guanahacabibes y la colección del Jardín Botánico Orquideario Soroa (JBOS)



La viabilidad celular fue evaluada mediante la prueba de tetrazolio (1% CTT). Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de cinco réplicas por especie. Se aplicó un modelo lineal generalizado mixto (MLGM) seguido de la prueba post hoc LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre especies.

Los resultados revelaron variaciones de viabilidad notables entre las especies analizadas. Las especies: *Coelia triptera*, *Encyclia bocourtii*, *Prosthechea pygmaea*, *Laelia undulata* y *Encyclia cajalbanensis* presentaron los porcentajes más altos de viabilidad celular, con valores superiores al 85 %.

En un rango intermedio, con valores de viabilidad celular entre 70-80 % se situaron especies como *Epidendrum strobiliferum*, *Nidema ottonis*, *Broughtonia cubensis* y *Basiphylaea wrightii*; en contraste, *Cyrtopodium punctatum*, *Dendrophylax porrectus*, *Encyclia x brevifolia*, *Tolumnia lucayana*, *Encyclia grvida*, *Macradenia lutescens* y

*Lephanthes dressleri* mostraron valores por debajo del 70 %. En el caso de *Dendrophylax porrectus* y *Tolumnia lucayana*, pertenecientes a la colección del JBOS, su baja viabilidad podría estar asociada a dificultades en el proceso de polinización manual, dada la reducida dimensión de sus inflorescencias. El caso de *Dendrophylax porrectus* y *Lephanthes dressleri* se decidió incorporarlos al banco de germoplasma, a pesar de su baja viabilidad, porque son especies endémicas amenazadas. Finalmente, se lograron incorporar al banco de germoplasma del Jardín Botánico Orquideario Soroa un total de 11 especies de las 16 colectadas.

Globalmente, el 56 % de las especies estudiadas registraron un porcentaje de viabilidad celular superior al 70 %, de las cuales el 67 % proviene de la RBSR (*Coelia triptera*, *Epidendrum strobiliferum*, *Prosthechea pygmaea*, *Encyclia bocourtii*, *Nidema ottonis* y *Basiphyllaea wrightii*).

Cuadro 2  
 Conteo de semillas viables e inviables resultado de la prueba de tetrazolio

Especie	Semillas tinturadas (viables)	Semillas no tinturadas (inviables)	Viabilidad celular (%) = $\frac{\text{Semillas viables}}{100} \times 100$
	(Media ± EE)	(Media ± EE)	
<i>Encyclia bocourtii</i>	97 ± 4.40	3 ± 0.77	97
<i>Prosthechea pygmaea</i>	96 ± 4.38	4 ± 0.89	96
<i>Laelia undulata</i>	95 ± 4.36	5 ± 1.00	95
<i>Encyclia cajalbanensis</i>	85 ± 4.12	15 ± 1.73	85
<i>Coelia triptera</i>	90 ± 4.24	10 ± 1.41	90
<i>Basiphyllaea wrightii</i>	71 ± 3.77	29 ± 2.41	71
<i>Epidendrum strobiliferum</i>	80 ± 4.00	20 ± 2.00	80
<i>Nidema ottonis</i>	75 ± 3.87	25 ± 2.24	75
<i>Cyrtopodium punctatum</i>	63 ± 3.55	37 ± 2.72	63
<i>Tolumnia lucayana</i>	29 ± 2.41	71 ± 3.77	29
<i>Lepanthes dressleri</i>	18 ± 1.90	82 ± 0.49	18
<i>Macradenia lutescens</i>	23 ± 2.14	77 ± 3.92	23
<i>Encyclia xbrevisfolia</i>	30 ± 2.45	70 ± 3.74	30
<i>Dendrophylax porrectus</i>	30 ± 2.45	70 ± 3.70	30
<i>Broughtonia cubensis</i>	75 ± 3.87	25 ± 2.24	75
<i>Encyclia gravida</i>	10 ± 1.41	90 ± 4.24	10

Viabilidad celular (%). Total de semillas por especie: 100.

