



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Función de la vía tasiRNAs durante la regeneración de plantas a partir de callos
embriogénicos de maíz

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:
Brenda Anabel López Ruiz

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. José Luis Reyes Taboada
[Instituto de Biotecnología](#)
Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez
[Instituto de Ecología](#)

Ciudad de México. Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi mamá, a mis hermanos y a la pequeña Irina

A Miguel

A la memoria de mi tutor el Dr. Sergio Vaca Pacheco

I

*Somos apenas
semilla en tierra
gusano mariposa
instante
Murmullo somos
luego grito voz
manejo de azares
huesos de polvo
Gotita de lluvia llanto
Somos viento espejo
sombra
manantial.
Pedacito de carne
sueños
humo.*

II

*Somos sólo
Aquello que nos ata
Es el sueño
El amor los ojos
La vida sus caprichos*

III

*Somos tan poco
Sueños
Huesos
Humo.*

Sergio Vaca Pacheco. 2010. Brasa Nocturna.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
Índice de abreviaturas.....	8
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	10
1. Regeneración en las plantas.....	10
2. Tipos de regeneración.....	10
a.Reconstrucción de meristemas y reparación de tejidos.....	10
b. Organogénesis.....	11
c. Embriogénesis somática	12
3. Origen celular de la regeneración.....	13
4. Bases moleculares de la regeneración.....	13
a. Formación del callo.....	13
b. Organogénesis de novo del brote.....	16
c. Organogénesis de novo de la raíz.....	17
d. Regeneración por Embriogénesis Somática (ES).....	18
5. Las auxinas y su función en el desarrollo de las plantas	20
6. El maíz como modelo	22
a. Embriogénesis cigótica de maíz.....	22
b. Cultivo in vitro de maíz	25
c. Caracterización molecular de la regeneración <i>in vitro</i> de maíz	26
7. RNAs pequeños (sRNAs) y su rol en la morfogénesis de la planta.....	27
a. microRNAs.....	28
I. Desarrollo del SAM embrionario	29
II. Formación del meristemo axilar del brote.....	30
III. Desarrollo de la hoja.....	30
IV. Formación del sistema radicular.....	31
V. Floración.....	32
b. tasiRNAs	32
8. Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs).....	35
a. ARFs blancos de tasiRNAs	37
9. Función de la vía tasiR-ARF.....	38

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
CAPÍTULO IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	43
Materiales y métodos	44
CAPÍTULO V. RESULTADOS	56
1. Caracterización morfo-histológica de los tipos de callo durante los procesos de desdiferenciación y la regeneración de plántulas.	56
2. Acumulación de miRNAs y sus blancos, relacionados a desarrollo, durante la desdiferenciación y regeneración.	67
3. Análisis de la expresión de los componentes de la vía tasiR-ARF en los tipos de callos y etapas de regeneración <i>in vitro</i>	72
4. Localización tisular de algunos elementos de la vía tasiR-ARF.....	80
I. Obtención de sondas para evaluar la localización tisular de transcritos <i>TAS3g</i> y <i>ZmARF24</i>	80
II. Localización de <i>ZmARF24</i> y <i>TAS3g</i> en los diferentes tipos de callo y primera etapa de regeneración	84
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL	87
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	102
REFERENCIAS	104
CAPÍTULO VIII. ANEXOS	113
Anexo I. Medios de cultivo.	113
Anexo II. Tinción con safranina “O”-verde rápido FCF	114
Anexo III. 1. Cinética de crecimiento del CE y CNE-A.	116
2. Morfología de las hojas de plántulas germinadas comparadas con las obtenidas de la regeneración <i>in vitro</i>	117
Anexo IV. Oligonucleótidos empleados y curvas de calibración.....	121
Anexo V. Soluciones para la inmunolocalización de auxinas y citocininas.....	124
Anexo VI. Soluciones stock para la hibridación <i>in situ</i>	125
Anexo VII. Vector pGEM-T Easy y resultados de la secuenciación de plásmidos	128
Anexo VIII. Acumulación de los componentes de la vía tasiR-ARF en el lote de dos años y expresión de los genes involucrados en la formación de SAM y hoja.	130
Anexo IX. Vías de regulación compartidas entre miRNAs y tasiR-ARFs	133
Anexo X. Publicaciones derivadas de este trabajo.....	135

RESUMEN

La regeneración *in vitro* de maíz es un proceso único que permite abordar aspectos básicos de diferenciación y reprogramación molecular sin la presencia de elementos clave de posición embrionaria. En maíz, la regeneración *in vitro* es empleada durante la transformación genética y la conservación del germoplasma, involucra la señalización por hormonas vegetales como las auxinas y es dependiente del genotipo y explante utilizados. Los mecanismos regulatorios, así como las señales de diferenciación involucradas, son aún desconocidos. Se sabe que los RNAs pequeños (sRNAs) presentan una reprogramación durante la formación de las masas celulares totipotentes conocidas como callos. En consecuencia, se ha propuesto que los sRNAs podrían ser reguladores clave involucrados en la totipotencia de las plantas, la respuesta a auxinas y la diferenciación celular. Los tasiRNAs (siRNAs de acción en trans) son un grupo de sRNAs que se originan a partir de los transcritos de los genes TAS. En maíz solo se han identificado genes ortólogos tipo *TAS3* de *Arabidopsis thaliana*. El procesamiento del transcrito o precursor, *TAS3* requiere un corte dirigido por miR390 y Argonauta AGO7. Los blancos de tasiRNAs originados de *TAS3* son los Factores de Respuesta a Auxinas 3/4 (ARF3/4), por lo que se les ha denominado tasiR-ARFs. La vía se encuentra altamente conservada en las plantas y es relevante para el desarrollo. A pesar de esto, los tasiR-ARFs no han sido estudiados en la regeneración *in vitro* de maíz.

El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de los componentes de la vía tasiR-ARF y de miRNAs involucrados en la regeneración *in vitro* de maíz variedad Tuxpeño VS-535. Para el proceso de inducción y proliferación de callos se emplearon embriones inmaduros, la auxina sintética: ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) y la citocinina benciladenina (BA). Se identificaron diferentes tipos de callos y etapas de regeneración que fueron caracterizadas mediante análisis histológico y microscopia electrónica de barrido. La regeneración de las plantas inicia con la formación de hoja derivada de células de tipo meristemáticas y culmina con la formación de la raíz. Se aislaron RNAs pequeños y largos en los tejidos caracterizados que fueron analizados mediante reverso transcripción y PCR en tiempo real (RT-qPCR). El callo no embriogénico (CNE) presentó menor abundancia de la mayoría de los componentes de la vía tasiR-ARF, excepto para miR390, *TAS3g* y tasiR-ARFg respecto al callo embriogénico (CE). Se observaron incrementos de diferentes especies de tasiR-ARFs dependiendo de la etapa de regeneración, mientras que todos los *ARF3* mostraron reducción significativa desde la primera etapa de regeneración. En las mismas etapas se evaluó la acumulación de cinco miRNAs involucrados en la formación del meristemo apical del brote (SAM) y de la hoja: miR156, miR160, miR164, miR166 y miR394 y de sus transcritos blanco: *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SBP)-LIKE (ZmSBP23)*, *ZmARF17*, *ZmARF19*, *CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (ZmCUC2)*, *ROLLED LEAF (ZmRLD1)* y una proteína con caja F-BOX adaptadora del complejo ubiquitin ligasa (*ZmGRMZM2G064954*). Los principales cambios en la acumulación de miRNAs ocurrieron durante las primeras etapas de regeneración, donde la mayor abundancia de miR156, miR160 y miR166 posiblemente se relaciona con la formación de la hoja. Los resultados de este estudio muestran que existe una acumulación diferencial de sRNAs relacionados a desarrollo y sus blancos en cada una de las etapas de desarrollo establecidas. Esta información podría resultar útil para realizar, en un futuro, un estudio detallado que aborde la especificación celular durante la formación *de novo* de una planta donde los sRNAs juegan un papel importante.

ABSTRACT

In vitro maize regeneration is a unique process that can be used to address basic questions of molecular reprogramming in the absence of embryonic positional cues. This process is used for genetic transformation and germplasm conservation and the plant regeneration success depends on the genotype and explant characteristics. The regulatory mechanisms of this process remain still unknown and important questions regarding differentiation signals remain unanswered. It is known that small RNAs (sRNAs) undergo substantial reprogramming during the induction of formation of the totipotent cell mass called callus. Thus, they are suggested to be key regulators of plant totipotency, auxin responses and cell differentiation. The tasiRNAs (trans-acting siRNAs) are a type of sRNAs originated from TAS genes transcripts. In maize, only *TAS3* genes have been identified. *TAS3* transcript is processed by a miR390-AGO7 guided cleavage and the resulting sRNAs target *Auxin Response Factor3-4* (*ARF3-4*). Hence, these tasiRNAs are termed tasiR-ARFs. This pathway is highly conserved in plants and is of critical importance in the regulation of plant development. However, its functions during *in vitro* plant regeneration are unclear.

The aim of this study was to analyse the expression of tasiR-ARF pathway components and development-related miRNAs during maize Tuxpeño VS-535 *in vitro* plant regeneration. The callus induction and proliferation protocols were established using immature zygotic embryo in the presence of synthetic auxin 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and the cytokinin benzyladenine (BA). Different types of calli and developing stages of regeneration were recognised and characterized by light and scanning electron microscopy. Plant regeneration started with leaf differentiation from meristem-like cells and culminated with root formation from the regenerated plantlet. Small and long RNAs were isolated at particular developmental stages and their abundance was analysed by reverse transcription and real time PCR (RT-qPCR). The non-embryogenic callus (NEC) presented significantly lower levels of all tasiR-ARF pathway components, except for miR390, *TAS3g* and tasiR-ARFg, compared to the embryogenic callus (EC). We observed differential expression patterns for tasiR-ARFs throughout maize *in vitro* developmental stages of *in vitro* maize regeneration. The tasiR-ARFs targets showed a substantial reduction from the first stage of plant regeneration. Furthermore, we studied the expression at the recognized developmental stages of five development-related miRNAs: miR156, miR160, miR164, miR166 and miR394 and their corresponding targets: *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SBP)-like* (*ZmSBP23*), *AUXIN RESPONSE FACTORS* (*ZmARF17*, *ZmARF19*), *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*ZmCUC2*), *ROLLED LEAF* (*ZmRLD1*) and an F-BOX ubiquitin ligase (*ZmGRMZM2G064954*). The major changes in miRNA accumulation switches took place at early stages of development suggesting their participation in the leaf development. So, the higher accumulation of miR156, miR160 and miR166 encompassed with the leaf formation. This study shows that during *in vitro* maize regeneration a differential accumulation of development related sRNAs and their targets takes place, suggesting their potential role in the *de novo* plant formation. Such information provides hints to further understand cell fate specification in the regeneration process.

Índice de abreviaturas

% H	Porcentaje de hormonas (auxinas y citocininas)
2, 4-D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
AGO	Argonauta
ARF	Factor de respuesta a auxina
BA	Benciladenina
CE	Callo embriogénico
CNE-A	Callo no embriogénico amarillo
CNE-B	Callo no embriogénico blanco
CUC	<i>Cup shaped cotyledon</i>
DCL	<i>Dicer like</i>
ddp	Días después de la polinización
DEPC	Dietil pirocarbonato
dsRNAs	RNAs de doble cadena
EI	Embrión inmaduro
ES	Embriogénesis somática
FC	Veces de cambio
HD-ZIP	Proteínas con homeodominio y cremallera de leucina.
HEN1	<i>Hua enhancer</i>
HST	<i>Hasty</i>
IAA	Ácido 3-indol acético
IPT	Isopentenil transferasa
LCR	<i>Leaf curling responsiveness</i>
LEC	<i>Leafy-cotyledon</i>
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MIR	Gen del microRNA
miRNA	microRNA
NAA	Ácido 1-naftalenacético
NAC	Dominio conservado de los factores transcripcionales NAM, ATAF y CUC
PHB	<i>Phabulosa</i>
PIN	<i>PIN-formed</i>
qRT-PCR	Retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa
RAM	Meristemo apical de la raíz
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RLD1	<i>Rolled leaf 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	Meristemo apical del brote
siRNA	RNA pequeño de interferencia
snRNA	RNA pequeño nuclear
STM	<i>Shoot meristemless</i>
SPL, SBP	Factores transcripcionales <i>Squamosa-promotor binding protein-like</i>
sRNAs	RNAs pequeños
ssRNA	RNA de cadena sencilla
TA	Temperatura ambiente
ta-siRNA	RNA pequeño de interferencia de acción en trans
tasiR-ARFs	tasiRNAs cuyo blanco son los ARFs
TIR1	<i>Transport inhibitor response protein 1</i>
t-RNA	RNA de transferencia

VS	Variedad sintética
WOX	Gen con caja homeótica (<i>homeobox</i>) relacionado a <i>Wuschel</i>
WUS	<i>Wuschel</i>
YUC	<i>Yucca</i>

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1. Regeneración en las plantas

La regeneración es la capacidad de los organismos multicelulares de desarrollar o reemplazar nuevas células, tejidos o incluso órganos completos después de un daño (Birnbaum & Alvarado, 2008). Cada especie posee diferentes capacidades regenerativas y cada órgano del mismo organismo puede responder de forma diferente durante la regeneración. Los animales presentan limitadas capacidades regenerativas. En contraste, las plantas muestran una elevada capacidad regenerativa que es dependiente de ciertos tejidos o tipos celulares. Además, existe una restricción espacio-temporal de este proceso que correlaciona con la localización de las células troncales y meristemáticas (Perez-García & Moreno-Risueno, 2018).

En plantas, la regeneración es muy relevante debido a su condición de organismos sésiles, permitiéndoles contender con las adversidades bióticas y abióticas que pueden comprometer su integridad corporal (Lup *et al.*, 2016). De esta forma, además del desarrollo embrionario, las plantas continúan desarrollándose durante la mayor parte de su ciclo de vida al crear nuevos órganos laterales como hojas, tallos, flores y raíces. La regeneración en las plantas involucra la reparación de un tejido, la formación de un nuevo órgano o de un individuo completo de forma natural o mediante el cultivo *in vitro*.

2. Tipos de regeneración

a. Reconstrucción de meristemas y reparación de tejidos

Las plantas poseen dos tipos de meristemas apicales denominados meristemo apical del brote (*shoot apical meristem*, SAM) y de la raíz (*root apical meristem*, RAM) (Fig. 1). Estos y otros meristemas son los responsables de la reparación del tejido después de un daño. Cuando la zona central del SAM es eliminada, las células de la zona periférica reconstruyen el meristemo funcional (Reinhardt *et al.*, 2003). De la misma forma, cuando parte del RAM es removido, las células que permanecen llevan a cabo divisiones celulares adicionales y reconstruyen un meristemo completo (Sena *et al.*, 2009).

En situaciones extremas, al perder los meristemas apicales, se potencializa el desarrollo de los órganos laterales. Cuando las plantas pierden todo el SAM, los brotes axilares comienzan a crecer

(Shimizu-Sato & Mori, 2001). De forma similar, al eliminar el RAM se forman nuevas raíces laterales o adventicias (Aloni *et al.*, 2006; Bellini *et al.*, 2014).

Otras formas de regeneración incluyen la reparación de tejidos después de incisiones parciales (Asahina *et al.*, 2011) y reconexión vascular durante los injertos (Melnik *et al.*, 2015).

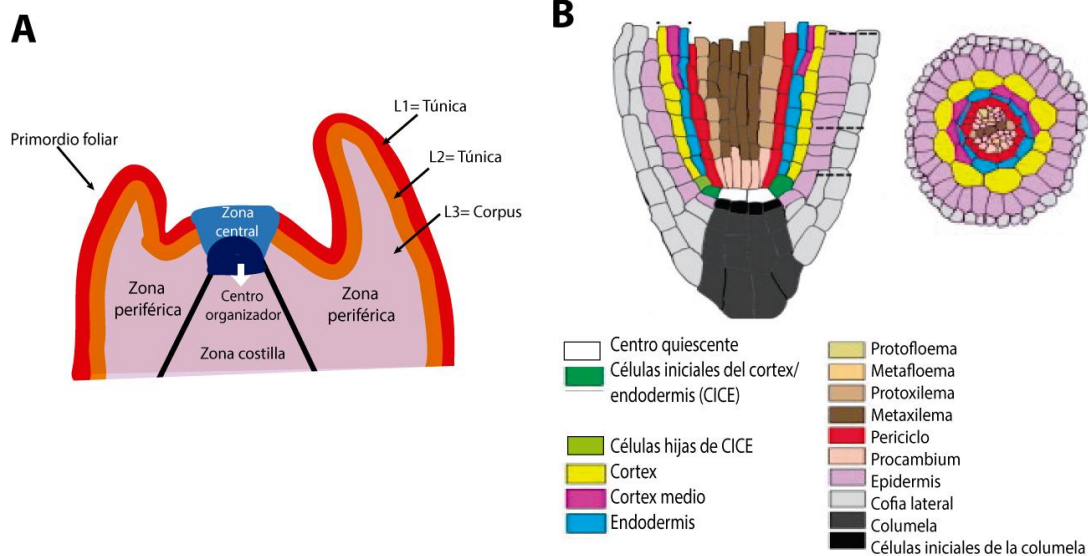


Fig.1 Tipos de meristemas apicales en las plantas. A. Meristemo apical del brote (SAM). El SAM es una estructura altamente organizada dividida en diferentes zonas y capas. La zona central mantiene la población de células troncales. En la zona periférica se inicia el crecimiento de los primordios de órganos. En la capa denominada túnica se encuentran células que se dividen anticlinalmente. B. Meristemo apical de la raíz (RAM). Sección longitudinal del RAM de *A. thaliana*. El centro quiescente (CQ) está compuesto de escasas células mitóticamente inactivas (cuatro o cinco células en la raíz primaria joven). Alrededor del CQ se encuentran células iniciales y sus células hijas derivadas. Modificado de Pauluzzi *et al.*, 2012

b. Organogénesis

Un modo de regeneración que se presenta tanto en la naturaleza, como en condiciones *in vitro*, es la organogénesis. De forma natural, después del corte de una parte de la planta se pueden generar nuevos órganos (Fig. 2). Por ejemplo, al separar una hoja de diversas plantas crasuláceas, se pueden formar nuevas raíces y brotes. En plantas bulbosas, como las del género *Lilium*, las escamas de los bulbos pueden regenerar brotes y raíces del sitio de corte (Hartmann *et al.*, 2010). Esta capacidad regenerativa natural de las plantas puede ser incrementada por la aplicación exógena de hormonas en el cultivo *in vitro*. Dependiendo de la especie, el balance de auxinas y citocininas determina el destino del órgano regenerativo. En muchas especies vegetales, entre ellas tabaco y *Arabidopsis*

thailiana (*Arabidopsis*), una relación elevada de auxinas respecto a las citocininas promueve la formación de raíces. De forma inversa, una proporción menor de auxinas respecto a las citocininas promueve la regeneración de brotes (Skoog and Miller, 1957).

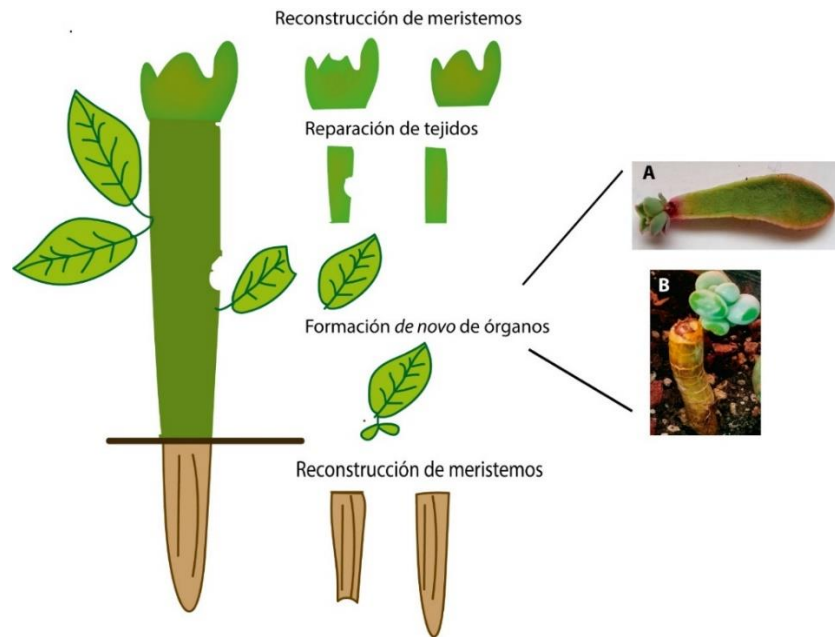


Fig.2 Tipos de regeneración en las plantas. Ejemplo de organogénesis a partir de una hoja de *Echeveria chazaroi* [A] y de un tallo de *Pachyphytum oviferum* [B].

c. Embriogénesis somática

Las plantas también se pueden regenerar a través de la embriogénesis somática (ES), donde células somáticas desarrollan estructuras similares a embriones cigóticos. Ambos procesos ocurren directamente del tejido parental o indirectamente mediante la formación de una masa celular conocida como callo (Ikeuchi *et al.*, 2016) (**Fig. 3**). La ES es un proceso que involucra diversos eventos como la desdiferenciación y activación celular, la reprogramación fisiológica, metabólica y genética del tejido explante deriva en un programa embrionario (Jakubekova *et al.*, 2011).

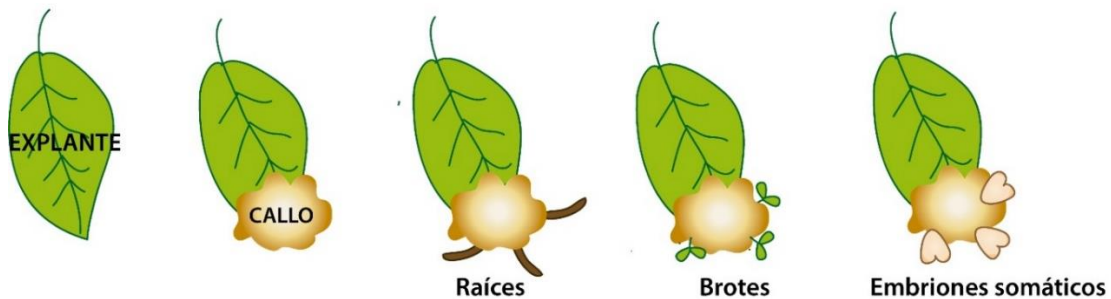


Fig.3. Durante el cultivo *in vitro* a partir de un explante, dependiendo de los fitoreguladores utilizados, se forma una masa celular conocida como callo que puede originar raíces, brotes o embriones somáticos.

3. Origen celular de la regeneración

Las plantas poseen al menos dos estrategias celulares para comenzar el proceso de regeneración. La primera es a través de la reactivación de células relativamente no diferenciadas y la otra es mediante la reprogramación de células somáticas diferenciadas. En ambos casos, la regeneración recae en la plasticidad celular, que es la habilidad de reespecificar el destino celular. Las células de las plantas en estado juvenil o inmaduro poseen un alto potencial regenerativo (Ikeuchi *et al.*, 2016).

Durante el desarrollo post-embrionario, la mayoría de las células llegan a diferenciarse y sólo escasos tipos celulares permanecen competentes para la formación de tejidos y órganos. Las raíces, por ejemplo, tienen un cilindro de células del periciclo situado entre la endodermis y la estela (**Fig. 1B**), que tienen la capacidad de formar raíces laterales. Estas células, junto con las células del parénquima o del procambium son fuente de la regeneración de las raíces o incluso de brotes o embriones somáticos (Che *et al.*, 2007; Atta *et al.*, 2009). La regeneración de brotes también puede lograrse a partir de células epidermicas de hojas maduras o de células del córtex (Ikeuchi *et al.*, 2016).

4. Bases moleculares de la regeneración

a. Formación del callo

La incubación de explantes de *Arabidopsis* en un medio rico en auxinas promueve la inducción de callos que asemejan los meristemos de la raíz lateral. En *Arabidopsis* la formación de callos no es un proceso de reprogramación a un estado no-diferenciado, sino que las células se diferencian a un estado semejante a las células del periciclo, independientemente del explante utilizado. Posteriormente, estas células son competentes para regenerar brotes después de que se transfieren al medio con citocininas. (Che *et al.*, 2007; Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010; Duclercq *et al.*, 2011). Durante este proceso se requiere una respuesta transcripcional mediada por los factores de transcripción PLETHORA3 (AtPLT3), AtPLT5, AtPLT7 que a su vez promueven la activación de los reguladores del meristemo de la raíz AtPLT1 y AtPLT2 para establecer un callo tipo de meristemo radicular. La expresión de AtPLT3, AtPLT5 y AtPLT7 también induce a los factores de transcripción tipo NAC (familia NAM, ATAF y CUC), CUP SHAPED COTYLEDON1 (AtCUC1) y AtCUC2, cuya presencia se asocia a la pluripotencia celular (Kareem *et al.*, 2015). Por ejemplo, un escaso número de células progenitoras en el callo, usando como explante raíces, inician el desarrollo de nuevos meristemos apicales a través de la expresión de AtCUC2, AtPIN-FORMED1 (PIN1), SHOOT MERISTEMLESS (AtSTM), REVOLUTA (AtREV) y CLAVATA 3 (AtCLV3) (Gordon *et al.*, 2007). Otros elementos que participan durante este proceso se muestran en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Factores transcripcionales que participan durante la formación del callo y/o durante la regeneración *in vitro* (Ikeuchi et al., 2019).

