STEVIBREED

GRUPO OPERATIVO REGIONAL

DOCUMENTO FINAL

PROYECTO INNOVADOR

MEJORA INTEGRAL DEL CULTIVO DE *STEVIA REBAUDIANA* PARA SU VALORIZACIÓN EN LA REGIÓN

JUNTA DE EXTREMADURA
Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Sostenible

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural:
Europa invierte en las zonas rurales

Proyecto cofinanciado por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) en un 85% dentro del Programa de Desarrollo Rural (PDR) de Extremadura 2014-2022, en la medida 16 "Cooperación" submedida 16.1 "Ayuda para la creación y el funcionamiento de grupos operativos de la AEI en materia de productividad y sostenibilidad agrícolas", siendo el resto cofinanciado por la Junta de Extremadura en un 11,28% y por el Estado, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en un 3,72%.

índice

1. Introducción..... 03
2. Participantes 04
3. Problemática abordada..... 04
4. Necesidad del proyecto..... 05
5. Objetivos específicos..... 07
6. Resultados 09
7. Conclusiones..... 23

Introducción

Los Grupos Operativos, elementos clave en el desarrollo de la Asociación Europea para la Innovación en materia de agricultura productiva y sostenible, son agrupaciones de actores de distintos perfiles (agricultores, ganaderos, selvicultores, industrias agroalimentarias o forestales, centros públicos o privados de I+D+i o de formación y asesoramiento, centros tecnológicos o instituciones sin fines de lucro), que se asocian para conseguir una innovación al objeto de resolver un problema o aprovechar una oportunidad, con el enfoque de acción conjunta y multisectorial. Cada grupo está asociado a su proyecto de innovación, manteniéndose hasta que dicha innovación se lleva a cabo.

El proyecto innovador **Mejora integral del cultivo de *Stevia rebaudiana* para su valorización en la región** del Grupo Operativo **STEVIBREED** se constituye en base al Decreto 140/2017, de 5 de septiembre, de la Junta de Extremadura, que establece las bases reguladoras de las ayudas para la realización de proyectos innovadores por parte de los Grupos Operativos de la Asociación Europea para la Innovación en materia de productividad y sostenibilidad agrícola, publicado en el Diario Oficial de Extremadura (DOE) n.º 174, de 11 de septiembre de 2017, y a la Convocatoria de estas ayudas para los sectores agroalimentario y forestal del año 2022, cuya resolución de 12 de julio de 2022, de la Secretaría General, de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio fue publicada en el DOE nº 138, de 19 de julio de 2022.

El proyecto innovador **Mejora integral del cultivo de *Stevia rebaudiana* para su valorización en la región** del Grupo Operativo Regional STEVIBREED está financiado por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) en un 85% dentro del Programa de Desarrollo Rural (PDR) de Extremadura 2014-2022, de la medida 16 "Cooperación" submedida 16.1 "Ayuda para la creación y el funcionamiento de grupos operativos de la AEI en materia de productividad y sostenibilidad agrícolas", siendo el resto cofinanciado por la Junta de Extremadura en un 11,28% y por el Estado, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en un 3,72%. El importe de la ayuda concedida para la realización del proyecto innovador es 254.089,20 €.

PARTICIPANTES

BENEFICIARIOS
BIOSTEVERA, S.L
(REPRESENTANTE)

DEHESA SAN SALVADOR S.L.U

NUEVAS INDUSTRIAS AGRÍCOLAS REUNIDAS, S.L. (NIARSA)

SUBCONTRATADOS
CENTRO TECNOLÓGICO NACIONAL AGROALIMENTARIO - CTAEX

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE FISIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE PLANTAS

Problemática abordada

El cultivo de *Stevia rebaudiana* presenta un gran potencial como alternativa sostenible y saludable frente a cultivos tradicionales en declive, como el tabaco. Sin embargo, su implantación a gran escala se ve limitada por varios factores:

Falta de variedades estables: Las plantas actuales muestran una gran variabilidad genética, lo que dificulta obtener un producto homogéneo en sabor y calidad.

Dificultades en la germinación: Las semillas de stevia tienen baja tasa de germinación y requieren condiciones muy específicas para desarrollarse correctamente.

Reproducción compleja: Muchas variedades mejoradas solo pueden reproducirse por esquejes, lo que complica su manejo agronómico.

Cultivo manual y costoso: La falta de mecanización en el trasplante aumenta los costes de producción.

Dependencia de importaciones: España importa la mayoría de la stevia que consume, lo que genera incertidumbre sobre la calidad y origen del producto.

Este proyecto STEVIBREED busca soluciones innovadoras para superar estos retos y posicionar a Extremadura como referente en el cultivo de stevia, mediante la mejora genética, la mecanización del cultivo y la apuesta por la producción ecológica.

Necesidad del proyecto

El suministro adecuado de alimentos para la población a nivel mundial es uno de los mayores desafíos para el futuro. Según un informe reciente de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, la población mundial alcanzaría los 9.730 millones en 2050. En consecuencia, para satisfacer la demanda, la agricultura necesitará producir casi un 50 % más de alimentos que en 2012 (FAO, 2017). También se conoce los últimos informes del IPCC (Inter-governmental Panel on Climate Change) de 2018 y 2021, que establece que, en el escenario más optimista, es probable que la temperatura global aumente 1,5 °C entre 2030 y 2052 si continúa con su aumento actual (IPCC, 2018, 2021). Debido a estos efectos previstos por el **calentamiento global y una mayor demanda de suministro de alimentos** a medida que crece la población humana, existe una necesidad **urgente de desarrollar variedades de plantas más robustas**, de las cuales se obtendrá un mayor rendimiento. Además del aumento de la población global, existe también un **incremento en el número de personas que padecen de enfermedades crónicas** como la diabetes, tanto a nivel global como nacional, y una mayor procura por productos sin azúcar, como parte de un estilo de vida más sano. Por todo ello, crece la necesidad de buscar cultivos alternativos, como es el caso de la Stevia, como integrante de una alimentación más saludable y equilibrada. En muchos países, la creciente demanda de alimentación más saludable y equilibrada. En muchos países, la creciente demanda de edulcorantes naturales ha llevado a cultivar estevia a gran escala y al estudio de este cultivo en diferentes partes del mundo (Dyduch-Sieminska et al., 2020). En Europa, sin embargo, las variedades cultivadas son muchas veces indefinidas y propagadas principalmente por métodos vegetativos convencionales. La falta de estabilidad en las variedades usadas lleva a la producción de plantas con una alta diversidad genética, lo que no garantiza la producción de glucósidos de esteviol y otros compuestos fitoquímicos a un nivel alto constante y, de esa manera, no proporciona un producto con niveles estándares uniformes. Es, por lo tanto, muy importante

