

## INDUCCION DE POLIPLOIDIA: EFECTO DE LA COLCHICINA EN SEGMENTOS NODALES DE *STEVIA REBAUDIANA* (BERTONI) VC. KH/IAN 142 (EIRETE)

**Denice Natalie Álvarez Ramos<sup>1</sup>**

Universidad Nacional de Asunción, CEMIT - Paraguay

**Rosa Oviedo de Cristaldo<sup>2</sup>**

Universidad Nacional de Asunción, DGICT - Paraguay

**Edgar Álvarez<sup>3</sup>**

PureCircle - Paraguay

**Edith Segovia Corrales<sup>4\*</sup>**

Universidad Nacional de Asunción, CEMIT - Paraguay

**Recibido:** 23/04/2025

**Aprobado:** 30/09/2025

### RESUMEN

La *Stevia rebaudiana*, originaria del Paraguay, pertenece a la familia *Asteraceae* y es una planta semiperenne, cuyo principal valor económico y social es la producción de steviósidos. El steviósido (tri-glucósido) y el rebaudiósido A (tetra-glucosido) típicamente representan la mayoría de los glucósidos de steviol presentes en las hojas de *Stevia rebaudiana*. Una alternativa para aumentar la producción de estos metabolitos secundarios y aumentar el rendimiento agronómico (*i.e.* masa foliar) puede ser la inducción artificial de poliploidía mediado por colchicina. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de colchicina para incrementar el número cromosómico en las especies *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni vc. KH/IAN 142 (*Eireté*). El estudio siguió un diseño experimental por parcelas subdivididas que se centra en poblaciones de 720 segmentos de esquejes nodales (*in vitro*). Los esquejes fueron sometidos a tres concentraciones de colchicina, que fueron de 0,01 ; 0,05 y 0,1 gr/100 mL, en tres tiempos de exposición (4h, 8h y 12h), a 25 °C. Como resultado, los esquejes no presentaron cambios en el nivel de

<sup>1</sup>Master. Universidad Nacional de Asunción, CEMIT. Correo electrónico: [dalvarezramos@gmail.com](mailto:dalvarezramos@gmail.com)

<sup>2</sup>PhD. Universidad Nacional de Asunción, DGICT. Correo electrónico: [rosa.cristaldo@gmail.com](mailto:rosa.cristaldo@gmail.com)

<sup>3</sup>MSc. PURE CIRCLE S.A. Correo electrónico: [edgar.alvarez@purecircle.com](mailto:edgar.alvarez@purecircle.com)

<sup>4</sup>PhD. Universidad Nacional de Asunción, CEMIT. Correo electrónico: [edith.segovia@cemit.una.py](mailto:edith.segovia@cemit.una.py) \*autor para correspondencia.

ploidía, permaneciendo diploides durante el proceso. Esto puede deberse al tipo de explante escogido y al tiempo de exposición al tratamiento para dicho explante.

**Palabras clave:** *Ka'a he'e* - Poliploides - Segmentos nodales - Colchicina.

## ABSTRACT

*Stevia rebaudiana*, native to Paraguay, belongs to the Asteraceae family. It is a semi-perennial plant whose main economic and social value is the production of steviosides. Stevioside (tri-glucoside) and rebaudioside A (tetra-glucoside) typically represent the majority of steviol glycosides present in *Stevia rebaudiana* leaves. An alternative to increase the production of these secondary metabolites and increase agronomic yield (i.e. leaf mass), may be the artificial induction of polyploidy mediated by colchicine. The objective of this study was to evaluate the use of colchicine to increase chromosome number in the species *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni cv. KH/IAN 142 (Eireté). The study followed a split-plot experimental design focusing on populations of 720 nodal cutting segments (*in vitro*). The cuttings were subjected to three concentrations of colchicine, which were 0.01, 0.05 and 0.1 g/100 mL, at three exposure times (4 h, 8 h and 12 h), at 25 °C. As a result, the cuttings showed no changes in ploidy level, remaining diploid throughout the process. This may be due to the type of explant chosen and the exposure time to treatment for that explant. We conclude that the treatments with the different concentrations of colchicine at the exposure times used were not viable for obtaining polyploid cells.