Gen	Descripción del gen	Proceso	Función en regeneración				Referencia
			RAM	SAM	Callo	ES	
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN							
<i>AtWOX11</i>	<i>Gen con caja homeótica (homeobox) relacionado a Wuschel 11</i>	Competencia celular					Hu, 2016 Liu et al, 2018
<i>AtWOX12</i>	<i>Gen con caja homeótica (homeobox) relacionado a Wuschel 12</i>	Competencia celular					Liu et al., 2014 Hu, 2016
<i>AtWOX5</i>	<i>Gen con caja homeótica (homeobox) relacionado a Wuschel 5</i>	Marcador del centro quiescente. Restauración del meristemo					Su et al., 2015 Hu, 2016
<i>AtWUS</i>	<i>WUSCHEL</i>	Formación del SAM					Gallois et al., 2004
<i>AtGL15</i>	<i>AGAMOUS-LIKE (MADS BOX)</i>	Formación de meristemos					Harding et al., 2003
<i>AtSTM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS (KNOX)</i>	Formación del SAM					Shi et al., 2016
<i>AtCUC1</i>	<i>CUP SHAPED-COTYLEDON 1 (DOMINIO NAC)</i>	Formación del SAM					Daimon et al., 2003
<i>AtCUC2</i>	<i>CUP SHAPED-COTYLEDON 1 (DOMINIO NAC)</i>	Formación del SAM					Daimon et al., 2003
<i>AtNAC1</i>	Proteína con dominio NAC 1	Regeneración de la raíz					Chen et al., 2016
<i>AtWIND1</i>	<i>WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (AP2/ERF)</i>	Reguladores de la reprogramación celular					Iwase et al., 2017
<i>AtWIND2</i>	<i>WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 2 (AP2/ERF)</i>	Reguladores de la reprogramación celular					Iwase et al., 2011
<i>AtPLT1/2</i>	<i>PLETHORA 1/2 (AP2/ERF)</i>	Desarrollo de raíz. Embriogénesis					Sena et al., 2009; Kareem et al., 2015
<i>AtPLT3</i>	<i>PLETHORA 3 (AP2/ERF)</i>	Inducción del callo. Formación de meristemos					Kareem et al., 2015
<i>AtPLT5</i>	<i>PLETHORA 3 (AP2/ERF)</i>	Inducción del callo, Formación de meristemos					Kareem et al., 2015
<i>AtBBM</i>	<i>BABY BOOM (AP2/ERF)</i>	Proliferación celular.					Horstman et al., 2017
<i>AtLEC1</i>	<i>LEAFY-COTYLEDON 1 (AP2/B3)</i>	Desarrollo embrionario cigótico tardío.					Horstman et al., 2017
<i>AtLEC2</i>	<i>LEAFY-COTYLEDON 2 (AP2/B3)</i>	Desarrollo embrionario cigótico tardío.					Stone et al., 2008
<i>AtARF5</i>	<i>FACTOR DE RESPUESTA A AUXINA 5</i>	Formación y reconstrucción del RAM					Efroni et al., 2005
<i>AtARF7</i>	<i>FACTOR DE RESPUESTA A AUXINA 7</i>	Iniciación RAM y callo					Lee et al., 2017
<i>AArRF19</i>	<i>FACTOR DE RESPUESTA A AUXINA 19</i>	Iniciación RAM y callo					Lee et al., 2017
<i>AtARF3</i>	<i>FACTOR DE RESPUESTA A AUXINA 3</i>	Ayuda a la especificación del SAM					Cheng et al., 2013
<i>AtIAA30</i>	<i>INDOLEACETIC ACID-INDUCED PROTEIN 30</i>	Modula biosíntesis de auxinas					Zheng et al., 2009
<i>AtARR1</i>	<i>REGULADOR DE RESPUESTA DE ARABIDOPSIS 1</i>	Formación de meristemos y de callo					Meng et al, 2017 Zubo et al., 2017

		inducido por citocininas. Regula a WUS					
AtARR10	<i>REGULADOR DE RESPUESTA DE ARABIDOPSIS 10</i>	Regula a WUS. Bloquea la localización de auxinas en los dominios de citocininas					Meng <i>et al.</i> , 2017 Zubo <i>et al.</i> , 2017
AtPHB AtPHV AtREV	<i>PHABULOSA</i> <i>PHAVOLUTA</i> <i>REVOLUTA (HDZIP III)</i>	Inducción de WUS dependiente de citocininas					Zhang <i>et al.</i> , 2017
AtSCR	<i>SCARECROW</i>	Competencia celular para la formación del SAM					Kim <i>et al.</i> , 2018
AtSHR	<i>SHORT ROOT</i>	Regula la formación del RAM					Sugimoto <i>et al.</i> , 2010
AtESR1	<i>ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1</i>	Regulador clave de la formación del SAM					Iwase <i>et al.</i> , 2017
AtE2FA	<i>FACTOR A DE UNIÓN AL PROMOTOR E2</i>	Promueve la proliferación celular					Liu <i>et al.</i> , 2018

Tabla 2. Reguladores epigenéticos y otros elementos que participan durante la formación del callo y/o la regeneración *in vitro*

Gen	Descripción del gen	Proceso	Función en regeneración				Referencia
			RAM	SAM	Callo	ES	
REGULADOR EPIGENETICO							
AtHAG1	<i>ACETILTRANSFERASA DE HISTONAS DE LA SUPERFAMILIA GNAT/MYST 1</i>	Competencia del SAM					Kim <i>et al.</i> , 2018
AtJMJ30	<i>JUMONJI 30</i> (demetilasa de histonas)	Crecimiento del callo					Lee <i>et al.</i> , 2018
AtMET1/DDM2	<i>METILTRANSFERASA DE DNA</i>	Expresión de WUS					Liu <i>et al.</i> , 2017
AtATXR2	<i>ARABIDOPSIS TRITHORAX RELATED 2</i>	Formación del callo					Lee <i>et al.</i> , 2017
OTROS							
AtYUC1	<i>YUCCA 1</i>	Síntesis de auxinas					Chen <i>et al.</i> , 2016
AtYUC2	<i>YUCCA 2</i>	Síntesis de auxinas					Chen <i>et al.</i> , 2016
AtYUC4	<i>YUCCA 4</i>	Síntesis de auxinas					Chen <i>et al.</i> , 2016 Meng <i>et al.</i> , 2017
AtYUC10	<i>YUCCA 10</i>	Síntesis de auxinas					Stone <i>et al.</i> , 2008
AtIPT5	<i>ISOPENTENIL TRANSFERASA 5</i>	Síntesis de citocininas					Cheng <i>et al.</i> , 2013
AtIPT3	<i>ISOPENTENIL TRANSFERASA 3</i>	Síntesis de citocininas					Cheng <i>et al.</i> , 2013
AtPME2	<i>METILTRANSFERASA DE PECTINA 2</i>	Modificador de la pared celular					Xu <i>et al.</i> , 2018
AtCYCD3;1 AtCYCD3;2 AtCYCD3;3	<i>CICLINA D3:1/2/3</i>	Entrada al ciclo celular					Ikeuchi <i>et al.</i> , 2017
AtPIN1/2/3.	<i>PIN-FORMED1/2/3</i>	Transporte de auxina					Bustillo <i>et al.</i> , 2017

b. Organogénesis *de novo* del brote

La percepción y señalización de citocininas permiten la formación del SAM a partir de células competentes del explante. En este proceso está involucrado el receptor de citocininas AHK4/WOL (*Histidin Kinasa de Arabidopsis 4/WOL*) y el componente de señalización ARR1 (REGULADOR DE RESPUESTA DE ARABIDOPSIS 1). La sobreexpresión de *AtARR1* resulta en la generación de brotes en el callo en la ausencia de citocininas (Higuchi *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2001). La función de las auxinas durante la regeneración del brote está menos establecida, pero los genes *YUCCA (AtYUC) 1 y 4* son inducidos en el medio rico en citocininas y son necesarios para la formación *de novo* del brote.

Durante la organogénesis del brote se requiere una distribución de dominios de células con alta sensibilidad a citocininas o auxinas (Cheng *et al.*, 2017). De esta forma se crean patrones de respuesta a éstas hormonas mutuamente exclusivas. Por ejemplo, *AtARF3 (Factor de respuesta a Auxinas 3)* es activado transcripcionalmente por las auxinas y la proteína codificada por este gen, que actúa como un represor, reprime a *AtIPT5 (Isopentenil Transferasa 5)* correspondiente a una enzima involucrada en la biosíntesis de citocininas (Cheng *et al.*, 2017). De forma inversa, ARR1/10/12 suprimen directamente la expresión de *AtYUC4* para prevenir la biosíntesis de auxinas en los dominios de respuesta a citocininas.

Un evento clave durante la formación del SAM es la activación transcripcional de *WUSCHEL (AtWUS)*. Las citocininas activan la expresión de *WUS* y ARR1/10/12 lo sobrerregulan (Wang *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017). A pesar de esto, la señalización de citocininas no es suficiente para inducir la expresión de *WUS*. En callos de *Arabidopsis*, solamente escasas células comienzan a expresar *WUS*, a pesar de la activación de la respuesta generalizada a citocininas en el tejido (Zhang *et al.*, 2017). Los factores de transcripción de la familia HD-ZIP III (CLASS III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER): *PHABULOSA (AtPHB)*, *PHAVOLUTA (AtPHV)* y *REVOLUTA (AtREV)*, en conjunción con las proteínas ARR tipo B (REGULADORES DE RESPUESTA DE ARABIDOPSIS), son reguladores adicionales para la activación de la expresión de *WUS* y la formación del brote (Zhang *et al.*, 2017). Estos factores también regulan al gen clave para la formación del brote *AtSTM (SHOOT MERISTEMLESS)* (Shi *et al.*, 2016).

El daño de un tejido de la planta por un corte también promueve la regeneración de brotes gracias a la sobreexpresión de *AtWIND1* (familia de transcripción AP2/ERF). *AtWIND1* regula este proceso mediante la activación transcripcional de *AtESR1/2 (ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1)*, dos reguladores clave para la formación del brote. La expresión ectópica de *ESR1/2* es suficiente para disparar la formación *de novo* del SAM (Iwase *et al.*, 2001) (**Fig. 4**).

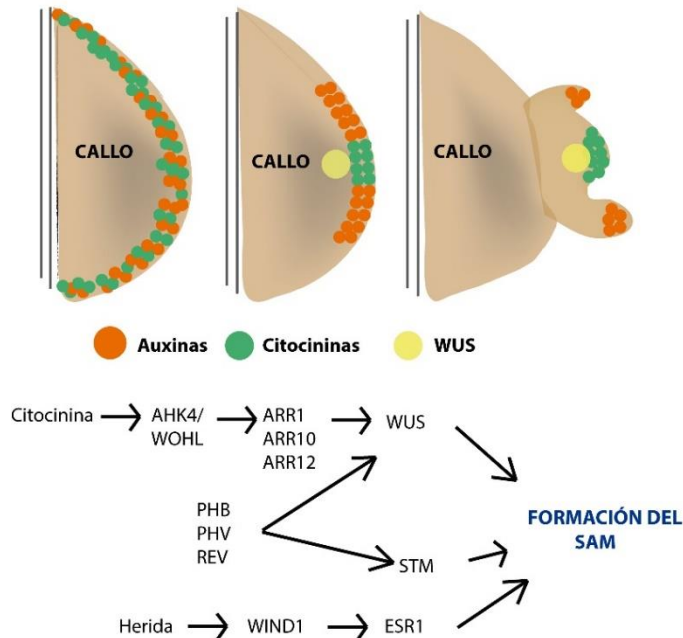


Fig.4. Bases moleculares de la regeneración de novo del brote. Los callos presentan una amplia gama de células con respuesta a auxinas y citocininas que posteriormente se localizan en dominios separados. *AtWUS* se expresa en células localizadas en la vecindad de la respuesta a auxinas. Las citocininas promueven la formación del SAM mediante la activación de *AtWUS* mediado por *ARR* y HD-ZIP III. Las heridas en el tejido también promueven la formación del SAM mediante la activación de *AtESR1* mediado por *AtWIND1* (Ikeuchi *et al.*, 2019).

c. Organogénesis de novo de la raíz

Algunas plantas regeneran de forma natural raíces después de un corte y en este proceso varias hormonas como auxinas y citocininas están involucradas. Cuando las hojas de *Arabidopsis* son removidas, hay una acumulación de auxinas en el sitio de corte, la cual induce la expresión de dos factores de transcripción tipo homeobox *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN11* (*AtWOX11*) y *AtWOX12* en el procambium y en las células del parénquima. La expresión de estos genes promueve la conversión del destino celular del procambium de la hoja o células parénquimáticas en células fundadoras de la raíz. Además *AtWOX11/12* participan en el establecimiento de novo del meristemo radicular que involucra la expresión de *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN16* (*AtLBD16*), *AtLBD29* y *AtWOX5* (Liu *et al.*, 2014). *AtLBDs* y *AtWOX5* también están involucradas en la formación de las raíces laterales, donde la acumulación local de auxinas promueve la formación de nuevos meristemas de la raíz de las células del periciclo. (Goh *et al.*, 2012; Ditengou *et al.*, 2008). Además, la inducción de *AtWOX11* requiere elementos de la respuesta a auxinas (*auxin response elements*; AuxREs) en su promotor, por lo que los ARF también pueden estar involucrados (Liu *et al.*, 2014).

d. Regeneración por Embriogénesis Somática (ES)

En *Daucus carota* y *Arabidopsis thaliana* la ES puede ser inducida cuando las células somáticas son expuestas a diversos tipos de estrés como presión osmótica, salinidad o altas temperaturas (Kiyosue *et al.*, 1989; Kamada *et al.*, 1994; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003). De la misma forma, muchas plantas pueden formar ES si se emplea un cultivo con auxinas y después si se transfieren en un medio libre de ellas (Ikeuchi *et al.* 2016). La auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) es el inductor más efectivo para este proceso, posiblemente porque dispara las respuestas de estrés y de auxinas simultáneamente promoviendo la división celular (Gliwicka *et al.*, 2013). De esta forma, los altos niveles de auxinas en el medio de cultivo promueven la proliferación celular y la formación del callo embriogénico (CE). Un elemento fisiológico clave durante el cambio a un medio de cultivo libre de auxinas, es el establecimiento *de novo* de gradientes de auxinas en el callo. Esto inicia un programa de desarrollo similar a la embriogénesis cigótica y también es guiado por la distribución polarizada de auxinas. Estos gradientes de auxinas provocan la localización de *WUS* a dominios de bajos niveles de auxinas, marcando la posición del futuro SAM (Su *et al.*, 2009).

Los reguladores clave de la ES y del desarrollo de la semilla como *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON1*), *AtLEC2*, *AtFUS3* (*FUSCA3*) y *AtAGL15* (*AGAMOUS-LIKE15*), son inducidos durante la ES y controlan respuestas fisiológicas corriente abajo para promover el desarrollo embriogénico (Braybrook and Harada, 2008). Una de éstas, es el refinamiento de la producción y señalización de auxinas. *AtLEC1* induce al gen *AtYUC10* que codifica a una enzima de biosíntesis de auxinas. *LEC2* activa a los genes *AtYUC2* y *AtYUC4* (Junker *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2008). *AtLEC2* y *AtAGL15* promueven la expresión de *INDOLE ACETIC ACID INDUCIBLE 30* (*AtIAA30*), un regulador negativo de la señalización de auxinas mediada por los ARFs, para mediar la señalización de esta hormona (Braybrook *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2009). En estadios tempranos *AtWUS* y *AtWOX5* (*WUSCHEL*-related *Homeobox*) se expresan de forma sobrelapada en un subconjunto de células cerca del máximo de auxinas. Gradualmente, los dominios de *AtWUS* y *AtWOX5* se separarán para especificar el inicio del SAM y el RAM respectivamente (Su *et al.*, 2009) (Fig. 5).

Otros estudios también sugieren que un bajo nivel de giberelinas (GA) relativo al ácido abscísico (ABA) favorece la embriogénesis; el ABA favorece el desarrollo de los embriones, mientras que el GA favorece la germinación. Consistente con esto, *AtAGL15* regula positivamente a *AtGA2ox6* que codifica para una enzima degradadora de GA y negativamente a *AtGA3ox2*, que participa en la biosíntesis de GA, provocando bajos niveles de GA_{1,4} (Wang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009). Además, *AtFUS3* desregula la biosíntesis de GA reprimiendo a *AtGA3ox1* y *AtGA3ox2* e induciendo la síntesis de ABA (Curaba *et al.*, 2004).

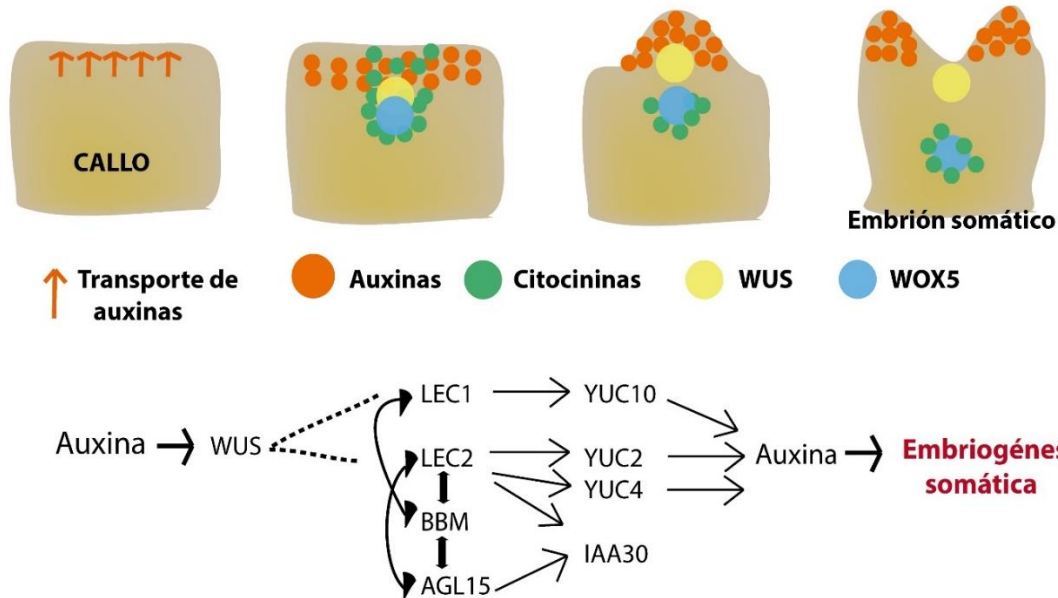


Fig.5. Bases moleculares de la formación de embriones somáticos. En el medio de cultivo libre de auxinas exógenas, el transporte polar de auxinas endógenas promueve la formación de un máximo de auxinas cerca de la superficie del callo. Al principio los dominios de citocininas y auxinas se sobrelapan y *AtWUS* y *AtWOX5* se localizan de forma adyacente. Eventualmente *AtWUS* y *AtWOX5* se localizan en los polos opuestos que originarán la bipolaridad del embrión somático. Esta disposición está relacionada íntimamente con la señal hormonal en regiones específicas que induce la expresión de estos genes. La auxina activa la expresión de *WUS*, requerido para la inducción de los reguladores embrionarios *AtLEC1* y *AtLEC2*. Estos factores, junto con *Babyboom (BBM)* y *AGL15* forman una red regulatoria que promueve la ES. *AtLEC2* activa la expresión de *AtIAA30* y *AtAGL15*. *IAA30* es una proteína de señalización de auxinas que altera la respuesta a auxinas o causa un incremento en los niveles de auxinas libres, que permite la iniciación de la ES. Esta proteína también está enriquecida en el centro quiescente del RAM de *Arabidopsis*, sugiriendo que este tipo de células meristemáticas tienen la competencia para llevar a cabo la ES. Además, la expresión ectópica de *AtAGL15*, tras el tratamiento de auxinas, incrementa la competencia del SAM del explante para llevar a cabo la ES. En suma, *AtLEC2* puede promover el desarrollo de embriones somáticos afectando la inducción y la competencia de los tejidos para responder a la señalización de auxinas (Información de Braybrook *et al.*, 2006; Ikeuchi *et al.*, 2019).

5. Las auxinas y su función en el desarrollo de las plantas

La auxina es una hormona vegetal esencial para el desarrollo de las plantas. El término auxina se refiere a una clase de pequeñas moléculas que tienen la capacidad de inducir el crecimiento. En plantas, el crecimiento se define como un incremento irreversible del tamaño, que es logrado por el alargamiento de las células.

Homeostasis de la auxina: biosíntesis, conjugación y degradación

El IAA, la auxina más estudiada, es sintetizado principalmente a partir del L-triptofano (Trp) en la vía del índole-3-piruvato (IPA). En *Arabidopsis* el gen *TIR2* (*SHADE AVOIDANCE 3 (SAV3)/WEAK ETHYLENE INSENSITIVE 8 (WEI8)/TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 2*) codifica a TAA1 que cataliza la conversión de Trp en IPA. A su vez, las proteínas YUC catalizan la conversión de IPA a IAA de una manera dependiente de NADPH (Kasahara *et al.*, 2015).

La regulación de los niveles de auxinas por la síntesis *de novo* es un mecanismo homeostático importante y los niveles de IAA pueden ser atenuados por conjugación (principalmente conjugados a aminoácidos y azúcares) y degradación. Los genes involucrados en la conjugación de IAA incluyen a los miembros de la familia de genes inducibles por auxinas *GH3* (*Gretchen Hagen 3*), por ejemplo el IAA puede ser conjugado y almacenado en el desarrollo de la semilla y usado posteriormente durante la germinación.

Por su parte, durante la degradación del IAA, los productos que se forman son el 2-oxoindol-3-ácido acético (oxIAA) y la oxIAA-glucosa (oxIAA-Glc), sin embargo los genes involucrados en el catabolismo de las auxinas no han sido identificados (Ljung, 2013).

Transporte de auxinas.

La auxina es un ácido orgánico débil que consiste en una estructura de anillo indol acoplado a una cadena lateral con un grupo carboxilo. El grupo carboxilo puede ser protonado en un pH bajo, lo que provoca que el IAA sea menos polar. En esta forma, la auxina puede difundir cruzando la membrana de las células, pero de forma desprotonada o cargada negativamente es demasiado polar para poder difundir. El pH varía entre los diferentes compartimentos celulares, en el fluido apoplástico de la pared celular y las vacuolas el pH es de ~5.0-5.5 y en el citosol de ~7.0. Por tanto en el apoplasto y en las vacuolas el IAA puede difundir en las membranas, mientras que en el citosol el IAA queda atrapado en la célula y no puede salir sin la ayuda de transportadores de eflujo. En *Arabidopsis* se han identificado dos familias de acarreadores de eflujo del IAA: la familia PIN y la familia ABCB. También existen transportadores de influjo, como los de la familia AUX1/LAX que son importantes para incrementar el transporte de IAA en tipos celulares específicos. Los transportadores de influjo y eflujo de auxinas en la membrana plasmática permiten el transporte dentro y fuera de la célula (también llamado transporte polar de auxinas) lo que crea los gradientes de auxinas esenciales durante el desarrollo (Ljung, 2013).

Señalización

La señalización de la auxina regula la respuesta celular a los diferentes niveles de auxina que son formados por una combinación del metabolismo y transporte. La familia de receptores nucleares de auxina TIR/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT) son proteínas F-BOX que junto con otras proteínas (ASK1, CUL1, RBX) forman el complejo de ubiquitina ligasa SCF^{TIR1}. TIR1/AFBs une al IAA, formando un complejo coreceptor con las proteínas represoras Aux/IAA, que son reguladores negativos de la señalización de auxinas. A bajos niveles de auxinas, las proteínas Aux/IAA pueden unirse a las proteínas ARF, un grupo de factores de transcripción que regulan a los genes de respuesta a auxinas. Sin embargo a altos niveles de auxina, la formación del complejo (TIR1/AFB)-IAA-(Aux/IAA) permite la degradación de las proteínas IAA vía proteosoma.

Otra vía de señalización de auxinas independiente del proteosoma involucra al receptor ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN 1) que se encuentra localizado en el retículo endoplasmático y la pared celular y juega un importante papel durante la división celular y la elongación. Este receptor es parte de la respuesta rápida a las auxinas. Cuando la auxina es percibida, en la cara externa de la membrana plasmática por ABP1, provoca la activación de la bomba de protones (H⁺ ATPase) y los canales de potasio. La activación de la bomba de protones hiperpolariza la membrana plasmática y acidifica la matriz extracelular, lo que permite que enzimas, como las expansinas, modifiquen la pared celular volviéndola más laxa. A su vez, el incremento de K⁺ intracelular contribuye a la entrada de agua que es necesario para la expansión celular. ABP1 también está involucrado en la transición de G1/S y G2/M del ciclo celular. La expresión de las ciclinas tipo D, como las CYCD3.1 que son reguladoras positivas de la transición G1/S, se reducen rápidamente después de la inactivación de ABP1. Por otra parte, ABP1 también se ha asociado a la expresión de genes de respuesta a auxinas como los genes que codifican a las proteínas Aux/IAAs (Tomas *et al.*, 2010).

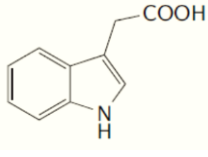
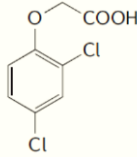
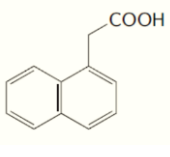
De las auxinas sintéticas, el 2,4-D es de los compuestos más utilizados en cultivo *in vitro*. El 2,4-D es un herbicida selecto que provoca un crecimiento descontrolado de plantas susceptibles, principalmente dicotiledóneas, mimetizando los efectos de las auxinas, sin embargo en cultivos como el maíz y arroz no tiene dichos efectos negativos (posiblemente a la diferencia en su sistema vascular) (Quastel, 1950).