conseguir variedades con características/rasgos tanto a nivel morfológico como bioquímico y molecular estabilizados, para garantizar la uniformidad del producto final. Además, el hecho de que la estevia presente autoincompatibilidad y de que, por ello, muchas de las variedades mejoradas solo se reproduzcan empleando esquejes, dificulta no solo la obtención de diferentes orígenes de estevia por parte de las empresas, sino también su labor en la producción de plantas con las características deseadas.

Por otro lado, los agricultores de la zona de Orellana, comarca de Vegas Altas, disponen de una gran superficie de terreno en regadío (56.000 ha)11, con una gran capacidad productiva en relación con los recursos humanos y maquinaria que disponen, así como de todos los elementos del proceso de secado de cultivos. El problema real al que se enfrentan es que sus mercados, como es el caso del tabaco, actualmente, carecen de rentabilidad por los descensos generalizados de precios y la disminución de las subvenciones acopladas a los mismos. La implementación del cultivo de estevia en la comarca y en la comunidad extremeña en general, supondría la introducción de un cultivo nuevo en la zona, lo que permitiría transformar el margen comercial, y el valor añadido de las producciones, contribuyendo a aumentar la sostenibilidad del entorno, mediante una producción de calidad, que atendiera a la demanda del mercado nacional y de los mercados centroeuropeos.

¿Por qué es innovador?

Conforme lo anterior, se justifica la necesidad de estabilizar variedades de *Stevia rebaudiana* a través de un programa de mejora genética, para la producción de plantas que presenten una mayor robustez y productividad. Esta propuesta presenta un alto grado territorial de innovación. Con el proyecto presentado, se fomentará la innovación en el ámbito rural en la región de Extremadura, ya que permitirá que se apliquen e integren técnicas de mejora vegetal ya bastante desarrolladas en otras comunidades autónomas, pero aún no muy desarrolladas en la región.

La obtención de variedades estables y más productivas ayudará a que el cultivo de estevia sea sostenible en términos económicos y medioambientales y ayudará a la valorización del cultivo en la diversificación de cultivos en la región de Extremadura. Se trata, por lo tanto, de buscar alternativas de cultivo, tanto en la zona del Tiétar, como también en las Vegas del Guadiana, de ahí la idoneidad del consorcio, tanto por la localización de las empresas, como por la especialización de cada una de ellas, tanto en tecnologías de producción, como en la de invernaderos, como en la mecanización del cultivo, este último punto fundamental para garantizar la implantación del cultivo.

Objetivos específicos

El objetivo general del proyecto que presenta el GO STEVIBREED es la **obtención de variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni que se adapten mejor a las actuales demandas comerciales, mediante el desarrollo e implementación de un programa de mejora vegetal, y adoptar medidas que faciliten su mecanización para mejorar sus expectativas comerciales y para valorizar el cultivo en la región de Extremadura.**

Con este propósito se han diseñado los siguientes objetivos específicos:

01 Obtener semillas de diferentes orígenes/variedades de *Stevia rebaudiana* en bancos de germoplasma.

02 Identificar y optimizar las condiciones ambientales que favorecen una alta y sincrónica germinación de las semillas de *Stevia rebaudiana.*

03 Seleccionar las líneas parentales de *Stevia rebaudiana* que confieren las características morfofisiológicas, químicas y moleculares (ratio hoja/tallo y contenido de glucósidos de esteviol) de interés agroeconómico.

04 Conservar ex situ las líneas parentales seleccionadas mediante herramientas biotecnológicas (micropropagación) y esquejes.

05 Desarrollar híbridos a través del diseño de cruces entre las líneas parentales seleccionadas.

06 Producir semillas de los híbridos con los rasgos de interés estabilizados para su posterior comercialización.

07 Mecanizar el proceso de trasplante de las diferentes variedades de *Stevia rebaudiana.*

08 Divulgar el potencial del cultivo de Stevia tanto a nivel económico como para la diversificación de cultivos en la región de Extremadura entre el sector agrícola y las autoridades autonómicas.

Actividad 1. Plan de implementación y gestión de riesgos del grupo operativo

Actividad 2. Obtención de semillas de diferentes origenes / variedades

Actividad 3. Estudios de germinación

VALORIZACIÓN DEL CULTIVO DE *STEVIA REBAUDIANA* EN EXTREMADURA

Actividad 4. Mejora vegetal de *Stevia rebaudiana*

+

Actividad 5. Mecanización del transplante de *Stevia rebaudiana*

Resultados

ESTUDIO DE GERMINACIÓN

El estudio realizado permitió evaluar el comportamiento germinativo de semillas de *Stevia rebaudiana* bajo distintas condiciones y procedencias, con el objetivo de identificar los factores que afectan su viabilidad y desarrollo inicial.

A pesar de utilizar variedades comerciales, se constató que la especie presenta una germinación irregular, con un máximo del 61%. Este dato evidencia que, incluso en materiales seleccionados, la germinación sigue siendo un reto importante. Por ello, se subraya la necesidad de procesar adecuadamente las semillas si se pretende recolectarlas para su posterior cultivo.

Se analizaron distintos lotes de semillas cosechadas en fechas próximas y sometidas al mismo protocolo de limpieza. Los resultados mostraron una gran variabilidad en la germinación: mientras el lote 7 alcanzó un 41%, el lote 8 no presentó germinación alguna. Además, se observaron diferencias en el estado fitosanitario de las semillas, lo que sugiere que es necesario revisar y optimizar las prácticas de cosecha, procesamiento y almacenamiento, especialmente evitando la humedad y manteniendo condiciones de temperatura fresca.

