

RESUMEN

Conocidas son las aplicaciones de la tecnología nuclear con fines médicos, industriales, agrícolas y en generación de energía eléctrica y térmica. En el ámbito forestal son desconocidas, aunque la radiación ionizante podría ser una herramienta de mejoramiento muy importante para crear variabilidad genética inexistente en la naturaleza, no disponible mediante las tecnologías tradicionales que deben usar la recombinación genética mediante hibridación (polinización artificial) y otras herramientas biotecnológicas más recientes (modificación del genoma).

Las aplicaciones de tecnologías nucleares podrían tener un gran impacto en el nuevo escenario de cambio climático que está afectando la adaptabilidad de las especies nativas y exóticas en el país, lo que se manifiesta en la aparición de enfermedades y plagas, como es el caso de la mortalidad en poblaciones naturales de *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch, en la significativa merma de productividad de las plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill., en la vulnerabilidad de especies como el ruil (*Nothofagus alessandrii* Espinosa) y otras.

La aplicación de bajas dosis de radiación gamma "hormesis", genera alteraciones metabólicas y fisiológicas, mejora la germinación en las semillas y también el crecimiento inicial de las plantas. Aunque se sabe poco sobre la naturaleza básica de este fenómeno, existe una relación entre hormesis y efectos epigenéticos que se manifiestan como respuestas adaptativas en las especies irradiadas.

En tanto, la aplicación de dosis mayores de radiación gamma produce un efecto conocido como mutagénesis, producto de alteraciones en el ADN, que puede realizarse al azar sobre cualquier secuencia, o bien de forma dirigida (mutagénesis dirigida) sobre una secuencia conocida y en la posición de interés. En estos casos las características modificadas genéticamente son heredables y se aplican a programas de mejoramiento genético vegetal aumentando la biodiversidad y la productividad. La aplicación de rayos gamma y otros agentes mutágenos físicos y químicos en el mejoramiento de cultivos agrícolas (arroz, trigo, maíz, cebada y soya entre otros) en los últimos años ha resultado en 3.275 cultivares mutantes registrados en 224 especies, generando enormes beneficios económicos y propiciando mejores niveles de vida de las variedades en todo el mundo. Sin embargo, existen pocas experiencias a nivel mundial de aplicación de estas tecnologías en especies forestales, donde se reportan entre otras a *Araucaria angustifolia*, *Pinus montezumae* y *Abies religiosa*.

En este trabajo se efectúa una revisión del estado del arte de estas tecnologías y sus posibles aplicaciones al ámbito de la conservación y el mejoramiento genético forestal de especies nativas y exóticas de rápido crecimiento en Chile.

Palabras clave: Radiación gamma, hormesis, mutagénesis, ADN, conservación, mejoramiento genético forestal

SUMMARY

Known are the applications of nuclear technology for medical, industrial and agricultural purposes, and in the generation of electrical and thermal energy. In the forestry field, they are unknown, although ionizing radiation could be a very important breeding tool to create genetic variability that does not exist in nature, not available through traditional technologies that must use genetic recombination through hybridization (artificial pollination) and other most recent biotechnological tools (modification of the genome).

The applications of nuclear technologies could have a great impact in the new scenario of climate change that is affecting the adaptability of native and exotic species in the country, which manifests itself in the appearance of diseases and pests, as is the case of the mortality in natural populations of *Araucaria araucana*, in the significant decrease in productivity of the plantations of *Eucalyptus globulus*, in the vulnerability of species such as the Ruil (*Nothofagus alessandrii*) and others.

The application of low doses of gamma radiation "hormesis", generates metabolic and physiological alterations, improves germination in the seeds and also the initial growth of the plants. Although little is known about the basic nature of this phenomenon, there is a relationship between hormesis and epigenetic effects that manifest as adaptive responses in irradiated species.

Meanwhile, the application of higher doses of gamma radiation produces an effect known as mutagenesis, product of alterations in DNA, which can be performed randomly on any sequence, or in a directed manner (directed mutagenesis) on a known sequence and on the position of interest. In these cases, the genetically modified characteristics are heritable and are applied to plant breeding programs increasing biodiversity and productivity. The application of gamma rays and other physical and chemical mutagens in the improvement of agricultural crops (rice, wheat, corn, barley and soybean, among others) in recent years has resulted in 3,275 mutant cultivars registered in 224 species, generating enormous economic benefits and promoting better living standards of varieties throughout the world. However, there are few worldwide experiences of application of these technologies in forest species, where they report, among others, *Araucaria angustifolia*, *Pinus montezumae* and *Abies religiosa*.