En cultivo de tejidos, el 2,4-D es relevante porque es estructural y funcionalmente análogo a la auxina natural IAA. El 2,4-D entra a la célula mediante AUX1, un transportador de influjo y puede ser percibido por el receptor nuclear TIR1/AFB1-3 (Calderon-Villalobos *et al.* 2010). Esto promueve la degradación de las proteínas AUX/IAA que liberan a la familia de ARFs y así permite activar la regulación de genes de respuesta a auxinas como los involucrados en el ciclo celular (Dharmasiri *et al.* 2006). A diferencia de IAA, el 2,4-D no es un buen sustrato por el receptor AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1) y es pobremente transportado por los transportadores de eflujo (Song *et al.*, 2013) (**Tabla 3**).

Sin embargo, el metabolismo del 2,4-D en plantas comparte características comunes con el metabolismo de las auxinas endógenas y se basa en tres mecanismos: la degradación o modificación química de la cadena del ácido acético, la hidroxilación del anillo aromático y la conjugación de la

molécula de 2,4-D principalmente con aminoácidos y glucosa formando 2,4-D-acido glutámico o aspártico (2,4-D-Glu, 2,4-D-Asp) (Feung *et al.*, 1978, Eyer *et al.*, 2016). El metabolismo del 2,4-D se ha detectado también en callos (Davidonis *et al.*, 1980).

Tabla 3. Propiedades de la auxina natural IAA y las auxinas sintéticas (Teale *et al.*, 2006)

Tipo de auxina	Natural	Sintética	
Estructura química	<p>IAA</p> 	<p>2,4-D</p> 	<p>NAA</p> 
Afinidad a receptores			
Unión a TIR1 (K_d)	Alto	Bajo	Medio
Unión a ABP1 (K_d)	Medio	Bajo	Alto
Capacidad de transporte			
Acarreadores de influjo	Sí	Sí	No (por difusión)
Acarreadores de eflujo	Sí	No	Sí

6. El maíz como modelo

El maíz es uno de los cultivos más valorados a nivel mundial. La enorme adaptabilidad, elevado rendimiento como alimento y forraje, además de su uso como biocombustible, ha promovido su masiva producción. Para generar cultivos de alto rendimiento se han empleado técnicas tradicionales de mejora, sin embargo, actualmente el maíz cuenta con variedades transgénicas comercializadas (Hake, 2009). Además de lo anterior, el maíz ha sido una especie modelo en genética, ya que fue la primera planta en tener un mapa genético, inicialmente publicado por Emerson *et al.*, en 1935. Los elementos transponibles fueron descubiertos inicialmente en maíz, así como la organización nucleolar, los telómeros y la regulación epigenética, actualmente descritos como propiedades universales del genoma eucarionte (Bennetzen & Hake, 2009).

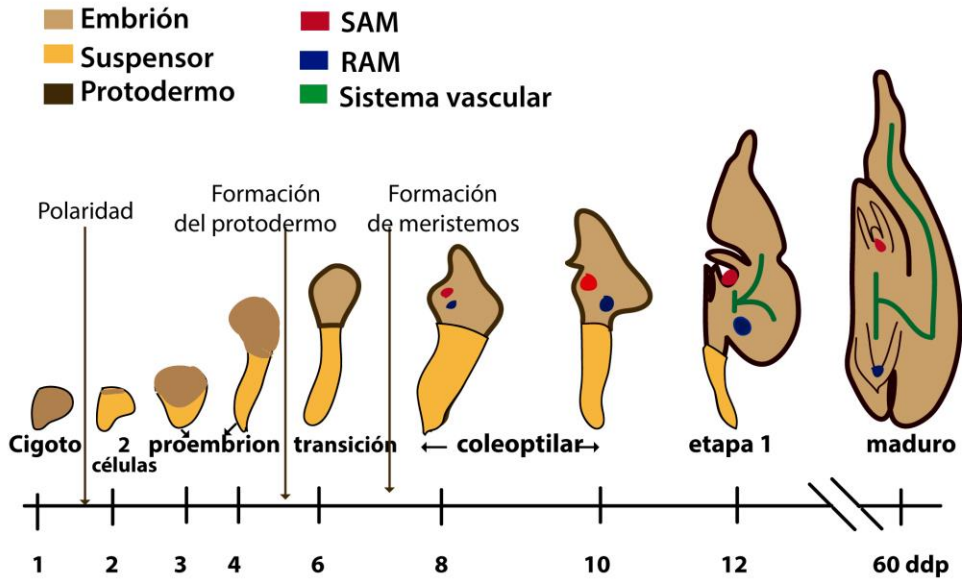
a. Embriogénesis cigótica de maíz

La embriogénesis cigótica inicia con la fertilización y la formación del embrión preservado en los tejidos maternos. En el maíz, este proceso se divide en diversas fases (Fig.6). Durante la primera etapa o etapa proembrionaria, el cigoto lleva a cabo la primera división celular asimétrica que origina una

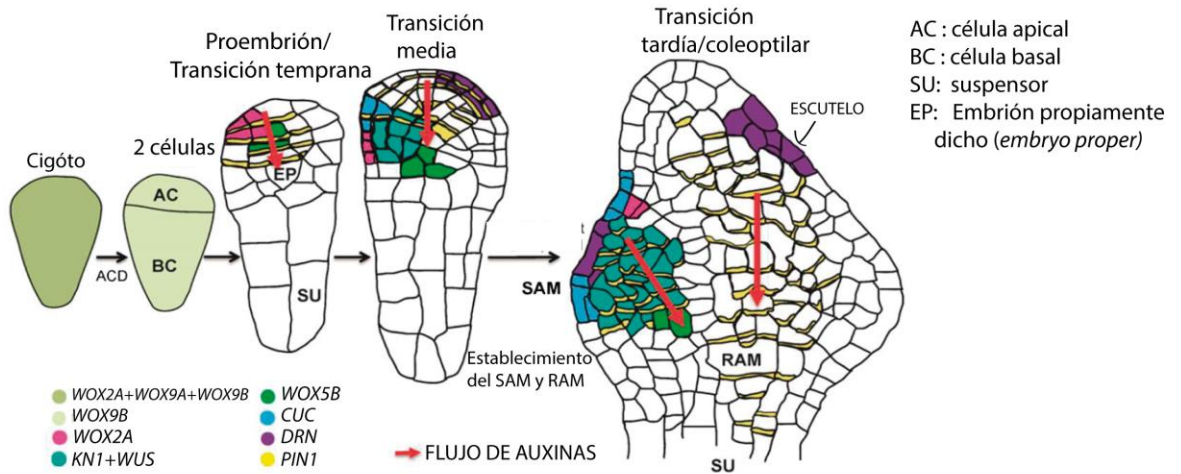
célula apical que formará el embrión y una célula basal que dará lugar al suspensor. La simetría radial del proembrión cambia a simetría bilateral en la etapa de transición, donde el embrión y el suspensor incrementan su tamaño debido a divisiones celulares. Esta etapa se caracteriza por la formación de una capa celular externa llamada protodermo. La etapa coleoptilar se caracteriza por la formación del SAM y el RAM, los cuales se forman entre los 7 y 9 días después de la polinización (ddp). Al final de esta etapa (10-15 dpp), el escutelo (cotiledón transformado en órgano absorbente, adosado al endosperma) se alarga apical, basal y lateralmente. Las etapas tardías de la embriogénesis se nombran de acuerdo al número de hojas (etapa de hoja 1-6). La última etapa es la maduración, donde se acumulan sustancias de reserva y se degrada el suspensor. El embrión se vuelve resistente a la desecación durante la maduración de la semilla (Vernoud *et al.*, 2005; Nardmann & Werr, 2009).

Entre los genes que marcan el destino celular durante la embriogénesis cigótica temprana de maíz, los transcritos de *ZmWOX2A* son detectados en el dominio apical del proembrión y posteriormente se confinan en la cara adaxial del embrión, donde el SAM emergerá. *ZmWOX5B* es activado en las células centrales de la base del embrión propiamente dicho en el embrión de 6 ddp, posteriormente *ZmWOX5B* se restringe en el centro quiescente, lo que marcará el inicio del meristemo de la raíz. *ZmKN1*, ortólogo de *AtSTM*, se activa en el proembrión y en la etapa de transición temprana y no solo se confina en el SAM (como en *Arabidopsis*) sino que su transcripción se extiende central y basalmente hacia los límites del embrión propiamente dicho y el suspensor. Por su parte *Dornröschen (DRN)* se expresa durante el cambio del proembrión a la etapa de transición temprana y su función se ha asociado a la señalización de auxinas durante la embriogénesis temprana y el desarrollo del escutelo. La expresión de *ZmCUC* en la etapa de transición temprana y junto con *ZmWUS1*, *ZmWOX5* y *DRN* contribuye a la simetría bilateral del embrión (Zimmerman & Werr, 2007; Zhao *et al.*, 2017).

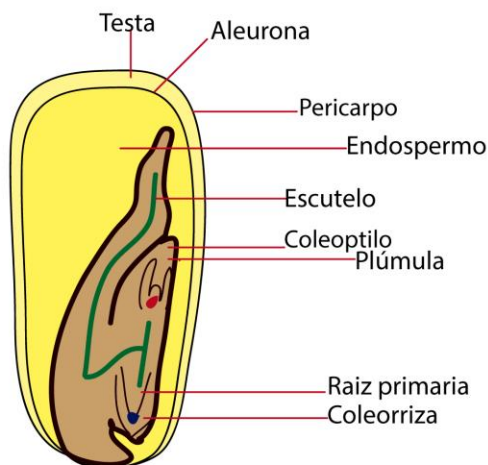
A



B



C



D

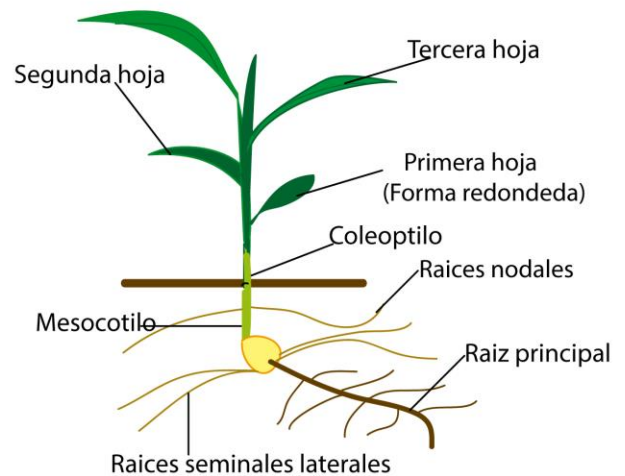


Fig.6. Desarrollo del embrión y la plántula del maíz. A. Se muestran las etapas de desarrollo del embrión en una escala de días después de la polinización (ddp). Esta información varía dependiendo del fondo genético y el ambiente. En colores se muestra el desarrollo de los principales tejidos o partes de la planta (Información de Vernoud *et al.*, 2005). B. Patrón de expresión de genes y flujo de auxinas que regulan la determinación del destino celular durante la embriogénesis temprana del maíz (Modificado de Zhao *et al.*, 2017). C. Partes de la semilla del maíz. D. Plántula germinada de maíz, se indican el nombre de las hojas y raíces que se desarrollan (Información de Kiesselbach, 1999; Iowa State University of Science and Technology, 1993)

b. Cultivo *in vitro* de maíz

Green & Phillips (1975) reportaron por primera vez la regeneración *in vitro* de maíz usando como explante embriones inmaduros. Posterior a este trabajo pionero, se han generado varios protocolos para el cultivo *in vitro* empleando diversos explantes: regiones nodales, hojas, anteras, panículas, protoplastos, meristemos del brote, embriones maduros e inmaduros. Algunos de estos trabajos se resumen en la **Tabla 4**.

El tipo de explante, el medio de cultivo, así como el fondo genético juegan un papel determinante para establecer los cultivos *in vitro*. Por esta razón, es importante analizar de forma particular las condiciones de crecimiento para explotar las herramientas del cultivo *in vitro* de maíz en la propagación clonal y la transformación genética (Rackshit *et al.*, 2010).

Tabla 4. Líneas de maíz empleadas para el cultivo *in vitro*

Línea de maíz	País	Explante para el cultivo <i>in vitro</i>	Proceso de regeneración	Referencia
Dan-San 91 King Hwang 13. Coe's stock 6	China	Antera (con microsporas en la etapa mononucleada)	Embiogénesis somática (ES)	Ting <i>et al.</i> , 1981
B73	EUA	Embrión inmaduro 12-14 dpp (1-2 mm)	ES, organogénesis del brote	Lowe <i>et al.</i> , 1985
CHI31, S615, S7.	Republica Checa	Segmentos basales de la lámina de la hoja de plántulas de 3-4 semanas de edad	ES	Conger <i>et al.</i> , 1987
A619, H99, LH38, LH39, MBS501, MS71, Oh43, U94 U98	EUA	Inflorescencia inmadura	ES	Pareddy & Petolini 1989
HE/89	Hungría	Protoplastos de callos obtenidos de embriones inmaduros de 1 mm de longitud	ES	Morocz <i>et al.</i> , 1990
DH5 x DH7 H99 x Fr16	EUA	Antera (con microsporas en la etapa uninucleada)	ES	Barloy & Beckert 1993
Tropical, subtropical	México	Embrión inmaduro (1.0-1.5 mm)	N/D	Bohorova <i>et al.</i> , 1995

LH 74xA 641, LH 262xLH252, LH 198xLH227, FR1064xFR1064xLH 1857 LH 176xLH 177	EUA	Meristemas del brote	ES	Sairam <i>et al.</i> , 2003
9046, C8605, 478, 8112, Mo17, Qj319, Su1	China	Embrión maduro (sección de la plúmula)	ES	Huang <i>et al.</i> , 2004
H99, LH198xH111, PHA, KHI, LI, L2, L4, L9, L9xL5	EUA	Nodo coleoptilar de plántulas de 7-10 días de germinación	Organogénesis del brote	Sidorov <i>et al.</i> , 2006
Hi-II, LH198xLH227, R23, B73	EUA	Embrión maduro dividido longitudinalmente	Organogénesis del brote	Al-Abed <i>et al.</i> , 2006
Pa91 · H99	EUA	Cotiledón	Organogénesis del brote	Ahmadabadi <i>et al.</i> , 2007
CM111, CM117, CM124, CM125 CM 300	India	Embrión inmaduro 14 ddp (1-2 mm)	Organogénesis del brote	Rackshit <i>et al.</i> , 2010
1-48	Argentina	Embrión inmaduro 12-14 ddp (1-2 mm)	ES	Gonzalez <i>et al.</i> , 2011
Tuxpeño VS-535	México	Embrión inmaduro 15-18 ddp	ES	Garrocho-Villegas <i>et al.</i> , 2012
Y423	China	Embrión inmaduro 12-15 ddp (1.5-2.5 mm)	ES	Liu <i>et al.</i> , 2015
CML-176, CML-186, CML-145 QPM	México	Embrión inmaduro (1.5-2 mm)	N/D	Aguado-Santacruz <i>et al.</i> , 2017

c. Caracterización molecular de la regeneración *in vitro* de maíz

Mientras la mayoría de los esfuerzos han sido enfocados a encontrar las condiciones adecuadas para el cultivo *in vitro* de maíz, existen escasos reportes que describen los patrones de expresión genética durante el proceso de regeneración de plántulas. Uno de estos trabajos se realizó en la variedad de maíz Hi II durante la maduración de embriones somáticos y la formación de plántulas (germinación) (Che *et al.*, 2006). Durante la maduración de embriones somáticos, respecto al callo embriogénico, fueron reprimidos genes que codifican para histonas y proteínas ribosomales lo que resulta en un decremento en la proliferación celular y el crecimiento. Posteriormente, durante la germinación la expresión de estos genes se recupera. Además, durante esta etapa, los genes que se inducen incluyen a los que codifican para enzimas hidrolíticas, de almacenamiento, relacionados a la respuesta a estrés, transportadores de membrana y los relacionados a fotosíntesis.

Por otra parte, recientemente se compararon cuatro líneas de maíz, dos altamente regenerativas y dos con baja capacidad de regeneración después de nueve días de rediferenciación del callo embriogénico (Zhang *et al.*, 2019). Las líneas altamente regenerativas presentaron genes diferencialmente expresados asociados con fotosíntesis, porfirinas, el metabolismo de clorofila,

ribosomas, transducción de señales de fitohormonas, así como genes *WOX*. Las líneas con baja capacidad regenerativa mostraron expresión diferencial de genes relacionados al metabolismo de la taurina, hipotaurina, nitrógeno, la elongación de ácidos grasos, el metabolismo de sacarosa y almidón, la biosíntesis de fenilpropanoides y de ritmo circadiano.

7. RNAs pequeños (sRNAs) y su rol en la morfogénesis de la planta

Desde el descubrimiento de una molécula de RNA de 22 nucleótidos (nt) que regula el desarrollo post-embionario en *Caenorhabditis elegans*, los sRNAs han sido descritos en muchos organismos eucariontes. En plantas, los sRNAs derivan de precursores tipo tallo-asa (como miRNAs) o de RNAs de doble hebra (como los siRNAs) y se clasifican dependiendo de su biogénesis y función. Estos sRNAs regulan una enorme variedad de procesos como defensa y desarrollo (**Tabla 5**) (D'Ario *et al.*, 2017)

Tabla 5. Tipos de sRNAs en plantas

Clase	Descripción		Tamaño (nt)	Origen	Función
<i>miRNAs</i>	microRNAs		20-24	Genes MIR, intrones (mirtrones)	Regulación postranscripcional, represión traduccional
<i>siRNAs secundarios</i>	phasiRNAs	RNAs pequeños de interferencia en fase	21	Genes PHAS	Regulación postranscripcional
	tasiRNAs	RNAs pequeños de interferencia de acción en trans	21	Genes TAS	Regulación postranscripcional
	easiRNAs	RNAs pequeños de interferencia derivados de elementos transponibles	21	Derivados de elementos transponibles	Regulación postranscripcional
<i>hc-siRNAs</i>	RNAs pequeños de interferencia heterocromáticos		24	Secuencias repetidas o transposones	Regulación postranscripcional
<i>NAT-siRNAs</i>	RNAs pequeños de interferencia naturales antisentido		21-22	Transcritos bidireccionales inducidos por estrés	Regulación de genes de respuesta a estrés

La morfogénesis de organismos multicelulares subyace en divisiones celulares coordinadas y la diferenciación celular, con el fin de obtener el patrón corporal característico de un organismo. En el caso de las plantas, al contrario de los animales, debido a la presencia de las paredes celulares rígidas, no ocurre migración o rotación celular. Por esta razón, el patrón corporal de las plantas depende principalmente de la información posicional para asegurar la diferenciación “*on-site*” de las nuevas células formadas. Este mecanismo se basa en la coordinación de la comunicación célula-célula (Hisanaga *et al.*, 2014).

En *Arabidopsis* se han identificado diversas moléculas que median la comunicación celular como péptidos, fitohormonas y factores de transcripción. Recientemente los sRNAs han sido descritos como una nueva clase de moléculas de señalización que potencialmente se mueven célula-célula y actúan como señales de posición. Los principales sRNAs que se han descritos para estos procesos son los microRNAs y los tasiRNAs (Hisanaga *et al.*, 2014). Dichos sRNAs se describen a continuación.

a. microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son sRNAs de 20 a 24 nt codificados en el genoma que derivan de precursores transcritos a partir de genes *MIR*. Los genes *MIR* son transcritos por la RNA polimerasa II que origina un RNA primario (pri-miRNA) que presenta estructura tipo tallo-asa (**Fig. 7**). El pri-miRNA es procesado por la enzima DICER-LIKE1 (DCL1) produciendo un precursor tallo-asa de menor tamaño (pre-miRNA) y requiere la participación de otros elementos como la proteína de unión a cap 20 (CBP20), SERRATE (SE), el dominio asociado a forkhead (FHA) e HYPONASTIC LEAVES (HYL1). El pre-miRNA es también procesado por DCL1 para producir un dúplex de miRNA y miRNA* (también denominado miRNA-5p/miRNA-3p). Este dúplex es metilado en los extremos 3' por HEN1 (HUA ENHANCER 1) y es exportado del núcleo al citoplasma por HASTY (HST). En el citoplasma, una de las hebras de dúplex (comúnmente el miRNA-5p) es cargada en la proteína ARGONAUTA 1 (AGO1), formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). El miRNA funciona como guía del RISC al dirigirlo a sus mRNAs blanco por medio de complementariedad. El silenciamiento postranscripcional por miRNAs en plantas puede ocurrir por degradación del transcrito o por inhibición de la traducción (Chen, 2009).

Los miRNAs controlan el desarrollo de las plantas ya que, los defectos en la expresión de genes clave de la biogénesis de estos sRNAs ocasionan efectos pleiotrópicos. Además, los blancos de muchos miRNAs son factores transcripcionales descritos como elementos clave en el desarrollo. A continuación, se describen las funciones de miRNAs durante la ontogenia de la planta, utilizando como modelo a *Arabidopsis* (**Fig.8**).

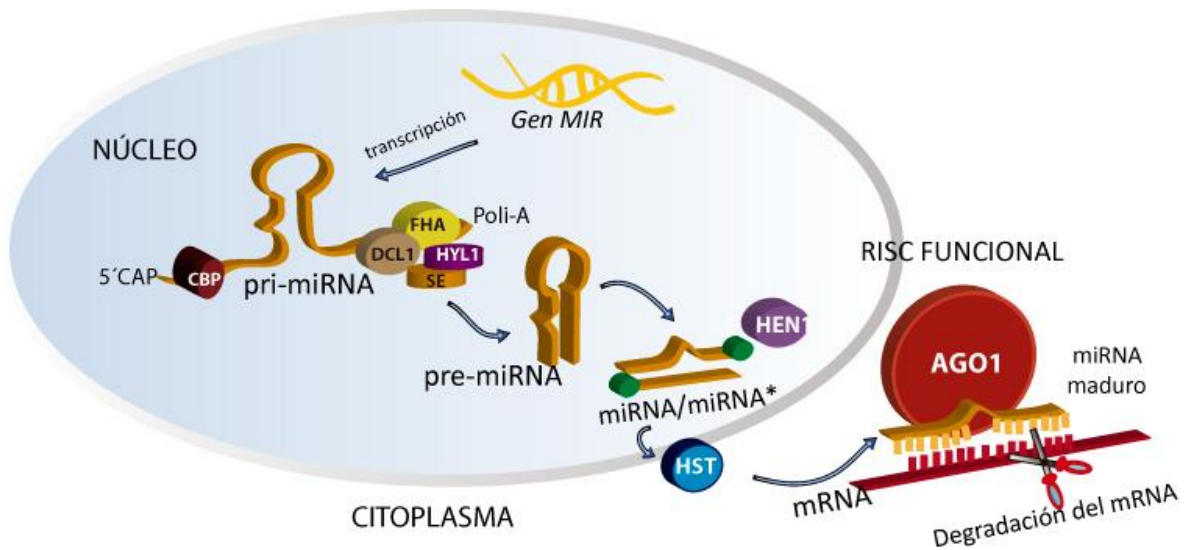


Fig.7 Biogénesis de miRNAs en plantas. El gen *MIR* es transcrito en un pri-miRNA con cap y poliadenilado. El pri-miRNA es procesado en un pre-miRNA y finalmente en el dúplex miRNA-miRNA* por DCL1. El miRNA maduro es cargado en AGO1 para regular a sus transcritos blanco mediante degradación o represión traduccional (no representado) (Información de Chen, 2009).

I. Desarrollo del SAM embrionario

Los microRNAs MiR165/miR166 regulan a la familia de factores de transcripción HD-ZIP III que están involucrados en el desarrollo del SAM, parte apical del embrión y la polaridad de órganos laterales. Estos miRNAs son cargados por AGO10 el cual los secuestra para prevenir su función represiva sobre los genes HD-ZIP III y, así, mantener el desarrollo del SAM (Li & Zhang, 2006). Las mutaciones en *AGO10* impiden el mantenimiento del meristemo apical embrionario y provocan un ápice vacío (*pinhead*).

En maíz, *ROLLED LEAF 1* (*ZmRLD1*) codifica una proteína que comparte alta identidad con *REVOLUTA* (*REV*) de *Arabidopsis*, que es un factor transcripcional tipo HD-ZIP III. *ZmRLD1* se expresa en el SAM y es blanco de miR165/miR166 por lo que maíz y *Arabidopsis* podrían poseer un mecanismo similar para la regular el SAM (Juarez *et al.*, 2004). Por otra parte, miR394 ha sido descrito como una señal móvil que establece el patrón y mantenimiento de las células troncales en el SAM. En *Arabidopsis*, *AtMIR394B*, uno de los precursores que originan a miR394, se transcribe específicamente en la capa L1 del SAM (Fig. 1) y en el lado adaxial de los primordios foliares de embriones en estado acorazonado. El miRNA maduro, por otra parte, se encuentra en las tres capas del SAM (L1-L3), lo que sugiere su movimiento a las capas internas donde degrada a su transcritos blanco. Este blanco es una ubiquitina ligasa tipo F-BOX, denominada *AtLCR* (*LEAF CURLING RESPONSIVENESS*). Se ha propuesto que *LCR* degrada a una proteína, aun no identificada, que modifica la función y transporte de *WUS*. El transcritos *AtLCR* resistente a *miR394* recapitula el fenotipo de terminación de las células troncales (Knauer *et al.*, 2013).