Por otro lado, las semillas obtenidas de las líneas seleccionadas a pesar de haber recibido mejoras en el tratamiento pre-germinativo, **no superaron los resultados obtenidos en otras líneas testadas**, lo que indica que aún hay margen de mejora en los protocolos aplicados.

Finalmente, en esta fase inicial del desarrollo, no se ha detectado una marcada asincronía en el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, se recomienda continuar el seguimiento en etapas posteriores para determinar si esta falta de sincronía se manifiesta conforme avanza el desarrollo vegetativo.

SELECCIÓN DE VARIEDADES

Fenotipado y caracterización molecular de las plantas de Stevia

Se seleccionaron los fenotipos según las **características morfológicas:** tamaño, área de las hojas y distancia entre los entrenudos, fisiológicas: tasa fotosintética, datos nutricionales: N,Ca,K,Na y **químicas** según los metabolitos secundarios de interés: Stevioside y Rebaudioside A.

Fenotipos de Stevia

A continuación, se muestran el perfil de metabolitos secundarios de las diferentes variedades de Stevia:

	ESTEVIÓSIDOS %						
	Reb D	**Reb A**	**Esteviósido**	**Reb F**	**Reb C**	**Dulcósido A**	**TOTALES (%)**
1	0,13	2,07	3,79	1,82	0,53	0,33	9,51
2	0,15	3,41	4,37	2,27	0,61	0,06	12,08
3	0,12	0,63	7,27	2,20	0,36	0,12	11,39
4	0,19	1,57	4,42	1,66	0,38	0,32	9,27
5	0,04	3,94	4,72	2,00	0,66	0,12	12,72
6	0,06	2,36	6,31	2,18	0,37	0,22	12,41
7	0,31	2,42	5,63	2,04	0,61	0,39	12,45
8	0,57	2,89	6,61	2,70	0,55	0,39	15,05
9	0,16	2,21	5,36	2,01	0,55	0,59	11,79
10	0,32	2,20	4,62	1,90	0,50	0,39	10,90
11	0,60	2,54	4,72	2,18	0,62	0,30	12,16
12	0,34	5,25	5,97	1,76	0,81	0,37	16,10

Se observa que las plantas 8 y 12 presentan una mayor cantidad total de esteviósidos, compuestos responsables del sabor dulce en la Stevia. Al analizar el equilibrio entre Rebaudiósido A y Esteviósido, dos de los principales componentes, se registra un ratio de 0,44 en la planta 8 y de 0,88 en la planta 12. Esto indica que, además de una mayor concentración total de esteviósidos, la planta 12 posee una proporción más elevada del compuesto que proporciona un dulzor más agradable y menos amargo. Por este motivo, dichas plantas fueron seleccionadas.

En los programas de mejora de la Stevia no se priorizó únicamente el aumento en la producción de hojas, sino también la optimización del perfil de sabor de las variedades cultivadas. Para ello, se procura incrementar la proporción de rebaudiósido A respecto al esteviósido, ya que esto contribuye a mejorar la calidad del dulzor.

Tras el análisis fenotípico y la caracterización molecular realizados en la tarea anterior, se seleccionaron 10 plantas que se utilizaron como líneas parentales. A continuación, se muestran los resultados:

	Altura (cm)	Área hoja (cm)	Distancia entrenudos (cm)	Esteviósidos totales (cm)	Ratio Reb A: esteviósido
1	73,3	32,0	3,3	14,56	0,72
7	29,7	26,0	1,5	10,17	0,01
8	61,1	15,5	4,9	12,85	0,33
10	65,6	27,7	4,6	16,19	0,28
11	47,7	34,0	2,9	18,75	0,90
18	54,8	28,5	4,4	19,96	0,40
22	74	29,0	3,5	24,79	0,36
23	89,1	26,0	3,7	20,28	0,30
1 campo	n/a	n/a	n/a	19,94	0,63
2 campo	n/a	n/a	n/a	16,01	1,12

La elección se basó en varios criterios: un alto contenido total de glucósidos de esteviol (los compuestos responsables del dulzor), una buena proporción de rebaudiósido A frente a esteviósido (lo que mejora la calidad del sabor), un ratio hoja/tallo favorable (es decir, hojas más grandes y tallos más cortos), y una mayor altura de la planta, lo que indica un porte más robusto.

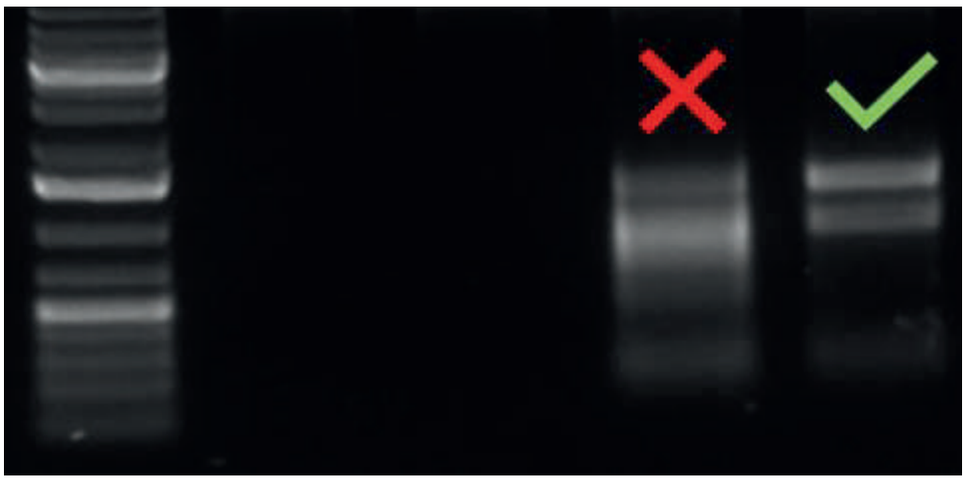
Además, se seleccionaron otras tres plantas con características opuestas, con el objetivo de estudiar cómo se heredan ciertos rasgos y determinar qué características son dominantes. Estas plantas fueron la 7, 8 y 10, que, aunque no presentan los peores perfiles morfofisiológicos, sí muestran menor altura y un ratio bajo de rebaudiósido A respecto al esteviósido.