**Keyword:** *Ka'a he'e*, - Polyploidy - Nodal cutting - Colchicine.

## 1. Introducción

La *Stevia rebaudiana* (Bertoni) es una planta nativa del Paraguay, la cual recibe el nombre vernáculo de *Ka'ahe'e* o *tuguy he'e pohá* (Pin et al., 2009) y es cultivada por sus propiedades edulcorantes (Sanabria-Velázquez et al., 2023). Teniendo en cuenta su ecología vegetal en las sabanas del sur de Brasil (Matto Grosso do Sul) y en las mesetas del este de Paraguay, se cultiva en los departamentos de Amambay, Concepción y Central (Cabrera, 1996). En Paraguay, la producción de *Stevia* en el año 2024 fue de 100,4 toneladas (T), mientras que para el año 2025 se esperaba aumentar esa producción a fin de satisfacer la demanda internacional (campoagropecuario.com.py, 2025), aunque estos

niveles de producción son inferiores a los rubros agrícolas como soja o trigo, con un nivel de producción de 11.000 T para la soja y 1.000 T para el trigo (CAPECO, 2025). Las variedades más cultivadas en Paraguay son Eirete, Katupyry y AKHL1 (Villalba Martínez y Oroa Pfefferkorn, 2018). El material KH/IAN vc.142 (Eireté) es una variedad clonal, obtenida por el Instituto Agronómico Nacional perteneciente al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG-Paraguay), tras el método de selección individual, realizado en el año 1998 en una población “landrace” de *Stevia* constituida por 5000 plantas. La variedad sobresaliente fue KH/IAN – vc. 142, que se denominó *Eireté*, la cual es de multiplicación exclusivamente vegetativa, garantizando así la identidad genética de la variedad. Posee de 5 a < 10% de esteviosidos en hojas y 3 a < 6% de rebaudiosido A en hojas y el rendimiento medio es de 3.694 Kg / Ha de hojas secas (Britos y Park, 2016). En la literatura especializada se encuentran reportes sobre esta variedad, observándose un aumento del poder germinativo de las semillas bajo el efecto estimulante de dosis de rayos gamma cobalto-60 (60-Co) bajas (González y Nakayama, 2015), pero presentan poca tolerancia al estrés hídrico en condiciones *in vitro* (Villalba y Nakayama, 2016).

Desde el punto de vista del mejoramiento genético de la *Stevia rebaudiana* – especie diploide de  $2n = 22$  (Xu *et al*, 1982)-, resulta de interés el incremento de la variabilidad genética mediante la obtención de plantas con variaciones cromosómicas numéricas (Niazian y Nalousi, 2020) o estructurales. Estas variaciones serían de utilidad como materia prima para la obtención de cultivares de mayor rendimiento, adaptación o especialización de estos (Sattler *et al.*, 2016).

La mutagénesis es una herramienta potencial para ampliar la variabilidad y aislar los rasgos económicos deseables en corto periodo en comparación con los procedimientos convencionales de mejoramiento (Ahmar *et al.*, 2020; Roychowdhury y Tah, 2013). Con el descubrimiento de agentes mutagénicos, tanto físicos como químicos, los fitomejoradores tienen la capacidad de inducir la variabilidad y utilizarlo en sus programas de mejoramiento. Algunos agentes mutagénicos son los siguientes: los rayos x, rayos g, neutrones rápidos, y productos químicos como el etilmetanosulfonato (EMS), dietilestilbestrol (DES), metilmetanosulfonato (MMS) (FAO/OIEA. 2021). La inducción química se realiza mediante la utilización de compuestos químicos como la colchicina, que se une a las proteínas (dímeros de tubulinas libres). Al unirse a los microtúbulos producen la despolimerización e interrumpen la polimerización posterior de los

microtúbulos (Slobodnick et al., 2018). A su vez, las cromátidas no son traccionadas a los polos, formándose núcleos de restitución con doble número de cromosomas (Kumar et al., 2019).