## Discusión

Este estudio tuvo como objetivo conservar a largo plazo el material genético de 16 especies de orquídeas, colectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario (RBSR), el Parque Nacional Guanahacabibes y la colección del Jardín Botánico Orquideario Soroa (JBOS). La iniciativa busca incorporarlas al banco de germoplasma del JBOS y así contribuir a su preservación, reproducción y eventual reintroducción en sus hábitats naturales, especialmente en el caso de especies endémicas clasificadas como vulnerables o en peligro de extinción. Los resultados obtenidos confirman la viabilidad e importancia de implementar estrategias efectivas de conservación *ex situ* para orquídeas nativas.

En este estudio se empleó la prueba de tetrazolio para determinar la viabilidad celular de las semillas de las especies colectadas. Las semillas destinadas a conservación en bancos de germoplasma a largo plazo deben presentar una viabilidad celular o germinativa igual o superior al 85 %. Viabilidades entre 70-84 % son aceptables en colecciones activas o para especies raras, mientras que valores inferiores al 70 % generalmente no se conservan (Wijnker *et al.*, 2024). Los resultados evidenciaron una considerable variabilidad entre especies: *Coelia triptera*, *Encyclia bocourtii*, *Prosthechea pygmaea* *Laelia undulata* y *Encyclia cajalbanensis* mostraron viabilidades superiores al 85 %, indicando la preservación de funciones metabólicas esenciales como la respiración y la síntesis proteica, lo que indica que la mayoría de las células embrionarias no sufren daños estructurales ni estrés severo, conservando sus funciones vitales (respiración, síntesis de proteínas, división celular); lo que se traduce en una mayor capacidad de germinación y desarrollo de plántulas sanas tanto en condiciones naturales como en cultivo *in vitro* (Pradhan *et al.*, 2022; Salazar-Mercado Gélvez-Manrique, 2015).

La alta viabilidad favorece el almacenamiento exitoso de semillas en bancos de germoplasma o mediante crioconservación (Andriolli *et al.*, 2023). Por lo que este parámetro constituye una condición crítica para evaluar la calidad fisiológica del material vegetal y su potencial en programas de rescate y micropropagación de especies amenazadas o con fines comerciales, ya que para ello se necesita material biológico sano y vigoroso (Salazar-Mercado y Gélvez-Manrique, 2015).

Estos altos porcentajes coinciden con estudios previos que identificaron el tetrazolio como método confiable para evaluar el potencial germinativo en Orchidaceae (Hosomi *et al.*, 2011). La prueba de tetrazolio es ampliamente utilizada para estimar la viabilidad de semillas de *Cattleya sp.*, *Anacamptis sp.*, *Dendrobium sp.*, *Catasetum sp.* y *Epidendrum sp.* con fines de propagación y conservación (Chacón-Velasco *et al.*, 2018; Magrini *et al.*, 2019a; Ribeiro *et al.*, 2021). Este método es recomendado debido a su eficiencia y facilidad de uso. Las semillas viables son fácilmente identificadas por su coloración roja característica debida a la reacción que ocurre en las células, las cuales liberan hidrógeno por la actividad deshidrogenasa en el proceso de la respiración. No obstante, la prueba se basa únicamente en las condiciones internas de las semillas y no revela el comportamiento combinado de su calidad con ciertas condiciones de crecimiento (Ossenbach *et al.*, 2007). Además, tratamientos como la desinfección y el uso de tintes afectan la detección de

semillas viables, lo que sugiere que manipulaciones previas a la viabilidad pueden inducir pérdida celular (Pradhan *et al.*, 2022).

Las especies con mayor viabilidad pueden mantenerse almacenadas por períodos prolongados, mientras que aquellas con menor viabilidad podrían requerir técnicas especializadas, como la criopreservación o ajustes en las condiciones de almacenamiento (Merritt *et al.*, 2014).

