



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales -Programa de Magister

**Efectos atérmicos de la radiación wifi (RF-MI) sobre la
germinación, desarrollo vegetativo y patrones de
metilación de *Arabidopsis thaliana* en cultivo hidropónico.**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

VICTORIA VALENTINA MONTERO LOPEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Rodrigo Jorge Hasbún Zaror
Dpto. de Sicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Efectos atérmicos de la radiación wifi (RF-MI) sobre la germinación, desarrollo vegetativo y patrones de metilación de *Arabidopsis thaliana* en cultivo hidropónico.

Comisión Evaluadora:

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor guía)

Ingeniero Forestal, Dr. _____

Soraya Bravo (Profesor co-guía)

Bióloga, Dra. en Ciencias Biológicas _____

Patricia Sáez Delgado (Comisión evaluación)

Ingeniero Forestal, Dr (a). _____

Director de Postgrado:

Regis Teixeira Mendonça

Ingeniero Químico, Dr. _____

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate.

Ingeniero Forestal, Dr. _____



AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis de magister es el culmine de una carrera extenuante, llena de obstáculos y que el alcanzar la meta en varios momentos, requirió mucha constancia, esfuerzo y sacrificio. Sin embargo, y aunque la mayoría del tiempo existe el sentimiento de soledad, muchas personas están en las bancas, en el camino y corriendo contigo para darte ánimo.

La idea de este proyecto nace de una conversación con mi colega Gastón Bravo, el cual me inspiró y me empujó a realizar este proyecto, y por lo cual le estoy profundamente agradecida. El profesor Dr. Rodrigo Hasbún tomó este desafío junto conmigo, sin saber cuáles podrían ser los resultados. A él, le agradezco profundamente por tomar este riesgo y apoyarme en todo el camino. También agradezco a la Dra. Soraya Bravo, quien fue parte importante de mi formación académica dentro del desarrollo del Magister, y cuyos comentarios y sugerencias siempre fueron acertados. Por supuesto, el apoyo económico brindado por Innova Biobío y Becas CONICYT, permitió tanto la ejecución de la investigación, como la posibilidad de estudiar.

Agradezco también de manera personal a Fabián Quiroz, a quien conocí por circunstancias de la vida y cuya ayuda en la toma de mediciones de radiación durante el proyecto, fueron de suma importancia para el desarrollo del mismo.

Quiero también expresar mis más sinceros agradecimientos a Aileen Turner, Felipe Campos y Gerson Riffo, mis primeros compañeros de laboratorio, quienes me asesoraron, acompañaron, enseñaron e hicieron de esta aventura, algo menos pesada y llevadera.

Mención aparte para mi familia, quienes siempre han estado presente, en cada idea loca, en cada proyecto, en cada emprendimiento que he decidido realizar. Ellos, con su sola presencia, amor y cariño, han hecho posible que esté hoy escribiendo estas palabras. Una vida completa no basta para agradecerles todo su apoyo.

Finalmente, agradezco a todos quienes colaboraron de alguna forma con la realización de esta investigación.

ABREVIATURAS

RF-MI: Radiofrecuencia-Microondas

wifi: Marca registrada por Wi-Fi Alliance que más tarde se conoció como “Wireless Fidelity”

SAR: Specific Absorption Rate

RF: Radiofrecuencia

MI: Microondas

GHz: GigaHertz

MHz: MegaHertz

Hz: Hertz

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNg: ADN genómico

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

bZIP: Basic Leucine Zipper Domain

5-mC: 5-metilcitosinas

ANOVA: Análisis de la varianza (Analysis Of Variance)

HPLC: High-performance liquid chromatography

MSAP: Methylation Sensitive Amplification Polymorphism

PCR: Polymerase Chain Reaction

LNM: Loci no metilados

LSM: Loci susceptibles a metilación

SIMR: Stress-Induced Morphogenesis Responses

WLAN: Wireless Local Area Networks

ÍNDICE GENERAL

| TEMA | Nº de pág. |
|---|-----------------------|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Pregunta de investigación, Hipótesis y Objetivos..... | 8 |
| Materiales y Métodos..... | 9 |
| Resultados..... | 16 |
| Discusión..... | 30 |
| Conclusiones..... | 35 |
| Referencias Bibliográficas..... | 36 |



INDICE DE TABLAS

| Tabla | N° de pág. |
|--|-----------------------|
| Tabla 1: Radiación promedio utilizada en los ensayos de germinación (GT) y crecimiento (T1, T2 y T3), en distintas unidades de medida..... | 12 |
| Tabla 2: Adaptadores y partidores utilizados en el procedimiento MSAP..... | 14 |
| Tabla 3: Temperatura promedio de la sala de crecimiento donde se realizó el ensayo de germinación y crecimiento..... | 16 |
| Tabla 4: Principales características asociadas a la germinación, analizadas en semillas de <i>A. thaliana</i> ecotipo Columbia bajo radiación wifi..... | 19 |
| Tabla 5: Sensibilidad de HpaII y MspI y las bandas de restricción resultantes..... | 24 |
| Tabla 6: Resumen de los loci susceptibles a metilación (LSM) y no metilados (LMN) obtenidos del análisis realizado en R, con el paquete <i>msap</i> | 26 |
| Tabla 7: Perfil de las bandas polimórficas según cambio en el estado de metilación de ADNg de hojas de <i>A. thaliana</i> tratadas con radiación wifi y control..... | 29 |



INDICE DE FIGURAS

| Figuras | N° de pág. |
|--|-----------------------|
| Figura 1: Diseño experimental del ensayo de germinación. GT corresponde al tratamiento con radiación wifi, mientras que GC corresponde al control (sin radiación wifi)..... | 10 |
| Figura 2: Diseño experimental de ensayo de crecimiento. T1, T2 y T3 corresponden a los tratamientos dependientes de la distancia. C1, C2, C3 corresponden a los controles (sin router) utilizados para contrastar los tratamientos..... | 11 |
| Figura 3: Temperatura registrada durante ensayo de germinación. TG=tratamiento. CG=control. El encendido de las luces es a las 8:00 h y el apagado es las 00:00 h..... | 17 |
| Figura 4: Temperatura registrada durante ensayo de crecimiento. TC=tratamientos. CC=controles. El encendido de las luces es a las 8:00 h y el apagado es las 00:00 h..... | 18 |
| Figura 5: Valor o velocidad de germinación promedio de TG y CG de semillas de <i>A. thaliana</i> , monitoreado durante 14 días después de la siembra..... | 19 |
| Figura 6: Vista aérea de hojas de <i>A. thaliana</i> en medio hidropónico a los 21 días de crecimiento. Plantas control C1, C2 y C3 ubicadas en la columna izquierda. Plantas tratadas T1, T2 y T3 ubicadas en la columna derecha..... | 21 |
| Figura 7: Vista frontal de raíces de <i>A. thaliana</i> en medio hidróponico a los 21 días de crecimiento. Plantas control C1, C2 y C3 ubicadas en la columna izquierda. Plantas tratadas T1, T2 y T3 ubicadas en la columna derecha..... | 22 |
| Figura 8: Biomasa obtenida luego de 21 días de crecimiento para <i>A. thaliana</i> . a) Proporción del peso seco hoja:raíz de <i>A. thaliana</i> . b) Peso seco de la parte aérea de <i>A. thaliana</i> . c) Peso seco de la zona radicular de <i>A. thaliana</i> . T1, T2 y T3 corresponden al tratamiento con radiación wifi continua desde el día 7. C1, C2 y C3 corresponden a los controles. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, P<0,05)..... | 23 |
| Figura 9: Representación gráfica de la clasificación de las bandas epigenéticas según el estado de metilación encontradas en las diferentes combinaciones utilizadas en este estudio. I=demetilado, II=metilación en la citosina interna, III=hemimetilación, IV= Hipermetilación. T1, T2, T3 corresponden al tratamiento con radiación wifi. C1, C2 y C3 corresponden a los controles..... | 25 |
| Figura 10: Análisis de componentes principales (PCoA) de la matriz LSM obtenida en R. C1, C2 y C3 corresponden a los controles. T1, T2, T3 corresponden a los tratamientos..... | 27 |
| Figura 11: Dendrograma de la matriz LSM obtenida con R. C1, C2 y C3 corresponden a los controles. T1, T2, T3 corresponden a los tratamientos..... | 28 |

RESUMEN

Los niveles de exposición diaria de radiofrecuencias y microondas (RF-MI) han aumentado significativamente en las últimas décadas para todos los seres vivos que habitan en la Tierra. La exposición a cualquier radiación del espectro de RF-MI, tanto de manera individual o en combinación, aumenta la probabilidad de que existan efectos potencialmente nocivos. Estos efectos pueden ser térmicos (aumento de la temperatura del material biológico) o atérmicos (tales como cambios en la permeabilidad de la membrana celular y la tasa de crecimiento celular, así como la interferencia con iones y moléculas orgánicas), donde el nivel de peligro depende de los niveles de potencia y frecuencia de las radiaciones, y de las propiedades intrínsecas de los tejidos expuestos.

La legislación mundial vigente está enfocada en prevenir los daños por los efectos térmicos de estas radiaciones. Sin embargo, diversos estudios, desarrollados mayoritariamente en seres humanos y animales, han demostrado que existe un potencial riesgo para la salud asociado a los efectos atérmicos. Sobre esta base, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto atérmico de la radiación wifi, proveniente de un router de uso doméstico, sobre la germinación, el desarrollo vegetativo y los patrones de metilación de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados muestran que la radiación wifi no tiene influencia sobre el proceso de germinación. No obstante, cuando se exponen plántulas de 7 días de edad a radiación wifi continua por 14 días se observa mayor crecimiento de las hojas en detrimento de la raíz, y ese patrón es independiente de la distancia a la fuente. Los patrones de metilación evaluados en las hojas de estas plántulas, cambian significativamente en comparación con los controles, disminuyendo la metilación en el caso de las tratadas. Los cambios en los patrones de metilación, junto con la respuesta diferencial observada en la formación de biomasa en plántulas expuestas a radiación, indicarían que estos campos electromagnéticos producen efectos de tipo atérmicos sobre las plantas.

ABSTRACT

Daily exposure levels of radiofrequency-microwave (RF-MW) have increased significantly in recent decades for all living things on Earth. Exposure to any radiation of the RF-MW spectrum, such as microwaves, either individually or in combination, increases the likelihood for potentially harmful effects. These effects may be thermal (temperature rise of the biological material) or non-thermal (such as changes in the permeability of the cell membrane and the rate of cell growth, and interference with ions and organic molecules), where the level of danger depends on power level, and frequency of radiation, and the intrinsic properties of the exposed tissue.

The global legislation is focused on preventing damage by thermal effects of this radiation, however, several studies developed mainly in humans and animals have shown that there is a potential health risk associated with non-thermal effects. On this basis, the aim of this study was to analyze the non-thermal effect of wifi radiation from a household router on germination, vegetative growth and methylation patterns of *Arabidopsis thaliana*. The results show that the wifi radiation does not influence the germination process. However, when 7 days old seedlings were exposed to continuous wifi radiation for 14 days, increased leaf growth at the expense of root is observed, and this pattern is independent of the distance to the source. Methylation patterns evaluated in leaves of these seedlings changed significantly compared to controls, decreasing the overall methylation in the case of treated plants. Changes in methylation patterns, along with that observed in differential response of biomass formation in seedlings exposed to RF-MW wifi radiation, indicates that these electromagnetic fields produce non-thermal effects on plants.