II. Formación del meristemo axilar del brote

El meristemo del brote axilar puede formarse múltiples veces en la vida de la planta y es el responsable de la iniciación de las ramificaciones e inflorescencias. En tomate, los genes *LATERAL SUPPRESSOR (LS)* y en arroz, *MONOCULM I (MOCI)* regulan la iniciación de meristemos axilares (Fig. 8, izquierda). Estos genes actúan río abajo de *CUC1* y *CUC2*, que son regulados por miR164 (Li & Zhang, 2006). Los mRNA de *CUC1/2* se acumulan en los primordios foliares axilares, donde participan en el establecimiento de dichos meristemos. Además, fenotipos de las mutantes sencillas o dobles de *CUC1* y *CUC2* han sugerido su función en la iniciación del meristemo embrionario, establecimiento del límite entre el SAM y el cotiledón (Hibara et al., 2006; Raman et al., 2008).

III. Desarrollo de la hoja

La formación de una hoja madura es el resultado de múltiples procesos en el que varios miRNAs están involucrados. El primordio foliar es iniciado a partir de células no diferenciadas en la región periférica del SAM. Durante este proceso son necesarios límites que separen el primordio foliar del SAM y posteriormente puedan diferenciarse. Por este motivo, el módulo *CUC1/2*-miR164 podría estar involucrado (Li & Zhang, 2006).

Por otra parte, miR319, cuyo blanco es *TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PCF1/2)*, posee funciones conservadas en el desarrollo de la hoja. La sobreexpresión de este miRNA en tomate y arroz resulta en la formación de hojas más anchas, al inhibir a su blanco que reprime la diferenciación celular. De la misma forma, el módulo miR396-*AtGRF (GROWTH-REGULATING FACTORS)* está implicado en la regulación del tamaño de la hoja. La sobrerregulación de *AtGRF1/2* provoca cotiledones y hojas alargadas. Caso contrario, la sobreexpresión de miR396a/b resulta en la formación de hojas más estrechas (Kim et al., 2003; Liu et al., 2009). En un circuito de regulación, TCP4 activa directamente la transcripción de los precursores de miR396 y miR164 promoviendo la inhibición del crecimiento celular. Por otro lado en *A. thailiana* y *Cardamine hirsuta*, miR156 regula a los factores de transcripción *SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE)* que promueven el cambio de fase juvenil a adulto. En hojas jóvenes, miR156 es abundante inhibiendo a *SPL*, además TCP une y activa los factores de transcripción *CUC* por lo que las hojas son pequeñas y con bordes lisos. En hojas adultas, baja la expresión de miR156 y aumentan la acumulación del transcrito de *SPL* que es capaz de interactuar con *TCP* y permitir la acumulación de *CUC*. De esta forma se producen hojas más largas, con mayor número de células y con forma aserrada (Rubio-Somoza et al., 2014; Rodríguez et al., 2016).

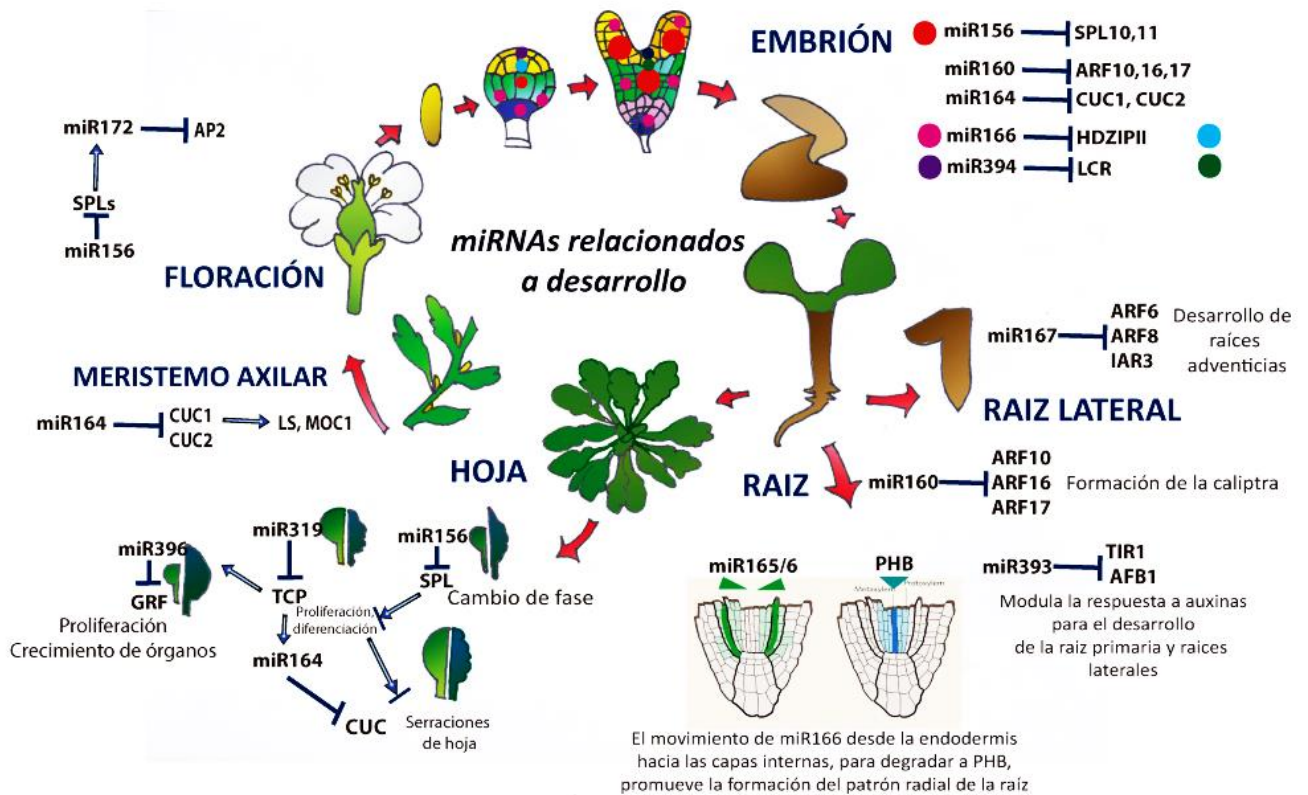


Fig. 8. Funciones de los miRNAs en el desarrollo de la planta. Las funciones de los miRNAs se describen en el texto. En el apartado del desarrollo de la hoja, los esquemas de la hoja representadas a la derecha muestran el fenotipo de la hoja debido a mutaciones en el miRNA o en su blanco. Información de Li & Zhang, 2006; Carlsbecker *et al.*, 2010; Vashisht & Nodine, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2017.

IV. Formación del sistema radicular

La arquitectura del sistema radicular es producto del desarrollo embrionario y postembrionario. En maíz, las raíces seminales o primarias derivan del embrión, mientras que el desarrollo postembrionario origina raíces laterales. Algunos miRNAs participan en la definición de la arquitectura de la raíz modificando la vía de señalización de auxinas (Fig. 8, derecha). TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE PROTEIN 1) es un receptor de auxina que está involucrado en la degradación de los represores transcripcionales Aux/IAA (AUXIN/INDOLE ACETIC ACID). TIR1 pertenece a la misma familia que los AUXIN SIGNALING F-BOX (AFBs) (Familia TIR1/AFB) (Parry *et al.*, 2009). TIR1 y AFB1 participan en formación de la raíz de la plántula y son regulados por miR393. En arroz, la sobreexpresión de los precursores de este miRNA provoca una señalización alterada de auxinas promoviendo elongación de la raíz primaria (Bian *et al.*, 2012).

Las auxinas activan la transducción de señales y promueven el desarrollo mediante la acción de la familia de genes *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*). *Arabidopsis* posee 23 ARFs, de los cuales *ARF10/16/17* son blanco de miR160. La sobreexpresión de miR160c provoca un decremento en la longitud de la raíz primaria, el incremento de raíces laterales y defectos en la caliptra. La doble mutante de *arf10* y *arf16* recapitula estos defectos. Por tanto, miR160 controla el desarrollo de la raíz regulando a *AtARF10/16* (Wang *et al.*, 2005). Por otra parte el módulo miR167-*AtARF7/8* controla el desarrollo de raíces adventicias (Gutierrez *et al.*, 2009). miR165/miR166 también se generan en la endodermis del meristemo radicular, pero se desplazan a las capas internas para suprimir a sus blancos, los transcritos de la familia *HD-ZIP III*. Este movimiento promueve un gradiente de expresión de estos transcritos en las células de la estela vascular. Esto permite la especificación celular del protoxilema y el metaxilema (Carlsbecker *et al.*, 2010; Miyashima *et al.*, 2011).

Además, las citocininas forman un loop regulatorio con miR165 y *PHABULOSA* (*AtPHB*) para determinar el balance de división y diferenciación celular durante el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*. El efecto de las citocininas, mediado por el regulador transcripcional *AtARR1* (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR*, que participan en la respuesta temprana a las citocininas), reprime tanto a miR165 y a su blanco *PHB*, por esto se considera como un loop de regulación incoherente. Este factor de transcripción, a su vez, activa directamente al gen ISOPENTENYL TRANSFERASE 7 (*AtIPT7*) para la biosíntesis de citocininas en el promeristemo de la raíz y activa a *AtARR1* en la zona de diferenciación. *ARR1*, a su vez, reprime la expresión de *AtPHB* en la vasculatura de la zona de transición, restringiendo a *AtPHB* en la parte distal del promeristemo. *AtPHB* también es restringido en el haz vascular por la actividad de *AtMIR165A*, que se expresa en la endodermis. Adicionalmente *ARR1* también reprime la transcripción de *AtMIR165A* (Ioio *et al.*, 2012).

V. Floración

Los genes homeóticos de la familia *APETALA 2* (*AtAP2*) se encuentran involucrados en la transición de la identidad del meristemo floral. Al inicio de la floración, miR172 se acumula en el SAM, donde inhibe al transcrito de *AtAP2* y previene la transición del centro del SAM en el meristemo floral. Además, miR172 y miR156 están implicados en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva. La sobreexpresión de miR156 retrasa la floración, mientras que la sobreexpresión de miR172 la promueve. De esta forma, mientras miR156 especifica la fase juvenil, miR172 determina la fase reproductiva degradando a sus blancos, los transcritos *AtAP2-LIKE*. A su vez, la transcripción de miR172 es promovida por los *AtSPL* que son reprimidos durante la fase juvenil por miR156. Esto permite que las proteínas AP2-like repriman la floración en estadios jóvenes (D'Ario *et al.*, 2017).

b. tasiRNAs

Los tasiRNAs (*trans-acting small interfering RNA*) son un tipo de sRNAs encontrados únicamente en plantas. Son generados a partir de los transcritos de genes *TAS* mediante procesamiento por miRNAs

específicos. En *Arabidopsis* existen cuatro genes *TAS* (*TAS1-4*), pero sólo los tasiRNAs producidos a partir de genes *TAS3* están conservados en todas las plantas terrestres. Para su biogénesis los transcritos del precursor *TAS3* son procesados por miR390 unido a Argonauta 7 (AGO7) y estabilizados por el SUPRESOR DE SILENCIAMIENTO GÉNICO (SGS3) para evitar su degradación. En maíz, el ortólogo de *AtSGS3* es *LEAFBLADELESS* (*ZmLBL1*). Posteriormente se recluta una RNA polimerasa dependiente de RNA, RDR6, el cual produce una hebra complementaria al transcrito procesado y una enzima Dicer-like, DCL4, escinde el dsRNA en fragmentos de 21 nt “en fase”, es decir de forma continua (Fig. 9). La hebra positiva es seleccionada por AGO1 y el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) realiza la búsqueda de transcritos blanco, que en este caso son factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF) (Fei *et al.*, 2013). Acorde a sus transcritos blanco, los tasiRNAs derivados de *TAS3* son nombrados tasiR-ARFs (Chitwood *et al.*, 2009).

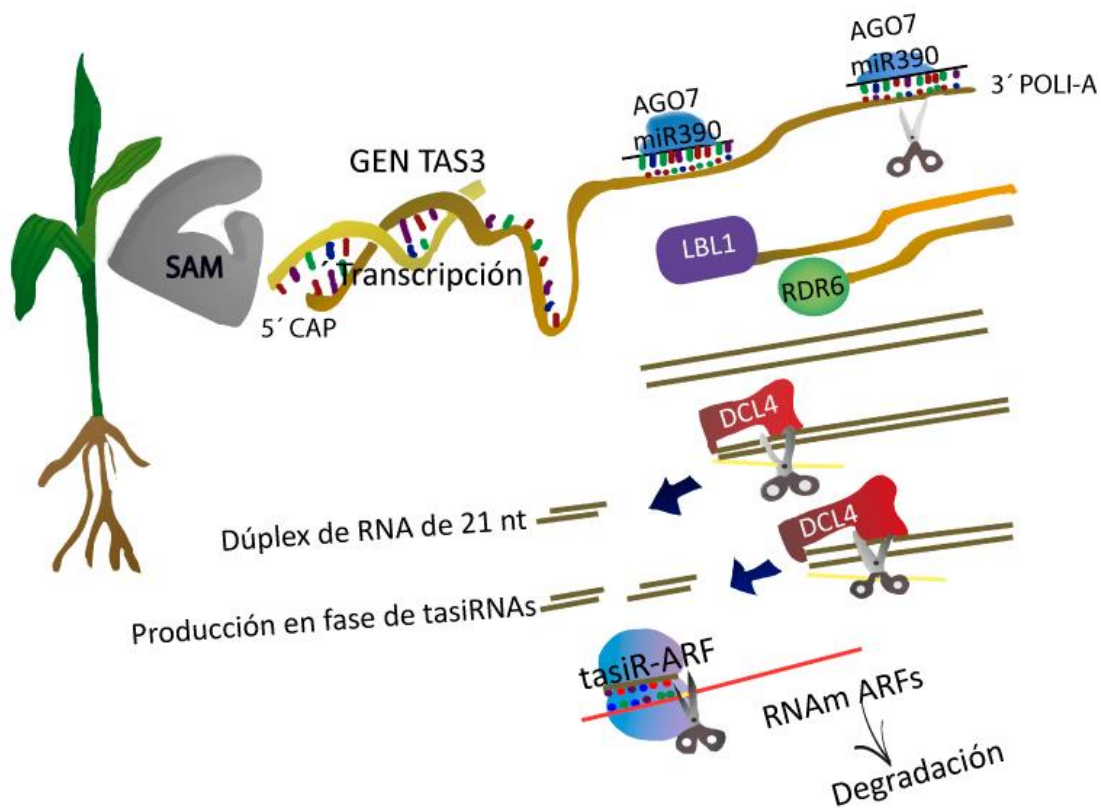


Fig. 9. Biogénesis de los tasiR-ARFs en maíz. Después de la transcripción de los genes *TAS3*, el transcrito de hebra sencilla (ssRNA) posee dos sitios de unión para miR390 cargado por la proteína AGO7. Sin embargo, sólo se escinde el extremo 3' para iniciar el procesamiento de los tasiRNA; la hebra es estabilizada por la proteína LBL1 para impedir su degradación. El extremo 5' no sufre ningún corte, cualquier alteración en este extremo, removiendo la unión de miR390-AGO7 o haciendo el sitio propenso a corte (el sitio de unión de forma común posee un desapareamiento entre el transcrito *TAS3* en el extremo 5' y miR390 que impide que el transcrito sea degradado por RISC) interrumpe la producción de estos tasiRNAs. Posteriormente se recluta la RDR6 para iniciar la síntesis de la segunda cadena de RNA. El RNA de dos cadenas (dsRNA) es procesado sucesivamente por DCL4 para generar tasiRNAs de 21 nucleótidos. Estos fragmentos entran al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) donde se escoge una de las hebras para buscar el mRNA blanco (ARF) por complementariedad de bases e iniciar su degradación (Información de Chitwood *et al.*, 2009).

En maíz, los transcritos de los genes *TAS3* fueron identificados en el ápice (que incluye el meristemo apical del brote con cinco primordios foliares) de plántulas de dos semanas de edad de la variedad B73 (Dotto *et al.*, 2014). En total, existen nueve genes *TAS* (*ZmTAS3a-i*) en el genoma del maíz. Estos genes *TAS3*, debido al procesamiento de DCL4, forman entre 18 y 26 tasiRNAs, sin embargo solamente los tasiRNAs originados en el corte 5 a 8 forman tasiR-ARFs (de esta forma su nombre por ejemplo para tasiR-ARFbD5, aquí la letra “b” significa que proviene del precursor *TAS3b*, “D5” significa que es el corte número 5 de DCL4). Los genes *TAS3h* no forma tasiR-ARFs y los tasiR-ARFs predichos para *TAS3f* no han sido detectados en las bibliotecas de sRNAs (Dotto *et al.*, 2014; Juarez-Gonzalez *et al.*, 2019). Es decir, solamente siete genes *TAS3* (*TAS3a*, *TAS3b*, *TAS3c*, *TAS3d*, *TAS3e*, *TAS3g* y *TAS3i*) forman tasiRNAs cuyos blancos son *ZmARF3*. *ZmTAS3a/b/c* forman dos tasiR-ARFs y los genes *TAS3* restantes forman solamente un tasiR-ARF (Tabla 6). En total existen diez tasiR-ARFs que muestran una alta similitud en secuencia (Fig. 10).

Tabla 6. Genes *TAS3* y los tasiR-ARF que producen

GEN TAS	N° de tasiRNAs	N° de tasiR-ARFs
<i>TAS3a</i>	26	2
<i>TAS3b</i>	20	2
<i>TAS3c</i>	20	2
<i>TAS3d</i>	24	1
<i>TAS3e</i>	18	1
<i>TAS3g</i>	20	1
<i>TAS3i</i>	18	1

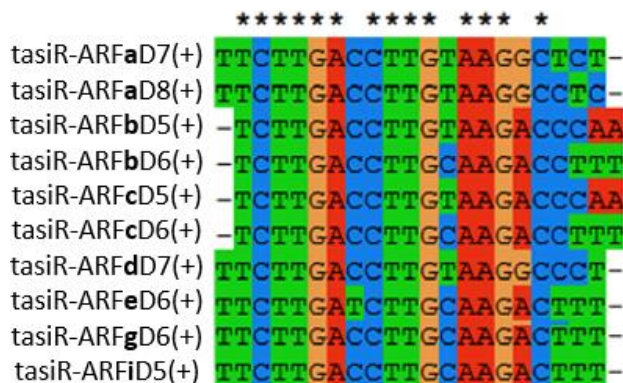


Fig. 10. tasiR-ARFs en maíz. Existen diez tasiR-ARFs en maíz que se nombran de acuerdo al precursor (*TAS3a-i*), el número de corte de DCL4 (5-8) y la hebra de RNA que los origina (+). (Tomado de Dotto *et al.*, 2014).

8. Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs)

Los ARFs son factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta a auxinas (*auxin response elements*, AuxREs) en las regiones promotoras de genes blanco, en el sitio canónico TGTCTC. En *Arabidopsis* existen 23 ARFs, en maíz 36, 25 en arroz y en *Marchantia polymorpha* 3 (Chandler, 2016).

Los ARFs poseen una estructura modular con tres dominios: Un dominio N terminal de unión a DNA (DBD), un dominio medio, responsable de la activación o represión y un dominio carboxilo terminal PB1 (Phox and Bem1), antes denominada dominio III/IV que permite las interacciones proteína-proteína principalmente entre ARFs y Aux/IAA (Chandler, 2016).

La clasificación de ARFs en activadores o represores transcripcionales se basa en la presencia de ciertos aminoácidos en el dominio medio. El dominio medio represor está enriquecido en prolina, serina y treonina y el dominio activador en glutamina. En *Arabidopsis* se piensa que cinco ARFs son activadores: *AtARF5-AtARF8* y *AtARF19* y los restantes son represores (Guilfoyle & Hagen, 2007). El número de ARFs activadores y represores varía ampliamente entre especies y la proporción de ARFs truncos es muy alta para especies como *Medicago truncatula* (Shen et al., 2015) y maíz (Wang et al., 2012). Esta clasificación se basa en comparaciones con la secuencia primaria de las proteínas de *Arabidopsis*, por lo que aún es necesaria una caracterización funcional para determinar su función represora o activadora. Además, el dominio medio por sí solo es capaz de funcionar como represor o activador (Tiwari et al., 2003) y la habilidad de las proteínas ARF para reprimir o activar ciertos genes es dependiente de la formación de complejos con co-activadores o co-represores. De la misma forma, no existen datos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y de regulación genética para la mayoría de los genes, blancos de los ARFs.

Para los ARFs con el dominio de activación, se ha determinado que su actividad transcripcional es inhibida por su dimerización con las proteínas Aux/IAA. Durante la percepción de auxinas por el complejo ubiquitina ligasa SCF^{TIR1} (SKP1-cullin-F-box), las proteínas Aux/IAA se vuelven blanco para la degradación proteosomal, lo que permite la desrepresión de los ARFs. Este mecanismo regula transcripcionalmente a los genes de respuesta a auxinas (Vernoux et al. 2011).

En el caso de los represores se ha descrito que solamente *AtARF4* y *AtARF9* pueden unirse a las proteínas Aux/IAA, por lo que se ha sugerido que los ARFs represores podrían inhibir a los ARFs activadores secuestrándoles vía heterodimerización, competir con ellos por los sitios de unión AUX/RE (Chandler, 2016) o podrían homodimerizar con TOPLESS (AtTPL) un co-represor que modula la expresión genética en diversos procesos incluyendo la señalización de hormonas (Causier et al., 2012).

Basado en las secuencias de *Arabidopsis*, los ARFs se clasifican en tres linajes: ARF5/6/7/8 (Clado A), ARF1/2/3/4/9 (Clado B) y ARF10/16/17 (Clado C) (Finet et al., 2013; Xia et al., 2017).

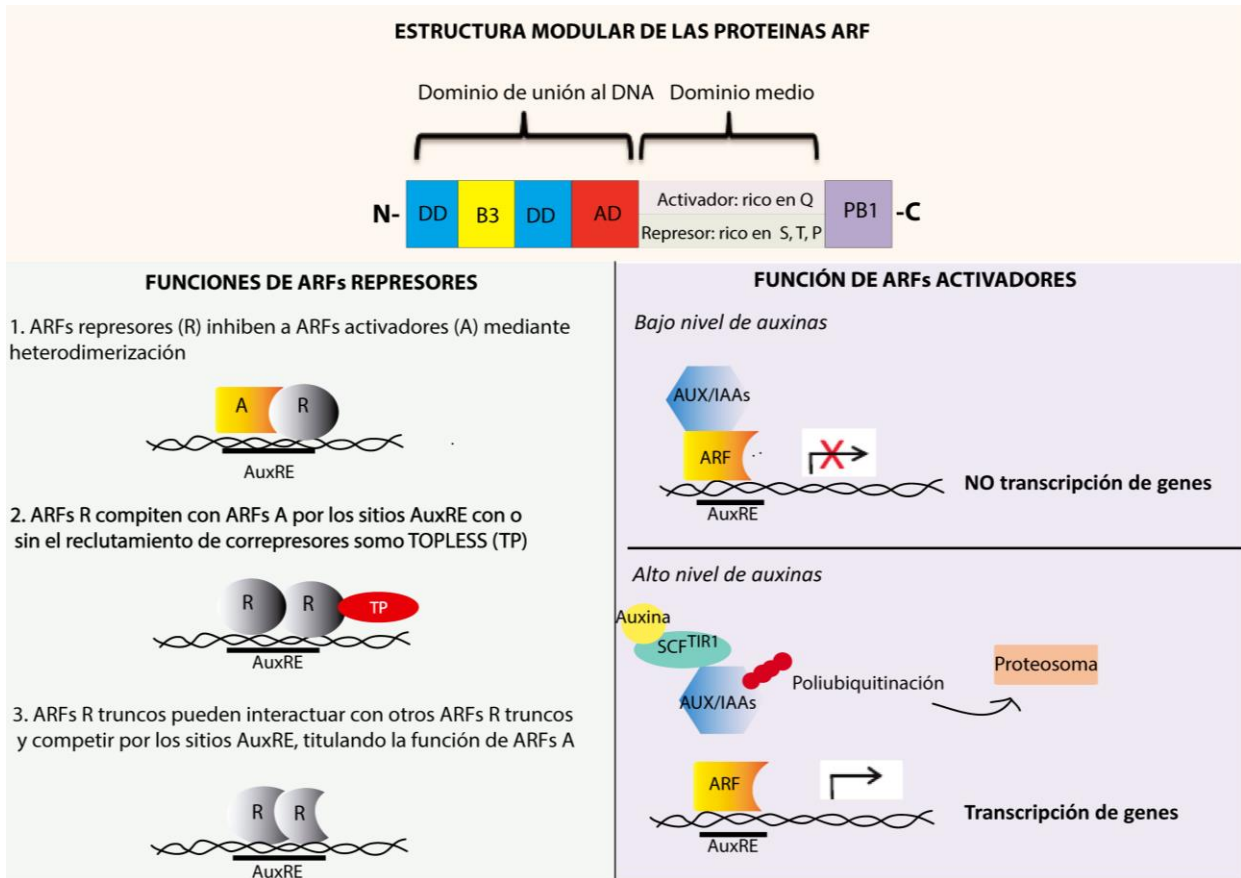


Fig. 11. Estructura modular de las proteínas ARFs y función de los ARFs represores o activadores. Los ARFs están compuestos por los dominios de unión a DNA tipo B3, el dominio medio y el el dominio de Phox y Bem1 (PB1). ARF1 y ARF5 tienen además un dominio de dimerización (DD) y la región de anclaje (AD). Para la regulación de los ARFs activadores, la auxina IAA se une a su correceptor el Inhibidor de Respuesta al Transporte (TIR1) y a las proteínas Auxina/Ácido Indol Acético (Aux/IAA). TIR1 son proteínas F-box que forman parte del complejo SCF^{TIR1} que consiste de cuatro subunidades (TIR1/AFB, ASK1, CUL1 y RBX), que en conjunto forman el complejo de ubiquitina-ligasa. Cuando los niveles de IAA son bajos, las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con los ARFs para reprimir la transcripción de genes. Sin embargo si incrementan los niveles de IAA, la asociación de IAA a su correceptor une a las proteínas Aux/IAA para su degradación por el proteosoma, que induce la desrepresión de la regulación transcripcional de los ARF y la expresión de los genes de respuesta a auxinas (Información de Chandler, 2016).