En el grupo con viabilidad intermedia (70-80 %), destacan especies como *Epidendrum strobiliferum*, *Nidema ottonis*, *Broughtonia cubensis* y *Basiphylloaea wrightii*, que, aunque no alcanzan el umbral óptimo, son consideradas viables para conservación en colecciones activas o en proyectos de propagación asistida. Es relevante subrayar el caso de *Broughtonia cubensis*, especie endémica y amenazada colectada en el Parque Nacional Guanahacabibes, que mostró valores superiores al 75 %, similar a lo reportado para la especie *Psychilis truncata*, perteneciente a la Alianza Broughtonia, la cual presentó una gran producción de semillas viables con mayor variabilidad genética (Cabrera-García *et al.*, 2022), lo que respalda su potencial para programas de conservación asistida y reproducción controlada y el mantenimiento de su hábitat. La incorporación de *Broughtonia cubensis* al banco representa una contribución tangible a los esfuerzos nacionales por preservar el patrimonio fitogenético cubano.

Por el contrario, especies como *Dendrophyllax porrectus*, *Tolumnia lucayana* y *Encyclia gravida* presentaron niveles de viabilidad celular inferiores al 70 %, límite considerado crítico para la conservación a largo plazo. Las dificultades asociadas a la polinización manual, especialmente en especies con inflorescencias pequeñas o mecanismos reproductivos especializados, coinciden con lo reportado en semillas de *Fernandezia sanguinea* bajo condiciones de polinización artificial (Montenegro, 2014). Además, las prácticas manuales pueden no replicar las condiciones óptimas de polinización natural (en términos mecánicos, químicos o de estimulación), lo que puede producir embriones parciales, daño celular o fecundación incompleta (Perkins *et al.*, 2023). En el caso de *Encyclia gravida*, presenta una inflorescencia terminal que produce hasta 20 flores que casi nunca abren, debido a que es una planta que recurre a la autopolinización como mecanismo de reproducción, limitando la fecundación cruzada y reduciendo la calidad fisiológica de las semillas. La autopolinización y la falta de apertura floral limitan la fecundación cruzada, este fenómeno puede disminuir la calidad fisiológica de las semillas (Pupulin *et al.*, 2011), además de incrementar la pérdida de diversidad genética, reduciendo la capacidad de adaptación a cambios ambientales y favoreciendo la depresión endogámica debido a la acumulación de mutaciones recesivas deletéreas (Charlesworth y Willis, 2009).

Estos factores reproductivos deben considerarse en programas de recolección, ya que la viabilidad del embrión es determinante para el éxito de la conservación *ex situ*. Cabe señalar que sólo el 56 % de las especies evaluadas alcanzaron viabilidades superiores al 70 % para bancos de germoplasma, siendo el umbral óptimo valores superiores al 85 % para almacenamiento a largo plazo.

El 67 % de las especies con alta viabilidad provienen de la RBSR, lo que subraya la relevancia de esta área como fuente primaria de germoplasma viable (Guantiva-Rey,

2024). Este patrón coincide con observaciones de hábitats similares, donde zonas bien conservadas y con alta diversidad florística generan semillas de mejor calidad fisiológica (Duarte *et al.*, 2017). La especie endémica *Broughtonia cubensis*, clasificada como amenazada y colectada en el Parque Nacional Guanahacabibes mostró altos niveles de viabilidad celular. Estos resultados respaldan su incorporación al banco de germoplasma, contribuyendo significativamente al programa de conservación de especies endémicas y en peligro desarrollado por el JBOS.

En el proceso de almacenamiento en banco de germoplasma la viabilidad de las semillas de diferentes cápsulas varía considerablemente y en muchas especies de orquídeas disminuye durante el almacenamiento debido a cambios fisiológicos, como acumulación de sustancias inhibitoras como el ácido abscísico (ABA), que inducen dormancia secundaria y limitan la germinación inicial del embrión (Magrini *et al.*, 2019b). Durante el almacenamiento prolongado, además, se activan procesos como la embriogénesis somaclonal y la erosión genética del material resguardado (Johnson *et al.*, 2011). Estudios han demostrado que las semillas con siete años de envejecimiento natural en banco de germoplasma presentan un 0% de germinación (Aguirre-Bolaños *et al.*, 2017). Por lo que es necesario realizar un monitoreo periódico de la calidad y viabilidad de las semillas con pruebas de germinación y análisis de la composición lipídica, para conocer el grado de envejecimiento (Franceschi *et al.*, 2019). Otros autores han demostrado que, aunque la viabilidad puede disminuir en muchas especies, en algunos casos es posible conservar semillas de orquídeas durante décadas, dependiendo de factores como el contenido graso y la estructura del embrión (Francisqueti *et al.*, 2024).