INTRODUCCION

A partir del término de la segunda guerra mundial, el nivel de exposición a las Radiofrecuencias-Microondas (RF-MI) ha aumentado dramáticamente con el desarrollo y masificación de las tecnologías de las comunicaciones inalámbricas (Hyland 2000, Zamanian y Hardiman 2005). Las soluciones tecnológicas más comunes dentro del rango de las radiofrecuencias, incluyen radio AM y FM, estaciones de televisión y los teléfonos móviles; mientras que los sistemas de radar e internet inalámbrico como el wifi, emiten en el rango de las microondas (Zamanian y Hardiman 2005). Este último corresponde a una marca registrada por Wi-Fi Alliance y actualmente se le conoce como la contracción de “Wireless Fidelity” (<http://www.wi-fi.org>). Es una tecnología de banda ancha inalámbrica de corto alcance que transmite entre 2.4 y 2.5 GHz y se ha posicionado como uno de los avances tecnológicos más utilizados de los últimos años (Foster y Moulder 2013). En la actualidad, el wifi es la base de casi todas las redes de área local inalámbricas (WLAN, por sus siglas en inglés) presentes en los hogares, oficinas y otros ambientes, donde prácticamente todos los ordenadores portátiles y teléfonos inteligentes vienen equipados con wifi (Avendaño *et al.* 2012, Foster y Moulder 2013).

El incremento excesivo en el medio ambiente de RF-MI, que ha llegado incluso a catalogarse de “contaminación electromagnética” (Balmori 2009), ha despertado el interés en el estudio de sus efectos en los organismos vivos. La frecuencia de las RF-MI, en conjunto con la intensidad de las mismas, puede provocar el calentamiento del material expuesto, debido a la absorción de energía por parte del contenido hídrico del tejido (Hyland 2000). El impacto térmico se considera de “corto plazo”, y se mide a través de la Tasa de Absorción Específica (SAR, por sus siglas en inglés), es decir, la cantidad de radiación absorbida por kilogramos de masa. La legislación actual en la mayoría de los países, se basa en estos efectos, la cual fija un límite de 2 W/kg de SAR para la exposición a RF-MI (Belyaev 2008). En la actualidad sin embargo, la controversia se centra en los efectos atérmicos, los cuales provocan alteraciones que no están asociadas a un aumento de la temperatura ($SAR < 2 \text{ W/kg}$), y para los cuales, no

existe regulación o normativa, a excepción de Rusia (Belyaev 2005, 2008). Algunas de las alteraciones más estudiadas se relacionan con cambios en la permeabilidad de la membrana celular y la tasa de crecimiento celular, así como la interferencia con iones y moléculas orgánicas, como el ADN y las proteínas (Hyland 2000, Shiroff 2008, BioinitiativeReport 2012). Estas respuestas están ligadas generalmente a exposiciones prolongadas o “crónicas”, que son difíciles de monitorear en el tiempo (Belyaev 2005).

Diversos estudios indican que los efectos atérmicos de estas radiaciones provocan alteraciones de tipo genotóxicas que, dependiendo de factores tales como la ontogenia, tiempo de exposición, tipo de RF-MI, entre otros factores, pueden gatillar distintas respuestas. Una disminución del crecimiento principalmente en las raíces, fue reportada por Singh *et al.* (2012) y Sharma *et al.* (2009) en plántulas de *Vigna radiata*. La germinación también se vio inhibida en esta especie, en correlación con el tiempo de exposición (Sharma *et al.* 2009). En *Allium cepa*, bajo campos electromagnéticos de 400 y 900 MHz, se obtuvo un rango normal de germinación, mientras que se observó un aumento en las aberraciones cromosómicas de células radiculares (Tkalec *et al.* 2009). Un resultado similar se obtuvo en el análisis de *Lens culinaris* bajo radiación de 1800 MHz derivada de teléfonos móviles, observando un aumento del grado de c-mitosis en semillas en estado de dormancia (Akbal *et al.* 2012). Árboles jóvenes de *Pinus sylvestris*, creciendo bajo radiación directa de una antena de radio (154-162 MHz), experimentaron una disminución en el crecimiento radial del fuste, un aumento de la producción de resina, crecimiento y envejecimiento prematuros, disminución de la viabilidad y una baja germinación de las semillas con respecto a aquellos que crecían lejos de la fuente de radiación (Balodis *et al.* 1996, Selga y Selga 1996). En plántulas de soya (*Glycine max*) se reportaron respuestas positivas y negativas de crecimiento de raíces, epicotilo e hipocotilo bajo campos electromagnéticos, dependiendo de la amplitud de las ondas, tiempo de exposición y tipo de radiación (Halgamuge *et al.* 2015).

Variados reportes sugieren una fuerte relación entre los desajustes fisiológicos, morfológicos y celulares con un aumento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO); moléculas de señalización que constituyen un componente común de las respuestas de las plantas a diferentes tensiones (Shiroff 2008, Patakas *et al.* 2012). En la investigación realizada

por Sharma *et al.* (2009) se observa una disminución del crecimiento con el consiguiente aumento de marcadores de estrés oxidativo (H_2O_2 y malondialdehído) y de la actividad de enzimas antioxidantes en plántulas de *Vigna radiata* bajo la exposición de RF-MI. Asimismo sucede con el proceso de rizogénesis de la misma especie, donde se registró una disminución en el crecimiento y cantidad de raíces, en concordancia con un aumento en el contenido de prolina, H_2O_2 y malondialdehído (MDA) y en la actividad y cantidad de las enzimas oxidativas; todo esto bajo la radiación de un campo electromagnético de 900 MHz proveniente de dos teléfonos móviles (Singh *et al.* 2012). En plántulas etioladas de *Spirodela oligorrhiza* se produjo un aumento de alanina (señalizador de estrés) asociado a la formación de ERO, bajo la exposición de campos electromagnéticos de alta frecuencia (Parola *et al.* 2005). En plantas de *Lemna minor* las respuestas a las RF-MI varían según la intensidad y la frecuencia (400 y 900 MHz) de la radiación aplicada, con una tendencia al incremento de marcadores oxidativos (H_2O_2 y peroxidación lipídica) y la actividad de enzimas antioxidantes en plantas tratadas (Tkalec *et al.* 2007). Estos resultados ponen de manifiesto la potencial genotoxicidad de las RF-MI, cuyos efectos pueden repercutir en el funcionamiento general de los individuos.

Además de los efectos genotóxicos, se han registrado alteraciones a nivel de expresión de genes, conocidos como efectos no-genotóxicos (Adlkofer 2008, Shiroff 2008). Estos estarían revelando la existencia de una cascada de señales que induce la expresión diferencial de genes bajo RF-MI. En individuos de *Lycopersicon esculentum* sometidos a radiación electromagnética de 900 MHz y de baja intensidad durante 10 minutos, se generó la acumulación rápida de tres transcritos asociados a respuestas a estrés por heridas, con perfiles cinéticos muy similares a respuestas que se dan por otros estímulos (como fuego y daño mecánico) (Roux *et al.* 2006 y 2008). Así mismo sucedió con el factor de transcripción bZIP (basic Leucine Zipper Domain) el cual se une al ADN y es parte esencial del funcionamiento de varios procesos como desarrollo del cáncer, síntesis de hormonas, funciones reproductivas, entre otros; y que en plantas, se acumula rápidamente bajo condiciones de estrés (Vian *et al.* 2006, Beaubois *et al.* 2007). En cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*, expuestas por 24h a 1.9 GHz de RF, fue reportada la expresión diferencial de 10 genes, tres de los cuales son inducidos bajo tratamientos lumínicos (Engelmann *et al.* 2008). En plantas de *S. oligorrhiza* se encontraron mayores cantidades de alanina, bajo radiación de 60 y 100 Hz de

frecuencia (Ben-Izhak *et al.* 2003, Parola *et al.* 2005). Estas evidencias, sumado a aquellas que indican un aumento de ERO, sugieren que las radiaciones pueden ser detectadas por la plantas como un estresor, y que la respuesta se caracteriza por ser inespecífica, rápida y sistémica.

Junto con las alteraciones en el desarrollo, el aumento de las ERO y los cambios en la expresión génica, también se han descubierto alteraciones epigenéticas que podrían estar relacionadas o siendo gatilladas por las RF-MI. La epigenética estudia los cambios estables, a menudo heredables, que influyen la expresión génica, y que no involucran un cambio en la secuencia de ADN (e.g. mutaciones). Opera a nivel de la cromatina, alterando su grado de compactación, que a su vez está controlado esencialmente por cuatro mecanismos: modificaciones postraduccionales de histonas, conformación y accesibilidad de la cromatina, modificación del ADN (e.g. metilación de citosinas) y ARNs no codificantes regulatorios (Fingerman *et al.* 2012). Dentro de los mecanismos epigenéticos, la modificación del ADN es el más estudiado, ya que representa el resultado de la interacción cooperativa de los mecanismos de regulación epigenética (Meyer 2011). La formación de ERO producto de la exposición a las RF-MI no sólo podría estar causando un daño genotóxico, sino que también podría estar influenciando los patrones epigenéticos celulares, específicamente, la metilaciones del ADN. La unión de las diferentes ERO con las guaninas del ADN, altera el sitio de unión de las metilasas, inhibiendo la metilación de las citosinas aledañas, resultado que en humanos, coincide con la hipometilación asociada al desarrollo de cáncer (Weitzman *et al.* 1994). Esta situación, induce cambios en el patrón de metilación del ADN (Shiroff 2008) y por ende, cambios en la expresión génica (Cerde y Weitzman 1997). En seres humanos existe una gran cantidad de estudios que registran expresión diferencial de genes asociados a cambios en la conformación de la cromatina bajo el estímulo de RF-MI (Belyaev *et al.* 2005, Adlkofer 2008), mientras que en plantas, hasta la fecha sólo un estudio ha demostrado alteraciones en la metilación global del genoma. Los resultados obtenidos por Minasbekyan y Abovyan (2013) en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) indican un aumento en la metilación de las 5-metilcitosinas (5-mC) bajo la exposición de radiación RF-MI de 45 y 46 GHz, mientras que disminuye bajo frecuencias de 49 GHz, 50 GHz y 50.3 GHz. En la segunda generación, estos niveles fueron parcialmente conservados y heredados. Esto sugiere que la metilación del ADN

podría ser uno de los mecanismos por el cual se explica la expresión de genes diferenciales y la transmisión ontogénica de estas alteraciones.

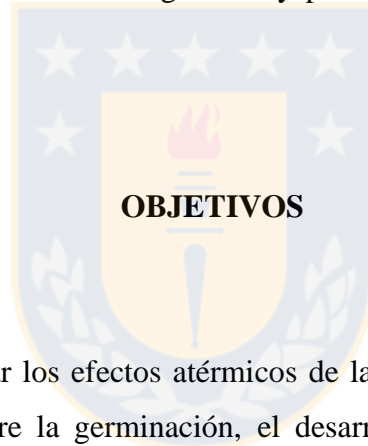
Considerando los antecedentes antes expuestos, esta investigación propone la utilización de plantas de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio para indagar los efectos atérmicos de la exposición continua a radiación wifi emitida por un router de uso doméstico. No existe a la fecha ningún estudio en plantas en donde se mida la interacción con este tipo de radiación, considerando el uso extendido que tiene este dispositivo en la vida diaria. *Arabidopsis*, por su condición de organismo modelo, ha sido ampliamente estudiada en variadas disciplinas de las ciencias biológicas, como también, su comportamiento ante distintas condiciones ambientales y estresores. Así, encontramos estudios de respuestas a estrés por frío (Thomashow 1999; Ishitani *et al.* 1997, Monroy *et al.* 1993), sequía (Knight *et al.* 1998), calor (Evrard *et al.* 2012, Silva-Correia *et al.* 2014), UV (Lois 1994, Jordan *et al.* 1998, John *et al.* 2001), estrés salino (Xiong y Zhu 2002), entre otros. El acceso a diferentes ecotipos, y la posibilidad de generar mutantes en esta especie, permite estudiar tolerancia o sensibilidad, en relación a diferencias genéticas (Larkindale *et al.* 2005, Tsugane *et al.* 1999, Huang *et al.* 2005) y epigenéticas, (Cervera *et al.* 2002, Bardini *et al.* 2003, Zicheng y Yanxia 2009, Li *et al.* 2015). Además, gracias a la gran cantidad de información sobre esta especie, actualmente es posible analizar las respuestas a estrés a nivel de transcriptoma (Zeller *et al.* 2009), proteómica (Bae *et al.* 2003, Rocco *et al.* 2013) y metabolómica (Kaplan *et al.* 2004, Kim *et al.* 2007). En resumen, entender las respuestas de *Arabidopsis* hacia las ondas wifi abre las posibilidades hacia una amplia línea de investigación futura, pero previamente es necesario responder la siguiente pregunta:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La radiación wifi (RF-MI) generada por un router de uso doméstico produce algún tipo de alteración en *Arabidopsis thaliana*?