La propagación de *Stevia* comúnmente se realiza por esquejes, los cuales enraízan fácilmente (Castañeda-Saucedo et al., 2020). También puede propagarse por semillas en tablones (Yadav, et al., 2011).

Considerando los antecedentes descritos, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la colchicina sobre esquejes nodales para incrementar el número cromosómico en la especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni vc. KH/IAN 142 (*Eireté*).

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Colecta de muestras de materiales de *Stevia rebaudiana*

El material utilizado para el establecimiento *in vitro* fueron segmentos nodales extraídos de plantas madre de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bert. vc. KH/IAN 142 (*Eirete*) obtenida del invernadero del Centro de Investigaciones Hernando Bertoni, situado en el departamento de Cordillera, Caacupé, aclimatados y desinfectados en el Centro multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT–DGICT– UNA).

### 2.2. Aspectos éticos e impacto ambiental

Este estudio no incorporó ninguna modificación genética a la especie. Por tanto, no necesita un estudio de impacto ambiental. Se realizaron los ensayos bajo condiciones controladas y asépticas.

### 2.3. Diseño Experimental

El diseño experimental se realizó por parcelas subdivididas con nueve tratamientos más tres testigos, por diez esquejes de segmentos nodales y seis repeticiones, todas con disposición al azar y a una temperatura de exposición de 25°C (**Ilustración 1**). Se centra en una población de 720 segmentos de esquejes nodales (*in vitro*) de la especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni vc. KH/IAN 142 (*Eirete*) de cultivo somaclonales, los cuales fueron sometidos a tres concentraciones (0,01 ; 0,05 y 0,1 gr/100 mL) del agente colchicina (CAS Number 64-86-8, código C3915, Sigma), en tiempos de 4h, 8h y 12h y a 25 °C (ver ilustración 1). Los análisis citogenéticos se basaron en la técnica de acuerdo al material de estudio Feulgen y Rossenberg (1924) en raíces.



C: concentración

C<sub>1</sub>: 0.01%

C<sub>2</sub>: 0.05%

C<sub>3</sub>: 0.1%

T: control

Numero de esquejes: 10

**Ilustración 1.** Diseño experimental del ensayo de colchiploides de *Stevia rebaudiana* vc KH/IAN 142 (Eirete).

## 2.4. Micropropagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bert. vc. KH/IAN 142 (Eireté) vía organogénesis somática.

Las multiplicaciones de esquejes somaclonales de *Stevia rebaudiana* se realizaron siguiendo las etapas en el proceso *in vitro* (**Ilustración 2**).

Como primera parte se procedió a realizar la desinfección y luego se colocaron en el invernadero del CEMIT-UNA para su aclimatación. Para el protocolo *in vitro* se seleccionaron explantes con las siguientes características: entre 4 – 5 nudos sin inducción a floración, cortadas a 3 nudos de la base de la planta madre de modo a que no estén en contacto con el suelo y cuyas hojas no presenten síntomas de enfermedad alguna. Para la multiplicación, los explantes fueron cortados entre los entrenudos a partir del segundo nudo desde la base y colocados en medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962) para su desarrollo. Se volvieron a replicar cada 10-15 días hasta obtener el número de población de estudio. Se permitió que el explante llegara hasta la fase de enraizamiento al cabo de 25 días para realizar los estudios cromosómicos pertinentes en las raicillas formadas.



**Ilustración 2.** Proceso de micropropagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* vc. KH/IAN 142 “Eirete”: a y b) desinfección, c y d) multiplicación.