In this work a review of the state of the art of these technologies and their possible applications to the field of conservation and forest genetic improvement of native and exotic species of rapid growth in Chile is made.

Key words: Gamma radiation, hormesis, mutagenesis, DNA, conservation, forest genetic improvement

INTRODUCCIÓN

En Chile existen grandes desafíos relacionados con los efectos del cambio climático en la adaptabilidad y crecimiento de los bosques nativos y de las plantaciones, que se manifiestan en la aparición de pestes y enfermedades (Sturrock *et al.*, 2011), como producto de largos períodos de sequía, y que también han favorecido incendios forestales como los del año 2017. De esta forma, un factor hace que se potencie el efecto negativo del otro, lo que plantea la necesidad de iniciar la investigación y evaluación de nuevas variedades genéticas forestales que permitan lograr la protección y sustentabilidad de los recursos forestales y, por extensión, del medio ambiente relacionado.

Los programas de reforestación deben incluir diferentes especies, tanto nativas como exóticas, que contribuyan a mitigar los efectos del cambio climático, en particular en las regiones más impactadas por los últimos incendios que afectaron casi medio millón de hectáreas.

Sin embargo, el crecimiento de los árboles puede tomar varios años y se debe disponer de variedades forestales adaptadas, de rápido crecimiento y en cantidades que permitan su propagación operacional masiva.

Una alternativa para obtener nuevas variedades es exponer germoplasma a radiación gamma, con el fin de inducir cambios genéticos, dando origen a la selección de nuevas líneas de variedades con tolerancia a estrés abiótico o resistencia biótica que puedan incluirse en el ecosistema forestal. Utilizando estas técnicas sería posible acelerar lo que la naturaleza realiza por sí sola en millones de años.

Las posibles aplicaciones de las tecnologías nucleares tienen gran importancia en el nuevo escenario mundial de cambio climático que está afectando tanto a especies nativas como exóticas en el país, en cuanto a la sorpresiva aparición de nuevas enfermedades y plagas, como es el caso de la mortalidad en poblaciones naturales de *Araucaria araucana* y plantaciones de *Eucalyptus globulus*, o incrementando la vulnerabilidad de especies como ruil (*Nothofagus alessandrii*) y otras.

Por ello, lograr un aumento en la variabilidad genética en especies forestales mediante técnicas nucleares permitiría mejorar la eficiencia del proceso de reforestación y la recuperación especies amenazadas en su hábitat natural, recuperando ecosistemas difíciles de sustentar en la actualidad.



Figura N° 1
MORTALIDAD DE *Araucaria araucana* (IZQ.) Y DAÑOS DE INSECTOS EN *EUCALIPTO* (DER.)

En el corto plazo, la sola aplicación de tecnologías de mejoramiento genético convencional no permite soslayar los problemas asociados a la adaptabilidad de las especies nativas y exóticas, en cuanto a la generación de variabilidad genética inexistente en la naturaleza.

Las tecnologías nucleares consideran la hormesis y la mutagénesis, que pudieran ser usadas tanto en programas de conservación genética forestal (bienes públicos) aplicables en especies vulnerables o cerca de la extinción, como en programas de mejoramiento genético de especies de rápido crecimiento con fines productivos comerciales (bienes privados).

Lo anterior en relación a los problemas de adaptabilidad de las especies forestales frente del cambio climático, como dificultades de propagación por semillas (quiebre de dormancia de semillas), crecimiento inicial o variables de interés económico (como mejorar el enraizamiento de clones híbridos de eucaliptos para su propagación a escala operacional).

En Chile, la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) posee dos irradiadores experimentales que pueden ser utilizados para otorgar al material forestal seleccionado las dosis adecuadas que estimulen los procesos fisiológicos que mejoren la germinación de las semillas, el enraizamiento o crecimiento inicial de las especies en estudio mediante hormesis o induzcan cambios genéticos que a su vez incrementen la variabilidad de especies en riesgo.