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La radiación wifi (RF-MI) proveniente de un router de uso doméstico tiene efectos atérmicos, alterando la germinación, el desarrollo vegetativo y patrones de metilación de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.



El objetivo general fue evaluar los efectos atérmicos de la radiación wifi, proveniente de un router de uso doméstico, sobre la germinación, el desarrollo vegetativo y los patrones de metilación de *Arabidopsis thaliana*.

Los objetivos específicos son:

- Determinar el efecto de la radiación wifi, proveniente de un router de uso doméstico, sobre el porcentaje y velocidad de germinación de *A. thaliana*.
- Analizar el efecto de distintas potencias de radiación wifi, proveniente de un router de uso doméstico, sobre la biomasa foliar y radicular de plántulas de *A. thaliana*.
- Examinar los patrones de metilación de ADN genómico de hojas de plántulas de *A. thaliana*, bajo la exposición de radiación wifi de distinta potencia, proveniente de un router de uso doméstico.

MATERIALES Y METODOS

1. Siembra de *A. thaliana* en cultivo hidropónico.

Semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia, fueron esterilizadas superficialmente, utilizando una solución al 10% de hipoclorito durante 10 min y lavadas cinco veces en agua estéril. Una vez realizado este procedimiento, se removió el agua y las semillas fueron llevadas a estratificación a 4°C en oscuridad por 72 h. Luego, se procedió según las indicaciones de Alatorre-Cobos *et al.* (2014). Brevemente, las semillas fueron depositadas sobre un soporte fabricado con malla antiáfidos 16/10 (Protekta), en recipientes de 1 L de capacidad y sellados con parafilm. Se le practicó una pequeña abertura a la tapa del recipiente para asegurar el traspaso de oxígeno, la cual se selló con tela microporo (3M). El medio de cultivo hidropónico utilizado fue Hoagland, optimizado para *A. thaliana*, siguiendo las indicaciones de Conn *et al.* (2013). Todo el procedimiento fue realizado con materiales esterilizados y bajo cámara de flujo laminar.

Las plantas de *A. thaliana* se mantuvieron en sala de crecimiento con las siguientes condiciones: uso de tubos fluorescentes T8 de 36W, luz día (GE), humedad relativa del 65%, temperatura día de 23°C, temperatura noche de 19°C y un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad).

2. Ensayo de germinación

El ensayo de germinación (GT) consistió en sembrar 100 semillas por cada réplica (4 en total), las cuales fueron monitoreadas durante 14 días desde la siembra, bajo radiación wifi (Fig. 1). Se contabilizaron las semillas germinadas diariamente, considerando “germinadas” aquellas plántulas cuyos cotiledones fueran visibles.

Al finalizar el ensayo GT, se comenzó con el control (GC) cuyas condiciones fueron las mismas que GT, con la excepción de que el router se apagó durante todo el ensayo (Fig. 1).

Se calcularon distintos parámetros que ayudan a caracterizar el proceso de germinación de cualquier semilla, en base a literatura (FAO 1991). Uno de los parámetros más utilizados es el porcentaje de germinación o germinación total que indica la capacidad de germinación de una muestra analizada y la dormancia asociada a éstas. Otro de los parámetros utilizados es el “valor de germinación”, que calculado según Czabator (1962), indica la velocidad del proceso de germinación de la muestra analizada.

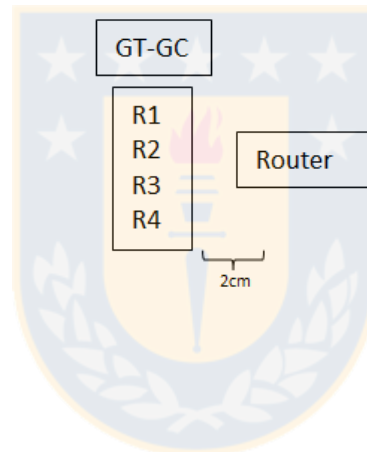


Figura 1: Diseño experimental del ensayo de germinación. GT corresponde al tratamiento con radiación wifi, mientras que GC corresponde al control (sin radiación wifi).

3. Ensayo de crecimiento

Los ensayos de crecimiento fueron realizados al terminar el ensayo de germinación. Consistieron en tres réplicas por sector (Fig. 2), cada una con alrededor de 180 semillas. En el caso de los tratamientos T1, T2 y T3 (cada uno indica la distancia al router siendo T1 el más cercano y T3 el más lejano), se aplicó la radiación wifi por 24 h diarias, siete días después de la siembra, hasta completar 21 días de crecimiento. Para los controles C1, C2 y C3 (al igual

que los tratamientos, cada uno indica la distancia al router), ejecutados después de terminar los tratamientos, se consideraron las mismas condiciones y sectores, pero con el router apagado. Luego del plazo establecido, se tomaron tres submuestras de cada réplica (hoja y raíz), una de las cuales fue utilizada para el análisis de la biomasa, y las dos restantes (sólo hoja) para el análisis de los patrones de metilación.

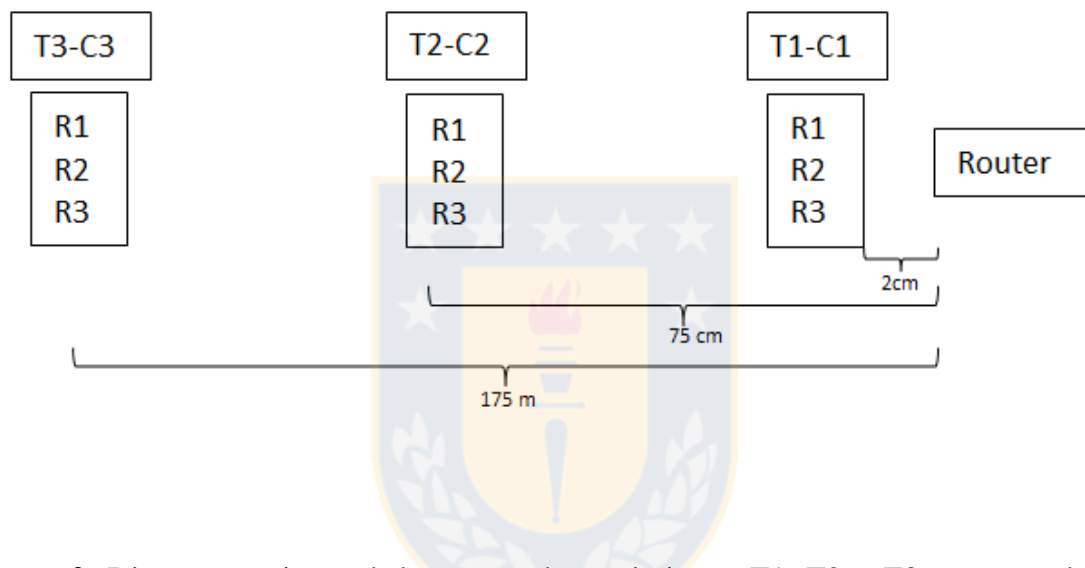


Figura 2: Diseño experimental de ensayo de crecimiento. T1, T2 y T3 corresponden a los tratamientos dependientes de la distancia. C1, C2, C3 corresponden a los controles (sin router) utilizados para contrastar los tratamientos.

4. Análisis de la biomasa

Se procedió a tomar el peso fresco por separado del conjunto de raíces y hojas que componían una submuestra (tanto de las plántulas tratadas como control), proveniente del ensayo de crecimiento, utilizando una balanza analítica (Boeco). Luego, las muestras fueron llevadas a secar en estufa con una temperatura de 40°C, hasta alcanzar peso constante (peso seco).

5. Fuente de radiación wifi.

Para los tratamientos de ambos ensayos, se utilizó un router doméstico (D-Link) que emite en la banda de los 2.4 GHz de frecuencia. Se tomaron tres mediciones diarias de la potencia (dbm) durante la duración de ambos ensayos antes descritos con ayuda del script wifiData.sh confeccionado por el profesor Jorge Pezoa (2010), de la facultad de Ingeniería en Telecomunicaciones (Universidad de Concepción). Al final de cada ensayo, se promediaron todas las mediciones y se expresó el valor en densidad de potencia (nW/cm^2) (Tabla 1).

Tabla 1. Radiación promedio utilizada en los ensayos de germinación (GT) y crecimiento (T1, T2 y T3), en distintas unidades de medida.

| | Promedio potencia (dbm) | Densidad de potencia (nW/cm^2) |
|-----------|-------------------------|------------------------------------|
| Ensayo GT | -22,9 ($\pm 2,5$) | 2,12 |
| Ensayo T1 | -23,2 ($\pm 2,9$) | 1,99 |
| Ensayo T2 | -36,2 ($\pm 1,5$) | 0,099 |
| Ensayo T3 | -42,2 ($\pm 1,9$) | 0,024 |

6. Seguimiento de la temperatura durante los ensayos.

Se realizaron mediciones de la temperatura (HOBO Pro V2, Onset) cada una hora, durante la realización de ambos ensayos, con el fin de comparar e identificar la existencia de diferencias significativas que pudieran dar lugar a efectos biológicos no deseados.

7. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico, se tomaron 20 mg aproximadamente de tejido foliar de las dos submuestras de cada réplica, tratamiento y control respectivamente, del ensayo de crecimiento. Se procedió a realizar la molienda empleando el equipo FastPrep Homogenization System (Precellys, Bertin Technologies) siguiendo posteriormente las indicaciones del DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN). Para confirmar la integridad del ADN obtenido, éste se observó en un gel de agarosa al 1%, mientras que para medir la concentración, se utilizó el software GelQuantNet (BiochemLabSolutions).

8. MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polimorfism)

Para realizar el ensayo MSAP se utilizaron los parámetros previamente establecidos por Cervera *et al.* (2002) y por Hasbún *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Las muestras de ADN_g utilizadas corresponden a tejido foliar del ensayo de crecimiento.

8.1 Digestión/ligación:

Se tomaron 5.5 µl de alícuotas de ADN genómico diluido (1:5) de cada muestra y se llevó a cabo la etapa de digestión y ligación en una sola reacción de 11 µl totales (50 mg NaCl, 1mg BSA). Se utilizaron las enzimas EcoRI, HpaII y MspI (New England Biolabs) para digerir el ADN, y la enzima T4 ligasa (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) para unir los adaptadores (2 pmol/µl, Tabla 2) a los sitios de restricción de los fragmentos digeridos, con las siguientes condiciones: 37°C por 2h, 16°C por 1h y 65°C por 20 min. Finalmente los productos se diluyeron 1:5 con buffer LowTE [1mM Tris-HCl, 0.1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8] y almacenado a -20°C para su posterior utilización.

8.2. Pre-amplificación selectiva:

La preamplificación sin nucleótidos selectivos (Tabla 2) se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl donde 5 µl corresponden a ADN digerido mezclado con 0.2 µM de partidores E+0 y H-M+0, 0.5U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 1X de buffer Taq DNA polimerasa, 0.1

mM dNTPs y 1.5 mM MgCl₂. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 72°C por 4 min, 94°C por 30 s, 28 ciclos de 94°C por 20 s, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min y un ciclo final de extensión de 60°C por 30 min. Los productos de PCR fueron diluidos 1:10 en buffer LowTE y almacenado a -20°C para su posterior utilización.

8.3. Amplificación selectiva

Finalmente, se ejecutó una amplificación selectiva con tres combinaciones de partidores de tres nucleótidos selectivos (Tabla 2). El volumen total de la reacción fue de 12,5 µL conteniendo los siguiente: 2.5 µL de producto diluido de la pre-amplificación, 0.1 µM partidor EcoRI (marcado con fluoroforo), 0.5 µM partidor HpaII/MspI, 0.5 U Taq DNA platinum (Invitrogen), 1X de buffer Taq platimun, 0.1 mM dNTPs y 1.5 mM MgCl₂. Las siguientes condiciones de PCR fueron usadas: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 20 s, 60°C por 1 min y 72°C por 2 min y un ciclo final de extensión de 60°C por 30 min.

