SECIVTV 2021
XIV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES

AMORIM

iMiDRA Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario

PROYECTO CORK2WINE. Producción masiva de alcornoques mediante embriogénesis somática.

María del Mar RUIZ-GALEA[1], Carolina KREMER MORALES[2], Gonzalo del OLMO BERENGUER[2], Eva FRIERO MOLANO[1], Inmaculada HERNÁNDEZ SÁNCHEZ[1], Jose Pedro FERNANDES[2], Francisco CARVALHO[2]

[1] Departamento de Investigación Agroambiental, Grupo de Biotecnología Forestal. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario, Finca El Encín, Autovía A2 km38,2. 28805. Alcalá de Henares. Madrid.
[2] AMORIM FLORESTAL ESPAÑA S.L., Polígono Industrial Pelagocotes s/n. 06500. San Vicente de Alcántara (Badajoz).
Email de contacto: mdelmar.ruiz@madrid.org

SESIÓN II: Embriogénesis1 PÓSTER C027

CORK2WINE

DESCRIPCIÓN http://cork2wine.es

CORK2WINE es un proyecto de I+D+i que tiene por objetivo aplicar un nuevo enfoque integral a la investigación del corcho para abordar el avance y la superación de los retos tecnológicos actuales del sector corchero nacional. Desde las etapas de la producción primaria en el ámbito forestal hasta la posterior fabricación de tapones de vino, esta iniciativa también estudia el aprovechamiento rentable y óptimo de los subproductos y residuos. En definitiva, CORK2WINE pretende garantizar la competitividad, sostenibilidad, posicionamiento internacional y viabilidad futura del sector.

ESTRUCTURA DEL PROYECTO

➢ **ACTIVIDAD1**: ***FOREST.*** *Aspectos forestales y genéticos de los alcornocales que afectan la fisiología e histología del corcho y su interacción con el vino.*

➢ **ACTIVIDAD2**: ***PROCORK.*** *Procesado del corcho, la elaboración del tapón y nuevas aplicaciones para los subproductos de la fabricación de tapones.*

➢ **ACTIVIDAD3**: ***QUALITA.*** *Mejora de la calidad sensorial de los tapones de corcho.*

Embriogénesis somática de *Quercus suber L.*

Selección de árbol adulto y recogida de estacas

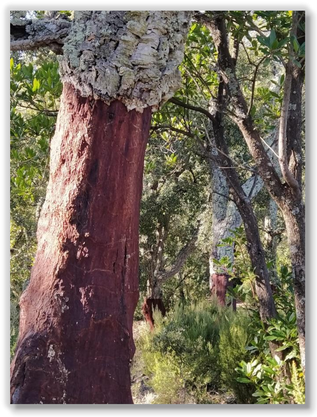


Fig. 1. A. Árbol seleccionado, B. Brotación en perlita húmeda. C. Hoja con embriogénesis somática

Brotación e inducción de embriogénesis somática en hojas

Fase de acondicionamiento	• Medio de cultivo G, 10g/L sacarosa, 6g/L agar. SIN HORMONAS, pH 5.75. • Cultivo de 7d. en cámara en oscuridad a 23ºC.
Fase 1ª de inducción	• Medio de cultivo de macros de SH resto de MS, 30g/L sacarosa, 6g/L agar. 50µM ANA + 10µM BAP, pH 5.75. • 30d. de cultivo en cámara en oscuridad a 23ºC.
Fase 2ª de inducción	• Medio de cultivode macros de SH resto de MS, 30g/L sacarosa, 6g/L agar. 0.5µM ANA + 0.5µM BAP, pH 5.75. • 30d. de cultivo en cámara con 16h luz a 23ºC.
Fase 3ª de manifestación	• Medio de cultivo de macros de SH resto de MS, pH 5.75. • Manifestación tras 30d. cultivo en cámara, 30g/L sacarosa, 6g/L agar. SIN HORMONAS, pH a con 16h. luz a 23ºC. **Fig. 1C**
Fase 4ª de proliferación en medio con agar	• Medio de cultivo de macros de SH resto de MS, 30g/L sacarosa, 6g/L agar. SIN HORMONAS, pH 5.75. • 30d. de cultivo en cámara con 16h. de luz a 23ºC.

Proliferación y diferenciación de suspensiones en medio líquido

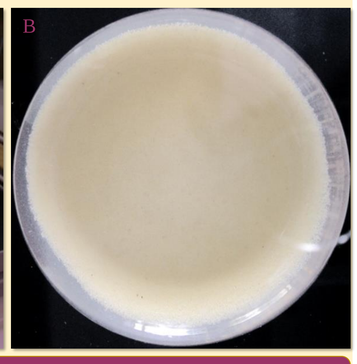


Fig. 2. A. Establecimiento en medio líquido. B. Cultivo de suspensiones.