OBJETIVOS

El objetivo de largo plazo de un proyecto forestal utilizando tecnología nuclear sería mejorar la eficiencia del proceso de reforestación, con genotipos superiores de especies exóticas y/o nativas obtenidas mediante el uso de radiación gamma, y la asistencia de marcadores moleculares y de herramientas biotecnológicas, que permitan la propagación de este nuevo material genético adaptado al cambio climático.

La aplicación de la mutagénesis, junto con la biotecnología disponible como la genómica y las técnicas de cultivo *in vitro*, permitirá acelerar las etapas principales de los programas de mejoramiento, desde la generación de variabilidad genética, pasando por la selección fenotípica/genética, hasta la rápida multiplicación de los genotipos superiores.

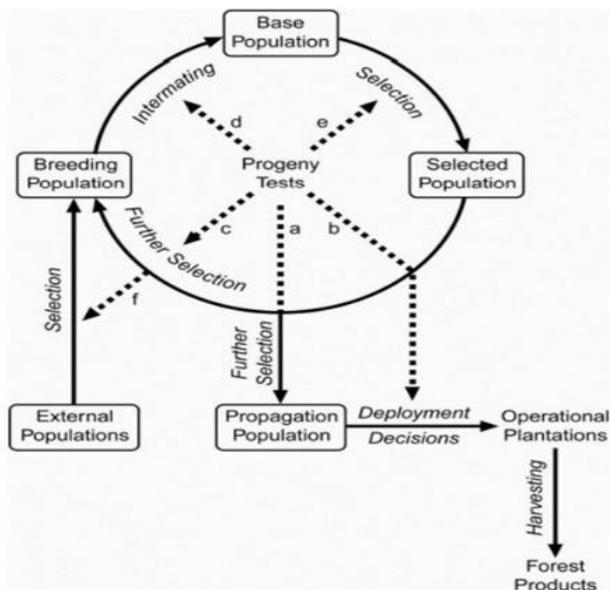
MEJORAMIENTO FORESTAL CONVENCIONAL

Una población base de primera generación se encuentra conformada por millones de individuos y una variabilidad genética que en ocasiones no se adapta al cambio ambiental para su producción, ya sea en bosques naturales o plantaciones.

Una población base de generación avanzada consiste de árboles mejorados genéticamente que crecen en los ensayos genéticos, además, a estos árboles se les conocerá el pedigrí, es decir, sus progenitores, ancestros, historia y origen geográfico.

El ciclo de mejora comienza en cada generación con la selección fenotípica de árboles plus o superiores, basado generalmente en el método de selección de comparación con árboles en el entorno.

En un programa de primera generación, la selección normalmente es de este tipo masal o fenotípica. En programas de generación avanzada los árboles superiores se seleccionan de acuerdo al desempeño individual y de sus progenitores y parientes (selección genética) (Figura N° 2).



Árboles plus Selección Masal

Familias de Polinización Abierta en Vivero

Ensayo de Progenies Año 1

Selección Genética Año 8

Figura N° 2
CICLO DE MEJORAMIENTO GENÉTICO FORESTAL Y ENSAYO DE PROGENIES

Para una generación dada, la población está compuesta por algunos ejemplares o toda la población seleccionada. La función de la población de producción es generar descendencia genéticamente mejorada para plantaciones operacionales, ya sea por semillas (sexuada) o por clones (asexuada).

Los huertos semilleros clonales y las áreas de multiplicación clonal (setos) constituyen los tipos más usados de poblaciones de producción en las empresas forestales, aunque existen otras alternativas para obtener material para plantaciones operativas.

Para una generación determinada, algunos o todos los individuos de la población seleccionada se incluyen en la población de mejora, la cual tiene por objeto crear la población base de la siguiente generación. Esto se alcanza al inducir la recombinación de genes entre genotipos superiores; la progenie resultante se establece en pruebas genéticas y una vez que la nueva población base se ha creado, comienza un nuevo ciclo de mejora, por infusión de nuevo material genético.

HORMESIS Y MUTAGÉNESIS

La radiación ionizante se puede cuantificar en términos de dosis absorbida (D), que es la cantidad de energía de radiación ionizante depositada por unidad de masa de material irradiado. La unidad para cuantificar los efectos biológicos de la radiación ionizante es el Gray (Gy)¹⁹, derivada del sistema internacional de unidades para medir la dosis absorbida de radiación ionizante para un determinado material.