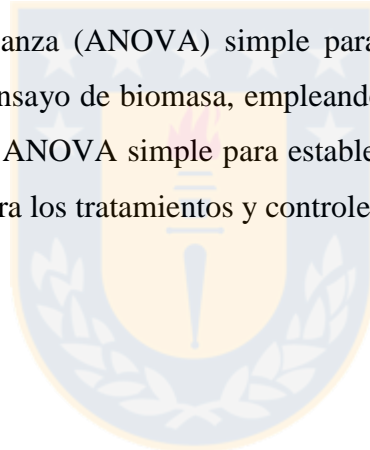
Tabla 2: Adaptadores y partidores utilizados en el procedimiento MSAP.

| | Nombre | Secuencia (5' - 3') |
|---|---------------|---|
| Adaptadores | EcoRI | CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC |
| | HpaII/MspI | GATCATGAGTCCTGCT CGAGCAGGACTCATGA |
| Partidores pre-amplificación selectiva | E+0 | GACTGCGTACCAATTC |
| | H-M + 0 | ATCATGAGTCCTGCTCGG |
| Partidores amplificación selectiva | E+ACA/H-M+CTG | GACTGCGTACCAATTCACA/ ATCATGAGTCCTGCTCGGCTG |
| | E+ACG/H-M+CCG | GACTGCGTACCAATTCACG/ ATCATGAGTCCTGCTCGGCCG |
| | E+AGT/H-M+CCG | GACTGCGTACCAATTCAGT/ ATCATGAGTCCTGCTCGGCCG |

Las amplificaciones selectivas resultantes se separaron por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y los datos obtenidos se analizaron con el software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems). Con el fin de analizar el estado de metilación en las muestras, las bandas polimórficas fueron asignadas como 1 (presente) o 0 (ausente) para posteriormente generar la matriz binaria. Una vez obtenida la matriz, se procedió a realizar un análisis con el programa estadístico R (versión 3.2.2), utilizando el paquete *msap* (Pérez-Figueroa 2013). Con este análisis se obtuvieron los “loci no metilados” (LNM) y los “loci susceptible a metilación” (LSM), junto con los PCoA, AMOVA y dendrogramas respectivos.

9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para el ensayo de germinación, y un ANOVA de dos vías para el ensayo de biomasa, empleando el programa estadístico SAS 9.0. Adicionalmente, se realizó un ANOVA simple para establecer diferencias significativas entre las temperaturas registradas para los tratamientos y controles de ambos ensayos.



RESULTADOS

1. Análisis de la temperatura durante los ensayos.

Los resultados indican, para el ensayo de germinación (Tabla 3, Fig. 3.), que no hay diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las temperaturas registradas para el caso del tratamiento (TG) y control (CG).

Tabla 3. Temperatura promedio de la sala de crecimiento donde se realizó el ensayo de germinación y crecimiento.

| Ensayo de germinación | | Ensayo de crecimiento | |
|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| | Temperatura (°C) | | Temperatura (°C) |
| TG | 21,63a | T1-T2-T3 | 21,57a |
| CG | 21,77a | C1-C2-C3 | 21,87b |

TG=período tratamiento del ensayo de germinación, CG= período control del ensayo de germinación, T1-T2-T3= período tratamiento del ensayo de crecimiento, C1-C2-C3= período control del ensayo de crecimiento. Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $P < 0,05$).

Si bien el comportamiento no es del todo homogéneo, el rango de temperaturas se mantiene dentro del óptimo para el crecimiento de la especie (Weigel y Glasebrook 2002, Rivero-Lepinckas *et al.*, 2006). En el caso del ensayo de crecimiento, se observa un comportamiento similar al detallado anteriormente, sin embargo, el test estadístico arroja diferencias significativas (Tabla 3, Fig. 4). A pesar de este dato, el rango y la tendencia de temperaturas

sigue siendo el óptimo, por lo que se descarta que estas variaciones pudieran causar respuestas diferenciales en plántulas tratadas y controles.

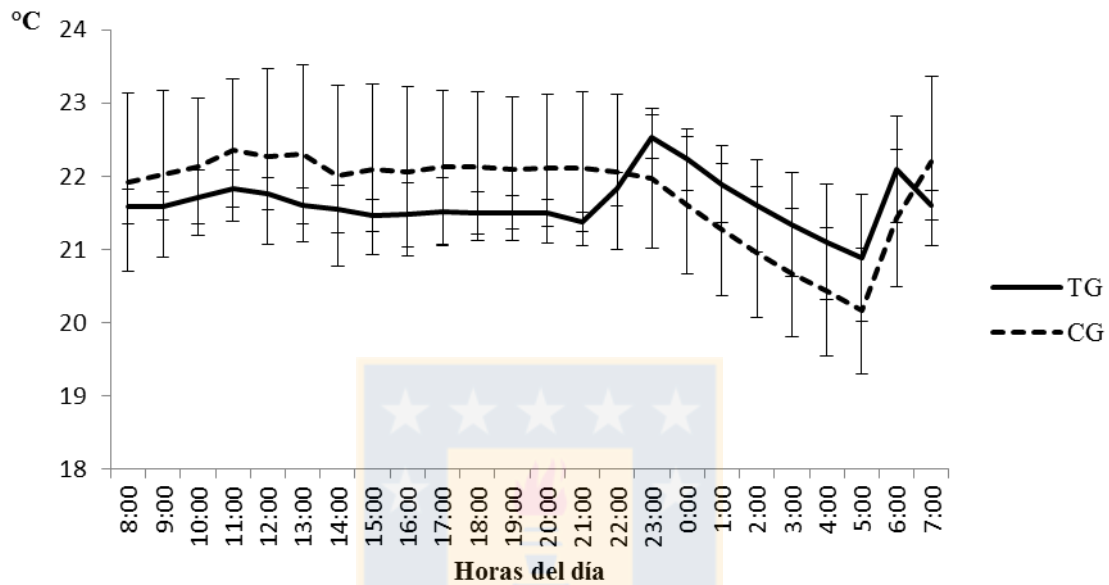


Figura 3. Temperatura registrada durante ensayo de germinación. TG=tratamiento. CG=control. El encendido de las luces es a las 8:00 h y el apagado es las 00:00 h.

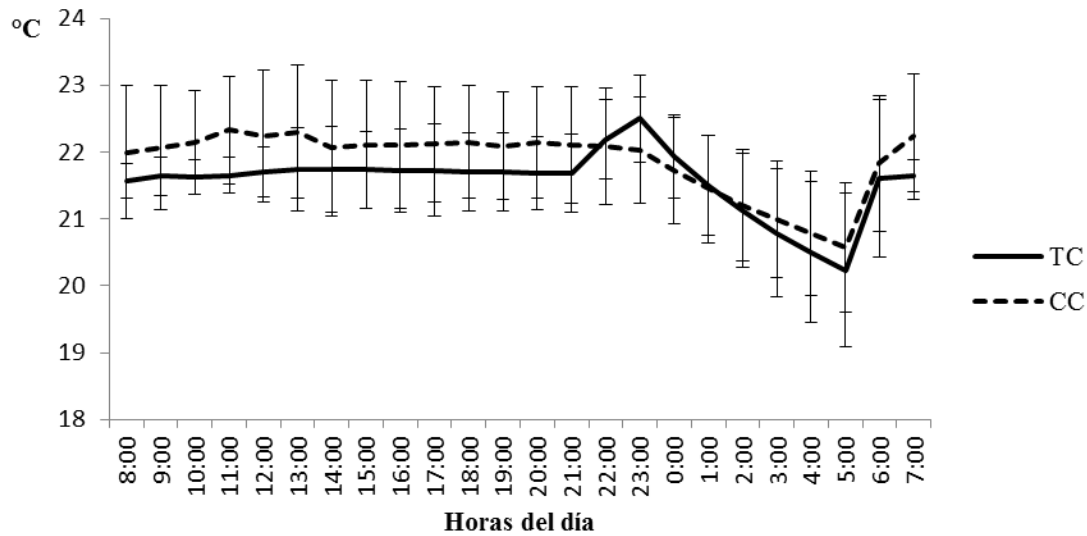


Figura 4. Temperatura registrada durante ensayo de crecimiento. TC=tratamientos. CC=controles. El encendido de las luces es a las 8:00 h y el apagado es las 00:00 h.

2. Efecto de la radiación wifi sobre la germinación.

La curva pronunciada sobre los primeros días (Fig. 5) revela el comportamiento típico de esta especie, con una casi nula latencia, alta velocidad y tasa de germinación en los primeros días después de la siembra, para decaer rápidamente los días posteriores (Rivero-Lepinckas *et al.*, 2006). El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas para las características evaluadas (Tabla 4). Las condiciones de temperatura no variaron significativamente durante TG y CG (Fig. 3, Tabla 3), lo que valida el análisis estadístico para ambos casos.

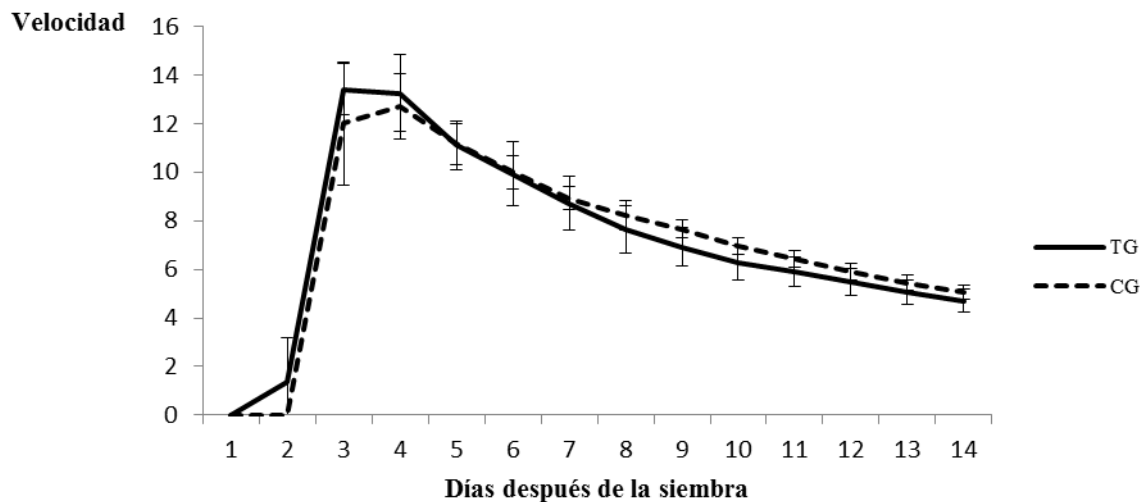


Figura 5: Valor o velocidad de germinación promedio de TG y CG de semillas de *A. thaliana*, monitoreado durante 14 días después de la siembra.

Tabla 4: Principales características asociadas a la germinación, analizadas en semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia bajo radiación wifi.

| Ensayo | Germinación total (%) | Valor de germinación (velocidad) |
|--------|-----------------------|----------------------------------|
| TG | 62,25 | 65,95 |
| CG | 70,75 | 65,81 |

TG=tratamiento, CG=control. No hubo diferencias significativas para las características analizadas (ANOVA, $P < 0,05$).

3. La radiación wifi altera el crecimiento vegetativo en *A. thaliana*.

A diferencia de lo obtenido en el proceso de germinación, la biomasa lograda después de 14 días de radiación wifi, tanto en hojas como raíces, difiere de la obtenida en las plántulas control (Fig. 6, 7 y 8). Los resultados indican una tendencia al aumento de la biomasa foliar, un 40,4% más en promedio, y a su vez una disminución de alrededor de un 80,9% de la biomasa radicular, bajo la influencia del campo electromagnético generado por la radiación wifi, independiente de la distancia a la fuente (Fig. 8 a y b). Sin embargo, se aprecian diferencias en la producción de biomasa radicular entre las distancias establecidas (Fig. 8 c) para las plántulas control, que pueden haberse debido a variaciones locales de temperatura y luz en la sala de crecimiento.