Expresión génica de genes de la ruta de biosíntesis del esteviol

Para el análisis molecular se empleó material vegetal procedente del órgano foliar, recolectado en diferentes verticilos, con un total de entre 10 y 15 hojas por muestra. Antes de la extracción de RNA, las muestras fueron conservadas a -80 °C para preservar su integridad. Se utilizaron los siguientes kits comerciales tanto para la extracción de RNA como para la reacción qPCR.

Antes de proceder con los análisis, se evaluó la pureza y concentración del RNA mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) y 280 nm (proteínas). Se consideraron aptas aquellas muestras con una relación 260/280 entre 1.8 y 2.1, y una concentración cercana a 100 µg/mL.

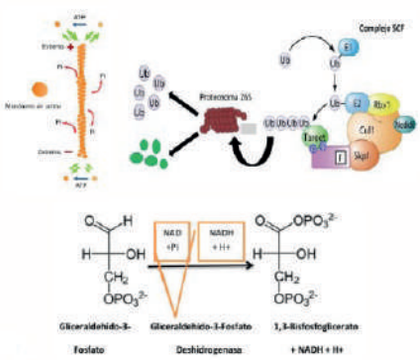
La **integridad del RNA** se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón TAE 1X. Las muestras se revelaron en un transiluminador Geneflash (Syngene), y solo se seleccionaron aquellas que mostraban **tres bandas bien definidas**, correspondientes a los ARN 28S, 18S y de pequeño peso molecular, lo que indica una alta calidad del material genético para estudios posteriores de expresión génica.



En las primeras fases del estudio se evaluaron distintos genes candidatos para normalizar los resultados de expresión de genes implicados en la **ruta de síntesis de esteviósidos** en *Stevia rebaudiana.*

Cebadores empleados

Gen	Enzima		Secuencia de cebadores	Amplicón
Act	Actina	Fw	CGCCATCCTCCGTCTTGATCTTGC	100
		Rv	CCGTTCGGCGGTGGTGGTAA	
Ubq	Ubiquitina	Fw	TCACTCTTGAAGTGGAGAGTTCCGA	90
		Rv	GCCTCTGTTGGTCCGGTGGG	
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa	Fw	CCGTGAGGTTGGAAAAAGCTGCC	97
		Rv	CGCCATCCTCCGTCTTGATCTTGC	
UGT74G1	UDP glucosiltransferasa-74G1	Fw	ACCACAGTAACACCACCACC	97
		Rv	TCCAAATATGATTCTCCTGCACTCA	
UGT76G1	UDP glucosiltransferasa-76G1	Fw	CACCATCTTTCACACCAACTTCA	91
		Rv	ATGCGTTCGTCTTGTGGGT	



Los análisis mostraron **diferencias significativas en la expresión del gen Actina (Act)** entre las distintas muestras de plantas, con un **p-valor de 2,6 × 10^{-8}**, lo que indica una alta variabilidad y lo descarta como gen de referencia estable.

En cambio, el gen **Ubiquitina (Ubq)** presentó una expresión constante entre las plantas evaluadas **(p-valor de 0,058)**, lo que lo convierte en el candidato más adecuado para **normalizar la expresión de los genes diana** en este estudio.

Por otro lado, el gen GAPDH no mostró un patrón de expresión estable, por lo que también se descartó como gen control para este tipo de análisis.

Estos resultados permiten avanzar con mayor precisión en el estudio de los genes relacionados con la producción de compuestos dulces en la Stevia, utilizando **Ubq como referencia fiable** para los ensayos de expresión génica.

Finalmente, en esta fase inicial del desarrollo, no se ha detectado una marcada asincronía en el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, se recomienda continuar el seguimiento en etapas posteriores para determinar si esta falta de sincronía se manifiesta conforme avanza el desarrollo vegetativo.

SELECCIÓN DE VARIEDADES

Fenotipado y caracterización molecular de las plantas de *Stevia*

Se seleccionaron los fenotipos según las **características morfológicas:** tamaño, área de las hojas y distancia entre los entrenudos, fisiológicas: tasa fotosintética, datos nutricionales: N,Ca,K,Na y **químicas** según los metabolitos secundarios de interés: Stevioside y Rebaudioside A.

	Act	**GADPH**	**Ubq**
Ct	23,71	38,50	26,94
	23,99	27,87	26,35
	23,71	27,34	26,85
	25,37	23,45	26,97
	25,15	26,90	26,47
	25,00	28,01	26,86
$\bar{X}$	24,49	26,68	26,74
σ	0,77	5,10	0,27

ENSAYO 1

Los resultados obtenidos muestran que el gen **SrUGT76G1** presenta una **mayor expresión en la muestra 8** en comparación con la muestra 12. Sin embargo, esta diferencia no se traduce en una mayor cantidad de **rebaudiósido A (Reb-A)**, ya que es la muestra 12 la que presenta niveles más altos de este compuesto.

Este hallazgo sugiere que la relación entre la expresión de SrUGT76G1 y la producción de Reb-A **no es lineal**, y podrían estar influyendo otros factores:

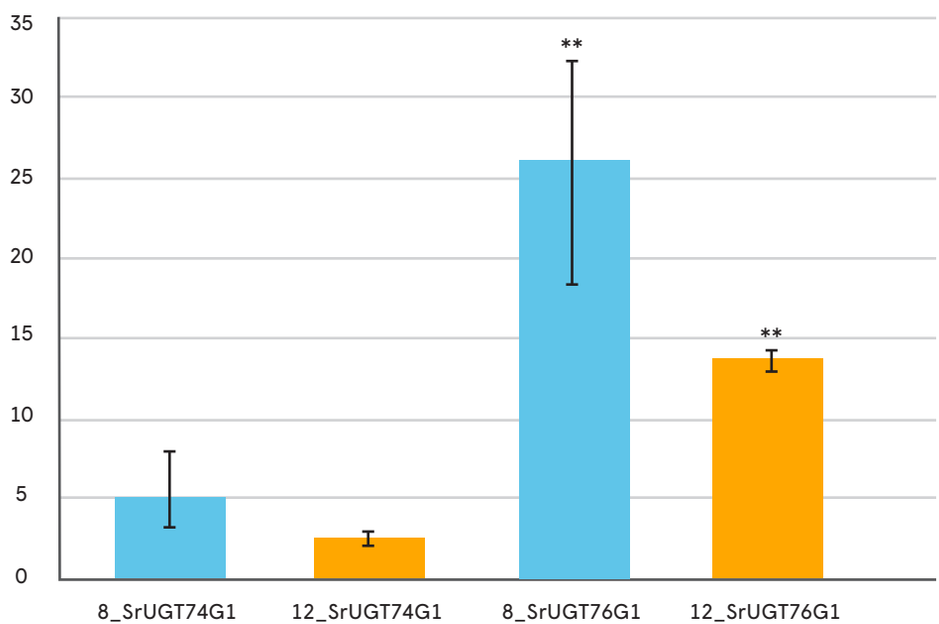
- **Conversión de Reb-A en otros compuestos:** Es posible que la enzima codificada por SrUGT76G1 esté transformando el Reb-A en Reb-I, dado que esta enzima cataliza más de una reacción. Sería interesante evaluar la presencia y cantidad de Reb-I en ambas muestras para confirmar esta hipótesis.