Los hallazgos de este estudio permiten delinear algunas recomendaciones clave para fortalecer las estrategias de conservación *ex situ* de orquídeas nativas, entre las que destacan: estandarizar protocolos de recolección y polinización considerando las particularidades morfo-reproductivas de cada especie, y así garantizar la alta calidad de las semillas recolectadas (Chacón-Velasco *et al.*, 2018).

Conservar también especies con baja viabilidad en casos críticos, como especies endémicas extremadamente raras o amenazadas, mediante técnicas avanzadas como criopreservación o cultivo *in vitro* de embriones (Abdelnour-Esquivel y Vega, 2013). Se reportan avances significativos en la criopreservación de semillas o polen de los géneros *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cymbidium* y *Cattleya* (Popova *et al.*, 2016; Vendrame, 2018). En el caso de semillas de orquídeas utilizadas para congelación ultrabaja, la desecación y el uso de soluciones de vitrificación de plantas (PVS) como crioprotectores son pretratamientos clave para mantener la viabilidad (Popova *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Para estas especies, los mejores tratamientos para la desecación de semillas implican el secado al aire y el gel de sílice (silicato de sodio). Recientemente, PVS2 (glicerol 30% + etilenglicol 15% + dimetilsulfóxido + sacarosa 0.4 M) se utilizó con éxito en *Encyclia cordigera*, manteniendo la viabilidad de las semillas en 93.79% (Pereira *et al.*, 2021).

Bajo el contexto de combinar pruebas de viabilidad celular con ensayos de germinación, el medio más adecuado para germinar las semillas que se almacenan en banco de germoplasma es el Knudson C, pues propicia la germinación y, en contraste

con *Phytamax*, potencia el proceso natural de desarrollo de cada plántula, lo que permite diferenciar en forma normal sus estructuras (Jolman *et al.*, 2022). La preservación conjunta de hongos micorrícicos es crucial, pues proveen nutrientes esenciales para la germinación (Abril, 2023).

Por último, priorizar áreas de alta diversidad y conservación, como la RBSR, como fuentes estratégicas de germoplasma, es una prioridad para el desarrollo de la conservación *ex situ* en Cuba; además, los jardines botánicos y bancos de germoplasma desempeñan un papel fundamental como centros de custodia, reproducción y educación ambiental. En particular, el JBOS se consolida como un espacio clave para la preservación de la diversidad orquídeológica cubana, integrando investigación, conservación y sensibilización pública. Su labor, en coordinación con redes nacionales e internacionales, es esencial para enfrentar los desafíos que plantea la crisis climática, la pérdida de hábitat y el comercio ilegal de especies (Vigil *et al.*, 2017).

## Conclusiones

Este estudio demuestra la efectividad del uso de la prueba de tetrazolio para evaluar la viabilidad celular en semillas de orquídeas nativas de Cuba, contribuyendo a establecer criterios técnicos para su conservación *ex situ*.

De las 16 especies analizadas, 11 fueron incorporadas al banco de germoplasma del Jardín Botánico Orquideario Soroa.

Las especies con viabilidad superior al 70 % son candidatas óptimas para el almacenamiento a largo plazo, mientras que aquellas con valores bajos, pero de alto valor ecológico o endémico, requieren estrategias complementarias como crioconservación o cultivo *in vitro*.

La Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario destacó como fuente clave de germoplasma viable.