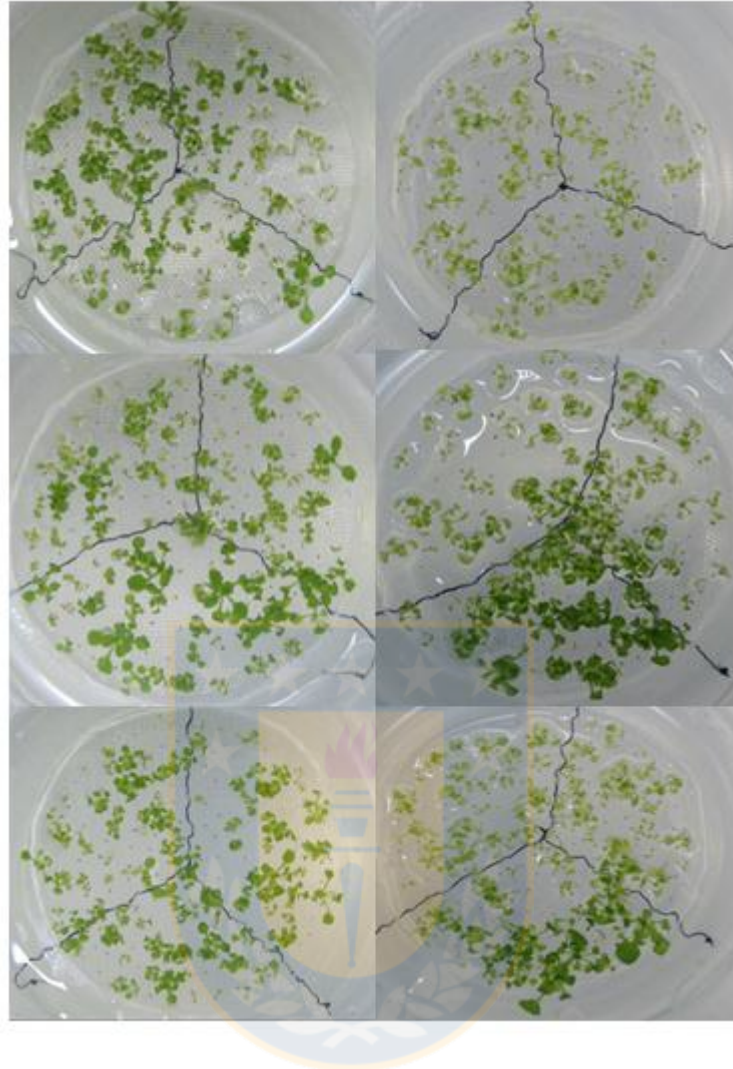


Figura 6. Vista aérea de hojas de *A. thaliana* en medio hidropónico a los 21 días de crecimiento. Plantas control C1, C2 y C3 ubicadas en la columna izquierda. Plantas tratadas T1, T2 y T3 ubicadas en la columna derecha.

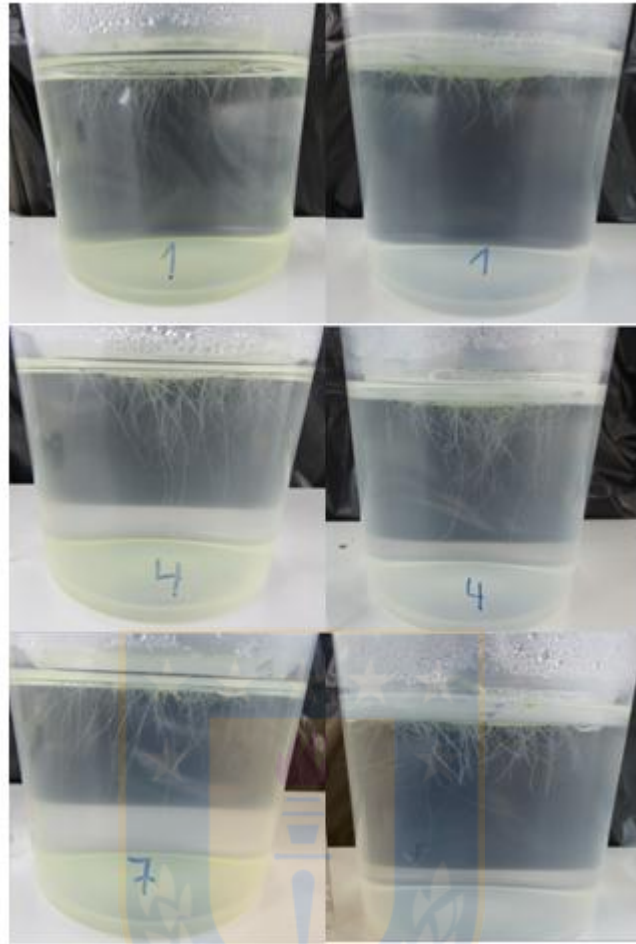


Figura 7. Vista frontal de raíces de *A. thaliana* en medio hidróponico a los 21 días de crecimiento. Plantas control C1, C2 y C3 ubicadas en la columna izquierda. Plantas tratadas T1, T2 y T3 ubicadas en la columna derecha.

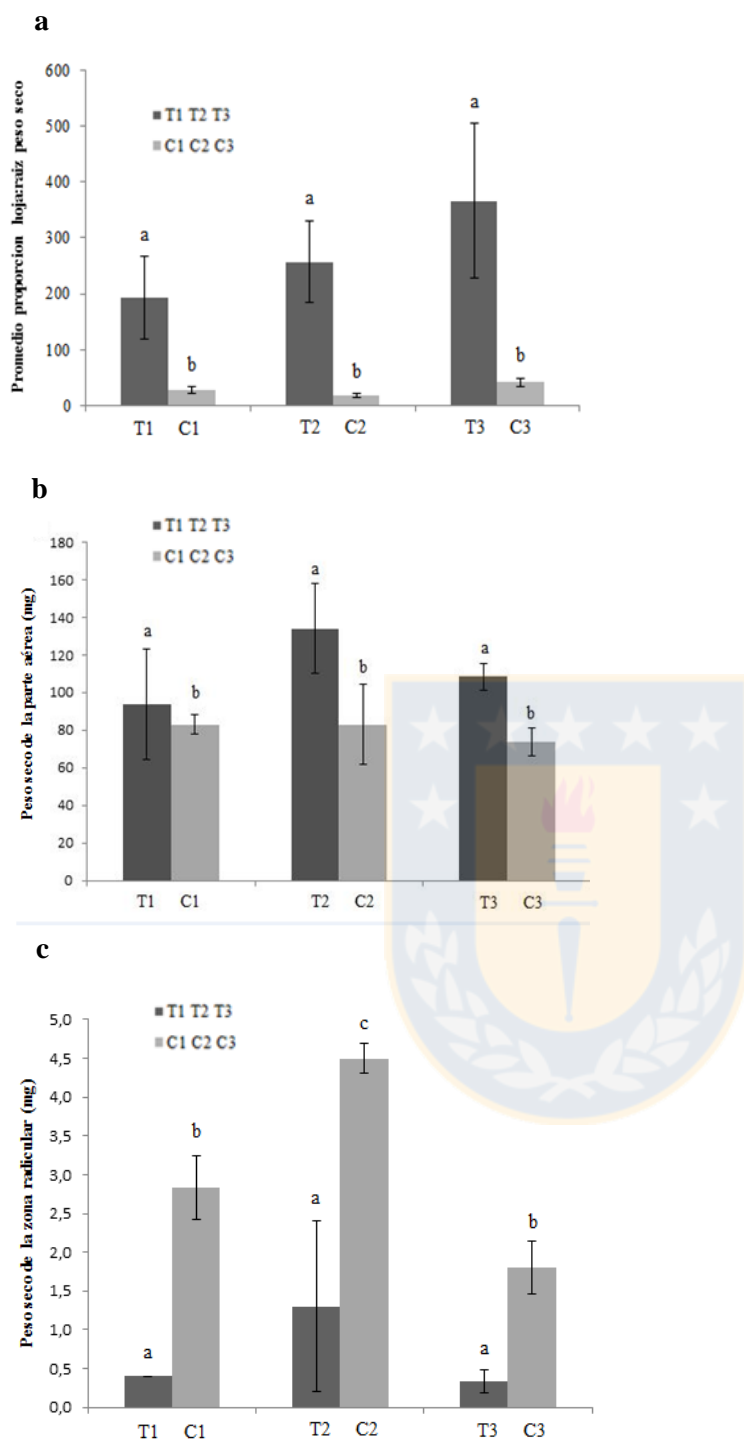


Figura 8. Biomasa obtenida luego de 21 días de crecimiento para *A. thaliana*. a) Proporción del peso seco hoja:raíz de *A. thaliana*. b) Peso seco de la parte aérea de *A. thaliana*. c) Peso seco de la zona radicular de *A. thaliana*. T1, T2 y T3 corresponden al tratamiento con radiación wifi continua desde el día 7. C1, C2 y C3 corresponden a los controles. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$).

4. Análisis de los patrones de metilación del ADN genómico.

Los patrones de metilación fueron analizados en tejido foliar proveniente del ensayo de crecimiento con la técnica MSAP. Esta técnica se basa en la detección de la metilación según la sensibilidad de los isoesquizómeros HpaII y MspI (Tabla 5, Fig. 9). El perfil de las bandas polimórficas II-I, III-I, IV-II, IV-I y IV-III corresponden a casos de demetilación para el sitio CCGG mientras que los perfiles III-IV, I-II, I-III, I-IV y II-IV indican un incremento en la metilación. Los patrones II-III y III-II sugieren una metilación o demetilación de una de las cadenas de ADN, sin variación para el nivel general de metilación.

Tabla 5. Sensibilidad de HpaII y MspI y las bandas de restricción resultantes.

| Sitio de restricción | HpaII | MspI | Estado de metilación | Clasificación |
|----------------------|-------|------|-----------------------------------|---------------|
| CCGG | + | + | Demetilado | I |
| GGCC | | | | |
| <u>C</u> CGG | - | + | Metilación en la citosina interna | II |
| GG <u>C</u> C | | | | |
| <u>CC</u> GG | + | - | Hemimetilación | III |
| GGCC | | | | |
| <u>CC</u> GG | - | - | Hipermetilación o sitio mutado | IV |
| GG <u>CC</u> | | | | |

“+” y “-” hacen referencia a presencia y ausencia, respectivamente.

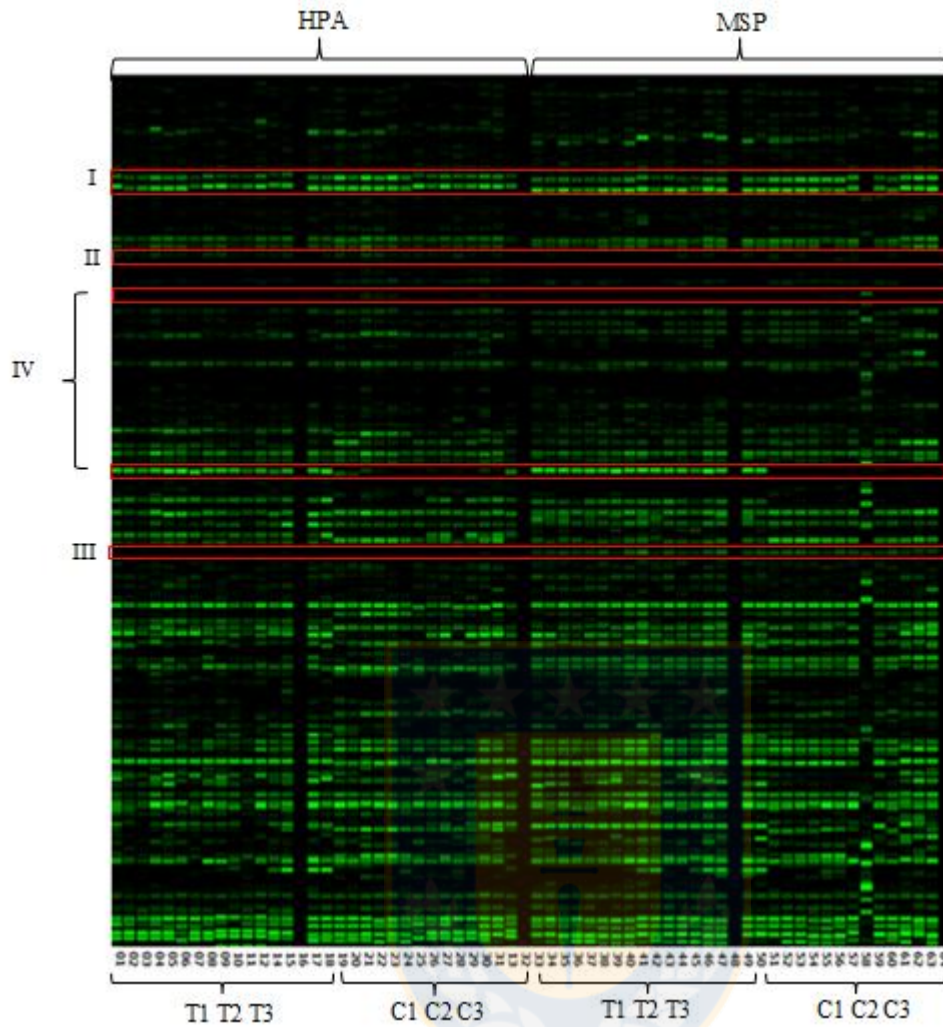


Figura 9. Representación gráfica de la clasificación de las bandas epigenéticas según el estado de metilación encontradas en las diferentes combinaciones utilizadas en este estudio. I=demetilado, II=metilación en la citosina interna, III=hemimetilación, IV= Hipermetilación. T1, T2, T3 corresponden al tratamiento con radiación wifi. C1, C2 y C3 corresponden a los controles.