## 2.5. Inducción a Colchiploides de esquejes nodales de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bert. vc. KH/IAN 142 (Eireté)

La preparación de los segmentos nodales de ejemplares de *Stevia r.* (Bertoni) Bert. var. *Eirete* consistió en la impregnación de estos segmentos nodales en forma invertida en los tubos de ensayo con solución de colchicina al 0,01; 0,05; 0,1 gr/100ml, con tiempos de tratamiento de 4h, 8h y 12h, a una temperatura de 25°C. Se realizó el lavado de los materiales tratados con agua destilada esterilizada, procediendo a la regeneración *in vitro* de los materiales tratados en medio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962). Se realizó la primera selección por análisis observacional de comparación morfológica y primer recuento cromosómico por el método citogenético de Feulgen y Rossenberg una vez enraizado. Luego, se realizó la selección de los materiales que reunieron las condiciones deseadas (4 entrenudos) y se sub cultivaron. Se repitió el protocolo de micropropagación y el análisis de recuento cromosómico por método citogenético de Feulgen y Rossenberg hasta 6 repiques y la estabilización que consistía en el control y mantenimiento del nivel de ploidía de las muestras, verificadas mediante análisis citogenético (**Ilustración 3**).



**Ilustración 3.** Proceso de inducción y Análisis *in vitro* de plantas tratadas con colchicina (Colchiploides).

## Análisis Citogenético

El análisis se realizó sobre la porción meristemática de la raíz de la vitroplanta tratada con colchicina. Los estudios cromosómicos en raíces de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bert. vc. KH/IAN 142 (*Eireté*) por el Método de Feulgen y Rossenberg en raíces en el 1°, 3° y 5° repique. Se determinó el carácter genético de la planta madre de la especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bert. vc. KH/IAN 142. (*Eirete*). Una vez regenerados los explantes tratados y desarrolladas las raíces, fueron realizados los estudios cromosómicos por el protocolo del método de Feulgen y Rossenberg. La variable evaluada fue el número de explantes con número cromosómico poliploide.

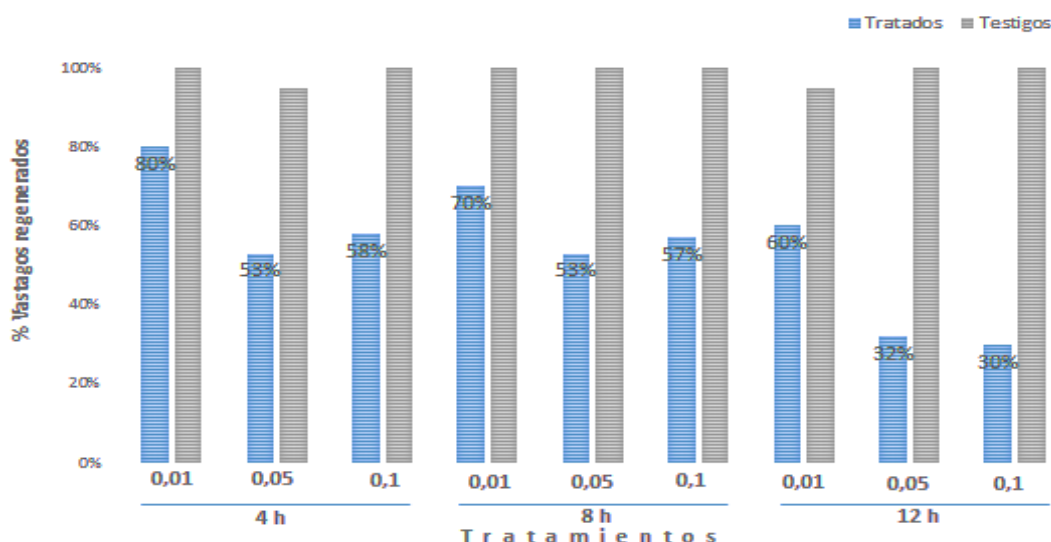
## 3. Resultados y discusiones

### 3.1. Micropropagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* vía organogénesis somática.

De un total de 1.000 vitro plantas, 540 esquejes fueron seleccionados para el proceso de inducción por colchicina. Ciento ochenta esquejes conformaron los testigos del proceso, obteniéndose un total de 720 esquejes para el estudio.