- **Regulación post-transcripcional o post-traduccional:** Aunque el gen se exprese en mayor medida, la enzima podría no estar activa debido a mecanismos internos de regulación que afectan su funcionalidad. Esto explicaría por qué no se observa un aumento de Reb-A a pesar de la alta expresión de SrUGT76G1.

- **Mutaciones en la secuencia del gen:** Otra posibilidad es la existencia de **mutaciones en SrUGT76G1** que alteren la secuencia peptídica de la enzima, reduciendo su capacidad para sintetizar Reb-A. Esta teoría se apoya en lo

reportado por **Lucho et al., 2024**, quienes identificaron variedades de Stevia brasileña con un **codón de parada prematuro** en este gen, lo que resultaba en una menor producción de Reb-A.

EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE ESTEVIÓSIDOS

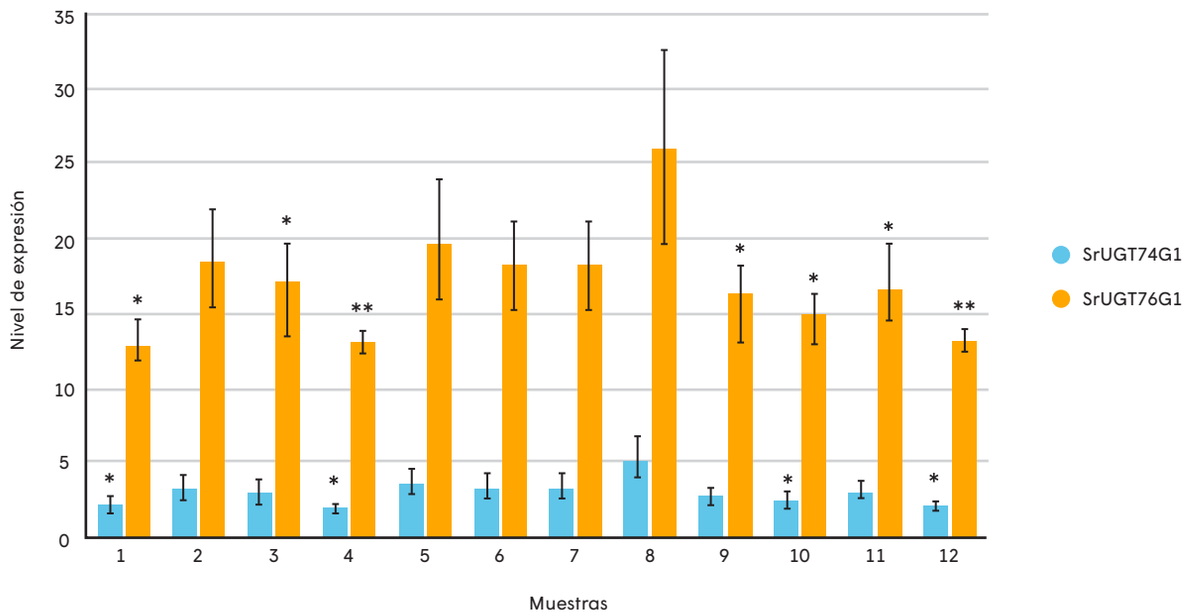


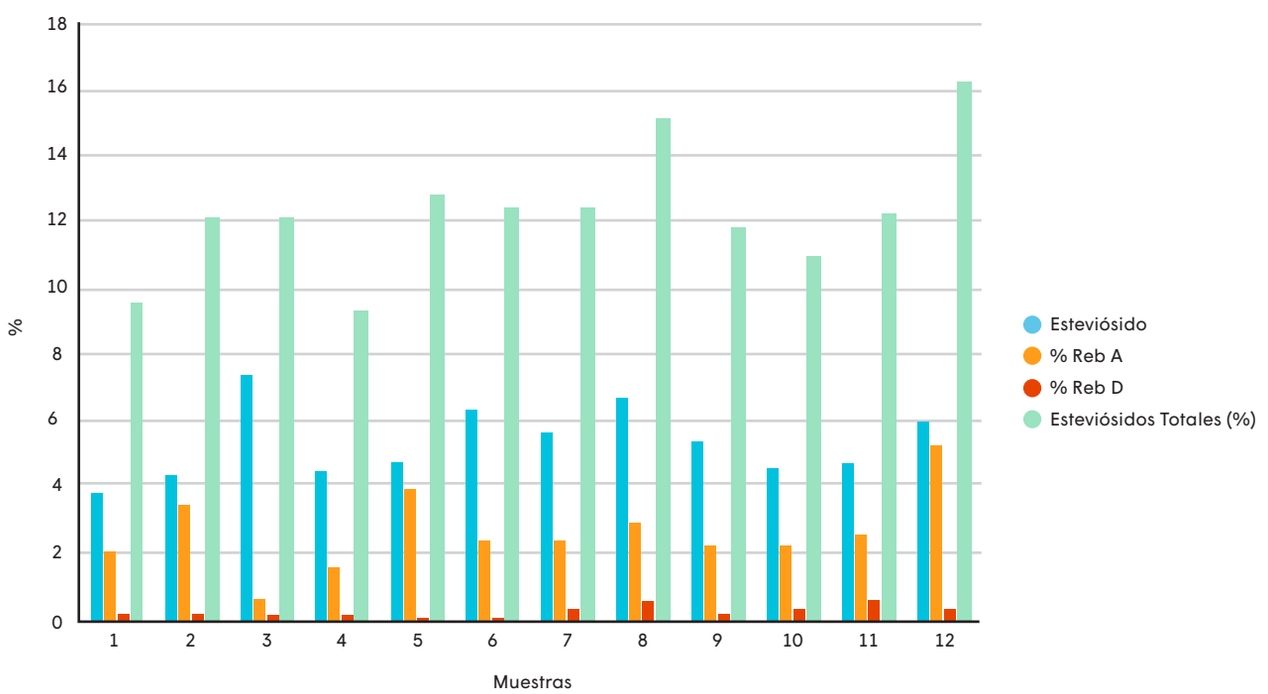
Estos resultados abren nuevas líneas de investigación para comprender mejor la regulación genética de los compuestos dulces en *Stevia rebaudiana*, y optimizar su producción en programas de mejora genética.