Con los partidores utilizados en el procedimiento MSAP se obtuvo un polimorfismo total del 71%. (Tabla 6), con demetilaciones e hipermetilaciones de sitios de manera simultánea; una fuerte diferenciación entre las plántulas tratadas v/s las plántulas control y una tendencia a la disminución de la diversidad epigenética para el caso de la población tratada, independiente de

las distancias evaluadas (Fig. 10 y 11), lo que se concuerda con el análisis estadístico de acumulación de biomasa foliar. El detalle entregado por el análisis de R indica claramente que las poblaciones T1, T2 y T3 son prácticamente iguales en cuanto a los porcentajes de loci LSM encontrados (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los loci susceptibles a metilación (LSM) y no metilados (LNM) obtenidos del análisis realizado en R, con el paquete *msap*.

| | E+ACA/H- M+CTG | E+ACG/H- M+CCG | E+AGT/H- M+CCG | Porcentaje polimorfismo | Índice de Shannon | AMOVA (P<0.0001) |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| LSM | 20 | 35 | 31 | 71% | 0,625 | 0.8006 |
| LNM | 17 | 7 | 10 | 3% | - | - |
| Detalle de las bandas polimórficas | | | | | | |
| | C1 | C2 | C3 | T1 | T2 | T3 |
| HPA+/MSP+ | 27% | 30% | 34% | 40% | 40% | 41% |
| HPA+/MSP- | 21% | 25% | 22% | 18% | 18% | 18% |
| HPA-/MSP+ | 0,6% | 0,6% | 0,8% | 10% | 10% | 10% |
| HPA-/MSP- | 45% | 40% | 36% | 33% | 33% | 33% |
| Marcadores totales | 120 | | | | | |

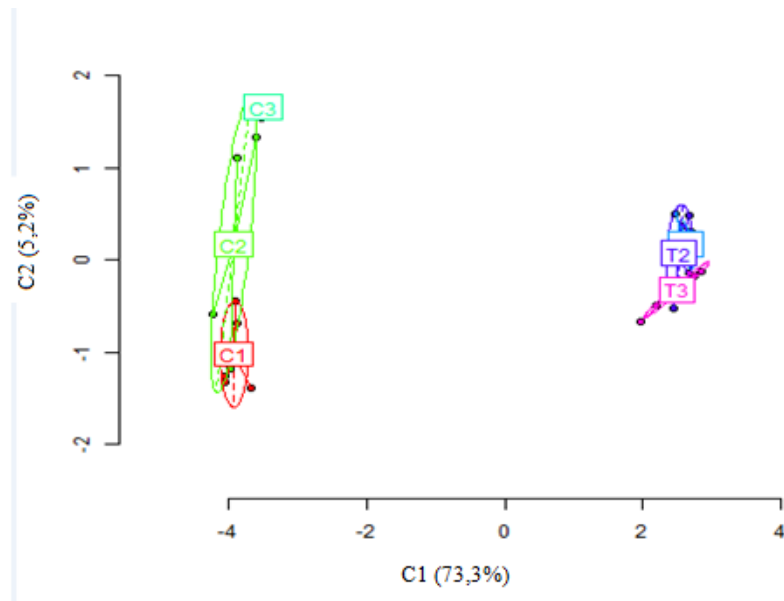
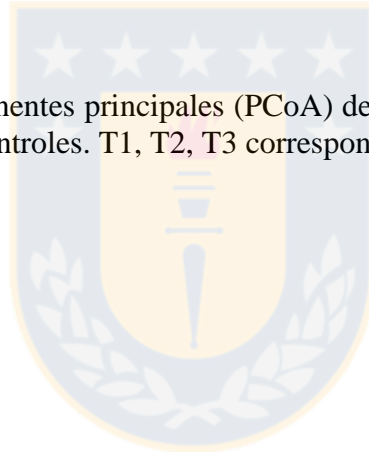


Figura 10: Análisis de componentes principales (PCoA) de la matriz LSM obtenida en R. C1, C2 y C3 corresponden a los controles. T1, T2, T3 corresponden a los tratamientos.



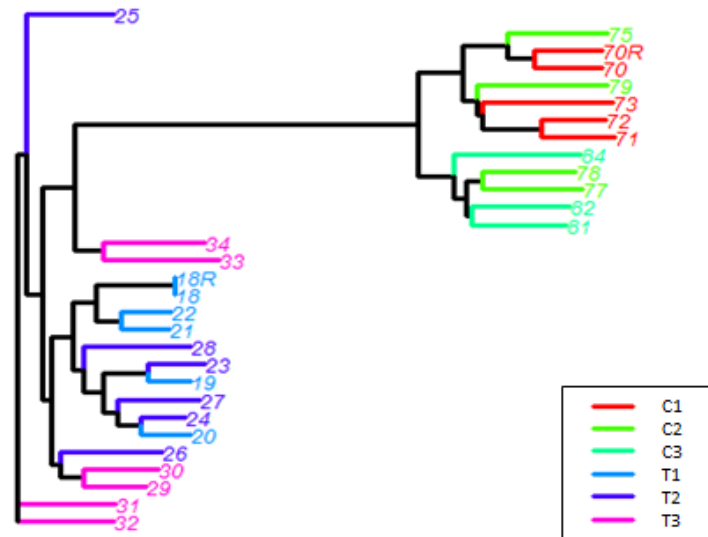


Figura 11. Dendrograma de la matriz LSM obtenida con R. C1, C2 y C3 corresponden a los controles. T1, T2, T3 corresponden a los tratamientos.

El análisis minucioso de los loci encontrados, reveló que hubieron varios del tipo IV, con los que el programa *msap* no pudo lidiar, por lo que se realizó un análisis detallado del perfil de bandas manualmente, donde se utilizaron solo los LSM que seguían un patrón específico, para determinar el cambio de los sitios con respecto a su estado de metilación. Se aprecia una leve disminución de la metilación global para sitios CCGG, el que representa un 21,67% de los sitios totales (Tabla 7), en el cual el aporte principal fue la gran cantidad de bandas que cambiaron su estado de IV a I (14 en total).

Tabla 7. Perfil de las bandas polimórficas según cambio en el estado de metilación de ADN_g de hojas de *A. thaliana* tratadas con radiación wifi y control.

| Disminución de la metilación | C→T | Aumento de metilación | C→T |
|-------------------------------------|------------|------------------------------|------------|
| II-I | 1 | I-III | 0 |
| II-III | 0 | I-II | 3 |
| III-I | 2 | I-IV | 11 |
| IV-I | 14 | II-IV | 0 |
| IV-II | 2 | III-II | 0 |
| IV-III | 7 | III-IV | 10 |
| Total | 26 | Total | 24 |
| Porcentaje | 21,67% | Porcentaje | 20% |



DISCUSION

El presente estudio tuvo como propósito evaluar el efecto atérmico de la radiación wifi, sobre la germinación, el desarrollo vegetativo y los patrones de metilación de plántulas de *A. thaliana*. Con el fin de develar si estos efectos tienen un impacto a nivel macro, se realizó un análisis de la germinación y la acumulación de biomasa ya que estos parámetros han sido ampliamente utilizados como indicadores sensibles a la contaminación medioambiental (Kummerová y Kmentová 2004, Liu *et al.* 2005), mientras que se aplicó la técnica MSAP para analizar los cambios en los patrones de metilación de ADN genómico foliar. A continuación, se discutirán los principales hallazgos de esta investigación.

El proceso de germinación de semillas de *A. thaliana* expuestas a 14 días de radiación wifi se mantuvo sin variaciones significativas, indicando que la radiación emitida por el router no genera un efecto sobre las mismas (Tabla 4, Fig. 5). Un caso similar fue reportado en la germinación de semillas de *A. cepa* expuestas a RF-MI de 0,4 y 0,9 GHz, con densidades de potencia variables de entre 0,3 y 38,2 W/m², la cual no mostró diferencias significativas entre las distintas frecuencias e intensidades mencionadas (Tkalec *et al.*, 2009), lo que implica que el proceso de germinación podría no estar siendo influenciado completamente por la densidad de potencia, sino que responde también a otros factores como la cercanía a la fuente (Selga y Selga 1996), tiempo de exposición (Sharma *et al.*, 2009), estado de latencia (Akbal *et al.*, 2012), entre otros. Incluso es posible que la densidad de potencia emitida por el router (Tabla 1) sea muy baja para tener alguna influencia sobre la germinación, dado que en la mayoría de los reportes científicos aquí mencionados se han utilizado intensidades más altas. La inconsistencia de todos estos resultados explica en parte la falta de interés en las posibles aplicaciones agrícolas que a partir de los años 20 se vislumbró con el uso de estas radiaciones como pre-tratamiento de semillas (Smith *et al.* 1993, Namba *et al.* 1995, Davies 1996, Pietruszewski 2011, Teixeira da Silva y Dobránszki 2015).