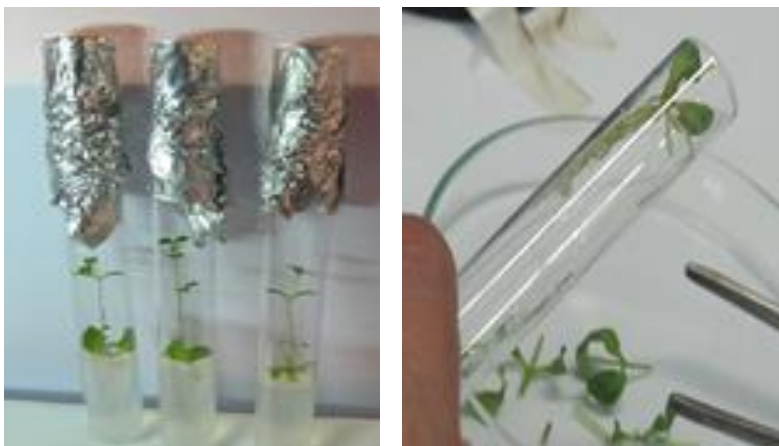
### 3.2. Inducción a Colchiploides de esquejes nodales de *Stevia rebaudiana*.

Como indica la **Ilustración 4**, la población tratada con 0.01 gr/100ml de colchicina, para los tiempos de exposición de 4h, fue de 80%, para 8 h fue de 70% y para 12 h fue de 60% de recuperación, respectivamente. En la concentración de 0,05 gr/100ml la recuperación de la población fue de 53% a las 4 h y 8 h y para las 12 h disminuyó a 32%; para la concentración de 0,1 gr/100ml de colchicina los porcentajes de recuperación fueron de 58% a las 4 h; 57% a las 8h y 30 % a las 12h. Los vástagos considerados muertos al segundo día del tratamiento mostraron un progresivo deterioro; la colchicina tiene la capacidad de eliminar la viabilidad celular de los vástagos de *Stevia*, al menos en el tiempo exposición y de concentración al cual estas fueron sometidas en este trabajo. El comportamiento para los testigos fue de un desarrollo normal.



**Ilustración 4.** Efectos del tratamiento de esquejes de *Stevia rebaudiana* vc. KH/IAN 142 (Eireté), con solución de colchicina al (0,01%; 0,05%; 0,1%) en medio MS.

A los quince días, los vástagos empezaron a echar raíces sin necesidad de adicionar IBA o ANA como menciona la literatura (Yang *et al.*, 1981). Al día dieciocho las raíces tenían un largo de 1cm, necesarios para realizar el recuento cromosómico (**Ilustración 5**).



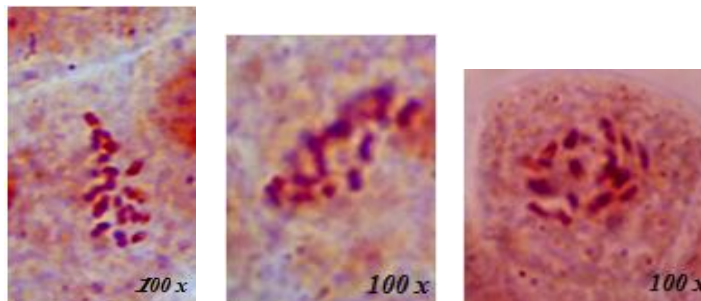
**Ilustración 5.** a) Vástagos tratados con raíces. b) Raíces utilizadas en el recuento cromosómico.

## 2.6. Análisis citogenético

Un total de 263 vástagos tratados fueron analizados por recuento cromosómico. Cada línea fue examinada para cada tratamiento y se observó que no hubo variación en su nivel de ploidía normal, es decir, el 100% de los individuos permanecieron diploides ( $2n=2x=22$ ), con relación a los testigos de la misma especie y variedad (**Ilustración 6**), Los resultados de esta investigación no concuerdan con los trabajos realizados por Pinheiro, (2000) en *Barachiaria brizantha* para mejora de forrage; Collavino,(1995) en *Stevia reabudiana* a partir formación de callos, que indujo el crecimiento de la parte aérea y de la raíz por separado mediante la aplicación de hormonas exógenas, con lo que se incrementa el costo y el tiempo de experimentación; Hamil (1992), en inducción a autotetraploidía en *Musa acuminata*.