ENSAYO 2

Los resultados obtenidos sugieren que podría existir una correlación entre el nivel de expresión del gen SrUGT74G1 y el contenido total de esteviósido. Sin embargo, esta relación no se cumple en todos los casos: las muestras 12 y 2, por ejemplo, no muestran una correspondencia significativa entre ambos parámetros. Una posible explicación es que, aunque el gen se exprese en menor medida, la enzima que codifica podría estar sometida a una regulación más laxa, permitiendo que su actividad se prolongue antes de ser inactivada o degradada, lo que compensaría su baja expresión.

EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE ESTEVIÓSIDOS





Por otro lado, se plantea que la enzima codificada por SrUGT76G1 podría estar transformando el rebaudiósido A (Reb-A) en otros derivados, como el Reb-I, lo que explicaría la menor acumulación de Reb-A en ciertas muestras a pesar de una expresión génica elevada.

ENSAYO 3

Los análisis realizados sobre las muestras seleccionadas revelaron que los niveles de expresión de los genes **SrUGT74G1 y SrUGT76G1**, ambos implicados en la síntesis de compuestos dulces en *Stevia rebaudiana*, fueron **más estables** en comparación con los datos obtenidos en estudios previos. Además, no se detectaron **diferencias significativas** en la expresión de estos genes entre las distintas muestras evaluadas, lo que indica una **uniformidad en el comportamiento** molecular de las plantas seleccionadas. Esta estabilidad es especialmente relevante para los programas de mejora genética, ya que facilita la identificación de líneas con perfiles consistentes y predecibles.

CONSERVACIÓN EX SITU DE LINEAS PARENTALES

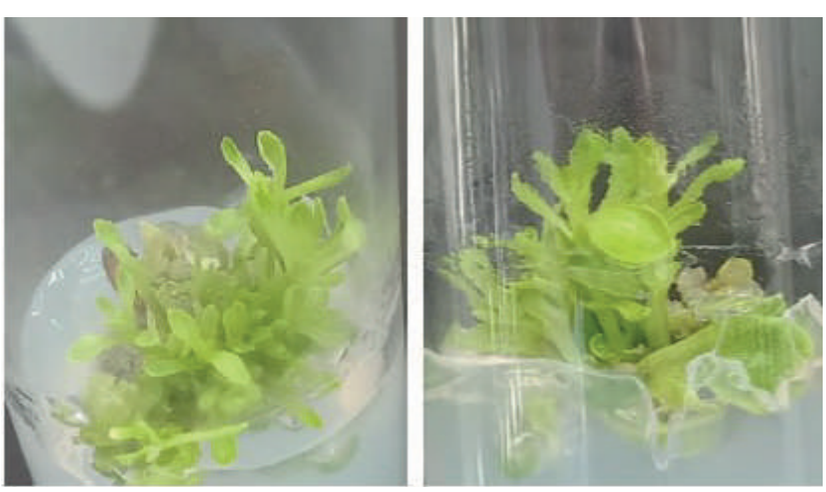
Micropropagación

Para iniciar el cultivo in vitro, se emplearon explantos (fragmentos de tallo con nudo y entrenudo) procedentes de plantas adultas. Estos fueron desinfectados mediante un tratamiento con alcohol al 70 % y lejía comercial (NaClO al 20 % con detergente), seguido de lavados con agua destilada estéril.

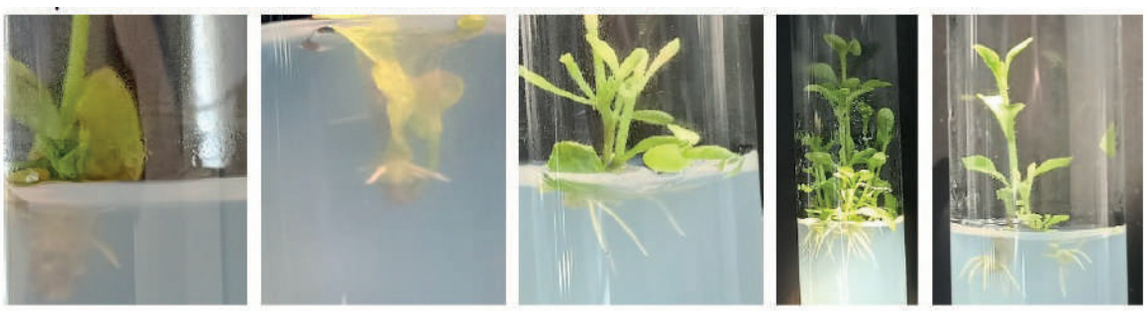
Los explantos se seccionaron en fragmentos de 0,5 cm y se colocaron verticalmente en tubos con medio de cultivo inicial (medio a). Posteriormente, se trasladaron a una cámara de cultivo con condiciones controladas: fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, iluminación LED de 4000 lux y temperatura entre 22–27 °C.

A los 15 días, se observaron yemas adventicias que dieron lugar a tallos de entre 2 y 5 cm. Estos tallos fueron individualizados y transferidos al medio de enraizamiento (medio b), manteniendo las mismas condiciones ambientales. A los 7 días, comenzaron a emerger raíces con buen aspecto y vigor, lo que confirma la eficacia del protocolo aplicado.