Los ARFs pueden ser regulados a diversos niveles: epigenético, transcripcional, postranscripcional y estabilidad de la proteína (**Tabla 7**). A nivel postranscripcional, algunos ARFs son regulados por miRNAs y tasiRNAs mediante una interacción de complementariedad entre el RNA mensajero (mRNA) del ARF y el sRNA lo que promueve la degradación del transcrito mediada por RISC.

Tabla 7. Niveles de regulación de los ARFs (Chandler, 2016)

Nivel de regulación	Mecanismo
Epigenético	Metilación del gen ARF
Transcripcional	Splicing alternativo Regulación policistrónica mediada por uORFs (upstream ORFs)
Postranscripcional	Regulación por miRNAs/tasiRNAs Represión de ARFs activadores por las proteínas AUX/IAA Activación o represión mediada por la interacción proteína-proteína. Modificación de la actividad mediante fosforilación
Estabilidad de la proteína	Degradación via proteosoma

a. ARFs blancos de tasiRNAs

Los tasiR-ARFs unen solamente a transcritos ARF del Clado B que incluyen a *ARF2/3/4* de *Arabidopsis* y que han sido descritos como represores (Xia *et al.*, 2017). *AtARF3* (*ETTIN* o *ETT*) es un ARF atípico ya que no interactúa con los represores Aux/IAA, debido a que carece del dominio PB1 y puede funcionar diferente a la señalización canónica de auxinas, considerándolo un sensor de auxinas no canónico (Fig. 12). ARF3 posee un dominio C-terminal no observado en otras proteínas y es conocido como dominio específico de ETT (dominio ES). Se ha sugerido que el dominio ES facilita la respuesta a la concentración de auxinas celulares. La interacción entre ARF3 y otros factores de transcripción se ve afectada por la presencia de esta hormona, por ejemplo la interacción entre ETT y el factor de transcripción INDEHISCENT (IND) se inhibe solamente con la adición de IAA, pero no cuando se emplean auxinas sintéticas (Simonini *et al.*, 2016).

En maíz existen 36 ARFs, de los cuales cinco (*ZmARF24*, *23*, *11*, *12*, *26*) son blanco de tasiR-ARFs, clasificados por su similitud con el *AtARF3* de *Arabidopsis*. *ZmARF24/11/26* poseen dos sitios de unión para tasiR-ARFs, mientras que *ZmARF23* y *ZmARF12* solamente uno. Análisis de la abundancia del transcrito de estos ARFs en maíz, ha demostrado una expresión diferencial tanto a nivel de tejido como en el proceso de desarrollo por lo que sus funciones pueden no son redundantes, sin embargo no existen mutantes descritas para estos genes (Xing *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

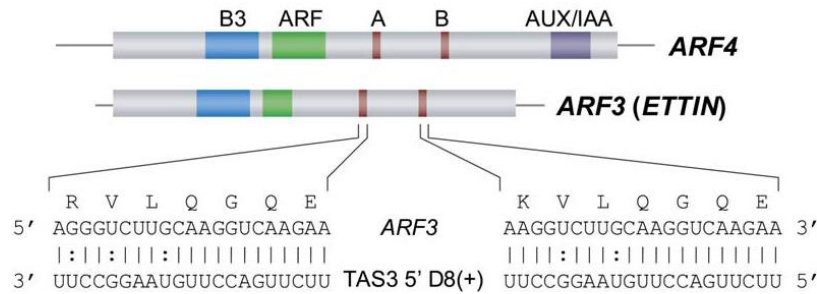


Fig. 12. Comparación entre ARF4 y ARF3, blancos de tasiR-ARF en Arabidopsis. En el transcrito ARF4, el sitio de unión de los tasiR-ARF se encuentra entre los dominios ARF y AUX/IAA. En el mRNA de ARF3 el sitio de unión se encuentra entre el dominio ARF y el C-terminal (Tomado de Fahlgren *et al.*, 2006).

b. Función de la vía tasiR-ARF

Se ha propuesto que los tasiR-ARFs fijan el umbral al que las hojas responden a las auxinas (Hunter *et al.*, 2006) y en *Arabidopsis* han sido identificadas como señales móviles, desplazándose intercelularmente del lado superior (adaxial) al inferior (abaxial) de la hoja para crear un gradiente morfogénico y establecer el eje adaxial-abaxial.

Los tasiR-ARFs se originan en el lado adaxial y ahí reprimen a sus blancos (**Fig. 13**). Además un miRNA, miR166, también participa en el establecimiento de la polaridad de la hoja reprimiendo a sus blancos, factores de transcripción de la familia HD-ZIP III en el lado abaxial. Las mutantes en la biogénesis de tasiR-ARFs presentan hojas ligeramente abaxializadas y aceleran la transición de la fase juvenil a la adulta. Los tasiR-ARF también están involucrados en el desarrollo de raíces laterales y el establecimiento de la arquitectura floral (Chitwood *et al.*, 2009). En arroz también se ha sugerido su participación para la iniciación del meristemo apical del brote (Nagasaki *et al.*, 2007).

En maíz, la vía tasiR-ARFs es esencial para el establecimiento de la polaridad en la hoja. Las mutantes *lb1*, presentan hojas fuertemente abaxializadas y adquieren un fenotipo de aguja (Juarez *et al.*, 2004). La biogénesis de los tasiR-ARFs se restringe a las dos capas celulares del lado adaxial de hojas en desarrollo, por la expresión localizada de miR390 (Benkovics *et al.*, 2014). Esta habilidad de los tasiRNAs para desplazarse de una célula a otra es esencial para la formación de gradientes de sRNAs y provee la información posicional para coordinar el destino celular (Benkovics *et al.*, 2014).

Esta vía también ha sido relacionada con el mantenimiento del SAM. Plantas con mutaciones en los genes *ZmLBL1* o *ZmAGO7* pierden el SAM. Además, transgenes de *arf3a*, insensibles al corte de los tasiRNAs, recapitulan el fenotipo de *lb1* de hojas abaxializadas, además de que la plantas son estériles (Dotto *et al.*, 2014).

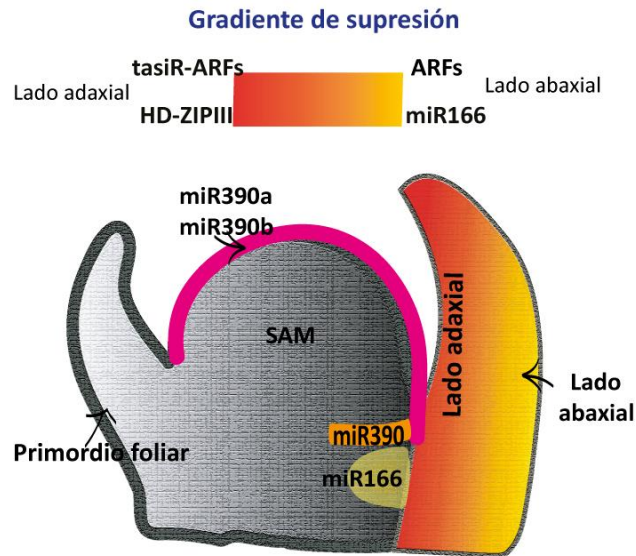


Fig. 13. Localización y modo de acción de los tasiR-ARF durante el establecimiento de la polaridad de la hoja. Los precursores de miR390: MIR390A y B se localizan en la capa L1 del SAM (indicado en rosa), sin embargo el miR390 maduro se localiza en el lado adaxial de la hoja incipiente (banda naranja en el SAM) y en desarrollo, restringiendo ahí la síntesis de los tasiRNAs. Los tasiR-ARFs se desplazan del lado adaxial al abaxial delimitando a sus ARFs blancos mediante un gradiente de degradación en el lado abaxial. Por su parte, miR166 se localiza debajo de la hoja incipiente (color amarillo claro) y en el lado abaxial de la hoja en desarrollo confinando a sus blancos, los transcritos de los genes *HD-ZIP III* en el lado adaxial. Los genes *HD-ZIP III* también se caracterizan por expresarse en el SAM (no indicado) (Chitwood *et al.*, 2007; Nogueira *et al.*, 2009)

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de la variedad de maíz Tuxpeño VS-535 se han encontrado cambios en la acumulación de algunos miRNAs y la regulación de sus transcritos blancos. Los niveles de miR156, miR164, miR398, miR408 y miR528 mostraron patrones de acumulación contrastantes durante la regeneración al disminuir la concentración de hormonas exógenas y al comparar el proceso de regeneración con y sin fotoperiodo (Chávez-Hernández *et al.*, 2015). Por otra parte, la abundancia de miR156 tiende a disminuir en cultivos de callos prolongados, mientras que los de miR528 se mantienen (Alejandri-Ramirez *et al.*, 2018).

En *Arabidopsis*, miR156, miR160, miR164, miR165/166 y miR394 son esenciales para el desarrollo del SAM debido a su localización espacio-temporal, ya que inhiben a los factores de transcripción: *AtSPL10/11*, *AtCUC1/2*, *AtARF10/16/17*, *HD-ZIP III* y *AtLCR*, respectivamente. También han sido asociados a la formación de embrión cigótico, sobre todo en el estadio globular y acorazonado (Tabla 8) (Vashisht & Nodine, 2014; Rodriguez *et al.*, 2017).

Tabla 8. Función de miRNAs durante el desarrollo de *Arabidopsis*. Se indica el gen blanco y su función, así como el ortólogo correspondiente en maíz

miRNA	Blanco (<i>Arabidopsis</i>)	Función (<i>Arabidopsis</i>)	Blanco (<i>Zea mays</i>)
miR156	<i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (AtSPL10, AtSPL11)</i>	División celular y formación de patrones	<i>ZmSBP23</i>
miR160	<i>FACTOR DE RESPUESTA A AUXINAS 10/16/17 (AtARF10, AtARF16, AtARF17)</i>	Señalización de auxinas, formación de patrones. Diferenciación.	<i>ZmARF17, ZmARF19</i>
miR164	<i>CUP-shaped cotyledon (AtCUC1, AtCUC2)</i>	Arreglo espacial del primordio cotiledonar	<i>ZmCUC2</i>
miR166	<i>PHABULOSA (AtPHB) PHAVOLUTA (AtPHV) Y REVOLUTA (AtREV)</i>	Polaridad de hoja, desarrollo de raíz	<i>Rolled leaf (ZmRLD1)</i>
miR394	<i>LEAF CURLING RESPONSIVENESS (AtLCR)</i>	Competencia del SAM (Activación de <i>WUSHEL</i>)	<i>GRMZM2G064954 (F-BOX)</i>

La sobreexpresión de *MIR165a* promueve una reducción drástica de los transcritos *HD-ZIP III* y la pérdida del SAM (Zhou *et al.*, 2007). En callos obtenidos de hojas de *Arabidopsis* y *Nicotiana*, la reducción de la abundancia de miR156 y un incremento de su blanco *SPL9* reducen la capacidad regenerativa del brote. Esto se debe a la atenuación de la vía de citocininas a través de los factores transcripcionales *ARR-B* (Zhang *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que miR160 es menos abundante en callos con alta capacidad regenerativa del SAM, comparados con aquellos incapaces de hacerlo. De la misma forma, el blanco de miR160, *ARF10* se asocia a la formación del SAM, debido a su acumulación en los sitios de formación de brotes y hojas (Quiao *et al.*, 2012).

Respecto a la vía tasiR-ARF, a pesar de ser una vía conservada evolutivamente, esencial durante el desarrollo de la planta, el único trabajo publicado que utiliza como modelo la regeneración *in vitro* se refiere a la ES de *Dimocarpus longan* (llamado ojo de dragón). En este trabajo se reportó que miR390 participa en la biogénesis de tasiRNAs derivados de las familias *TAS3* y *TAS4* en este árbol de la familia *Sapindaceae*. Los transcritos precursores poseen una baja acumulación en la etapa de embrión cotiledonar y una mayor en la etapa globular (Lin *et al.*, 2015). En otros trabajos, aunque la vía tasiR-ARF no ha sido explorada completamente, se ha descrito una expresión diferencial de miR390 dependiente del tejido. En naranja y algodón, miR390 es más abundante en el embrión somático globular, mientras que en *Larix leptolepis* se acumula más en los embriones somáticos en estadio cotiledonar.

Planteamiento del problema

Dado que el proceso de regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz involucra la formación de órganos en respuesta a cambios de la presencia de hormonas y luz, se espera que la regulación por RNAs pequeños participe en la modulación de los niveles de factores de transcripción involucrados en señales de posición que permitan el establecimiento del patrón corporal. En la regeneración de la variedad Tuxpeño, se han estudiado únicamente algunos miRNAs relacionados a estrés y desarrollo, mientras que la función de la vía de los tasiRNAs en este proceso es desconocida. Por esto el análisis de la vía tasiR-ARF, que está involucrada en el establecimiento de la polaridad de órganos y desarrollo de estructuras vegetales, resulta relevante para entender el éxito de la regeneración *in vitro* de maíz.

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Dado que la vía tasiR-ARF posee un rol importante en la formación del patrón y desarrollo de estructuras vegetales, esta vía tendrá una expresión espacio-temporal diferencial durante la regeneración de callos embriogénicos de maíz para regular los transcritos correspondientes a *ARF3*.

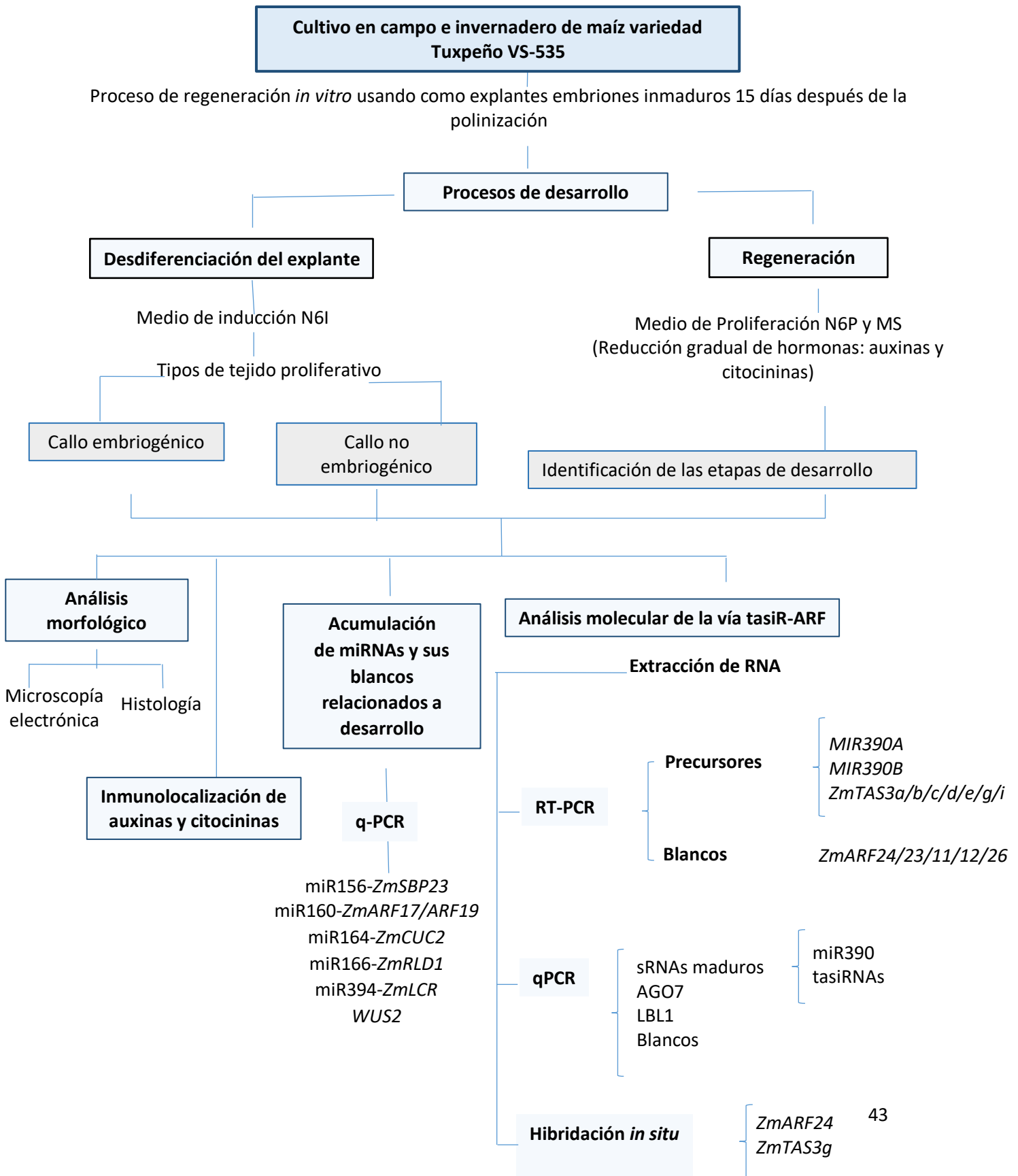
OBJETIVO GENERAL

Determinar la acumulación de los componentes de la vía tasiR-ARF, miRNAs de desarrollo y la regulación de sus transcritos blanco durante la dediferenciación celular y regeneración *in vitro* de plantas de maíz variedad Tuxpeño (VS-535).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el modelo experimental de callo embriogénico de maíz para su inducción, subcultivo y regeneración.
- Caracterizar morfo e histológicamente los tipos de callo y etapas de regeneración de la plántula.
- Evaluar la abundancia de miRNAs y sus transcritos blanco involucrados en desarrollo en los diferentes tipos de callos y etapas de regeneración de plántulas.
- Analizar la acumulación de miR390, transcritos *TAS3*, *AGO7*, *LBL1*, tasiR-ARF y los cinco parálogos de de *AtARF3* en las etapas de callo y regeneración de planta de maíz.
- Identificar la disposición espacial de auxinas y componentes de la vía tasiR-ARFs que muestren expresión diferencial durante las etapas de desarrollo establecidas.

CAPÍTULO IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Materiales y métodos

1. Establecimiento del modelo experimental de callo embriogénico de maíz para su inducción, subcultivo y regeneración.

Para la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos se empleó la variedad de maíz Tuxpeño (VS-535) desarrollada por el INIFAP (Márquez-Sánchez, 2008). Para la inducción de los callos se utilizaron embriones inmaduros de 15-18 días después de la polinización (ddp). Los embriones se colocaron en el medio N6I (medio basal, 2mg/L de 2,4-Diclorofenoxiacético [2,4-D]) y se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad por 3 semanas, hasta la formación de callos. Se pudieron distinguir tres tipos de callos derivados del embrión denominados: callo embriogénico (CE), callo no embriogénico amarillo (CNE-A) y callo no embriogénico blanco (CNE-B) (**Fig.14A**). Los callos (se trataba de mantener únicamente el CE y el CNE-A, debido a que el CNE-B crece de forma masiva y se asocia con aberraciones en la regeneración) fueron subcultivados en medio de proliferación N6P por 8 meses (medio basal con 2mg/L de 2,4-D y benciladenina (BA) 0.3 mg/L) (N6P 100% hormonas) (**Fig.14B**). Para la regeneración, los callos se subcultivaron en medio N6P reduciendo en dos etapas la concentración de la auxina sintética 2,4-D y la BA. En la primera etapa se redujeron las hormonas a la mitad de su concentración con respecto al medio N6P (N6P 50% hormonas, 1mg/L de 2,4-D y 0.15 mg/L de BA). Se tomó 1 g de tejido (callo) para subcultivar en cada frasco con medio de cultivo y se colocó en fotoperiodo (16:8 h luz/oscuridad). Una semana después del subcultivo se tomaron muestras del callo que contenían los puntos regenerativos y se mantuvieron a -70°C para su procesamiento. Los callos se mantuvieron una semana más en el medio N6P 50% hormonas (**Fig.14C**). Posteriormente, los callos regenerativos se subcultivaron en medio N6P sin auxina 2,4-D ni BA (N6P 0% hormonas) y a la semana del subcultivo se tomaron las muestras, lo que corresponde a la segunda etapa de regeneración. Siete días después, las estructuras regenerativas se subcultivaron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) y también a la semana de subcultivo se tomaron las muestras que constituyen la tercera etapa de regeneración. Aproximadamente una semana después se colectaron las plántulas ya desarrolladas. Este proceso de regeneración duró aproximadamente 42 días (**Fig.14 C**). La composición de los medios de cultivo se describe en el **Anexo I**.

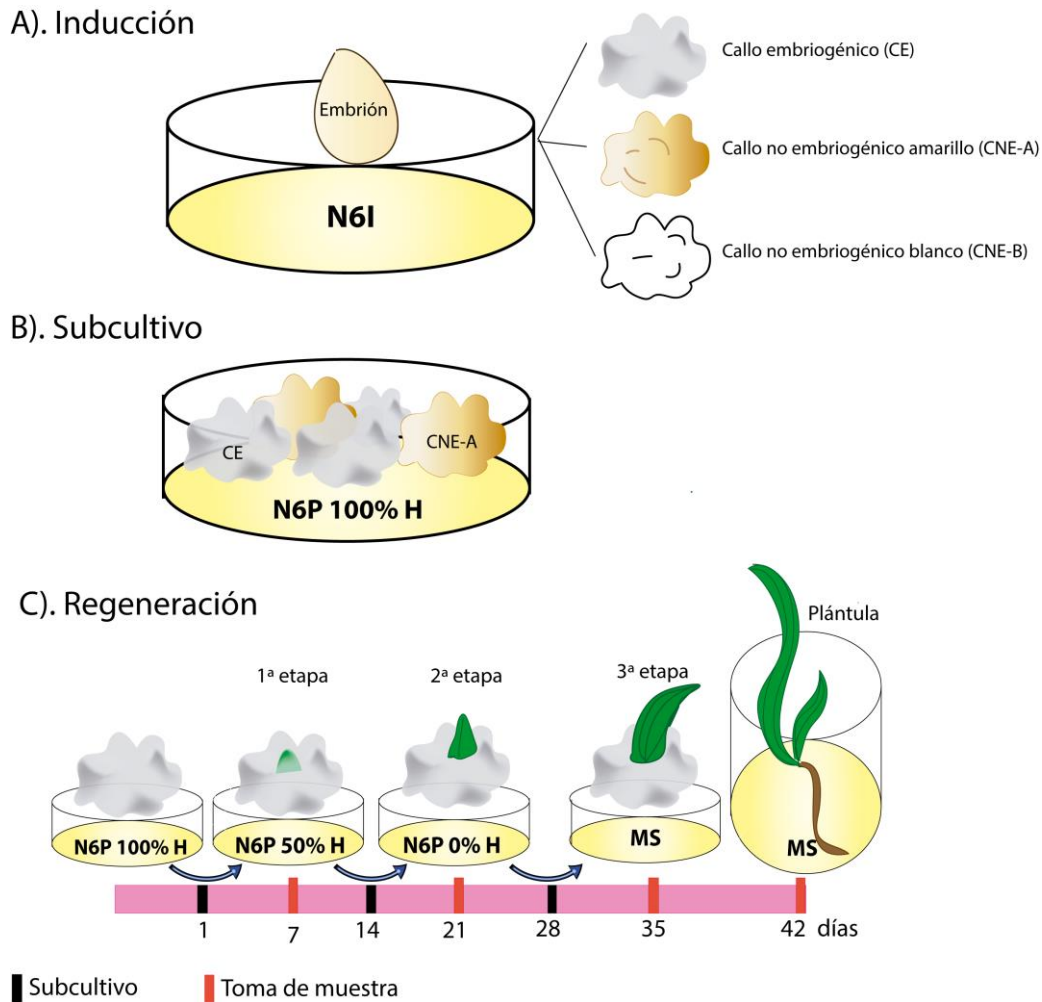


Fig. 14. Representación de los procesos de inducción, subcultivo y regeneración de callos de maíz. A). Después de la inducción, usando como explante embriones inmaduros, se pudieron identificar tres tipos de callos. B). Durante los subcultivos se empleó el medio de cultivo N6P 100% hormona (N6P 100% H). Se subcultivaron únicamente los callos CE y CNE-A. C) Durante el proceso de regeneración se llevaron a cabo tres subcultivos cada dos semanas en los medios N6P 50% hormonas (N6P 50% H), N6P 0% hormonas (N6 p 0% H) y MS respectivamente. La toma de muestra se realizó una semana después de cada subcultivo.