Salazar Mercado *et al.* (2021) observaron que, tras el tratamiento de plántulas de *Kalanchoe tubiflora*, se produjeron modificaciones morfológicas tanto en la planta como en las hojas, lo que favoreció el incremento de la biomasa. En un estudio de mejoramiento de la suculenta *Echeveria* 'Peerless', Cabahug *et al.* (2021) emplearon concentraciones de colchicina de 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% y 1.0%, con tiempos de exposición de 3, 6, 9 y 12 horas, y registraron cambios significativos en las hojas de los poliploides inducidos. Asimismo, en un estudio sobre la inducción de tetraploidía en *Citrus reticulata* Blanco mediante colchicina, se utilizaron concentraciones de 0.2% con un tiempo de exposición

de 24 horas, lo que afectó significativamente diversas características de la planta (Surson *et al.*, 2015).



**Ilustración 6.** Análisis citogenético de *Stevia rebaudiana* KH/IAN142 “Eirete” a) testigo  $2n=2x=22$ , b y c) vástagos tratados  $2n=2x=22$ .

La inducción con colchicina produjo esquejes con reacción vegetativa que necesitaron de repiques para romper el estado vegetativo e inducir el enraizamiento. Una vez obtenidas las raíces se verificó el nivel de ploidía, resultando en individuos diploides. En trabajos anteriores se utilizaron como explantes de estudio tradicional polen, semillas (Bernard *et al.*, 2012) y callos, siendo esta última la más utilizada. Dicho explante es considerado ideal para inducciones a poliploidía, pero tienen algunas desventajas como la producción de quimeras y la lenta regeneración del material, ya que precisa de dos pasos mediados por hormonas para la regeneración del explante. La utilización de segmentos nodales como explante de estudio tiene la facilidad de una rápida generación (Doliński & Kowalczyk, 2019), por lo que se optó por utilizar este tipo de explante. En este estudio, la colchicina no indujo a cambio en el número cromosómico de la especie. Esto podría ser debido al tipo de explante utilizado y al tiempo de exposición al que fueron sometidos, por lo que se podría considerar que las condiciones experimentales no fueron las más indicadas para esta especie. El éxito de la colchicina como agente poliploidizante depende de la interacción de varios factores: la concentración específica, el período de exposición, la división activa de los tejidos, el tipo celular tratado y el ambiente favorable para la mitosis (Eigsti *et al.*, 1955). Según Pehlivan y Kunter (2021), el uso de un medio sólido, semi sólido o líquido puede afectar el tratamiento, quienes también sugieren un mayor tiempo de exposición a dosis bajas de colchicina. Gracias a esta técnica se han podido realizar mejoras en vegetales de interés tales como los siguientes: *Nicandra physaloides*

(Gupta y Roy 1986), *Clitoria ternatea* (Gandhi S., 1997) y orange (Romero-Aranda *et al.* 1997).

Según otros estudios realizados, las concentraciones óptimas para obtener células poliploides de semillas de *S. rebaudiana*, de la variedad Zhongshan No. 2 fueron colchicina al 0,05 % durante 48 h o con colchicina al 0,1 % durante 24 h (Zhang *et al.*, 2018) o de 0.5 a 0.0001 % de colchicina en variedades brasileñas de CENARGEN/EMBRAPA (M. de Oliveira *et al.*; 2004). En otras especies vegetales, se observó la eficacia de la Colchicina en los rangos de 0,5mg a 5mg para *S cereale* (Caperta *et al.*, 2006b), 30, 60, 120, and 240 mg/L para *Echinacea purpurea* (Nilanthi *et al.*, 2009), 0.1% con DMSO para *P. plicatulum* (Sartor *et al.*, 2004), 0.01, 0.05 y 0.1% para *B. brizantha* (Pinheiro *et al.* 2000b), 0.05, 0.10 y 0.15 % para *A vera* L (Buiza *et al.*, 2001), con tiempos de exposición variados.