Figura N° 3
EQUIPO DE RADIACIÓN GAMMA (A), CARGA DE SEMILLAS EN REACTOR NUCLEAR (B) Y DIAGRAMA DE UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO VEGETAL CON RADIACIÓN GAMMA (C)

Se ha reconocido que las dosis bajas de radiación promueven en las plantas un aumento de la respiración celular, la activación de enzimas, un aumento de la producción de estructuras reproductivas, un mayor crecimiento, maduración temprana, desarrollo acelerado y resistencia a las enfermedades (Luckey, 1980; 1998).

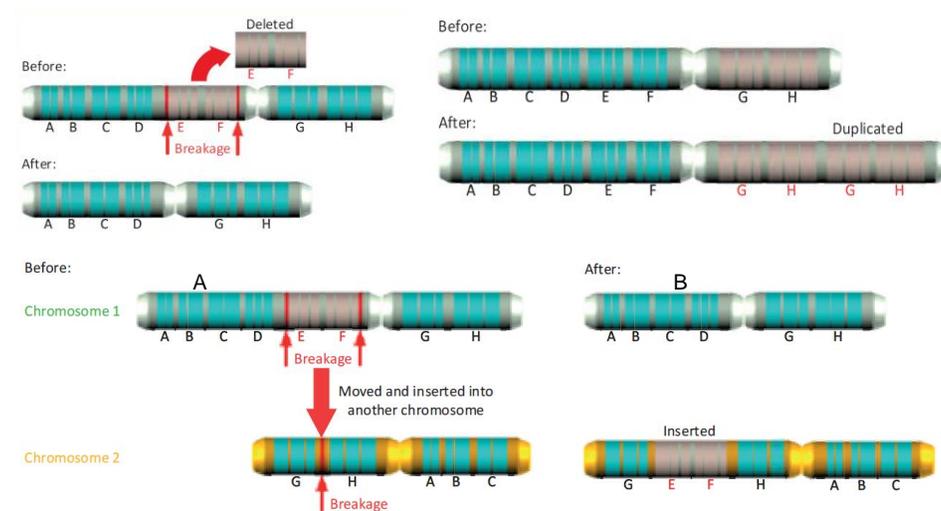
Los resultados de radioestimulación o radiohormesis revelaron incrementos (hasta un 10-40%) en los rendimientos agrícolas, un mejoramiento en la germinación de las semillas, en el contenido de carotenos y de vitamina C, y finalmente mayor resistencia a enfermedades y factores abióticos (González *et al.*, 2002; Vasilevski, 2003).

La mutagénesis producida por la radiación, es decir, el cambio hereditario en la composición genética de un individuo, da como resultado nuevos rasgos que se transmiten de padres a hijos y, por lo tanto, impulsan la evolución. En la naturaleza, las mutaciones son causadas por errores en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y en muchas ocasiones debido a la exposición a las radiaciones naturales del entorno. Un individuo modificado resultante se conoce entonces como mutante espontáneo. La mutación es la causa subyacente de la evolución, ya que un individuo con un rasgo novedoso puede ser seleccionado de manera preferencial por su naturaleza, debido a su aptitud superior que surge de la nueva característica de adaptación (mutantes), o artificialmente por el hombre debido a la conveniencia de la novedad. Sin embargo, para fines prácticos, la expresión fenotípica es la primera descripción del mutante. Así, la

¹⁹ Un Gray es equivalente a la absorción de un Joule de energía de radiación por kilogramo de material irradiado. Las dosis de radiación se dividen en tres categorías amplias: alta (> 10 kGy), media (1 a 10 kGy) y bajo (<1 kGy).

explotación de esta nueva variedad, a menudo ocurre mucho antes de que se entienda su modificación genética.

La mutagénesis permite la generación de nuevos genotipos de árboles y con las actuales tecnologías se puede en corto plazo seleccionar material genético adecuado mediante marcadores moleculares y propagación in vitro, para su posterior amplificación operacional en programas de reforestación. En el mejoramiento genético forestal la radiación ionizante podría ser una forma muy importante de crear variabilidad genética inexistente en la naturaleza y no disponible por las tecnologías tradicionales, como la recombinación genética mediante hibridación (polinización artificial) y otras como la biotecnología (modificación del genoma). Todos los cambios ocurren en el ADN, ya sea por eliminación o deficiencia (pérdida de segmento cromosómico, Figura N° 5A), duplicación (duplicación de un segmento cromosómico, Figura N° 5B) o inversión (nuevo arreglo de un grupo de genes, Figura N° 5C).