ETAPA 1. Consecución del desarrollo de callos y brotes



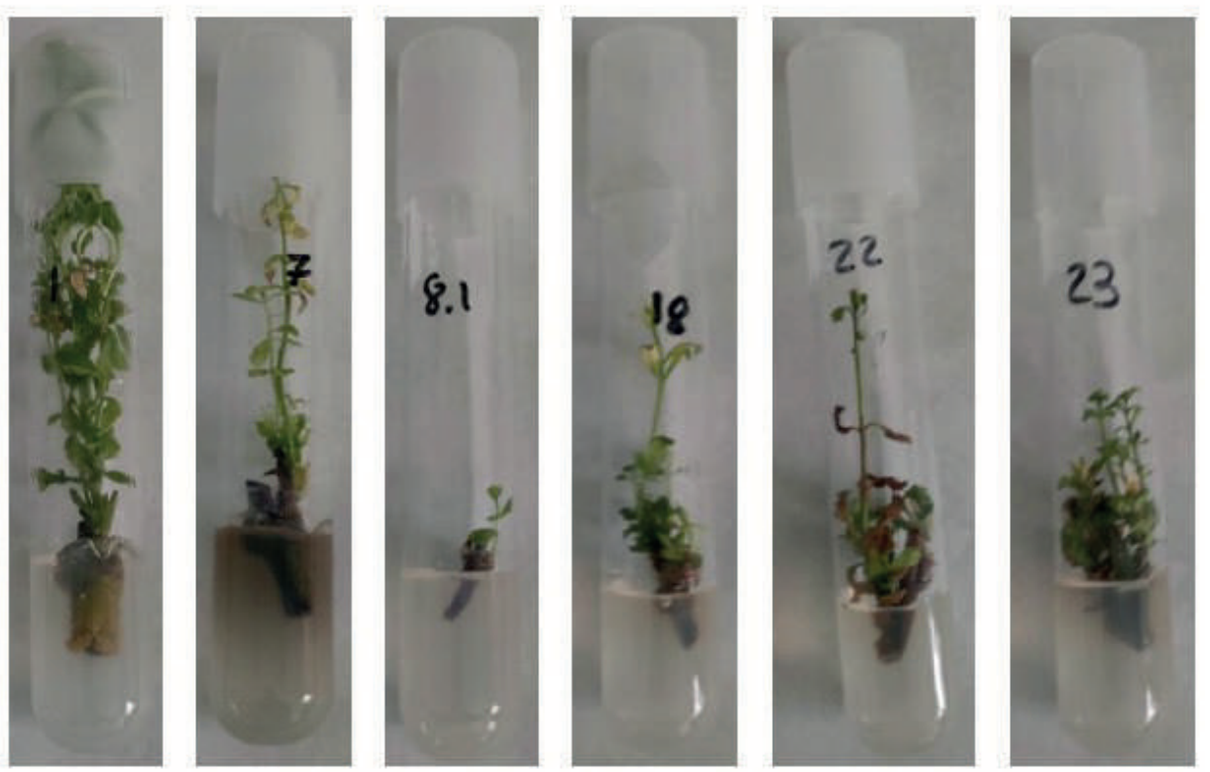
ETAPA 2. Enraizamiento tras cambiar fitohormonas.



ETAPA 3. Desarrollo en maceteros tras un periodo de aclimatación .

Líneas seleccionadas

El cultivo in vitro realizado sobre las líneas seleccionadas fue exitoso, permitiendo el desarrollo de individuos independientes viables. Tras el proceso de enraizamiento, las plantas fueron trasladadas a maceteros individuales, lo que garantiza su crecimiento autónomo y controlado.



La técnica de **micropropagación**, aplicada en este estudio, se confirma como una **estrategia eficaz para conservar la genética** de *Stevia rebaudiana* y obtener **clones de líneas de interés agronómico o comercial.* Además, la combinación de **fitohormonas** testadas sobre distintas líneas mostró resultados positivos, favoreciendo la regeneración de plantas completas con buen vigor y estabilidad.

Estos avances refuerzan el valor del cultivo in vitro como herramienta clave en los programas de mejora y conservación de esta especie.

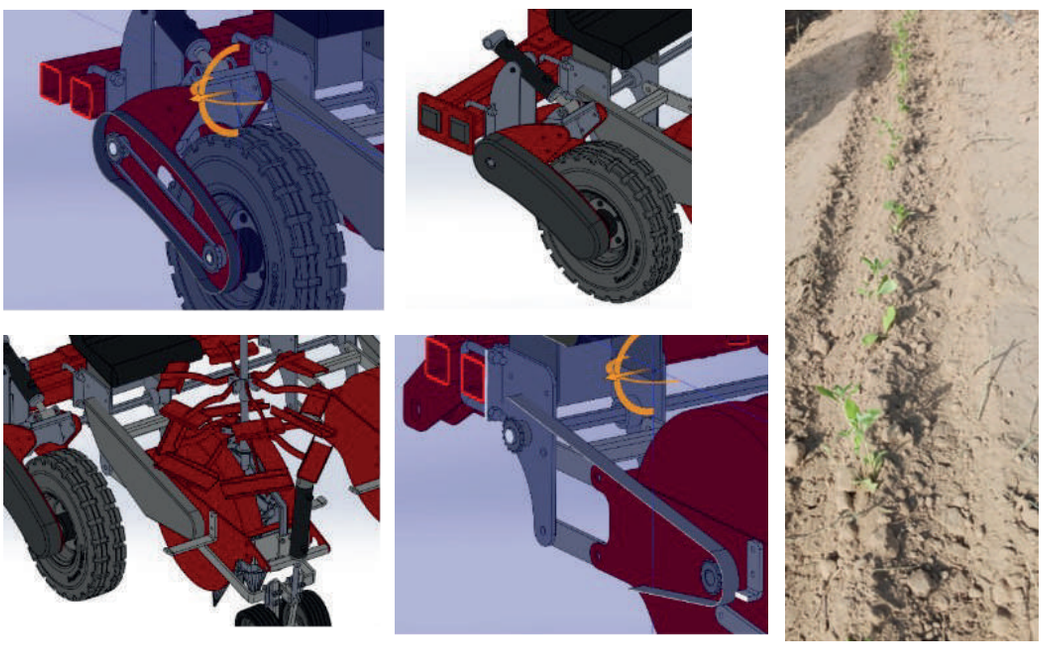
MECANIZACIÓN DEL TRASPLANTE DE *STEVIA REBAUDIANA*