2. Caracterización morfológica e histológica de los tipos de callo y las etapas de desarrollo durante la regeneración.

Los tipos de callo, subcultivados durante 8 meses y las etapas de desarrollo durante la regeneración de estos callos se siguieron mediante un microscopio estereoscópico y se observaron con microscopía electrónica de barrido. Además se realizó un análisis histológico de las muestras (Anexo II). De forma adicional, se realizaron cinéticas de crecimiento del CE y CNE empleando el peso fresco y peso seco. Inicialmente se pesaron 0.5 g de cada tipo de callo y se registró la diferencia de peso de los mismos dos veces a la semana por 28 días en el mismo medio de cultivo. Para el peso seco se

utilizó el mismo material del peso fresco, pero se mantuvo a 60°C por 24 h. Por otra parte las hojas de las plántulas obtenidas por regeneración *in vitro* fueron comparadas morfológicamente con las hojas de plántulas obtenidas al final de 14 días de germinación (**Anexo III**).

3. Extracción de RNA, transcripción reversa y qPCR.

Las muestras de tejido obtenidas de los mismos callos y etapas de regeneración que se utilizaron para el análisis morfológico se pulverizaron en nitrógeno líquido. La extracción de RNA total se realizó usando el método de TRIzol® Reagent (Invitrogen). Para separar los RNAs > 200 nt y los de 17-200 nt se utilizó el kit *RNA clean and concentrator*™ Zymo Research. Para la síntesis de cDNA de sRNA se utilizó la técnica de reacción pulsada multiplex que consiste en la síntesis de cDNA de hasta cinco sRNAs y el snRNA U6 como control interno. El protocolo para evaluar la expresión de miRNAs u otros sRNAs, así como sus transcritos blancos en tejidos caracterizados durante la regeneración de maíz se describe con detalle en el **Anexo X** (López Ruiz *et al.*, 2018). Así mismo se explica cómo se diseñan los oligonucleótidos tipo tallo-asa requeridos para la síntesis de cDNA a partir de sRNAs. La lista de oligonucleótidos y las curvas de calibración se muestran en el **Anexo IV**.

4. Inmunolocalización de auxinas y citocininas

La preparación de las soluciones se describe en el **Anexo V**.

a) Fijación de las muestras

Las muestras se colocaron en un tubo eppendorf con 1.5 ml de solución de fijación (3% de paraformaldehído y 0.5% de glutaraldehído en MTSB 1x suplementado con 0.1% de Tritón X-100). La relación medio de fijación/explante debe ser 10:1. Se aplicó vacío (20'' Hg) por 30 min, verificando que el tejido estuviera completamente sumergido. Se retiró el vacío y se continuó la fijación 2.5 horas a 4°C. Las muestras se lavaron con agua destilada 10 minutos.

b) Deshidratación.

La deshidratación se realizó mediante soluciones sucesivas de etanol durante 60 min a 4°C. Se inició con una solución al 10% hasta llegar al 100%.

c) Pre-infiltración

La solución de pre-infiltración consta de *Technovit 7100 Basic solution* y SFD 1:1v/v. Las muestras se colocaron en esta solución y se incubaron 2 h a temperatura ambiente.

d) **Infiltración**

Las muestras se colocaron en solución de infiltración (se mezcla 100 ml de Technovit 7100 basic solution más *Technovit 7100 hardener 1* dejando disolver por 4 h).

e) **Polimerización**

La solución de polimerización se prepara mezclando solución de infiltración con *Technovit 7100 Hardener 2* en relación 15:1 y se mezcla por 3 min. En recipientes de plástico, adecuados para el micrótopo, se acomodaron los tejidos, de forma independiente, y se agregaron 2 ml de esta solución. Se dejó polimerizando 2 h a 37°C (Herrera-Ubaldo & De Folter, 2018).

f) **Fortalecimiento del bloque.**

Se preparó la solución que le dará firmeza al bloque: *Technovit 3040* 2:1 polvo: líquido v/v. Inmediatamente se colocó 1 ml de esta solución en los recipientes de plásticos.

g) **Cortes**

Una vez que los bloques se endurecieron (48 h en oscuridad), se realizaron cortes de 12 μ m en el micrótopo. Se recolectaron los listones en una caja de 24 pocillos de agua MilliQ fría.

h) **Bloqueo**

Se retiró el agua del pocillo que contenía las muestras y se reemplazó con 500 μ l de solución de bloqueo (2% BSA en MTBS 1x). Se incubó tres veces por 10 minutos cada uno.

i) **Incubación con el anticuerpo primario.**

Se reemplazó la solución de bloqueo con solución del anticuerpo primario (anti-IAA o anti-trans zeatina, *OlChemIm s.r.o*) al 1%. El anticuerpo se preparó en solución de bloqueo suplementado con Tween 20 0.025%. Se incubó toda la noche, sin agitación a 25°C. Se colocaron controles de cada tejido sin el anticuerpo primario. Pasado el tiempo, se lavó 2 veces por 5 min con 500 μ l de MTBS 1X.

j) **Incubación con el anticuerpo secundario**

A cada pozo se agregaron 500 μ l del anticuerpo secundario (1:1000) en buffer de bloqueo. Este anticuerpo tiene conjugado a la proteína GFP. Se incubó en buffer de bloqueo. Se lavó 3 veces por 5 min a temperatura ambiente (TA).

k) **Montaje**

Las muestras se transfirieron a los portaobjetos con una gota de glicerol 20%. Se cubrió con un cubreobjetos y se observó en un microscopio confocal. Se analizó lo antes posible, ya que la muestra va perdiendo la fluorescencia.

5. Hibridación *in situ*

El presente protocolo de hibridación *in situ* se realizó de acuerdo a Serwatowska, J. (2012), sin embargo también puede emplearse el protocolo de Javelle *et al.*, (2011).

Preparación de las muestras

1. Fijación.

Los tejidos se fijaron en Formaldehido-Ácido acético-Etanol (FAE) (ver **Anexo VI**), preparado en el momento, por 24 h a TA.

2. Deshidratación

La deshidratación se realizó gradualmente con etanol absoluto y agua tratada con DEPC a TA:

- a) Etanol 30% 2 h. Desechar.
- b) Etanol 50% 2 h. Desechar.
- c) Etanol 60% 2 h. Desechar.
- d) Etanol 70 %2 h. Desechar (Es posible dejar las muestras toda la noche a 4°C).
- e) Etanol absoluto 2 h. Desechar.
- f) Etanol absoluto 2 h. Desechar.
- g) 75% etanol absoluto - 25% *histoChoice clearing agent* (Sigma Aldrich).
- h) 50% etanol absoluto - 50% *histoChoice clearing agent*.
- i) 20% etanol absoluto - 75% *histoChoice clearing agent*.
- j) 100% *histoChoice clearing agent*.
- k) 50% histoclear - 50% paraplast (Sigma Aldrich) incubar toda la noche a 58°C.
- l) Tirar la parafina, rellenar con parafina nueva (previamente derretida toda una noche). Incubar toda la noche a 58°C.

3. Montaje

- a) A los moldes se les vertió paraplast líquido a la mitad de su volumen. La muestra se colocó cuidadosamente dependiendo de la orientación que se deseara. Se rellenó con paraplast líquido el resto del molde.
- b) Las muestras se dejaron a 4°C para que solidificaran.

4. Cortes

- a) Después de desmoldar los bloques, se realizó una pirámide de la muestra, esto es, acotando la muestra dentro de la parafina mediante cortes hechos con bisturí o navaja de un solo filo, cuidando de no dañar el tejido.
- b) Se realizaron cortes en el micrótopo rotativo (Leica) a 8 µm de grosor. Las tiras de cortes se colocaron en una cartulina negra y se observaron en un microscopio óptico. Las muestras deseadas se colocaron en una tina con agua DEPC a 45°C y se colocaron en los portaobjetos de polilisina (Sigma Aldrich). Para estó, se colocaron 250 µl de agua a 45°C en el portaobjetos y cuidadosamente se puso encima la tira de lo cortes. Se cuidó la orientación: el lado brillante del corte (el que queda por debajo al hacer los cortes) es el que va hacia el portaobjetos al recogerlo.
- c) Se fijaron los cortes colocando los portaobjetos a 40° C toda la noche. Los cortes se usarán día siguiente y solamente durante 1 semana.

Generación de la sonda

La sonda se generó mediante una reacción de transcripción *in vitro* (Kit Roche). Se usó como DNA molde un plásmido linearizado, con las siguientes características:

- Un promotor para la RNA polimerasa.
- Una secuencia parcial del gen de interés con orientación antisentido y sentido (control negativo).

Nota: La sonda también puede generarse mediante amplificación por PCR utilizando la secuencia de los promotores T7 o SP6 en el extremo 5' del *primer* reverso (Javelle *et al.*, 2011).

a. Diseño de oligonucleótidos y reacción de PCR punto final

1. Para la síntesis de la sonda se diseñaron nuevos oligonucleótidos para *ZmARF24* y *TAS3g*. Para *ZmARF24*, los oligonucleótidos abarcan un fragmento de 497 pb y para *TAS3g* de 412 pb (**Anexo VII**). En ambos casos se respetaron los sitios de unión o producción de los tasiRNAs y de miR390.
2. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l con la siguiente composición: 2 μ l de amortiguador 10x, 1.8 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 0.4 μ l de dNTPs 10 mM, 0.2 μ l de cebador forward 10 mM y 0.2 μ l de cebador reverse 10 mM, 0.3 μ l de *Taq DNA Polimerase* (Fermentas), 1 μ l de DNA (50 ng) y 14.1 μ l de agua tratada con DEPC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de pre-desnaturalización de 2 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de amplificación del fragmento: desnaturalización a 94°C por 15 s, alineamiento de los oligonucleótidos a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Por último, un ciclo de extensión final de la cadena a 72°C por 10 min. Cada producto de PCR fue separado en un gel de agarosa 1% en solución TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.

b. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa y clonación del producto de PCR en el vector *pGEM-T Easy*.

Los productos de PCR fueron purificados usando el *kit QIAquick Gel Extraction*, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Qiagen). El DNA purificado se ligó en el vector *pGEM-T Easy* vector en una relación 8:1 del inserto: vector. La reacción de ligación se muestra a continuación:

Tabla 9. Reacción de ligación

Reactivo	Cantidad
Buffer 2x	5 μ l
<i>pGEM-T EASY vector</i>	1 μ l
Inserto	1.2 μ l (20-25 ng)
T4 DNA ligasa	1 μ l
H2O	1.8 μ l

La reacción se incubó 24 h a TA. Después se procedió a transformar células competentes de *E. coli* JM109 por choque térmico. Las células competentes fueron descongeladas 5 min antes de usar y mantenidas en hielo. Se agregaron 50 µl de las células al tubo de reacción del producto de ligación y se mezcló gentilmente. Se colocaron los tubos en hielo por 30 min y posteriormente se colocaron en un *thermomixer* a 42°C por 45-50 s. Inmediatamente se regresó el tubo al hielo por 2 min. A los tubos se les adicionó 900 µl de medio LB y se dejó incubando 37°C por 90 min a 150 rpm. Se colocaron 100 µl del cultivo transformante en una caja Petri con LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. A las cajas Petri con medio LB y ampicilina (100 µg/ml) se les agregaron 100 µl de IPTG (100 mM) y 20 µl de X-Gal (50mg/ml), estos componentes se extendieron en la caja y se esperó hasta que el líquido fuera absorbido antes de sembrar las bacterias. Posteriormente las cajas se incubaron 24 h a 37°C. Se analizaron 6 colonias blancas para verificar las que tenían el inserto mediante PCR de colonia. Posteriormente, se aisló DNA plásmidico utilizando el *kit Gen Elute Plasmid Miniprep* de acuerdo a las instrucciones del fabricante, partiendo de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB con ampicilina. La confirmación de la inserción se realizó mediante PCR y digestión enzimática usando la enzima *EcoRI*. Adicionalmente, los plásmidos se mandaron secuenciar a la Unidad de Secuenciación del IBT usando oligonucleótidos para el promotor T7. Con los resultados de la secuenciación se verificó el sentido del inserto y se determinó qué enzima se debía utilizar para la sonda sentido y antisentido de cada transcrito. Se decidió emplear la enzima *NcoI* para conservar el promotor para la RNA Pol T7 y la enzima *NdeI* para el promotor de la RNA Pol SP6 (**Anexo VII**).

c. Transcripción *in vitro*

1. Se linearizaron 5 µg de plásmido en un volumen final de 50 µl. La linearización se hizo dependiendo del sentido en el que estaba clonado el inserto en el vector y del promotor bajo el cual quedaba orientado (**Anexo VII**). Previamente se comprobó que el sitio para la digestión no se encontrara en el resto de la construcción.
2. Se comprobó que la digestión haya sido completada resolviendo 1 µl de la digestión en un gel de agarosa al 0.8%.
3. Se precipitó el plásmido:
Se cuantificó el DNA y se agregaron cantidades adecuadas de acetato de sodio 3M y etanol absoluto para obtener una concentración final de etanol al 70% y acetato de sodio 0.3M. Se mantuvo en hielo 10 min y se agregó 1µl de tRNA de levadura 10 mg/ml. Se mezcló la reacción y se centrifugó 15 min 12K rpm a 4°C. Se visualizó el pellet en el fondo del tubo y con cuidado se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70%. Se incubó 5 min a TA y se centrifugó 12K rpm 5 min. Se eliminó el DNA y se dejó secar. El pellet se resuspendió en 15 µl de buffer TE. Se cuantificó y se verificó en un gel de agarosa 0.8 %.

4. Para llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro* se usó un máximo de 2 µg de DNA, para no inhibir la reacción. La reacción se dejó incubando 90 min a 37°C (Tabla 10).

Tabla 10. Componentes de la reacción de transcripción *in vitro*

Componente	Volumen
DNA	X µl (completar a 13 µl de agua)
Buffer de transcripción 10x	2 µl
DIG-labelling mix 10x	2 µl
RNAasin	1 µl
Polimerasa SP6 o T7	2 µl

5. Se tomó 1 µl de la reacción y se conservó para verificarlo en un gel de agarosa.
6. A los 19 µl restantes se les añadió 1 µl de DNAsa. Se incubó 15 min a 37°C. Se tomó 1 µl de la reacción y se cargó en el gel de agarosa con el fin de verificar si se eliminó el DNA de la reacción.

Nota. Las sondas mayores a 250 bases pueden ser parcialmente hidrolizadas para obtener moléculas de RNA de aproximadamente 150 nt. Esto facilita la entrada de la sonda en el tejido y permite que la temperatura de hibridación no sea una limitante, dando buenos resultados finales. El protocolo completo se encuentra en Javelle *et al.*, 2011.

7. El resto de la sonda se precipitó toda la noche a -20°C añadiendo:

- 1 µl de t-RNA 10 µg/ µl
- 25 µl de acetato de amonio 7.5 M
- 220 µl de etanol absoluto

8. La sonda se centrifugó 15 min 13K rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante.
9. Se lavó con 500 µl de etanol 70% invirtiendo el tubo algunas veces. Se centrifugó 5 min 13K rpm 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Se resuspendió en 10 µl de agua DPC.
10. Se tomó 1 µl del punto anterior y se realizó la primera dilución (1/10). A los 9 µl restantes se añadieron 91 µl de tampón de hibridación (previamente calentado a 50°C) (Anexo VI). La sonda se almacenó a -20°C. Las diluciones que se emplearon para la inmunodetección a pequeña escala fueron: 1/100, 1/1000 y 1/10000.

Nota: El tampón de hibridación precipita a TA, por lo que al sacarlo de -20°C se debe poner de inmediato en el termomixer a 50°C, usarlo y guardarlo directamente a -20°C.

Inmunodetección a pequeña escala

Para la determinación del rendimiento y el cálculo de la dilución de la sonda se cortó un trozo de membrana Hybond N+. Se rotularon las diluciones con lápiz.

Se aplicó 1 µl de cada dilución y se dejó secar. Se fijó la membrana en el *crosslinker* 5 s a 70.000 µl/cm².

1. Se colocó la tira en un tubo tipo falcón de 10 ml y se añadieron 5 ml de TBS 1x. Se agitó 2 min.
2. Se eliminó el TBS y se añadieron 5 ml del agente bloqueante (**Anexo VI**). Se agitó 10 min.
3. Se eliminó la solución y se añadieron 6 ml de 1% BSA, 0.3% v/v, Tritón 10% en TBS 1X. Se incubó 5 min en agitación.
4. Se eliminó la solución, se añadieron 6 ml de la solución anterior y se agregaron 2 µl de anticuerpo anti-DIG. Se incubó por 20 min en agitación. Se desechó la solución.
5. La membrana se lavó con 6 ml de la solución 1% BSA, 0.3% v/v, Tritón 10% en TBS 1X. Se realizaron 2 lavados de 4 min cada uno.
6. Se eliminó la solución y se realizó un lavado de 5 ml con el tampón de detección (1:1) por 2 min.
7. Se eliminó la solución y la membrana se incubó con 5 ml del tampón de detección con 14 µl de NBT/BCIP.
8. Se agitó el tubo hasta que la señal apareció, se detuvo la reacción agua.

Prehibridación

1. Desparafinación de las muestras
 - i. Los portaobjetos se colocaron en una gradilla para portaobjetos (cabían aproximadamente 19 por gradilla). Se colocaron en una cubeta para tinción de vidrio con 250 ml de *histoChoice clearing agent*. Se incubó por 10 min a TA.
 - ii. Se eliminó el *histoChoice clearing agent* y se rellenó la cubeta con 250 ml de *histoChoice clearing agent* nuevo. Se incubó por 10 min a TA.
2. Se llevó a cabo la hidratación de las muestras usando las siguientes diluciones de etanol:
 - i. Etanol absoluto 2 min.
 - ii. Etanol absoluto 2 min.
 - iii. Etanol 96% 2 min.
 - iv. Etanol 70% 2 min.
 - v. Etanol 50% 2 min.
 - vi. Etanol 30% 2 min.
 - vii. Agua DPC 2 min.
 - viii. Agua DPC 2 min.
3. Hidrólisis ácida del tejido.
 - i. Se añadió a la cubeta 250 ml de HCl 0.2 M.
 - ii. Se incubó 20 min a TA sin que pasara de ese tiempo.
4. Lavados:
 - i. Agua DEPC 5 min a TA.
 - ii. Buffer SSC 2x 5 min a TA.
 - iii. Agua DEPC 5 min TA.
5. Incubación con la proteinasa K.

- i. A 250 ml de buffer proteínasa K, previamente calentado a 37°C, se añadió 1µg/ml de proteínasa K. Se agitó con la punta de una pipeta.
- ii. La cubeta con los portaobjetos se incubó a 37°C por 15 min, (se checó la temperatura con un termómetro previamente limpiado con etanol absoluto).
6. Se realizó un lavado con 250 ml de PBS 1X 2 min a TA.
7. La proteínasa K se bloqueó incubando 2 min a TA 300 ml de PBS 1x con glicina (0.6 g en 300 ml).
8. Se refijaron las muestras en formaldehído:
 - i. A la cubeta se le agregó formaldehído 4% en PBS1x a TA por 10 min.
9. Se realizaron dos lavados en PBS 1x durante 5 min cada uno a TA.
10. Deshidratación del tejido
 - i. Agua DEPC 2 min.
 - ii. Agua DEPC 2 min.
 - iii. Etanol 30% 2 min.
 - iv. Etanol 50% 2 min.
 - v. Etanol 70% 2 min.
 - vi. Etanol 96% 2 min.
 - vii. Etanol absoluto 2 min.
 - viii. Etanol absoluto 2 min.
11. La gradilla con los portaobjetos se retiró de la cubeta y se puso sobre papel secante. La gradilla se envolvió con papel-servilleta y se colocó en una campana con el flujo encendido por 1-2 h.

Hibridación

1. Se colocaron la sonda y los tubos de tampón de hibridación en el *termomixer* a 55°C.
2. Los portaobjetos se calentaron a 55°C sobre una parrilla térmica.
3. A un tubo de tampón de hibridación se añadió el volumen de sonda que se había calculado en la cuantificación. Se agitó y se colocó de inmediato a 80°C. Se dejó incubar por 2 min.
4. Se colocó de nuevo el tubo con la sonda a 55°C. Se tomaron 200 µl y se colocaron sobre uno de los portaobjetos que se estaba calentando en la placa.
5. Se hizo un “*sándwich*” colocando sobre el portaobjetos otro portaobjetos con tejido procurando que no quedaran burbujas.
6. Los *sándwiches* se colocaron dentro de una caja húmeda de manera que los portaobjetos no cayeran sobre el papel *Whatmann* (las cajas húmedas son cajas para almacenar portaobjetos en las cuales se colocan trozos de papel *Whatman* humedecido con solución de lavado: 2x SSC-50% formamida).
7. Las cajas húmedas se cerraron, se envuelvieron en film plástico y se introdujeron en el horno de hibridación que se había estabilizado previamente ~53°C. Se incubó toda la noche.

Lavados

1. Se colocó solución de lavado en un vaso de precipitados de 50 ml y el resto se repartió en las cubetas (250 ml c/u). Se calentó a 53°C antes de utilizarse (puede dejarse en la incubadora un día antes).
2. Con la solución de lavado en el vaso se separaron los portaobjetos, cuidando de no arrastrarlos uno contra otro. Se colocaron los portaobjetos en las gradillas.
3. Las gradillas se colocaron en la cubeta con la solución de lavado, previamente calentada. Se incubaron por 90 min a 53°C. Pasado el tiempo se colocaron los portaobjetos en solución de lavado nueva por 90 min a 53°C.

Inmunodetección

1. Las cubetas se dejaron a TA por 15 min. Se eliminó la solución de lavado y se añadió TBS 1x 5min a TA.
2. Los portaobjetos se colocaron en jarras Coplin y se añadió el agente bloqueante. Se dejó incubar 60 min a TA. Esta solución puede reusarse 3 veces.
3. Se realizó un lavado en solución BTT por 30 min a TA.
4. Se preparó el anticuerpo anti-DIG en solución BTT (16.7 µl por cada 50 ml de solución). Se dejó incubar toda la noche a 4°C.
5. Posteriormente, se lavó en solución BTT por 20 min a TA. Se realizaron dos lavados más con estas condiciones.
6. Se realizó un lavado en tampón de detección (mezcla A y B 1:1) 5 min a TA
7. Se añadió tampón de detección nuevo al que se le habían añadido 150 µl de NBT/BCIP. Se dejó incubar toda la noche en oscuridad, envolviendo las jarras Coplin en papel aluminio.

Observación de resultados

Al día siguiente se observan los portaobjetos en el microscopio. El tampón de detección con sustrato (NBT/BCIP) se cambió por tampón de detección nuevo sin sustrato antes de observarlo en el microscopio. Debido a que este tampón de detección corroe la platina del microscopio, se secan bien los portaobjetos antes de colocarlos. Cuando la señal es poca se agregó nuevo tampón de detección con sustrato (puntos 6 y 7 de la inmunodetección). En caso de buena señal la reacción se detuvo con agua, se colocó un cubreobjetos y se observó en el microscopio.

Análisis estadístico

Los resultados de qPCR fueron expresados como veces de cambio (*Fold change*) usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se consideró el callo embriogénico como el tejido de referencia y el RNAr 18S o el snRNA U6 como controles internos para el análisis de los transcritos o de los sRNAs respectivamente. Los resultados fueron un promedio de dos réplicas biológicas y al menos tres réplicas técnicas de cada una (6-12 mediciones). Se indica el error estándar en cada barra de las gráficas. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía (variable independiente: etapa de desarrollo; variable dependiente: abundancia del transcrito o del sRNA representada por las veces de cambio). Para las comparaciones múltiples, las diferencias entre las medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey empleando el programa *GraphPad Prism 6*.

CAPÍTULO V. RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación, en las primeras dos secciones, fueron publicados en la revista *International Journal Of Molecular Sciences* (López Ruiz et al., 2019. DOI: 10.3390/ijms20092079) (**Anexo X**).

1. Caracterización morfo-histológica de los tipos de callo durante los procesos de dediferenciación y la regeneración de plántulas.

Proceso de dediferenciación del embrión

De un cultivo en campo de maíz Tuxpeño VS-535 se cosecharon mazorcas 15-18 días después de la polinización para obtener embriones inmaduros para la inducción del callo. En el embrión, al colocarlo en medio de inducción con altas concentraciones de auxinas, se pudo observar la formación de dos tipos de masas celulares o callos que emergían de diferentes partes del explante. El primer tipo de callo surgía del escutelo (**Fig.15; D** indicado por las puntas de las flechas) y el segundo se distinguía del lado de la radícula, en oposición a la raíz emergida. (**Fig. 15; C, D** indicado por la flechas). Bajo microscopía electrónica de barrido (MEB) se observó que ambos tipos de callo presentaban una morfología celular diferente (**Fig. 15; H, I**). El callo derivado del escutelo se denominó callo embriogénico (CE) y el callo derivado de la radícula se denominó callo no embriogénico amarillo (CNE-A). Durante los siguientes subcultivos, fue posible identificar otro tipo de callo, del cual no se pudo identificar su origen y se denominó callo no embriogénico blanco (CNE-B). Estos tres tipos de callo presentan características morfo-histológicas particulares, como se describe a continuación.

Callo embriogénico (CE)

El callo embriogénico tiene una apariencia lisa, compacta, friable y es de color blanco translúcido (**Fig. 16; A**). Este es el único callo que tiene la capacidad de regenerar una plántula. Durante el proceso de regeneración presenta puntos localizados verdes en su superficie que marcan dónde se llevará a cabo la formación de la hoja.

Bajo el microscopio electrónico se observa que las células del callo presentan una morfología isodiamétrica (**Fig. 16; B**). Además, son visibles estructuras que sobresalen del callo tipo macropelos

(Fig. 17; A). Con el estudio histológico fue posible detectar, de igual forma, dos tipos de células: unas isodiamétricas sin núcleo aparente, en el centro del callo y otras de menor tamaño altamente nucleadas en la periferia (Fig. 16; C).