## Literatura citada

- Abdelnour-Esquivel, A. y Vega, M. E. (2013). Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica. *Crioconservación de Plantas En América Latina y El Caribe*, 12(1): 113-126.
- Abril Cuesta, P. F. (2023). Identificación molecular de hongos potencialmente micorrícicos, aislados de tres especies de orquídeas nativas del cantón Gualaceo. *Tesis de Licenciatura, Universidad de Cuenca, Ecuador*.
- Ackerman, J. D. (2013). Rapid transformation of orchid floras. *Lanķesteriana: International Journal on Orchidology*, 13(3). <https://doi.org/10.15517/lank.v13i3.14349>
- Ackerman, J. D.; Fernández, E.; Cabrera, B. y González-Orellana, N. (2025). A new miniature ghost orchid appears in the Dominican Republic. *Lanķesteriana: International Journal on Orchidology*, 25(1): 1-7. <https://doi.org/10.15517/lank.v25i1.62821>
- Aguirre-Bolaños, M.; Benítez-Flores, J. C.; González-Valle, M. R.; Hernández-Portilla, L. B.; Quintanar-Zúñiga, R. E. y Flores-Ortiz, C. M. (2017). Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2): 151-160.
- Álvarez, C. C.; López, A. M.; Torres, D. G.; Rico, D. T. y Miranda, J. J. (2023). Orquídeas: amenazas de su existencia, formas de conservación y protección. *Jandiekua, Revista Mexicana de Educación Ambiental*, 7(9): 44-59.

- Andriolli, B. V.; Corredor-Prado, J. P.; Pescador, R.; Montoya-Serrano, F. S.; Vesco, L. L. y Suzuki, R. M. (2023). Morpho-anatomy of in vitro germination and cryopreservation of the orchid *Cattleya crispa* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 71(1). <https://doi.org/10.15517/REV.BIOL.TROP.V71I1.52338>
- Aránega, J. J.; Rato, J. Á.; Márquez, L.; Abad, L. M.; Borrego, O. y Gutiérrez, M. C. (2009). La península de Guanahacabibes y su Parque Nacional (Cuba): biodiversidad marina y terrestre. *Maqaronesia: Boletín de La Asociación de Amigos Del Museo de Ciencias Naturales de Tenerife*, 11(1): 20-49.
- Mujica, E. Vigil, J. B. y Pupulin, F. (2004). Encyclia cajalbanensis (Orchidaceae), una especie nueva de la flora cubana. *Lankasteriana: International Journal on Orchidology*, 4(3): 209-211.
- Bermeo-Criollo, C. A. y Sari Cumbe, F. A. (2018). Simbiosis hongo-micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género epidendrum. Tesis de licenciatura, Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Cabrera-García, B.; Guerrero, Á.; Folgado, R.; Serra, C. y Jiménez-Rodríguez, F. (2022). Biología reproductiva de *Psychilis truncata* (Orchidaceae) en Arroyo Corral, Partido, provincia Dajabón, República Dominicana. *Moscosa*, 21(1): 99-114.
- Cárdenas Guarín, J. H.; Sigarrosa Rieche, A. K. y Salazar Mercado, S. A. (2022). Aplicación de semillas artificiales como método de conservación in vitro de orquídeas. *Revista Mutis*, 12(1).