Se desarrolló un prototipo de **trasplantadora mecanizada** para el cultivo de plantas de estevia con el objetivo de lograr la **viabilidad económica** y posibilitar la siembra a gran escala. Esta mecanización reduce el alto costo de la mano de obra asociado al trasplante manual, y también disminuye la manipulación de las plantas, lo que minimiza el riesgo de **contaminación con fitopatógenos.**

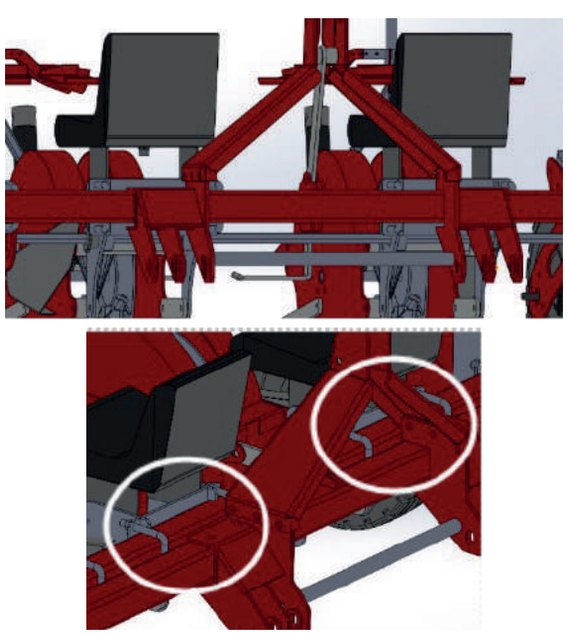
El diseño del prototipo se basó en el control de parámetros críticos para el éxito del trasplante de *Stevia rebaudiana*, como las características de los cepellones, la tipología de las bandejas de alveolos, los marcos de plantación, las técnicas de trasplante y el control de malas hierbas.

Para ello, se realizaron las siguientes **adaptaciones y modificaciones** sobre una trasplantadora base:

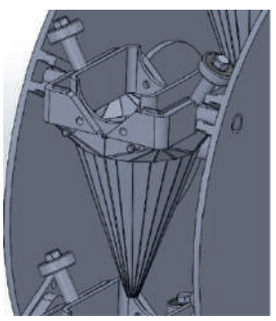
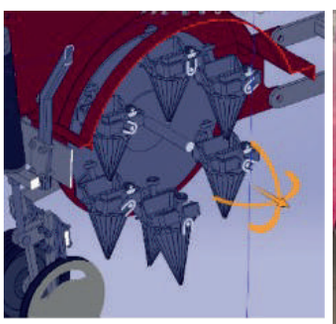
- **Rediseño de la máquina** para permitir un marco de plantación específico:
  - Distribución longitudinal de 150 a 200 mm entre plantas.



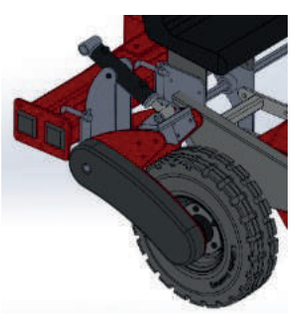
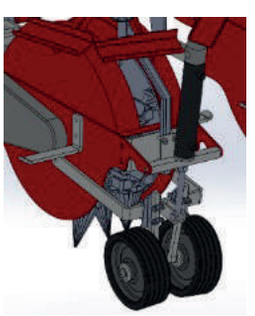
  - Distribución transversal de 600 a 800 mm entre líneas.



- **Implementación de un mecanismo** que permite trabajar tanto con plástico para control de malas hierbas como sin él.

- **Integración de un sistema de actuadores hidráulicos** para regular de forma independiente la posición relativa entre el chasis y el suelo, ajustando las ruedas de tracción y las del arropador desde la unidad tractora.

- **Incorporación de un sistema de inyección de microgránulo.**

- **Maquinaria adaptada al cultivo.**

Conclusiones

PROBLEMAS DE GERMINACIÓN

Las semillas comerciales (Pharmasat), las recolectadas en campo y las cultivadas en invernadero presentan dificultades de germinación, con tasas que no superan el 61%. Además, se observa un desarrollo desigual en las primeras etapas de crecimiento.

EXPRESIÓN GENÉTICA Y DULZOR

- El gen ubiquitina (Ubq) se identificó como el más adecuado para estudiar la expresión de genes relacionados con la producción de compuestos dulces.

- Existe una correlación entre la cantidad de esteviósidos y la expresión del gen SrUGT74G1. Sin embargo, una mayor expresión de este gen no garantiza un aumento de rebaudiósidos, posiblemente debido a:

  - La síntesis de isoformas de rebaudiósidos no analizadas
  - Mecanismos de regulación post-transcripcional o post-traduccional que limitan su actividad

CLONACIÓN VEGETAL: UNA HERRAMIENTA CLAVE

- El cultivo in vitro y la reproducción por esquejes permiten obtener plantas genéticamente idénticas. Estas técnicas son fundamentales para conservar rasgos deseables y desarrollar líneas parentales en programas de mejora genética.

MECANIZACIÓN DEL CULTIVO

- La mecanización agiliza la plantación y facilita la aplicación de tratamientos fitosanitarios y fertilizantes, mejorando la eficiencia del cultivo.

UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural:
Europa invierte en las zonas rurales

GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Sostenible

Proyecto cofinanciado por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) en un 85% dentro del Programa de Desarrollo Rural (PDR) de Extremadura 2014-2022, en la medida 16 "Cooperación" submedida 16.1 "Ayuda para la creación y el funcionamiento de grupos operativos de la AEI en materia de productividad y sostenibilidad agrícolas", siendo el resto cofinanciado por la Junta de Extremadura en un 11,28% y por el Estado, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en un 3,72%.