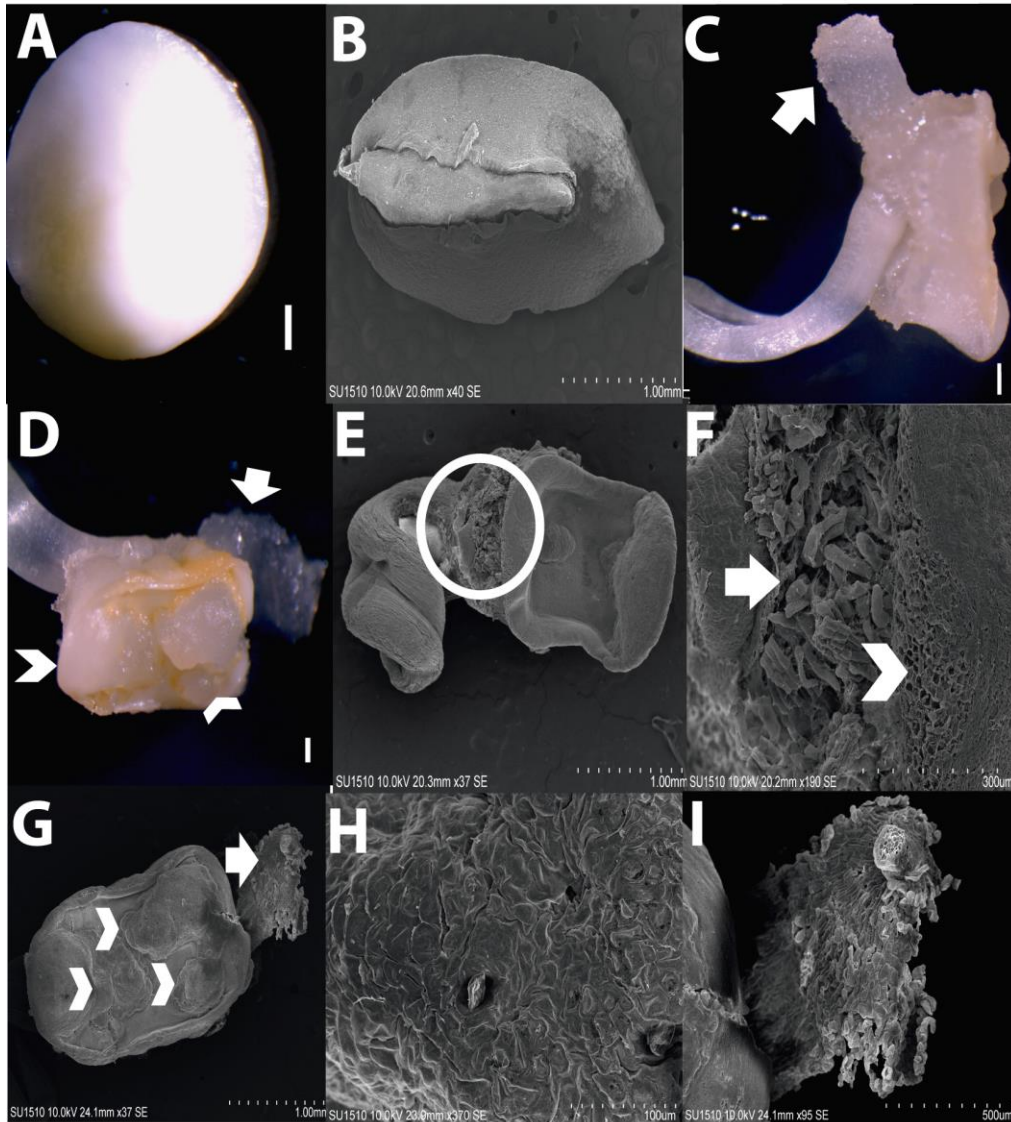


Fig. 15. *Origen de los diferentes tipos de callos derivados del embrión inmaduro del maíz Tuxpeño VS-535.* A. Embrión inmaduro (EI) 15-18 días ddp. B. El observado con MEB. C. El después de 7 días en medio N6I. D. El después de 9 día en medio N6I, se observa la protusión de la radícula y la formación de callo en diferentes partes del embrión. Las flechas indican el CNE-A y las puntas de las flechas indican el CE. E. El después de 7 días en medio N6I observado con MEB, F. Magnificación del área marcada en el círculo de la figura E. G. El después de 9 días en medio N6I observado con MEB. H. Magnificación de G en las zonas marcadas con la punta de las flechas. I. Magnificación de G en las zonas marcadas con las flechas. Barra=1mm.

Callo no embriogénico amarillo (CE-A)

Este tipo de callo se caracteriza porque tiene una superficie irregular, es muy acuoso (aguado), no es friable y es de color amarillo-café (**Fig. 16; D**). Tiende a proliferar masivamente en el medio N6P 100% de hormonas. En oscuridad desarrolla raíces, en fotoperiodo se oxida ligeramente y al parecer cesa la formación de raíces. Este callo es incapaz de formar una plántula (**Fig 19.2**). Bajo microscopia electrónica se nota una diferencia notable respecto al callo embriogénico. Las células que lo constituyen son alargadas de ~ 300 μm de longitud que se encuentran muy interespaciadas. Esto último podría explicar porque este callo no puede formar una planta debido a la escasa comunicación celular (**Fig. 16; E**). Con los cortes histológicos se notan células alargadas, pero sin núcleo aparente además fue posible identificar haces vasculares en el tejido (**Fig. 16; F**).

Callo no embriogénico blanco (CE-B)

El aspecto de este callo es color blanco opaco, textura lisa y es muy compacto (**Fig. 16; G**). Las micrografías electrónicas muestran un alto nivel de compactación celular a diferencia del callo no embriogénico descrito anteriormente (**Fig. 16; H**). Tanto en luz como en oscuridad puede formar raíces de forma masiva, por lo que se evita su pase entre los subcultivos, además se asocia a aberraciones en la regeneración, que impiden que la plántula se desarrolle (**Fig. 20; E**).

El análisis histológico ha develado que este tipo de callo se encuentra altamente vascularizado debido a la presencia de traqueidas (**Fig. 16; I**), un tipo de tejido secundario altamente especializado en el transporte de agua y minerales disueltos. Los tres tipos de callos pueden coexistir en el medio de cultivo, por lo que quizá el tejido vascular del callo blanco puede ser empleado por el callo embriogénico para el transporte de agua y soluciones del medio de cultivo. En la **fig. 17** se observan los tres tipos de callos observados con MEB, se aprecia que entre ellos su apariencia es muy diferente.

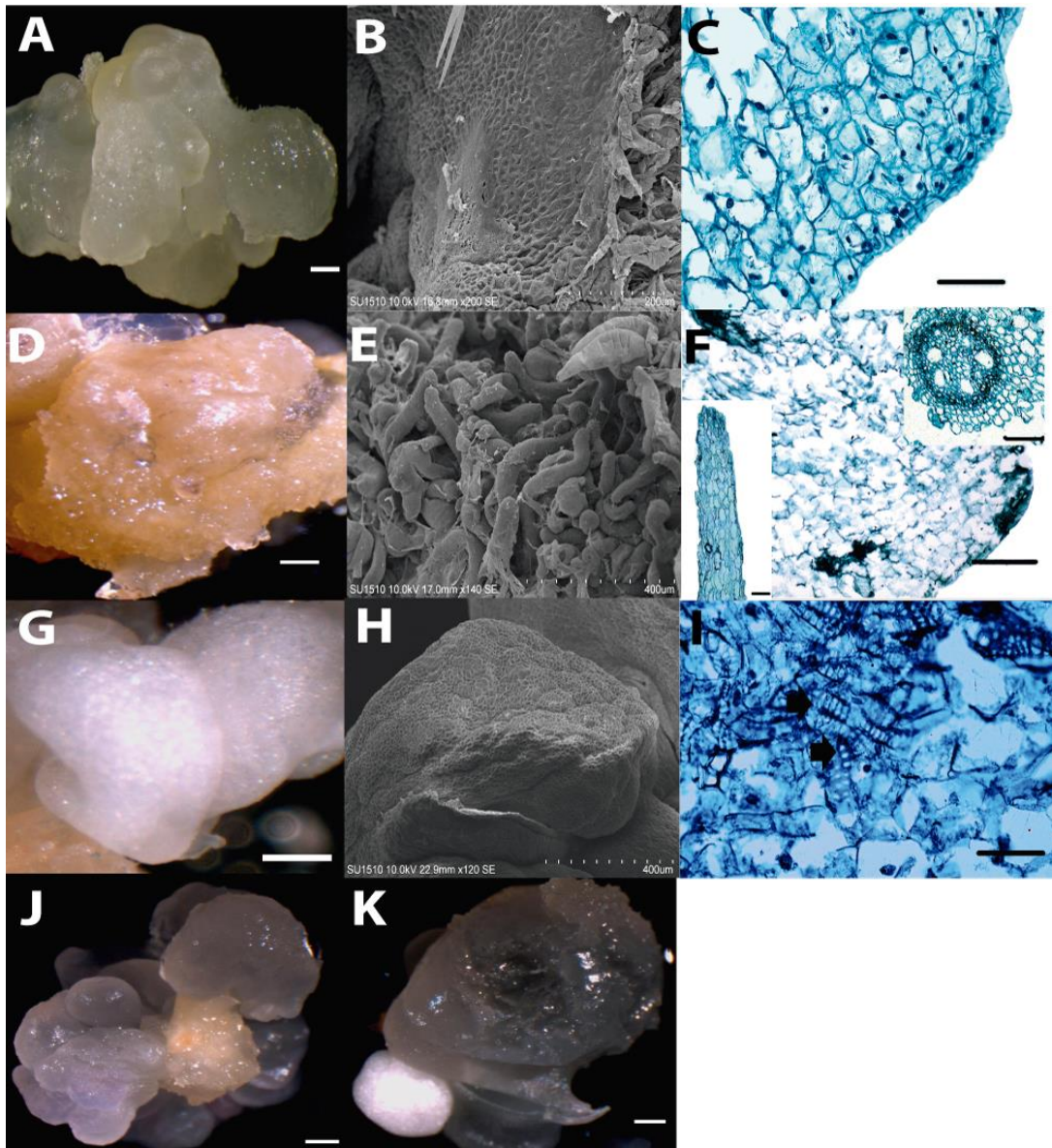


Fig. 16. *Tipos de callos observados durante el proceso de dediferenciación del E. coli.* **A.** CE. **B.** CE observado con MEB. **C.** Corte histológico del CE, se observan células con núcleo prominente. **D.** CNE-A. **E.** CNE-A observado con MEB. **F.** Corte histológico del CNE-A, se observan células con estructura amorfa, del lado izquierdo se aprecia un corte de una estructura tipo raíz derivada del callo; del lado derecho se muestran haces vasculares. **G.** CNE-B. **H.** CNE-B observado con MEB. **I.** Corte histológico del CNE-B donde se aprecian gran cantidad de traqueidas. **J y K.** Coexistencia de los tres tipos de callos. Los cortes histológicos tienen un aumento de x400. La barra en A, D, G y H =1 mm. La barra en C, F e I = 100 μm.

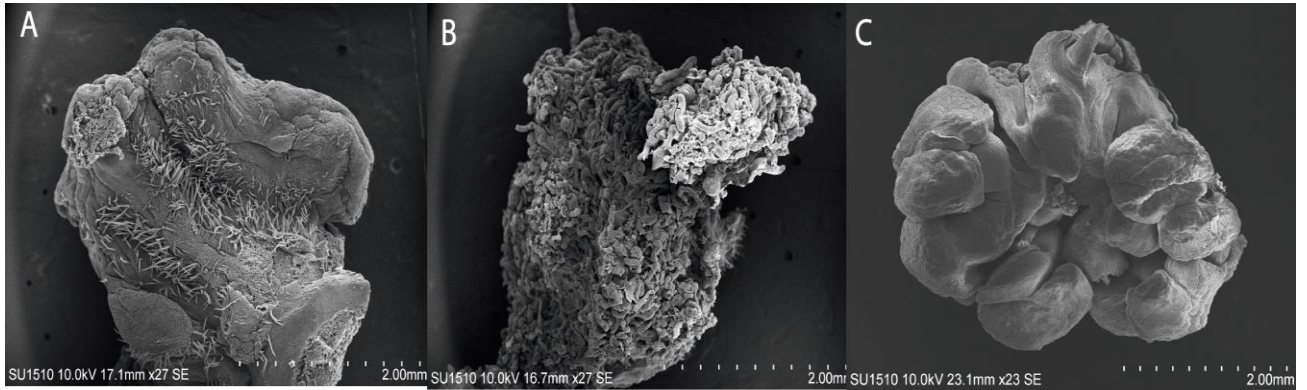


Fig. 17. Los tres tipos de callos observados con MEB. A. CE. B. CNE-A. C. CNE-B

Etapas de desarrollo durante la regeneración in vitro

Para la descripción del modelo de regeneración, los callos fueron subcultivados 8, 12, 20 y 24 meses y se sometieron al proceso de regeneración ya descrito para el maíz Tuxpeño VS-535. Con estos lotes se observó la reproducibilidad de las etapas de regeneración. Se identificaron cuatro etapas de regeneración: 1ª, 2ª, 3ª y plántula tal como se describe a continuación.

Primera etapa de desarrollo

La primera etapa de regeneración se colecta una semana después del subcultivo en medio N6P 50% hormona. Durante esta etapa son evidentes pequeñas protuberancias verdes (de aproximadamente 0.3 mm) (Fig. 18; A). Las micrografías electrónicas muestran que en la parte superior del callo, en la zona del reverdecimiento, las células presentan una morfología diferente (Fig. 18; B, C). Esto concuerda con los cortes histológicos que muestran una mayor proliferación celular en la parte apical, representado por células más pequeñas y nucleadas (Fig. 19; A, B). Otro aspecto interesante es que debajo de esta zona tipo meristemática se encuentran traqueidas, pero con una disposición desordenada (Fig. 19; C). Queda aún la interrogante si las células proliferativas en la parte apical del punto regenerativo presentan características de un meristemo apical del brote.

Segunda etapa de desarrollo

Siete días después de que los callos se subcultivaron en medio N6P sin hormonas es posible apreciar formas más alargadas en la periferia del callo de aproximadamente 1 mm de longitud. Esta estructura apical corresponde a la punta de la hoja enrollada sobre sí misma (Fig. 18; D). Las micrografías muestran que estos primordios de hojas están cubiertos de macropelos, características descritas como parte del lado adaxial de las hojas. Así mismo, fue posible distinguir como la superficie de esta estructura regenerativa adquirió el tipo celular típico de la epidermis (Fig. 18; E, F). Los cortes histológicos muestran células más parecidas a parénquima, que es el tejido de relleno y de sostén. Además son más comunes y visibles las traqueidas justo debajo del primordio de hoja, pero todavía se encuentran desordenadas. No existe indicio de un tipo meristemo apical radicular (Fig. 19; D, E, F).

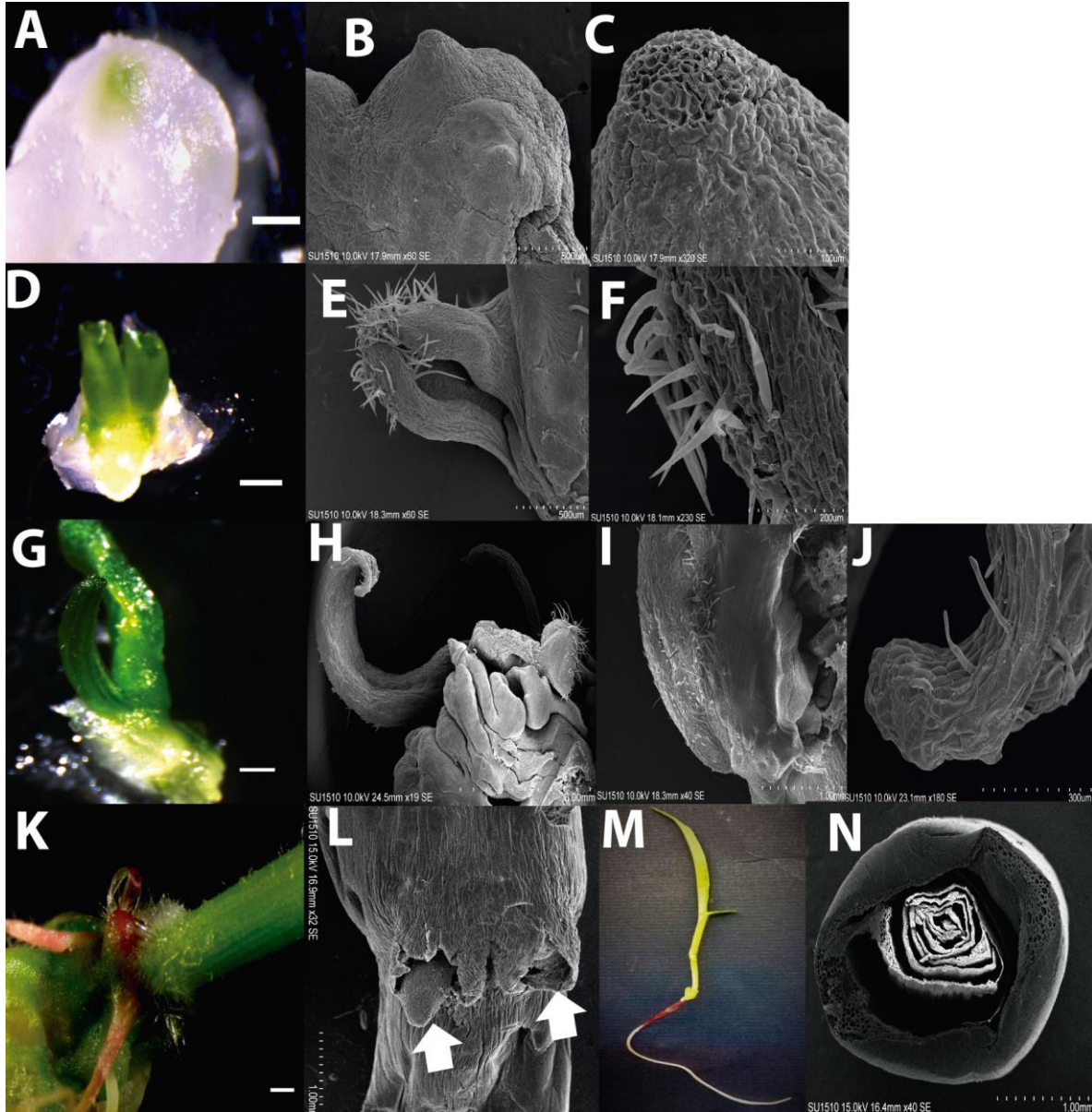


Fig. 18. *Etapas de desarrollo establecidas durante la regeneración del CE.* **A.** Puntos regenerativos observados en el CE subcultivado en medio N6P 50% hormonas y fotoperiodo (1ª etapa de regeneración). **B.** 1ª etapa observada con MEB. **C.** Magnificación de B. **D.** Crecimiento apical del punto regenerativo, que asemeja la punta de una hoja, subcultivada en medio N6P sin hormonas (2ª etapa de regeneración). **E.** 2ª etapa observada con MEB. **F.** Magnificación de E., la estructura presenta macropelos en su superficie. **G.** Diferenciación de la hoja, pero aún unida en el callo en medio MS (3ª etapa de regeneración). **H.** 3ª etapa observada con MEB. **I.** y **J.** Magnificación de H en la base y punta de la hoja. **K.** Tallo de una plántula regenerada dónde se aprecia el desarrollo de raíces. **L.** Emergencia de las raíces de la plántula obtenida *in vitro* observada con MEB. **M.** Plántula regenerada. **N.** Corte transversal del tallo de una plántula regenerada observada con MEB. Barra = 1mm.

Tercera etapa de desarrollo

Las estructuras regenerativas, subcultivadas en medio MS, presentan parecido a una hoja ya desarrollada, con las venaciones paralelas típica de las hojas de monocotiledóneas. El tamaño de esta estructura es de aproximadamente 3-6 mm y pueden presentarse una o dos hojas contiguas (**Fig. 18; G**). En esta etapa de desarrollo todavía no existen indicios de la formación de la raíz. La microscopía electrónica muestra que el tipo celular de esta estructura es muy diferente a la del callo, al que está todavía unido. Los tricomas no son tan evidentes (**Fig. 18; H-J**). El análisis histológico muestra que las traqueidas ya no están desordenadas, sino que comienza a alinearse, adquiriendo la forma de un sistema vascular maduro (**Fig. 19; G-I**, las traqueidas están indicadas por una flecha). Otras células que pueden notarse son las de epidermis clorofítico y posibles amiloplastos (**Fig. 19; H**)

Plántula

La última etapa de desarrollo se estableció cuando las hojas alcanzaron una longitud de 4-6 cm y finalmente emergieron las raíces, considerándola ya una plántula (**Fig. 18; K-M**). Este proceso se repitió en los tres lotes, tomando ~ 42 días para su formación. Estos resultados indican que es necesario el desarrollo inicial de las hojas y posteriormente la emergencia de las raíces, de no ser así, la plántula no se forma. Esto sucede porque las raíces en los medios de cultivo crecen muy rápido e invaden todo el sustrato, impidiendo una regeneración exitosa.

La morfología de las plántulas parece normal, sin embargo su desarrollo aún no está completo ya que en los cortes histológicos de la parte inferior del tallo aún el sistema conductor central no está formado y solo es posible distinguir el paquete de hoja enrollado (**Fig. 18; M y 19; N**). Otra diferencia importante es el ancho de las hojas, que es de 0.4-0.5 cm de ancho, lo que es reducido comparado con las hojas de una plántula germinada, que es de ~ 1.6 cm, además la vasculatura y los estomas son diferentes (**Anexo III**).

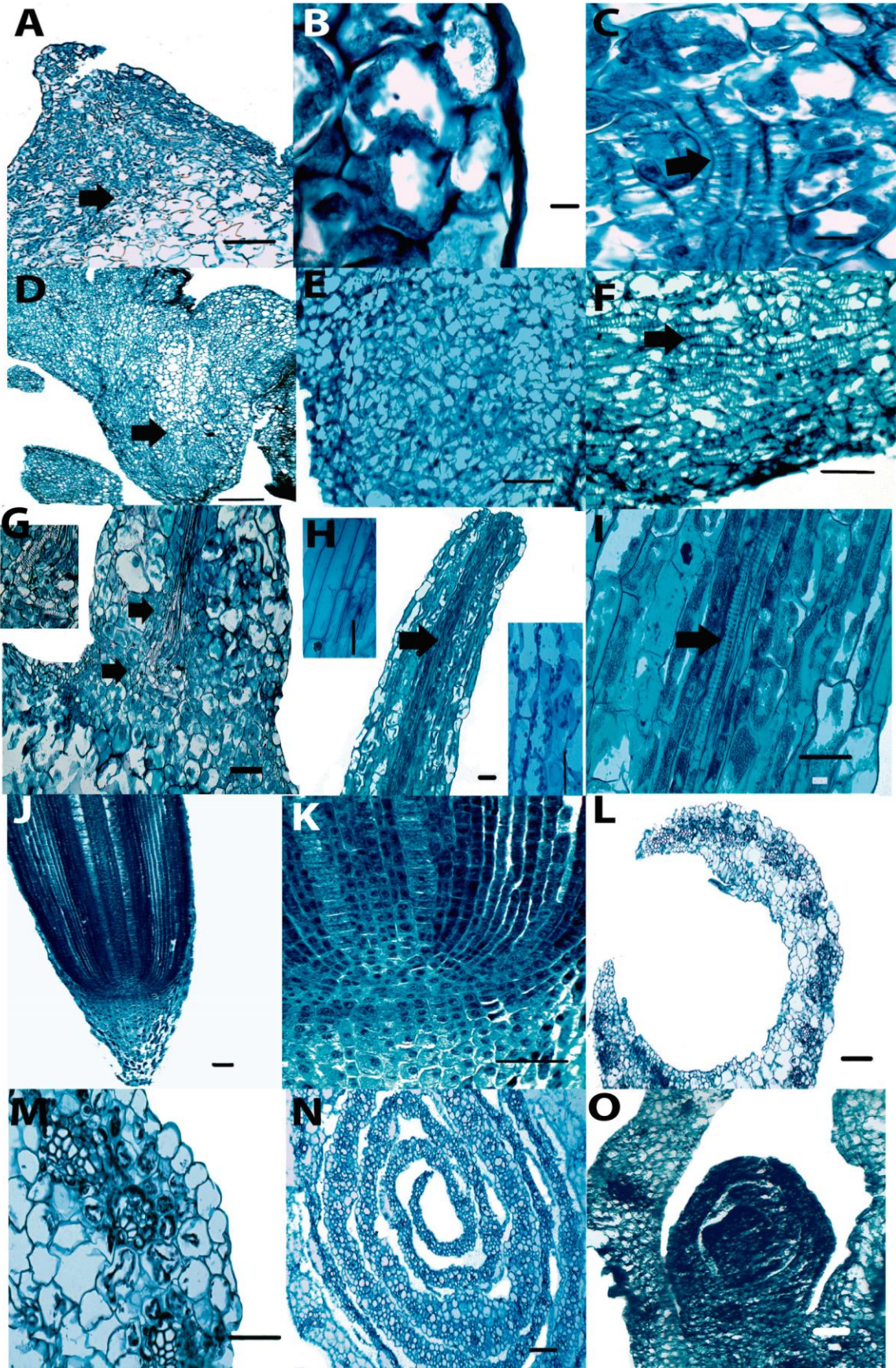


Fig. 19. Cortes histológicos de las etapas de regeneración. A. Sección longitudinal de la 1ª etapa de desarrollo (x400). Las flechas indican traqueidas aumentadas en C. B. Células meristemáticas presentes en el punto regenerativo (x1000). C. Traqueidas observadas en la base de los puntos regenerativos (X1000). D. Corte longitudinal de la 2ª etapa de regeneración (x100). Las flechas indican traqueidas ampliadas en F. E. Parte proliferativa de la 2ª etapa mostrando células meristemáticas (x400). F. Traqueidas osbervadas en D (X400). G. Corte longitudinal de la base de la hoja en la 3ª etapa de regeneración (x100). A la izquierda se muestra una amplificación de la zona que marcan las flechas indicando la presencia de traqueidas que comienzan a alinearse. H. Corte longitudinal de la punta de la hoja en la 3ª etapa (X100). A la derecha se muestran células tipo amiloplastos y a la izquierda clorenquima. I. Amplificación de H que muestra traqueidas alineadas (X400). J y K. Corte longitudinal de la raíz de la plántula regenerada *in vitro* con ampliaciones x100 y x400 respectivamente. El RAM puede ser observado. L y M. Corte longitudinal de una hoja con una ampliación de X100 y X400 respectivamente. Los haces vasculares pueden ser apreciados. N. Corte transversal del tallo de la plántula mostrando que no hay evidencia de haces vasculares centrales. O. SAM y primordios foliares observados durante un corte longitudinal del tallo de una plántula. Barra=100 µm, excepto en C dónde la Barra=20 µm.