(Adaptado de FAO/IAEA, 2018).

C

Figura N° 5

ELIMINACIÓN: UNA PARTE INTERSTICIAL DE UN CROMOSOMA SE PIERDE (A). DUPLICACIÓN: SE PRODUCE UNA COPIA ADICIONAL DE UNA REGIÓN CROMOSÓMICA (B). INVERSIÓN: DESPUÉS DE DOS ROTURAS EN UN CROMOSOMA, LA REGIÓN ENTRE LAS ROTURAS GIRA 180 GRADOS ANTES DE VOLVER A UNIRSE CON LOS DOS FRAGMENTOS FINALES (C)

IRRADIACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

Características del Material Biológico a Irradiar (FAO/IAEA, 2018)

- **Plantas enteras.** Las plantas de semillero o plantas pequeñas pueden ser irradiadas fácilmente por la mayoría de las máquinas de rayos X o por fuentes de rayos gamma en un invernadero o en salas blindadas. Hoy el uso de irradiación gamma en campos abiertos es extremadamente reducido considerando las restricciones asociadas con preocupaciones ambientales y de salud humana.

- **Semillas.** Las semillas son el material preferentemente usado para la inducción de mutagénesis por medio de la irradiación. Las semillas pueden ser irradiadas en muchos ambientes físicos y pueden ser desecadas, empapadas, calentadas o congeladas antes de los tratamientos. Se pueden almacenar durante largos períodos de tiempo en aire, vacío y condiciones refrigeradas.

Cuando están secas, las semillas son casi inertes biológicamente (inactivas), siendo más fáciles de manejar y transportar a grandes distancias. Sin embargo, se requieren mayores dosis de radiación para producir ciertas mutaciones genéticas comparativamente con las dosis de irradiación de otros materiales vegetales. Sin embargo, el aumento de humedad de las semillas en agua, antes de la irradiación puede favorecer la reducción del nivel de dosis requerida, pero a su vez generar otros cambios no deseados como el adelantar su germinación.

- **Granos de polen.** Una gran ventaja de la irradiación de polen en comparación con la irradiación de semillas o plantas es el hecho de que el primero raramente produce quimeras, es decir, las plantas M1 resultantes de la fertilización con polen irradiado serán totalmente homocigoto para cualquier mutación inducida. Las desventajas de la irradiación de polen incluyen la dificultad de obtener material suficiente de algunas especies y la corta viabilidad del grano de polen en muchas especies de plantas. Sin embargo, mediante el uso de técnicas adecuadas, el polen de algunas especies puede mantenerse vivo durante varios meses (o años para especies que tienen polen binucleado, por ej. palma aceitera) y se puede utilizar para conservación de germoplasma. Grandes cantidades de polen se pueden obtener naturalmente de la mayoría de las plantas de polinización cruzada, por ejemplo, una planta de maíz puede producir de 14 a 50 millones de granos de polen. Los granos de polen son generalmente considerados como los más adecuados para el tratamiento de irradiación UV.

- **Meristemas.** La irradiación de semillas es esencialmente un tratamiento de los meristemas embrionarios. Conocer la anatomía y el patrón de los meristemas embrionarios es importante para los tratamientos mutagénicos de las semillas (también como otro material vegetal) ya que determina si una célula mutada se perderá durante la diferenciación o producirá progenies celulares suficientes que se encuentran en gran parte de la planta incluidas células germinales. Para la mayoría de los cultivos de propagación vegetativa, las semillas no son consideradas y, por lo tanto, son otros tejidos de la planta el objetivo para la inducción de una mutación. La estructura de regiones meristemáticas y el desarrollo de nuevos meristemas a partir de los tejidos son particularmente importantes cuando se investiga la mutación inducida por radiación en especies con sistemas de propagación vegetativa. En la mayoría de los casos, los nuevos brotes se originan a partir de una sola célula epidérmica de un tejido y esto podría conducir directamente a plantas mutantes cuya genética debe ser investigada.