- Carrodegua-Gonzalez, A., Zuñiga Orozco, A. y Sánchez Calvo, L. (2022). Herramientas para el mejoramiento genético de orquídeas del género Vanda. *Revista FAVE. Sección Ciencias Veterinarias*, 21(2): 11-13.
- Cerna, M.; Cárdenas, S.; Cruz, A. y Jácome, I. (2014). Colección de germoplasma de especies de la familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez-Morona Santiago, Ecuador. *La Granja*, 20(2): 5-19.
- Chacón-Velasco, M. R.; Contreras Acero, O. M. y Cáceres Cárdenas, H. E. (2018). *Contribución a la conservación de orchidiáceas de Santander mediante cultivo in vitro de semillas*. Bucaramanga: Ediciones Universidad Simón Bolívar, Colombia. 177 p.
- Charlesworth, D. y Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10(11): 783-796.
- Clavo, M.; Esperon, P. y Sauleda, R. P. (2016). Encyclia brevifolia (Jenn.) Ackerman & Muji. Benitez, Validation and stat. *Nov. New World Orchidaceae-Nomenclatural Notes* 19.
- Dietrich, H. (1984). Floristische und taxonomische Notizen zu den Orchideen Cubas 5. *Revista Del Jardín Botánico Nacional*, 5(1): 29-56.
- Duarte, E. R.; Mangeón, V.; Küppers, G.; Rocha, P. y Niella, F. (2017). Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). *Caldasia*, 39(2): 388-399.
- Dulic, J.; Ljubojevic, M.; Savic, D.; Ognjanov, V.; Dulic, T.; Barac, G. y Milovic, M. (2020). Implementation of SWOT analysis to evaluate conservation necessity and utilization of natural wealth: terrestrial orchids as a case study. *Journal of Environmental Planning and Management*, 63(12): 2265-2286.
- Fernández, F. D. y Díaz, J. F. (2013). Vegetación de la Reserva de la Biosfera Península de Guanahacabibes, Cuba: mapa actualizado a escala 1: 300 000. *Ecovida: Revista Científica Sobre Diversidad Biológica y Su Gestión Integrada*, 4(1): 111-128.
- Franceschi, C. R.; Smidt, E. C.; Vieira, L. N. y Ribas, L. L. (2019). Storage and in vitro germination of orchids (Orchidaceae) seeds from the atlantic forest-Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(3): 1-11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180439>
- Francisqueti, A. M.; Marin, R. R.; Hengling, M. M.; Hosomi, S. T.; Pritchard, H. W.; Custódio, C. C. y Machado-Neto, N. B. (2024). Orchid seeds are not always short-lived in a conventional seed bank! *Annals of Botany*, 133(7): 941-952. <https://doi.org/10.1093/aob/mcae021>
- García-González, A. y Pérez-Márquez, R. (2011). La comunidad orquideológica en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 59(4): 1805-1812.
- Givnish, T. J.; Spalink, D.; Ames, M.; Lyon, S. P.; Hunter, S. J.; Zuluaga, A.; Doucette, A.; Caro, G. G.; McDaniel, J.; Clements, M. A.; Arroyo, M. T.; Endara, L.; Kriebel, R.; Williams, N. H. y