La exposición a los campos electromagnéticos del wifi presenta características similares a la exposición a antenas y teléfonos móviles. Mientras más cercano a la fuente, más intensidad de radiación emitida, y por ende mayor dosis de radiación recibida (BioInitiativeReport 2012). Por esta razón se establecieron tres distancias con respecto a la fuente, para analizar si las diferencias de densidad de potencia tenían algún efecto sobre la biomasa (Fig. 2). Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas que indiquen respuestas diferenciales en la acumulación de biomasa para las tres distancias elegidas, contrario a la hipótesis establecida y como se ha reportado en literatura (Balodis *et al.* 1996, Selga y Selga 1996, Schmutz *et al.* 1996). Esto podría deberse a que las distancias establecidas pueden no haber sido lo suficientemente “lejanas” como para generar una respuesta diferencial, teniendo en cuenta que la superficie de cobertura de un router ronda los 90 m (BioInitiativeReport 2012). Sin embargo, y al contrario de la germinación, la acumulación de biomasa se vio alterada producto de la exposición a los campos electromagnéticos, observándose un aumento de la masa foliar (Fig. 6 y 8 b), versus una disminución notable en la acumulación de biomasa radicular (Fig. 7 y 8 c). Esta disminución significativa en la zona radical, concuerda con lo observado por otros investigadores y ha resultado ser una de las respuestas más recurrentes a la exposición de RF-MI (Sharma *et al.* 2009, Akbal *et al.* 2012, Singh *et al.* 2012); un resultado interesante considerando que el sistema de raíces está catalogado como el órgano receptor de la mayoría de las señales externas, siendo etiquetado incluso como el “cerebro” de la planta, debido a la gran sensibilidad y procesamiento de la información recibida (Barlow 2006). Teniendo en cuenta este símil, no es de extrañar que tal y como sucede con el cerebro humano, las raíces sean uno de los órganos más afectados por la exposición a los campos electromagnéticos. Por otro lado, las diferencias obtenidas en la proporción de hoja:raíz de las plantas tratadas (Fig. 8 a), han resultado inesperadas considerando que la tendencia reportada es la disminución general del crecimiento en los primeros estadíos (Tkalec *et al.* 2005, Sharma *et al.* 2009, Akbal *et al.* 2012, Singh *et al.* 2012). Sin embargo, un fenómeno similar fue observado por Halgamuge *et al.* (2015), quienes obtuvieron comportamientos distintos para el crecimiento del epicotilo, hipocotilo y raíces dependiendo de la intensidad, modulación de la señal y tiempo de exposición en plántulas de soya (*Glycine max*). Estas diferencias podrían indicar una respuesta de morfogénesis inducida por estrés (Stress-Induced Morphogenesis Responses o en sus siglas en inglés SIMRs), que se componen de una mezcla de inhibición de

la elongación, estimulación localizada de la división celular y cambios complejos en la diferenciación celular, dados por la presencia de estrés abiótico (Potters *et al.* 2007, Patakas 2012). Se cree que el mecanismo por el cual ocurren estas diferenciaciones está asociado a gradientes de moléculas señalizadoras o “morfogenes” que inducen cambios en los patrones de crecimiento celular que finalmente influyen en el crecimiento general (Sugimoto-Shirasu y Roberts 2003, Rauch y Millonas 2004, Prusinkiewicz y Rolland-Lagan 2006). En otras palabras, los cambios en la morfología de las plantas en respuesta a diferentes estreses abióticos son la consecuencia última de modificaciones en la división y/o tasa de expansión de las células. Esta hipótesis encaja con las observaciones realizadas por diversos autores (Pakhomov *et al.* 1998, Tafforeau *et al.* 2002, Tkalec *et al.* 2009, Akbal *et al.* 2012) los cuales han sugerido que las RF-MI podrían estar produciendo efectos negativos sobre la función del huso mitótico, alterando las tasas de división celular, cuyos efectos podrían no verse reflejado necesariamente en el fenotipo, y que el mayor daño se estaría produciendo en células embrionales, tal como se ha documentado en seres humanos y animales (Ruediger 2009). Dado que la exposición de las plántulas de *A. thaliana* en la presente investigación fue cuando estaban en pleno crecimiento (7 días después de la siembra), es posible, bajo las hipótesis antes planteada, que se haya producido una alteración en la división celular producto de una modificación a nivel del huso mitótico y que ambos órganos hayan respondido de manera diferencial. Si bien este estudio no incluyó un análisis citogenético o similar que pueda dar confirmación a estas interrogantes, no se descarta que la radiación wifi proveniente de un router doméstico pueda tener un efecto genotóxico sobre las plantas dada la similitud en las respuestas encontradas con respecto a la literatura actual.

Un largo número de estudios han comprobado que las respuestas a las presiones del medio ambiente están reguladas por variaciones en el epigenoma que representan un importante mecanismo de adaptación (Chinnusamy *et al.* 2006, Boyko *et al.* 2010, Mirouze y Paszkowski 2011, Zhongai *et al.* 2015). En literatura se pueden encontrar reportes que han demostrado expresión genética diferencial bajo el estímulo de RF-MI (Ben-Izhak *et al.* 2003, Parola *et al.* 2005, Roux *et al.* 2006 y 2008, Vian *et al.* 2006, Beaubois *et al.* 2007, Engelmann *et al.* 2008), que bien podrían estar relacionados con variaciones epigenéticas. En base a toda esta información, surge la cuestión si los campos electromagnéticos tienen el potencial de causar

cambios en el epigenoma, específicamente sobre los patrones de metilación del ADN. La técnica MSAP ha sido ampliamente utilizada para estudiar los patrones de metilación de variadas especies bajo condiciones de estrés (Bardini *et al.* 2003, Zicheng y Yanxia 2009, Zhong *et al.* 2009, Wang *et al.* 2011, Karan *et al.* 2012, Li *et al.* 2015). Con esta técnica es posible generar marcadores cualitativos que permiten comparar dos condiciones biológicas, sin necesidad de conocer la secuencia genética, y además sirve como base para la generación de marcadores cualitativos, asociables a condiciones biológicas específicas (Rand *et al.* 2013).

Los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que las radiaciones wifi provenientes de un router doméstico tienen un impacto en el estado de metilación, generando un polimorfismo epigenético del 71% (Tabla 6). El polimorfismo epigenético dado por la metilación en sitios CCGG de *A. thaliana*, ha sido previamente estudiado por Cervera *et al.* (2002), quienes utilizando la misma técnica obtuvieron menos de 1% de polimorfismo entre plantas de un mismo ecotipo, lo que indica que los campos electromagnéticos emitidos por el router influyen de manera significativa sobre los patrones de metilación del ADN. El análisis de la metilación general obtenido en este estudio, muestra una tendencia a la disminución de la metilación para las plántulas tratadas (Tabla 7), independiente de la distancia, y por ende, de la intensidad de la radiación. Según Xu *et al.* (2004) el aumento de bandas tipo I y II indica una demetilación de la citosina externa, mientras que la aparición y desaparición de bandas tipo III involucra la alteración tanto citosinas internas como externas. Las bandas tipo IV se asocian a mutaciones en el sitio de corte, pero dado que las RF-MI no inducen cambios genéticos, la aparición de estas bandas indica una hipermetilación de los sitios. El aumento en la demetilación encontrada para las plántulas tratadas con wifi, está representada en su mayoría por el cambio de sitios totalmente metilados (IV) a completamente demetilados (tipo I), lo que podría estar indicando una activación de genes como consecuencia de la exposición a la radiación, o una posible modificación en la conformación de la cromatina producto de la alteración en la metilación, que a su vez podría haber liberado transposones que alteraron la tasa de crecimiento celular y e incidieron en la acumulación de biomasa foliar. Estos resultados son concordantes con las evidencias de genotoxicidad y aberraciones cromosómicas discutido anteriormente, e incluso se ajusta con la hipótesis de los cambios celulares que acompañan las respuestas SIMRs.

El único estudio a la fecha que ha medido la metilación en plantas bajo RF-MI es el llevado a cabo por Minasbekyan y Abovyan (2013), quienes observaron un aumento de metilación de hasta un 14% bajo frecuencias de 45 y 46 GHz (entre 18 y 20 veces más en comparación con lo que emite un router wifi), y una disminución para frecuencias más altas (49, 50 y 50,3 GHz), en plántulas de trigo (*Triticum Aestivum*), lo que indica una dependencia de la frecuencia en este caso. El análisis de las plántulas de la segunda generación muestra un traspaso parcial de la metilación de las plantas madres, lo que sugiere fuertemente que la influencia de las RF-MI puede permanecer por toda la generación, y traspasarse a la siguiente. La radiación wifi en el presente estudio fue aplicada durante las primeras fases del crecimiento, sin analizar la segunda generación. Sin embargo en seres humanos, la exposición a las RF-MI desde muy jóvenes se asocia a una acumulación de efectos dañinos que podrían afectar la vida adulta del individuo y a la potencial progenie (Adlkofer 2008), por lo que no se descarta que los patrones de metilación encontrados en esta investigación puedan ser heredables. Considerando la gran dependencia del recurso forestal y agrícola sobre la economía de la región del Biobío (la región posee más del 40% de las plantaciones y la superficie destinada a la agricultura es una de las mayores del país), es de suma importancia indagar los efectos de las RF-MI tanto a nivel transgeneracional, como en las posibles alteraciones productivas que se podrían manifestar.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación sobre las posibles alteraciones atómicas en la germinación, crecimiento vegetativo y patrones de metilación de *A. thaliana*, causadas por la exposición a radiación wifi proveniente de un router doméstico, se concluye lo siguiente:

I. Los campos electromagnéticos de wifi generados por un router de uso doméstico no afectan el proceso de germinación de *A. thaliana*.

II. Las ondas wifi inducen cambios en la acumulación de biomasa, independiente de la densidad de potencia o distancia a la fuente, generándose una respuesta diferenciada para cada órgano (raíces y hojas).

III. Los patrones de metilación de ADN genómico de hojas de *A. thaliana* son afectados por la radiación wifi, independiente de la densidad de potencia o distancia a la fuente y que se correlacionan con los cambios evidenciados en la acumulación de biomasa foliar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adlkofer, F. (2008). The Endorsement of Safety by the German Mobile Telecommunication Research Programme (DMF) Regarding the Health Risks of Mobile Phone Radiation Is Based Rather on Wishful Thinking than Facts. En *How susceptible are genes to mobile phone radiation?* (pp. 6-23) (Primera edición). St. Ingbert: Sin casa editora.
2. Akbal, A., Kiran, Y., Sahin, A., Turgut-Balik, D., y Balik, H.H. (2012). Effects of Electromagnetic Waves Emitted by Mobile Phones on Germination, Root Growth, and Root Tip Cell Mitotic Division of *Lens culinaris* Medik. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(1), 23-29.
3. Alatorre-Cobos, F., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Yong-Villalobos, L., Pérez-Torres, C.A., Oropeza-Aburto, A., Méndez-Bravo, A., González-Morales, S.I., Gutiérrez-Alanís, D., Chacón-López, A., Peña-Ocaña, B.A., y Herrera-Estrellam L. (2014). An improved, low-cost, hydroponic system for growing *Arabidopsis* and other plant species under aseptic conditions. *Plant Biology*, DOI: 10.1186/1471-2229-14-69.
4. Avendaño, C., Mata, A., Sanchez, C., y Doncel, G. (2012). Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, 97(1), 39-45.
5. Bae, M.S., Cho, E.J., Choi, E.Y., y Park, O.K. (2003). Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal*, 36(5), 652-63.
6. Balmori, A. (2009). Electromagnetic pollution from phone masts. Effects on wildlife. *Pathophysiology*, 16, 191–199.
7. Balodis, V., Balodc, Z., Brumelis, G., Kalviskis, K., Tjatve, D., y Znotiqa, V. (1996). Does the Skrunđa Radio Location Station diminish the radial growth of pine trees? *Science of the Total Environment*, 180, 57-64.
8. Bardini, M., Labra, M., Winfield, M., y Sala, F. (2003). Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 157–162.

9. Barlow, P.W. (2006). Charles Darwin and the Plant Root Apex: Closing a Gap in Living Systems Theory as Applied to Plants. En *Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life*. (pp. 37-51). Alemamia: Springer-Verlag.
10. Beaubois, E., Girard, S., Lallechere, S., Davies, E., Paladian, F., Bonnet, P., Ledoigt, G., y Vian, A. (2007). Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly transmitted systemic signals generated in response to electromagnetic field stimulation in tomato. *Plant, Cell and Environment*, 30, 834–844.
11. Belyaev, I.Y. (2005). Non-thermal Biological Effects of Microwaves. *Microwave Review*, 11, 13-29.
12. Belyaev, I.Y. (2008). Risk Assessment of Chronic Exposures to Non-Thermal Microwaves from Mobile Communication. En *How susceptible are genes to mobile phone radiation?*.(pp. 24-28). (Primera edición). St. Ingbert: Sin casa editora.
13. Ben-Izhak, M., Parola, A.H., y Kost, D. (2003). Low-frequency electromagnetic fields induce a stress effect upon higher plants, as evident by the universal stress signal, alanine. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 302, 427–434.
14. BioInitiative Working Group (2012, diciembre). *BioInitiative Report: A Rationale for Biologically-based Public Exposure Standards for Electromagnetic Radiation*. Sage, C., y Carpenter, O. (eds.). Recuperado en www.bioinitiative.org [2013, 14 de junio]
15. Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y.L., Golubov, R., Bilichak, A., Ilnytsky, Y., Hollander, J., Meins, F., y Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE*, 5(3), e9514.
16. Cerda, S., y Weitzman, S.A. (1997). Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 386(2), 141-152.
17. Cervera, M.T., Ruiz-García, L., y Martínez-Zapater, J.M. (2002). Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol Genet Genomics*, 268, 543–552.
18. Chinnusamy, V., y Zhu, J.K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12, 133–9.
19. Conn, S.J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., Aukett, L., Conn, V., Shearer, M.K., Fuentes, S., Tyerman, S.D., y Gilliham, M. (2013).

- Optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*, DOI: 10.1186/1746-4811-9-4.
20. Czabator, F.J. (1962). Germination value - an index combining speed and completeness of pine seed germination. *Forest Science*, 8, 386-396.
 21. Davies, M.S. (1996). Effects of 60 Hz electromagnetic fields on early growth in three plant species and a replication of previous results. *Bioelectromagnetics*, 17, 154–161.
 22. Engelmann, J.C., Deeken, R., Müller, T., Nimtz, G., Roelfsema, M.R., y Hedrich, R. (2008). Is gene activity in plant cells affected by UMTS-irradiation? A whole genome approach. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 1, 71-83.
 23. Evrard, A., Kumar, M, Lecourieux, D., Lucks, J., Koskull-Doring, P., y Hirt H. (2012). Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1, e59.
 24. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (1991). Ensayo de la semilla: Ensayos de germinación. En *Guía para la manipulación de semillas forestales*. Willan, R.L. (ed). Recuperado en <http://www.fao.org/docrep/006/ad232s/ad232s12.htm> [2015, 17 de marzo].
 25. Fingerman, I., Zhang, X., Ratzat, W., Husain, N., Cohen, R., y Schuller G. (2012). NCBI Epigenomics: What's new for 2013?. *Nucleic Acids Research*, 41, D221-D225.
 26. Foster, K., y Moulder, J. (2013). WI-FI and health: Review of current status of research. *Health Physics Society*, 105(6), 561-575.
 27. Halgamuge, M.N., Yak, S.K., y Eberhardt, J.L. (2015). Reduced Growth of Soybean Seedlings After Exposure to Weak Microwave Radiation From GSM 900 Mobile Phone and Base Station. *Bioelectromagnetics*, 36, 87-95.
 28. Hasbún, R., Iturra, C., Moraga, P., Wachtendorff, P., Quiroga, P., y Valenzuela, S. (2012). An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics y Genomes*, 8, 925–931.
 29. Huang, C., He, W., Guo, J. Chang, X., Su, P., y Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3041–3049.
 30. Hyland, G.J. (2000). Physics and biology of mobile telephony. *Lancet*, 356, 1833–36.

31. Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., y Zhu, J.K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathway. *Plant Cell*, 9, 1935–1949.
32. John, C.F., Morris, K., Jordan, B.R., Thomas, B., y Mackerness, S. (2001). Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 52(359), 1367-1373.
33. Jordan, B.R., James, P.E., y Mackerness, S. (1998). Factors affecting UV-B induced changes in *Arabidopsis* gene expression: the role of development, protective pigments and the chloroplast signal. *Plant Cell Physiology*, 39, 769-778.
34. Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D., Zhao, W., Schiller, C., Gatzke, N., Sung, D., y Guy, C. (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136, 4159–416.
35. Karan, R., De Leon, T., Biradar, H., y Subudhi, P.K. (2012). Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLOS ONE*, 7, e40203.
36. Kim, J., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E., y Kobayashi, A. (2007). Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 415–424.
37. Knight, H., Brandt, S., y Knight, M.R. (1998). A history of stress alters drought calcium signaling pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 16(6), 681–687.
38. Kummerová, M., y Kmentová, E. (2004). Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere*, 56, 387–393.
39. Larkindale, J., Hall, J., Knight, M., y Vierling, E. (2005). Heat Stress Phenotypes of *Arabidopsis* Mutants Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition of Thermotolerance. *Plant Physiology*, 138, 882–897.
40. Li, Z., Chen, X., Li, S., y Wang, Z. (2015). Effect of nickel chloride on *Arabidopsis* genomic DNA and methylation of 18S rDNA. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 51–57.

41. Liu, X., Zhang, S., Shan, X., y Zhu, Y.G. (2005). Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere*, 61, 293–301.
42. Lois, R. (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 194,498-503.
43. Meyer, P. (2011). DNA methylation system and targets in plant. *FEBS letters*, 585, 2008-2015.
44. Minasbekyan, L.A., y Abovyan, M.S. (2013). Changes in DNA Methylation Wheat Seedlings in First and Second Generations under Influence of EHF-EMI. *PIERS Proceedings*, 1,118-121.
45. Mirouze, M., y Paszkowski, J. (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 14, 267–74.
46. Monroy, A.F., Labbé, E., y Dhindsa, R.S. (1997). Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts. *FEBS Lett*, 410 (2), 206–209.
47. Namba, K., Sasao, A., y Hibusawa, S. (1995). Effect of magnetic field on germination and plant growth. *Acta Horticult*, 399,143–148.
48. Pakhomov, A.G., Akyel, Y., Pakhomova, O.N., Stuck, B.E., y Murphy, M.R. (1998). Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. *Bioelectromagnetics*, 19, 393–413.
49. Parola, A., Kost, D., Katsir, G., Monselise, E., y Cohen-Luria, R. (2005). Radical Scavengers Suppress Low Frequency EMF Enhanced Proliferation in Cultured Cells and Stress Effects in Higher Plants. *The Environmentalist*, 25, 103–111.
50. Patakas, A. (2012). Abiotic Stress-Induced Morphological and Anatomical Changes in Plants. En *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. (pp. 21-39). USA: Springer Science+Business Media.
51. Pérez-Figueroa, A. (2013). *msap*: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. *Molecular Ecology Resources*, 13, 522–527.
52. Pezoa, J.N. (2010). Script Comunicaciones Inalámbricas. Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Concepción.

53. Pietruszewski, S. (2011). Electromagnetic Fields, Impact on Seed Germination and Plant Growth. En *Encyclopedia of Agrophysics*. (pp. 267–269). Holanda: Springer
54. Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J., y Jansen, M.A.K. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends Plant Sci*, 12, 98–105.
55. Prusinkiewicz, P., y Rolland-Lagan, A.G. (2006). Modelling plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 83–88.
56. Rand, K., Young, G., Ho, T., y Molloy, P. (2013). Sensitive and selective amplification of methylated DNA sequences using helper-dependent chain reaction in combination with a methylation-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 41, e15.
57. Rauch, E.M., y Millonas, M.M. (2004). The role of trans-membrane signal transduction in turing-type cellular pattern formation. *J Theor Biol*, 226, 401–407.
58. Rivero-Lepinckas, L., Crist, D., y Scholl, R. (2006). Growth of Plants and Preservation of Seeds. En *Arabidopsis Protocols*. (pp. 3-12). (Segunda edición). USA: Humana Press Inc.
59. Rocco, M., Arena, S., Renzone, G., Scippa, G.S., Lomaglio, T., Verrillo, F., Scaloni, A., y Marra, M. (2013). Proteomic analysis of temperature stress-responsive proteins in *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Molecular Biosystem*, 9(6), 1257-67.
60. Roux, D., Vian, A., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E., y Ledoigt, G. (2006). Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. *Physiologia Plantarum*, 128, 283–288.
61. Roux, D., Vian, A., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E., Ledoigt, G. (2008). High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V/m) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta*, 227, 883–891.
62. Ruediger, H.W. (2009). Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields. *Pathophysiology*, 16, 89–102.
63. Schmutz, P., Siegenthaler, J., Stager, C., Tarjan, D., y Bucher, J.B. (1996). Long-term exposure of young spruce and beech trees to 2450-MHz microwave radiation. *The Science of the Total Environment*, 180, 43-48.

64. Selga, T., y Selga, M. (1996). Response of *Pinus sylvestris* L. needles to electromagnetic fields, cytological and ultrastructural aspects. *Science of the Total Environment*, 180, 65–73.
65. Sharma, V.P., Singh, H.P., Kohli, R.K., y Batish, D.R. (2009). Mobile phone radiation inhibits *Vigna radiata* (mung bean) root growth by inducing oxidative stress. *Science of the Total Environment*, 407, 5543–5547.
66. Shiroff, V.M. (2008). DNA and Chromosome Damage: A Crucial Non-Thermal Biological Effect of Microwave Radiation. En *How susceptible are genes to mobile phone radiation?* (pp. 29-43). (Primera edición). St. Ingbert: Sin casa editora.
67. Silva-Correia, J., Freitas, S., Tavares, R.M., Lino-Neto, T., Azevedo, H. (2014). Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods*, 10 (7), 1-11.
68. Singh, H.P., Sharma, V.P., Batish, D.R., y Kohli, R.K. (2012). Cell phone electromagnetic field radiations affect rhizogenesis through impairment of biochemical processes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 1813–1821.
69. Smith, S.D., McLeod, B.R., y Liboff, A.R. (1993). Effects of CR-tuned 60 Hz magnetic fields on sprouting and early growth of *Raphanus sativus*. *Biochem Bioenerg*, 32, 67–76.
70. Sugimoto-Shirasu, K., y Roberts, K. (2003). ‘Big it up’: end reduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 6, 544–553.
71. Tafforeau, M., Verdus, M.C., Norris, V., White, G., Demarty, M., Thellier, M., y Ripoll, C. (2002). SIMS study of the calcium-deprivation step related to epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 20(4), 611-623.
72. Teixeira da Silva, J.M., Dobránszki, J. (2015). Magnetic fields: how is plant growth and development impacted?. *Protoplasma*, DOI: 10.1007/s00709-015-0820-7.
73. Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 5, 571–599.
74. Tkalec, M., Malarić, K., y Pevalek-Kozlina B. (2005). Influence of 400, 900, and 1900 MHz Electromagnetic Fields on *Lemna minor* Growth and Peroxidase Activity. *Bioelectromagnetics*, 26, 185-193.

75. Tkalec, M., Malarić, K., y Pevalek-Kozlina, B. (2007). Exposure to radiofrequency radiation induces oxidative stress in duckweed *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*, 388, 78-89
76. Tkalec, M., Malarić, K., Pavlica, M., Pevalekkozlina, B., y Vidaković-cifrek, Z. (2009). Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 76-81.
77. Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., y Kobayashi, H. (1999). A Recessive *Arabidopsis* Mutant That Grows Photoautotrophically under Salt Stress Shows Enhanced Active Oxygen Detoxification. *The Plant Cell*, 11, 1195–1206.
78. Vian, A., Roux, D., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E., y Ledoigt, G. (2006). Microwave irradiation affects gene expression in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 1, 67–70.
79. Wang, W.S, Pan, Y.J, Zhao, X.Q., Dwivedi, D., Zhu, L.H. Ali, J., Fu, B.Y., y Li, Z.K. (2011). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 62, 1951.
80. Weigel, D., y Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis*, a Laboratory Manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
81. Weitzman, S., Turk, P., Milkowski, D., y Kozlowski, K. (1994). Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc. Nati. Acad. Sci*, 91, 1261-1264.
82. Wiart, J., Hadjem, A., Wong, M.F., y Bloch, I. (2008). Analysis of RF exposure in the head tissues of children and adults. *Phys Med Biol*, 53(13), 3681-95.
83. Xiong, L., y Zhu, J. (2002). Salt tolerance. En *The Arabidopsis Book*. (pp. 1: e0048). Publicado en línea: 10.1199/tab.0048.
84. Xu, M.G., Li, X.Q., y Korban, S.S. (2004). DNA-methylation alteration and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor Appl Genet*, 109, 899 – 910.
85. Zamanian, A., y Hardiman, C. (2005). Electromagnetic Radiation and Human Health: A Review of Sources and Effects. *High Frequency Electronics*, pp. 16-26.
86. Zhong, L., Xu, Y., y Wang, J. (2009). DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *Afr J Biotechnol*, 8, 6201–6207.

87. Zeller, G., Henz, S., Widmer, C., Sachsenberg, T., Ratsch, G., Weigel, D., Laubinger, S. (2009). Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *The Plant Journal*, 58, 1068–1082.
88. Zicheng, W., Yanxia, H. (2009). Effect of cryopreservation on the development and DNA methylation patterns of *Arabidopsis thaliana*. *Life Science Journal*, 6(1), 55-60