#### 4. Conclusiones

Bajo estas condiciones experimentales, los esquejes expuestos a las tres dosis de colchicina utilizados no generaron cambios en el nivel de ploidía, que permanecieron sin modificaciones durante el proceso. Se observó que al incrementar el tiempo de exposición y concentración del agente ploidizante se tuvo un mayor número de vástagos inviable. Esto puede deberse al tipo de explante escogido y al tiempo de exposición al tratamiento utilizados para esta especie vegetal.

Se sugiere realizar un ensayo con este tipo de explante en medio de cultivo semisólido por tiempo de exposición de una semana antes de dar por descartado el explante en sí. Así también, se recomienda el uso de vitroplantas como explantes las cuales deberán ser sometidas al mismo rigor del experimento.

#### 5. Referencias

Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K. H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2590.

- Bernard F, Moghbel N, Hassannejad S. (2012). Treatment of licorice seeds with colchicine: changes in seedling DNA levels and anthocyanin and glycyrrhizic acid contents of derived callus cultures. *Nat Prod Commun.* Nov;7(11):1457-60.
- Britos, R., & Park, J. (2016). *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. Ed. IPTA. Paraguay. 116pp.
- Buiza, J. I., & Cequea, H. (2001). Evaluación citogenética de la generación M1V2 de tetraploides experimentales en sábila (*Aloe vera* L.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 1(1), 29-33.
- Cabrera, A. L; Holmes, W. C; McDaniel, S. (1996). *Compositae III. Flora del Paraguay*, 25: 302-306
- Cabahug, R. A. M., Khanh, H. T. T. M., Lim, K. B., & Hwang, Y. J. (2021). Phenotype and ploidy evaluation of colchicine-induced *Echeveria* 'Peerless'. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 13, 17-24.
- campoagropecuario.com.py <https://www.campoagropecuario.com.py/notas/4232/stevia-alta-demanda-baja-produccion-y-nuevos-mercados-en-la-mira>. Revisado el 8/07/2025.
- CAPECO.org.py. 2025 <https://capeco.org.py/area-de-siembra-produccion-y-rendimiento/>. Revisado en 08/07/2025.
- Caperta, A; Delgado, M; Ressurreição, F; Meister, A. (2006). Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma* 227: 147–153
- Castañeda-Saucedo, M. C., Tapia-Campos, E., Ramírez-Anaya, J. D. P., & Beltrán, J. (2020). Growth and development of stevia cuttings during propagation with hormones in different months of the year. *Plants*, 9(3), 294
- Collavino, M; De Badaro, R; Mroginski, L. (1995). Inducción de variaciones cromosómicas por tratamiento con colchicina en diploides micropropagados de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. (Grado). UNAM, Corrientes- Argentina. pp 19.
- Doliński, R., & Kowalczyk, K. (2019). Fast direct regeneration of plants from nodal explants of *Stevia rebaudiana* Bert. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 18(5), 95-103.
- Eigsti, O.J; Dustin, P. (1955). *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology, and Chemistry*. Iowa State College Press. Iowa, U.S.A. pp 28-30; 383.

- Gandhi, S. (1997). Colchicine-Induced Autotetraploidy in *Clitoria ternatea* L. *Cytologia*, 62(1), 13-18.
- González, M. C., & Nakayama, H. D. (2015). Radioestimulación de la germinación en *Stevia rebaudiana* cultivar KH-IAN VC-142 (Eireté), mediante el empleo de rayos gamma 60CO. *Cultivos Tropicales*, 36(4), 117-119.
- Gupta, S. K., & Roy, S. K. (1986). Induced colchiploidy in *Nicandra physaloides*. *Cytologia*, 51(2), 319-324.
- FAO/OIEA. (2021). Manual de mejoramiento por mutación – Tercera edición. Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P. y Jankuloski, L. (coords.), Viena, FAO. <https://doi.org/10.4060/i9285es>.
- Feulgen, R., & Rossenbeck, H. (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die-darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.
- Hamill, D.S; Smith, M.K; Dodd W.A. (1992). In vitro Induction of Banana atotetraploids by colchicine treatment of micropropagate diploids. *J. Bot.*, 40: 887 - 96.
- Kumar, R., Jha, K. K., Sengupta, S., Misra, S., Mahto, C. S., Chakravarty, M. K., ... & Yadav, M. (2019). Effect of colchicine treatment on plant growth and floral behaviour in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5), 405-411.
- Niazian, M., & Nalousi, A. M. (2020). Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(3), 447-469.
- Nilanthi, D; Chen, Xiao-Lu; Zhao, Fu-Cheng; Yang, Yue-Sheng; Wu, H. (2009). Induction of Tetraploids from Petiole Explants through Colchicine Treatments in *Echinacea purpurea* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 7 p.
- M. de Oliveira, V; Forni-Martins, R.E; Magalhães, M. P; Alves, N. M. (2004). Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploidy cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 27, 2, 215-222.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3).