- Cameron, K. M. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica, and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography*, 43(10): 1905-1916. <https://doi.org/10.1111/jbi.12854>
- Gold, K.; León-Lobos, P. y Wáy, M. (2004). Manual de recolección de semillas de plantas silvestres. In Boletín INIA N° 110, Chile.
- González, A. J.; Andrade, G. A.; Sospedra, R. S. y Rodríguez, M. P. R. (2016). Perturbaciones humanas sobre la composición y estructura del bosque semidecíduo mesófilo, reserva de la biósfera Sierra del Rosario, Cuba. *Sathiri*, 10(1): 196-206.
- González-Torres, L. R.; Gonzalez-Oliva, L.; Bécquer, E. R.; Palmarola, A.; Testé, E. y Barrios, D. (2016). Lista Roja de la Flora de Cuba. *Bissea*, 10(1): 1-352. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24056.65288>
- Guantiva-Rey, S. J. (2024). Valoración de la eficacia en la aplicación de los instrumentos de planificación territorial en la estructura ecológica principal de ecosistemas lagunares endorreicos. Caso de estudio laguna de Suesca (Cundinamarca). Tesis de Maestría, Universidad de América, Colombia.
- Hosomi, S. T.; Santos, R. B.; Custodio, C. C.; Seaton, P. T.; Marks, T. R. y Machado-Neto, N. B. (2011). Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. *Seed Science and Technology*, 39(1): 178-189.
- Johnson, T. R.; Kane, M. E. y Pérez, H. E. (2011). Examining the interaction of light, nutrients, and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation*, 63(1): 89-99.
- Jolman, D.; Batalla, M. I.; Hungerford, A.; Norwood, P.; Tait, N. y Wallace, L. E. (2022). The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques. *Applications in Plant Sciences*, 10(5): 1-18. <https://doi.org/10.1002/aps3.11496>
- Llamacho, J. A. y Larramendi, J. A. (2005). *Las orquídeas de Cuba*. Greta Editores. España. <https://patialibros.org/book/2302>
- Magrini, S.; De Vitis, M.; Torelli, D.; Santi, L. y Zucconi, L. (2019a). Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. *Plant Biology*, 21(3): 544-550. <https://doi.org/10.1111/plb.12936>
- Magrini, S.; De Vitis, M.; Torelli, D.; Santi, L. y Zucconi, L. (2019b). Seed banking of terrestrial orchids: evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. *Plant Biology*, 21(3), 544-550. <https://doi.org/10.1111/plb.12936>
- Martija-Ochoa, M. (2019). *El gran libro de las orquídeas*. Parkstone International, Estados Unidos.
- Mayo-Mosqueda, A.; García-Hernández, E.; Noguera-Savelli, E.; Cetzal-Ix, W. y Alatorre-Cobos, F. (2022). Advances in breeding, bioprospecting, and *in vitro* culture of *Laelia* orchid species. *Horticulturae*, 8(2): 103-105.
- Mercado, S. A. S.; Caleño, J. D. Q. y Rozo, L. Y. M. (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): 1-8.
- Merritt, D. J.; Hay, F. R.; Swarts, N. D.; Sommerville, K. D. y Dixon, K. W. (2014). Ex situ conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1): 46-58.
- Montenegro, J. (2014). Estudio del mecanismo de polinización en *Fernandezia sanguinea* (Lindl.) Garay & Dunst (Orchidaceae), en una región boscosa húmeda de los andes del suroccidente colombiano. *Tesis de Licenciatura, Universidad de Nariño, Colombia*. <http://sired.udenar.edu.co/id/eprint/884>
- Mújica, E. y González, E. (2015). A new checklist of orchid species from Cuba. *Lanķesteriana*, 15(3): 219-269. <https://doi.org/10.15517/lank.v15i3.22613>
- Mújica, E.; Raventós, J.; González, E. y Bonet, A. (2013). Long-term hurricane effects on populations of two epiphytic orchid species from Guanahacabibes Peninsula, Cuba. *Lanķesteriana International Journal on Orchidology*, 13(1): 47-55.
- Ossenbach, C.; Arce Portuguese, J. A. y Warner, J. (2007). *Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma: deshidratación, almacenamiento y pruebas de viabilidad de las semillas*. Universidad Earth, Costa Rica.
- Pereira, S. T.; Vendrame, W. A.; Pivetta, K. F.; Sorgato, J. C. y Faria, R. T. (2021). Efficiency of cryoprotectors for cryopreservation of two orchid species from Americas. *Rodriguésia*, 72: e00352020.