- **Células vegetales y cultivo de tejidos in vitro.** El uso de células y cultivo de tejidos vegetales ofrece aplicaciones interesantes en la mutación reproductiva. A comienzos de los años 60, los métodos *in vitro* para micro propagación de plantas se convirtieron rápidamente en una herramienta poderosa para los científicos que trabajaban en la inducción de mutaciones de plantas, especialmente en plantas de propagación vegetativa.

Dosimetría

La dosimetría de radiación trata los métodos para la determinación cuantitativa de dosis absorbida (del material objetivo) y su interpretación física. La dosis absorbida es la energía que se deposita en una masa unitaria de materia, debido a la interacción de radiación con esta.

Uno de los pocos trabajos que existen en especies de árboles se realizó con *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze (Ferreira *et al.*, 1980). El estudio mostró un efecto hormético sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las plántulas a bajas dosis de radiación gamma (0,1 a 0,4 kR). Este primer estudio mostró la efectividad de la radiación ionizante para mejorar la germinación de semillas en especies forestales, siendo uno de los principales rasgos agronómicos para el manejo forestal.

En un estudio para determinar el efecto de la radiación gamma sobre la germinación de semillas en *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*, el efecto radioestimulador fue mayor en *Pinus hartwegii* ya que el tratamiento de 2 Gy produjo un alto porcentaje de germinación. La dosis de 5 Gy fue más efectiva para inducir un efecto similar en el *Abies religiosa*. Desarrollos recientes en biotecnología, especialmente en la comprensión de la estructura y función de los genomas de las plantas, confirman la inducción de mutaciones *in vitro* como una de las herramientas más eficientes y rentables para proyectos de genómica funcional, que se ocupan tanto de la investigación como

de estrategias de genética inversa (Jain and Spencer, 2010; Shu *et al.*, 2009).

El principal desafío de la obtención de mutaciones en especies forestales es identificar dosis de tratamientos de radiación gamma (dosis que produzcan un DL50) que produzcan mutaciones a frecuencias susceptibles de detección para su explotación comercial.

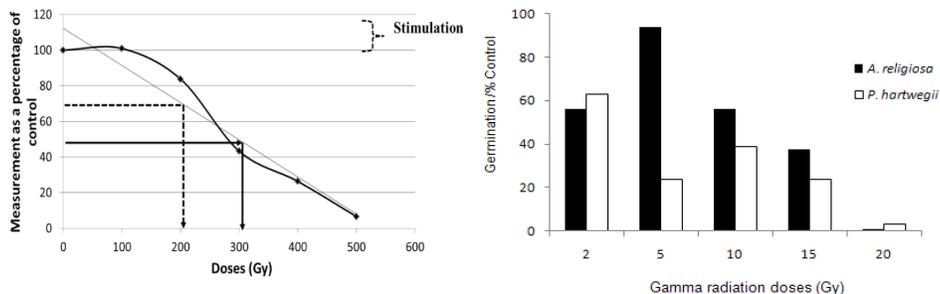


Figura N° 6
DETERMINACIÓN DOSIMETRÍA (IZQ.) Y RESPUESTA A RADIACIÓN GAMMA DE SEMILLAS DE ESPECIES FORESTALES (DER.)

Las limitantes y problemas en el mejoramiento forestal con irradiaciones gamma son las siguientes:

- **Generaciones para la selección.** Los árboles a diferencia de los cultivos anuales tienen largos ciclos de vida (entre 5 a 7 años es lo que demoran las especies de más rápido crecimiento), tiempo mínimo requerido para producir un mutante o variedad de interés comercial.
- **Espacio requerido.** Se requiere una mayor superficie para el crecimiento de poblaciones mutantes.
- **Conocimiento de la genética básica y biología reproductiva de las especies.** Es un factor importante para cumplir el objetivo de la producción comercial y su modo de propagación (semillas o clones).
- **La limitación más seria es acelerar el proceso de detección para identificar mutaciones deseables.** Aunque se pueden desarrollar algunas selecciones fenotípicas, las mayores ganancias genéticas se obtendrían mediante sistemas de detección de mutantes de ADN. Las capacidades de ADN (laboratorios de marcadores moleculares) permitirían una temprana detección de los mutantes deseables.

MARCADORES MOLECULARES DE ADN Y APLICACIONES DE LA “GENOTIPIFICACIÓN” PARA LA MUTAGÉNESIS Y EL MEJORAMIENTO FORESTAL

El valor de los marcadores genéticos como indicadores de selección indirectos en el fitomejoramiento es conocido desde hace más de 90 años. Sin embargo, es desde mediados de la década de 1980 que los marcadores moleculares están disponibles para una selección genética confiable.