- Pehlivan, E. C., & Kunter, B. (2021). Effects of colchicine on in vitro regeneration and ploidy level in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Agricultural and Natural Research & Reviews*, 99.
- Pin, A. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. In *Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción* (pp. 441-441).
- Pinheiro, A.A; Pozzobon, M.T; Do Valle, C.B; Penteado, M.I.O; Carneiro, V.T.C. (2000). Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Reports*, 19: 274–278.
- Romero-Aranda, R., Bondada, B. R., Syvertsen, J. P., & Grosser, J. W. (1997). Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus. *Annals of Botany*, 79(2), 153-160.
- Roychowdhury, R., & Tah, J. (2013). Mutagenesis—A potential approach for crop improvement. *Crop improvement: new approaches and modern techniques*, 149-187.
- Salazar Mercado, S. A., Quintero Caleño, J. D., & Bustos Urbano, V. J. (2021). Impact of colchicine on leaf morphology and stomatics of *Kalanchoe tubiflora* (Harv.) Raym.-Hamet (Crassulaceae). *Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation*. 2021. DOI: 10.17581/bp. 2021.10201, 10(2 (2021)), 1-10.
- Sanabria-Velazquez, A. D., Enciso-Maldonado, G. A., Maidana-Ojeda, M., Diaz-Najera, J. F., Thiessen, L. D., & Shew, H. D. (2023). Validation of standard area diagrams to estimate the severity of *Septoria* leaf spot on stevia in Paraguay, Mexico, and the United States. *Plant Disease*, 107(6), 1829-1838.
- Sartor, M. E.; Espinoza, F.; Quarín, C. L. (2004). Inducción de autoploidía en *Paspalum plicatum*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas - Resumen: A-016*. Universidad Nacional del Nordeste - Corrientes - Argentina.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243, 281-296.
- Slobodnick, A., Shah, B., Krasnokutsky, S., & Pillinger, M. H. (2018). Update on colchicine. *Rheumatology*, 57(suppl\_1), i4-i11.
- Surson, S., Sitthaphanit, S., & Wongma, N. (2015). In vivo Induction of Tetraploid in Tangerine Citrus Plants (*Citrus reticulata* Blanco) with the Use of Colchicine. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 18(1), 37-41.

- Villalba, B. L., & Nakayama, N. H. (2016). Efecto del estrés hídrico inducido con PEG-6000 sobre el crecimiento in vitro de plantas de *Stevia rebaudiana* cv. 'KH-IAN/VC-142'. *Biotechnol. Veg.* 16: 189-192.
- Villalba Martínez, C. J., & Oroa Pfefferkorn, E. D. (2018). Concentración de nutrientes en tres variedades de stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni] cultivadas en un Ultisol. *Informaciones agronómicas de Hispanoamérica*, (29), 9-13.
- Xu, B; Li, L. (1982). Karyotype analysis of *Stevia rebaudiana* (Compositae). *Bull. Jiangsu Agric. Coll.* 3:17-19.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian journal of plant science*, 91(1), 1-27.
- Yang, Y. W., Hsing, Y. I., & Chang, W. C. (1981). Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through axillary shoot proliferation in vitro. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 22, 57-62.
- Zhang, H., An, S., Hu, J., Lin, Z., Liu, X., Bao, H., & Chen, R. (2018). Induction, identification and characterization of polyploidy in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant biotechnology*, 35(1), 81-86.