- Pérez-Márquez, R.; Pérez-Castro, Y. y Bocourt-Vigil, J. L. (2010). *Orquídeas de la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario*. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba.
- Perez-Tarazona, F. (2024). Diversidad e inventario de orquídeas de los bosques de neblina: Carpish y la Divisoria. *Tesis de Maestría, Universidad Nacional Agraria de La Selva, Perú*.
- Perkins, J.; Hayashi, T.; Peakall, R.; Flematti, G. R. y Bohman, B. (2023). The volatile chemistry of orchid pollination. In *Natural Product Reports*, 40(4): 819-839 <https://doi.org/10.1039/d2np00060a>
- Popova, E.; Kim, H. H.; Saxena, P. K.; Engelmann, F. y Pritchard, H. W. (2016). Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology Advances*, 34(4): 380-403.
- Pradhan, N.; Fan, X.; Martini, F.; Chen, H.; Liu, H.; Gao, J. y Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical Studies*, 63(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00333-0>
- Pritchard, H. W.; Poynter, A. L. y Seaton, P. T. (1999). Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana*, 14(2): 92-101.
- Pupulin, F. y Benítez, E. M. (2005). Another new species of *Encyclia* (Orchidaceae: laeliinae) from Cuba. *Harvard Papers in Botany*, 10(2): 227-230.
- Pupulin, F.; Bogarín, D. y Guerrero, A. P. (2011). De *Encyclia* verdosa: variación natural, taxonomía, cleistogamia y un comentario sobre el código de barras del ADN. *Lankesteriana*, 11(3): 325-336. <https://doi.org/10.15517/lank.v11i3.18288>
- Ribeiro, L. M.; Sorgato, J. C.; Soares, J. S. y Ramos, J. C. (2021). Methodology of the tetrazolium test for identifying viable seeds of orchids of the genus *Cattleya* native to the Brazilian Cerrado. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(3): 1351-1360. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3p1351>
- Ricardo-Nápoles, N. E. y Echeverría-Cruz, R. (2019). Características de la flora del Área Protegida de Recursos Manejados Reserva de Biosfera Sierra del Rosario, Cuba/Flora characteristics of the protected areas of Managed Resources Sierra del Rosario Biosphere Reserve, Cuba. *Acta Botánica Cubana*, 218(1).
- Rosas, C.; León-Lobos, P.; Novoa, Q.; Saeton, P. y Pritchard, H. (2009). Recolección y conservación ex situ de semillas de orquídeas nativas Chile. *VII Simposio de Recursos Genéticos Para América Latina y El Caribe*. Pp. 148-149. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/41685>
- Salazar-Mercado, S. A. y Gélvez-Manrique, J. D. (2015). Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas utilizando la prueba de Tetrazolio e Índigo carmín. *Revista de Ciencias*, 19(2): 59-69.
- Seaton, P.; Kendon, J. P.; Pritchard, H. W.; Puspitaningtyas, D. M., y Marks, T. R. (2013). Orchid conservation: the next ten years. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 13(1): 93-101.
- Seijo, E. R.; Villalobos, R. R.; Leal, J. M. y Ramos, L. V. (2010). Aproximación preliminar a la ecología de *Tolumnia lucayana*. *Monteverdiá*, 3(2): 7-11.
- Swarts, N. D. y Dixon, K. W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 14(11): 590-598.
- Testé, E.; Orihuela, L. P.; González, W. D.; Veitía, R. S.; García, E. F.; Hernández, V. P.; Hidalgo, B. F.; Palmarola, A. y González-Torres, L. R. (2017). Estructura poblacional de *Encyclia pyriformis* (Orchidaceae) en Los Pretiles, Pinar del Río, Cuba/Population structure of *Encyclia pyriformis* (Orchidaceae) in Los Pretiles, Pinar del Río, Cuba. *Revista Del Jardín Botánico Nacional*, 38(1): 133-138.
- Vendrame, W. A. (2018). Cryopreservation. *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols*, 11(1): 283-302. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_15)
- Vigil, J. L.; Perez, M. G. y Santacruz, E. L. (2017). Programa de educación ambiental para la comunidad de trabajadores del Jardín Botánico, Orquideario Soroa, Artemisa. *Avances*, 19(2): 158-168.
- Wijnker, E.; Bouchaut, D.; van Treuren, R. y van Hintum, T. (2024). A pragmatic protocol for seed viability monitoring in ex situ plant genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 72(1): 49–59. <https://doi.org/10.1007/s10722-024-02019-x>
- Wu, R.; Chang, S.; Hsieh, T.; Chuang, K.; Ting, I.; Lai, Y. y Chang, Y. (2016). Cryopreservation of orchid genetic resources by desiccation: A case study of *Bletilla formosana*. *Cryopreservation in Eukaryotes, IntechOpen, Londres, Reino Unido*.
- Zhang, S.; Yang, Y.; Li, J.; Qin, J.; Zhang, W.; Huang, W. y Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. In *Plant Diversity*, 40(4): 196-208 <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>