Desde entonces, la selección indirecta utilizando marcadores de ADN ha aumentado significativamente la eficiencia y velocidad de fitomejoramiento con tecnologías automatizadas, como la secuenciación del ADN y el desarrollo de herramientas bioinformáticas (FAO/IAEA, 2018).

COMENTARIOS

El cambio climático en Chile está afectando la productividad y la sanidad de las plantaciones y los bosques nativos, como consecuencia de la disminución de las precipitaciones y el aumento de las temperaturas. En algunos sitios ahora marginales para el cultivo de *E. globulus* la especie está siendo sustituida por híbridos entre esa especie y *E. nitens*. Es difícil sin embargo que para algunas especies nativas de larga rotación biológica estas puedan adaptarse rápidamente al cambio climático en el corto plazo.

De acuerdo a la experiencia en especies forestales se puede concluir que las dosis bajas de radiación ionizante podrían mejorar los cultivos al aumentar la producción, reducir el tiempo de germinación y acelerar el crecimiento de las plantas. Por su parte, mediante la mutagénesis con dosis más altas, se podría generar nuevas variedades de plantas.

Dependiendo del tipo de tejido que se irradia y la cantidad de humedad interior del tejido, la utilización adecuada de la radiación ionizante como herramienta proporciona la base para el mejoramiento forestal.

Las tecnologías nucleares han sido muy efectivas para la generación de variedades mutantes en cultivos agrícolas, pero esta opción no ha sido válida para las especies forestales, debido a la larga rotación biológica y comercial de las especies. Sin embargo, las tecnologías disponibles actualmente, como la genómica y el cultivo *in vitro*, permiten la selección precoz de genotipos de interés comercial, como también la multiplicación del material a escala operacional.

Las tecnologías nucleares permiten, a través de la radiación gamma, producir cambios metabólicos y fisiológicos en las especies forestales, de forma que mediante la hormesis se mejore la germinación y el crecimiento inicial de especies nativas vulnerables.

En las especies exóticas de rápido crecimiento, como los eucaliptos, será posible inducir mutaciones con dosis de radiación gamma mayores que permitan la generación de nuevos fenotipos/genotipos de interés comercial. Para este propósito será necesario en una primera etapa determinar la variable de interés comercial a mejorar, el material genético (semillas, clones) y la dosimetría a irradiar. También se deberá implementar la estrategia de selección de los fenotipos/genotipos de interés comercial, variables y establecimiento, medición de los ensayos (vivero, terreno) como también la selección genética apoyada en marcadores moleculares y fenotípicos.

REFERENCIAS

FAO/IAEA, 2018. Manual on Mutation Breeding - Third edition. Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P. and Jankuloski, L. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 301 pp.

Ferreira, C.; Do Nascimento, V.; Ferreira, M. & Vencovsky, R., 1980. Efeito de baixas doses de radiação gama na conservação do poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. IPEF, 21:67-82

Jain S. and Spencer. M., 2010. Mutagenesis in crop improvement under de climate change. Romanian biotechnological letters. 15(2): 88-106.

Luckey, T., 1980. Hormesis with ionizing radiations. CRC press. Boca Raton, FLO, USA

Luckey, T., 1998. Radiation Hormesis: Biopositive effect of Radiation. Radiation Science and Health. CRC press. Boca Raton, FLO, USA.

González, L.; Ramírez, R. y Camejo, Y., 2002. Estimulación del crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate del cultivar Santa Clara a los rayos gamma del ⁶⁰Co. Alimentaria, 331: 67-70.

Shu, Q., Forster, B. P. and Namakawa, H., 2009. Turning plant mutation breeding into a new era: Molecular mutation breeding. Induced plant mutation in the genomic era. FAO, Rome: 425-427.

Sturrock, R. N.; Frankel, S. J.; Brown, A. V.; Hennon, P. E.; Kliejunas, J. T.; Lewis, K. J.; Worrall, J. J.; and Woods, A. J., 2011. Climate change and forest diseases. USDA Forest Service / UNL Faculty Publications. 143. In: <http://digitalcommons.unl.edu/usdafsfacpub/143>

Vasilevski, G., 2003. Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue: 179-186.