- 15d. de cultivo del material embriogénico inmaduro de Fase 4ª en Erlenmeyer de 250ml, sobre agitadores orbitales a 110rpm. Se filtra y elimina la fracción mayor 800µm y vuelve a cultivar 30d. en cámara a 23°C y 16h luz fluorescente blanca y roja (180 µmol·m^{-2}·s^{-1}). **Fig. 2A**
- 50ml medio de cultivo con macronutrientes de SH resto de MS, 30 g/L sacarosa. Sin hormonas, pH 5.75
- Filtrado y 30d. de cultivo de 8g/L de la fracción menor a 800µm. **Fig. 2B.**

Ensayos para la diferenciación de embriones en medio líquido:

➢ Tamaño y densidad inicial: 200mg (1g/l) y 400mg (8g/l)
➢ Adición de: BAP, IBA, ABA, glutamina, sacarosa y PEG.
➢ Diferenciación en medio sólido.

Resultados previos de diferenciación en medio sólido: POSTER C026

Maduración de embriones en biorreactor

Fig. 3. A. Biorreactor MATIS®, B. Biorreactor RITA®, C. Embriones en MATIS®, D. Embriones en RITA®.

- 30+15d. de cultivo de la fracción >800µm con inmersión de 2minutos cada 4horas.
- Medio de cultivo con Macronutrientes SH resto MS, 30g/L sacarosa. Sin hormonas, ph 5.75.
- 30d. de cultivo en cámara a 23°C y 16h. luz fluorescente blanca y roja (180 µmol·m^{-2}·s^{-1}).

Ensayos de maduración en sistemas de inmersión transitoria:

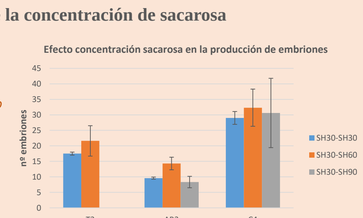
➢ Tamaño y densidad inicial (1g/L, 3g/L, 5g/L).
➢ Tiempo y composición del medio para madurar.

Resultados previos: Efecto de la concentración de sacarosa

BIORREACTOR RITA:
5g/l de la fracción >0,8 y < 3,5mm

PROLIFERACIÓN: 30días con 200ml medio estándar (30g/l de sacarosa).
Riego:2minutos 6 veces/ día.

MADURACIÓN : 15 días con 200ml de medio con 30, 60 ó 90 g/l de sacarosa
Riego:1minuto 2 veces/ día.



Estratificación 2 meses a 4ºC

Germinación directa en sustrato

Resultados previos: Efecto de temperaturas en germinación directa

Germinación in vitro	Embriones sembrados	% germinación	% aclimatación	% éxito
T constante 23°C	17	78	38	29
T alterna 15°C/23°C	24	75	72	54
T alterna 10°C/23° C	16	75	100	75

Siembra directa	Embriones sembrados	% germinación	% aclimatación	% éxito
T constante 23°C	25	24	50	12
T alterna 15°C/23°C	20	15	67	10

Siembra directa	Embriones sembrados	% germinación	% aclimatación	% éxito
T constante 23°C	20	30	83	25
T alterna 10°C/23°C	20	45	89	40

Fig. 4 . Siembra directa de embriones en alveolo forestal, fumigación y colocación en cajas cerradas con film plástico

- Sustrato turba-fibra de coco-perlita (2:2:1).
- Germinación en cámara a 23°C y 16h. luz (180 µmol·m^{-2}·s^{-1}) durante 60d. con reducción gradual de la humedad.

Ensayos de germinación directa:

➢ Desecación parcial del embrión.
➢ Tipo de sustrato.
➢ Temperaturas de germinación.
➢ Efecto de la edad del cultivo.

EMPRESAS: OLLER Depuis 1892 · Muga · AMORIM · Quimivita Lively innovation · J·VIGAS 1887 · VILARNAU BARCELONA

Una manera de hacer Europa — UNIÓN EUROPEA

Proyecto: CORK2WINE IDI- 20200659
Presupuesto: 4.948.217€
Financiación: 85%
CDTI 100: 4.205.984€
FEDER: 819.323€
Duración: 2019 - 2023
web: http://cork2wine.es/

Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) — Ministerio de Ciencia e Innovación — CDTI Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial — @CDTIoficial

CENTROS DE INVESTIGACIÓN COLABORADORES: INSTITUT CATALÀ DEL SURO · laae Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología · crag CENTRE FOR RESEARCH IN AGRICULTURAL GENOMICS · iata Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos · iMiDRA Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario · CICYTEX CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DE EXTREMADURA