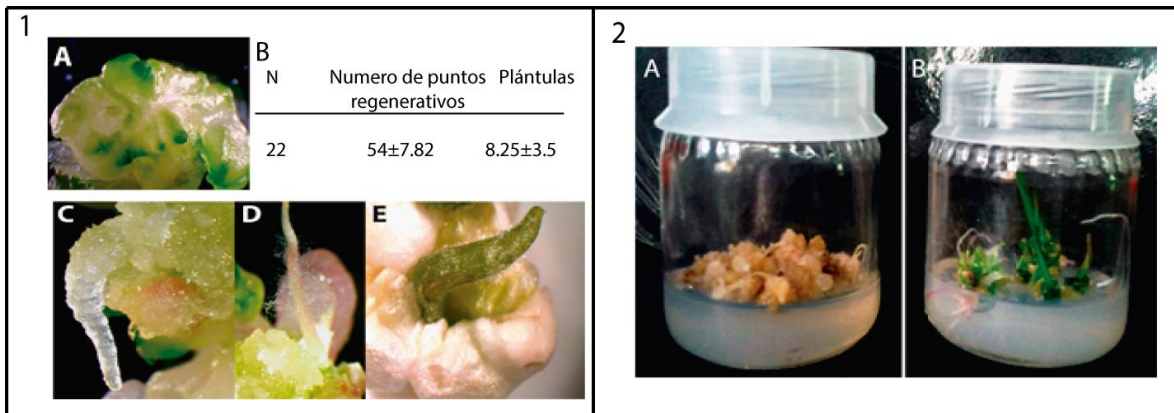


Fig.20. 1. A. Callo embriogénico con diversos puntos regenerativos en su superficie. B. Número de puntos regenerativos por 22 réplicas (22 frascos de cultivo cada uno con 1 g de callo). C. Estructuras tipo raíz que derivan del CNE-A en medio N6P 50% hormona. D. Raíz desarrollada del CNE-A en medio N6P sin hormonas. E. El CNE-B se asocia a estructuras regenerativas aberrantes que no culminan en la formación de una plántula. 2. Comparación entre el CNE-A y el CE después de 42 días en las condiciones de regeneración (reducción gradual de hormonas y fotoperíodo).

Comparación de la embriogénesis cigótica y la regeneración de las plántulas a partir de callos de maíz

De manera general se observó, de forma reproducible, que la regeneración de plantas a partir de células somáticas sigue un patrón de desarrollo de hoja, por lo que todo apunta a que se trata de un proceso de organogénesis de hoja, donde posteriormente se forma la raíz. En los cortes histológicos, no fue posible distinguir un indicio de RAM, comparado con lo reportado por algunos autores que han trabajado con embriones somáticos de maíz. A pesar de esto, solamente el uso de marcadores

moleculares, que marquen el inicio del RAM, podrá indicarnos en que momento se desarrolla el meristemo de la raíz.

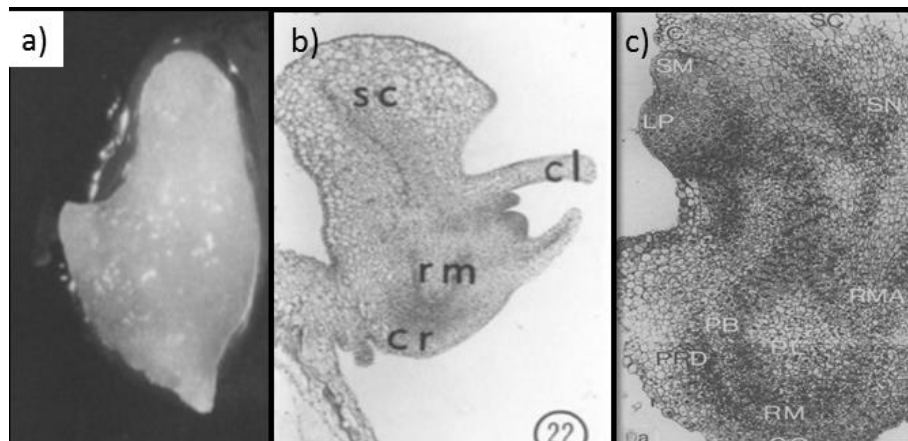


Fig. Embriones somáticos de maíz descritos en la literatura. a) Embrión somático de maíz usando como explante una hoja (Tomado de Conger, 1987), b) corte transversal de un embrión somático donde se muestra el RAM (rm), escutelo (sc), coleoptilo (cl), coleorriza (cr) (Tomado de Lu *et al.*, 1987), c) Corte de un embrión somático. Meristemo apical del brote (SM), Meristemo apical radicular (RM), primordio foliar (LP) (Tomado de Emons, 1995).

En la figura 21 se presentan las primeras tres etapas en regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos. Así mismo, se muestran embriones cigóticos tomados de mazorcas 15 ddp, pero que presentan diferentes tamaños y estadios, posiblemente a errores en la polinización manual que realizamos. El último embrión es el estándar que usamos como explante para el cultivo *in vitro*. Estos embriones nos permitiern visualizar el proceso de desarrollo de embriogénesis cigótica en el maíz Tuxpeño VS-535.

Como se puede notar, las estructuras en ambos procesos son muy diferentes. Los embriones cigóticos si poseen una bipolaridad característica descrita en la literatura. Las estructuras observadas durante la regeneración parece ser que no tienen esta dualidad de meristemos y quizá solo se forma inicialmente el SAM para el desarrollo de los primordios foliares. Por tanto, el proceso de regeneración *in vitro* no recapitula la embriogénesis cigótica.

Con base en lo anterior, el término de callo embriogénico, que se ha utilizado de forma histórica para referirse al callo que tiene la capacidad de regenerar una planta (Armstrong & Green, 1985), bajo nuestras etapas de regeneración establecidas, no resulta exacto, aunque todavía no se descarta la posibilidad de la formación de embriones somáticos a partir de este tipo de callo. Sin embargo, para fines practicos se mantiene el nombre de callo embriogénico (CE) y no embriogénico (CNE) a lo largo de la tesis.

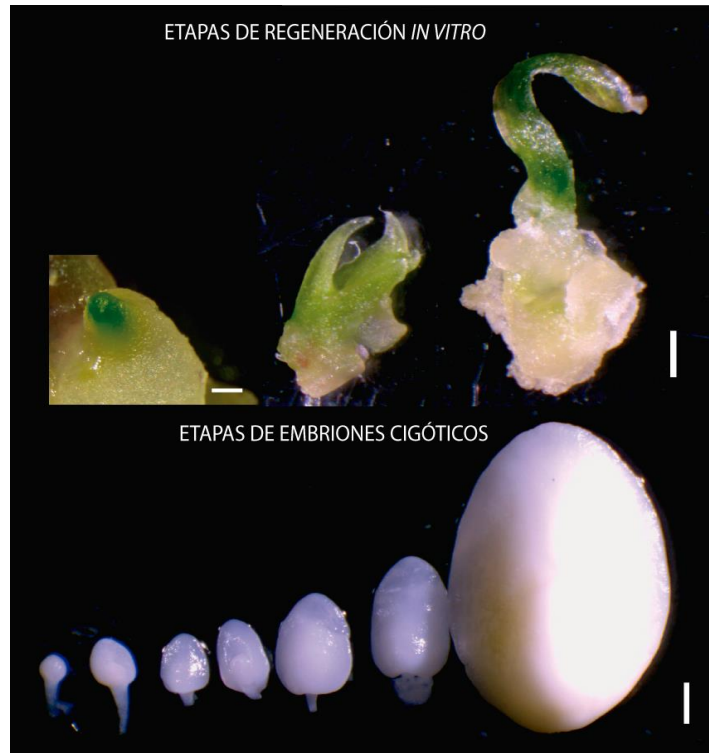


Fig. 21. Comparación de la regeneración *in vitro* y las etapas de embriones cigóticos. Barra=1 mm

2. Acumulación de miRNAs y sus blancos, relacionados a desarrollo, durante la desdiferenciación y regeneración.

La acumulación de miRNAs particulares, que tienen un rol en la embriogénesis y la formación del meristemo apical a través de la regulación de sus transcritos blanco, podría ser relevante durante la regeneración de maíz, por lo que se procedió a evaluar su acumulación en CE, CNE-A y en las etapas de desarrollo establecidas para el proceso de regeneración *in vitro* (Fig. 22). Se analizaron cinco miRNAs y sus blancos previamente descritos en embriogénesis o desarrollo (miR156-*ZmSBP23*, miR160-*ZmARF16/ZmARF19*, miR164-*ZmCUC2*, miR166-*ZmRLD1*, miR394-*ZmF-BOX*; Tabla 8), lo que permitió caracterizar a nivel molecular los tejidos. Además, se analizó WUSCHEL 2 (*ZmWUS2*) que está involucrado en la vía de miR394 para el mantenimiento de las células meristemáticas.

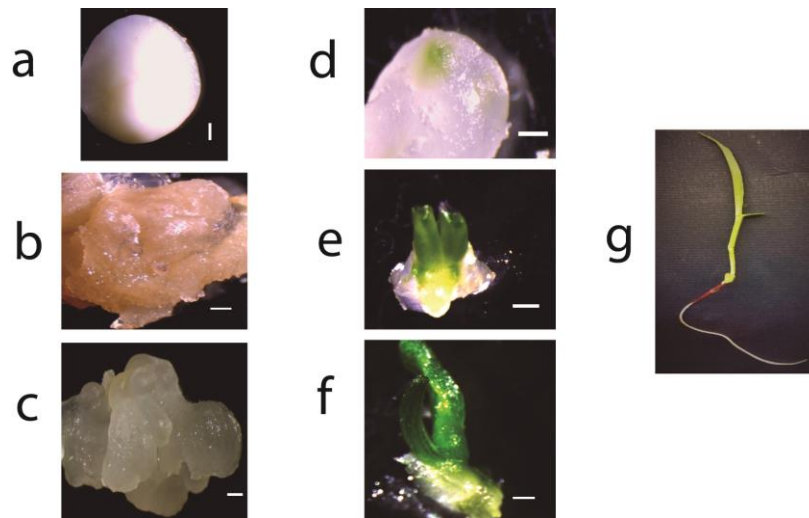


Fig. 22. Tejidos utilizados para el análisis de qPCR de miRNAs y sus blancos. a. Embrión inmaduro (EI), b. CNE-A, c. CE, d. 1ª etapa de regeneración, e. 2ª etapa de regeneración, f. 3ª etapa de regeneración, g. Plántula.

El tejido correspondiente al CE mostró mayor acumulación de todos los miRNAs analizados comparado con el CNE-A, sugiriendo que tanto a nivel morfológico como molecular existen diferencias importantes entre ambos tipos de tejidos proliferativos (Fig. 23). Por otra parte, miR160 y miR166 presentaron menor acumulación en CE que en el tejido explante, mientras que miR394 fue más abundante en el CE. Dado que estos miRNAs participan en la regulación mediante de la modulación de la abundancia de sus transcritos blanco, fue interesante observar, que también estos transcritos tienen mayores niveles en el CE. Sin embargo, en algunos casos se encontró una correlación inversa entre los miRNAs y sus transcritos blanco como se describe a continuación.

Abundancia de miRNAs relacionados a desarrollo durante la desdiferenciación

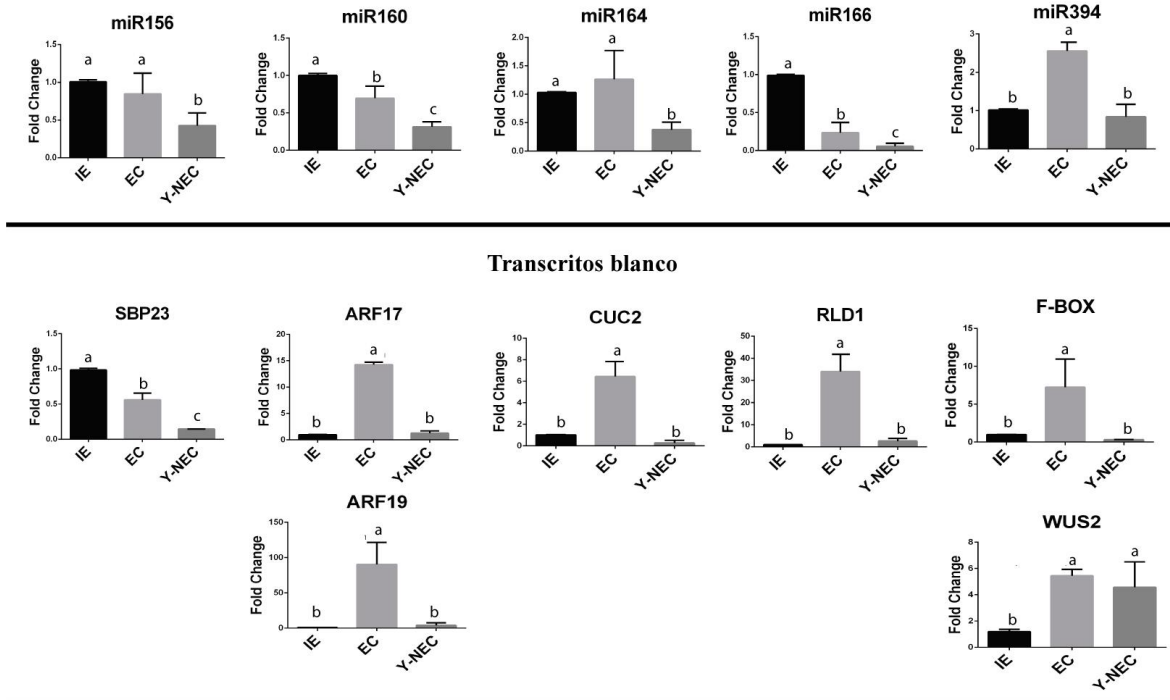


Fig. 23. Abundancia de miRNAs y sus blancos durante la formación de los callos: embriogénico (embryogenic callus, EC) y no embriogénico (yellow non-embryogenic callus, Y-NEC) usando como explante embrión inmaduro (immature embryo, IE). Cada blanco se colocó debajo del miRNA que lo regula, excepto para *WUS2*, que no es blanco de miRNAs, pero forma parte de una vía de regulación con *miR394* y *ZmF-BOX*. Las veces de cambio (Fold change) representan la abundancia relativa al embrión inmaduro y normalizado con el snRNA U6 o RNA18s como controles internos. Los valores representan un promedio de dos réplicas biológicas y al menos seis réplicas técnicas con valores de DS \pm . Las letras distintas arriba de las barras indican diferencia estadísticamente significativa entre tejidos. ANOVA de una vía. Prueba Post-hoc: Tukey ($p < 0.001$).

La correlación inversa (CI) entre algunos miRNAs y sus blancos en los dos tipos de callos se observa en la **fig. 24**. Se puede apreciar que en el CE existe una fuerte CI entre *miR164* y *CUC2*, así como *miR160-ZmARF17/ZmARF19* y *miR166-ZmRLD1* comparado con el CNE. Esto muestra que existe una mayor acumulación de los transcritos de los factores de transcripción que de los miRNAs que los regulan. Esto podría indicar que la presencia de estos transcritos es característica del callo pluripotente. Para *miR156* y *miR394* esta CI no fue tan evidente posiblemente a su restricción en ciertas células o zonas del CE.

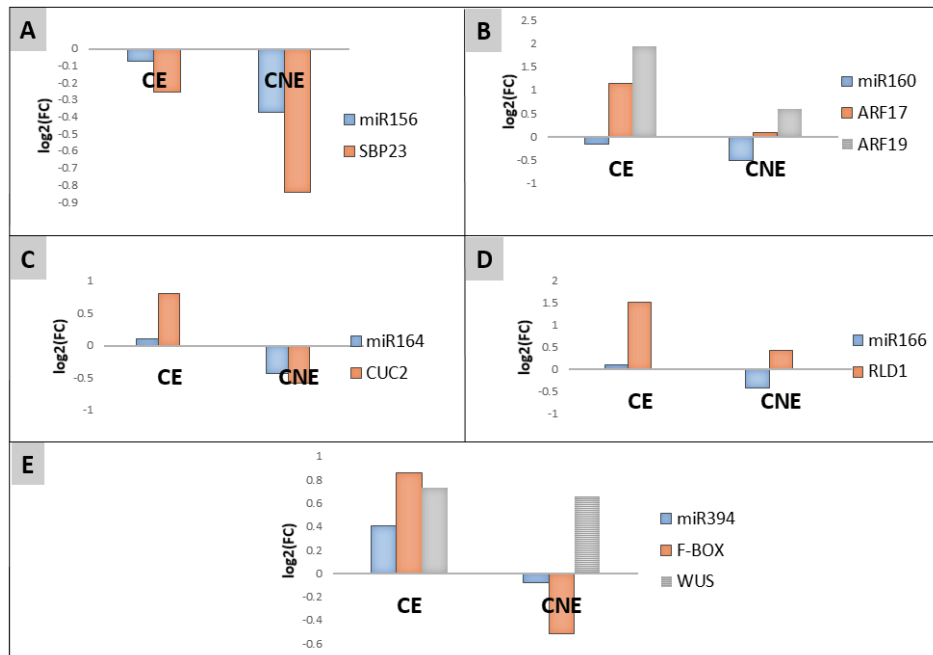
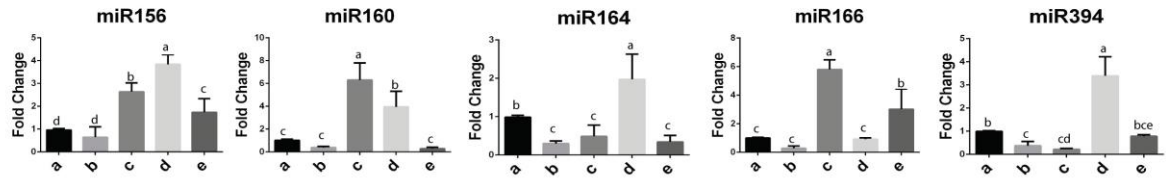


Fig. 24. Niveles de correspondencia entre la abundancia de miRNAs y sus blancos usando el \log_2FC . A. miR156 y SBP23. B. miR160 y ARF17/ARF19. C. miR164 y CUC2. D. miR166 y RLD1. E. miR394 y F-BOX.

En las etapas de regeneración se encontraron diferentes patrones de acumulación, dependiendo de cada miRNA, lo que sustenta sus funciones particulares en el desarrollo de la planta (Fig. 25). En la primera etapa se observó una reducción de miR164 y miR394, mientras que miR156, miR160 y miR166 incrementaron en la etapa 2, esto fue consistente con la reducción de la abundancia de *ZmARF17* y *ZmRLD* respectivamente. En la 3ª etapa se observaron incrementos para miR156 y miR164, sin embargo esto no se ve reflejado en la disminución de sus transcritos blancos. Estos patrones indicaron que los cambios más notables en la acumulación de miRNAs ocurren en la segunda y tercera etapa de desarrollo, evidenciando su posible rol en la diferenciación de la hoja. En etapa de plántula, se observó una disminución para miR156, miR160, miR164 y miR394, mientras miR166 incrementó sus niveles comparado con la etapa anterior de desarrollo. Esto podría deberse a su función en la formación de raíces o de nuevas hojas, tal como se ha descrito en la literatura. En las primeras etapas de desarrollo, se observó además una CI entre miR156, miR160 y miR166 y sus transcritos blancos. Esta tendencia no fue visible para miR164, miR394 y sus blancos. Esto posteriormente debe comprobarse de forma *in situ* en el tejido para determinar si existen dominios excluyentes de acumulación de miRNAs y sus blancos, además de otro tipo de regulación como la inhibición traduccional (Fig. 26).

Abundancia de miRNAs relacionados a desarrollo durante la regeneración



Transcritos blanco

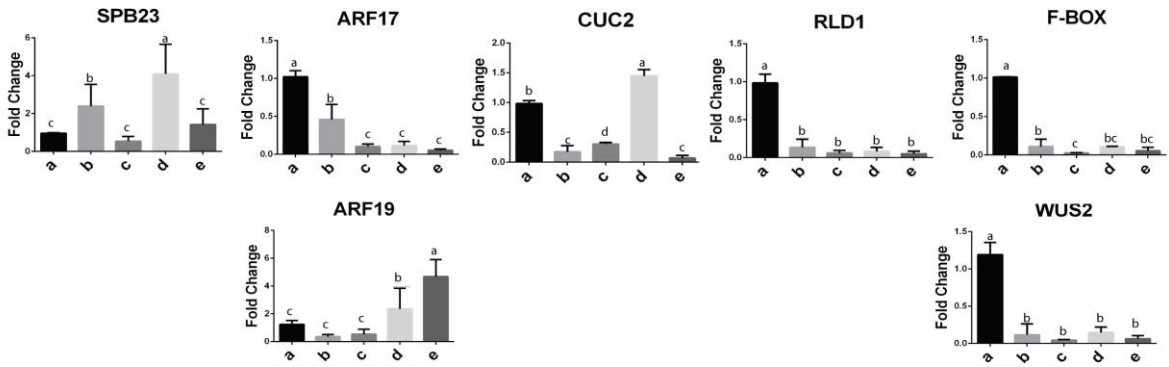
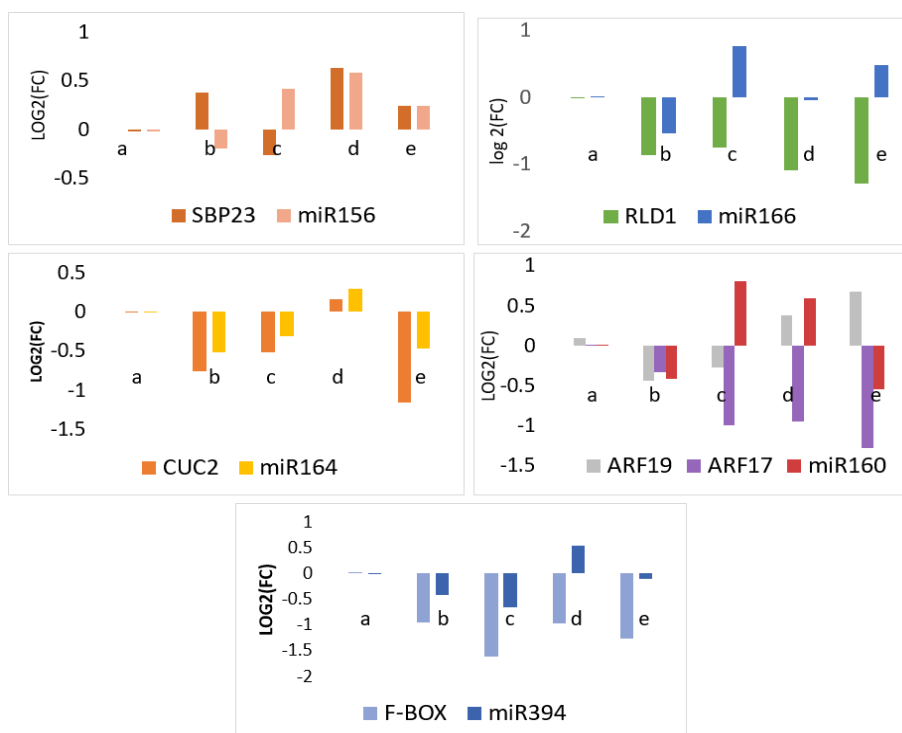


Fig. 25. Abundancia de miRNAs y sus blancos durante las etapas de regeneración, a. CE, b. 1ª etapa, c. 2ª etapa, d. 3ª etapa y e. plántula. Las veces de cambio (Fold change) representan la abundancia relativa al CE y normalizado con el snRNA U6 o RNA18s como controles internos. Los valores representan un promedio de dos réplicas biológicas y al menos seis réplicas técnicas con valores de DS \pm . Las letras distintas arriba de las barras indican diferencia estadísticamente significativa entre tejidos. ANOVA de una vía. Prueba Post-hoc: Tukey ($p < 0.05$).

A)



B)

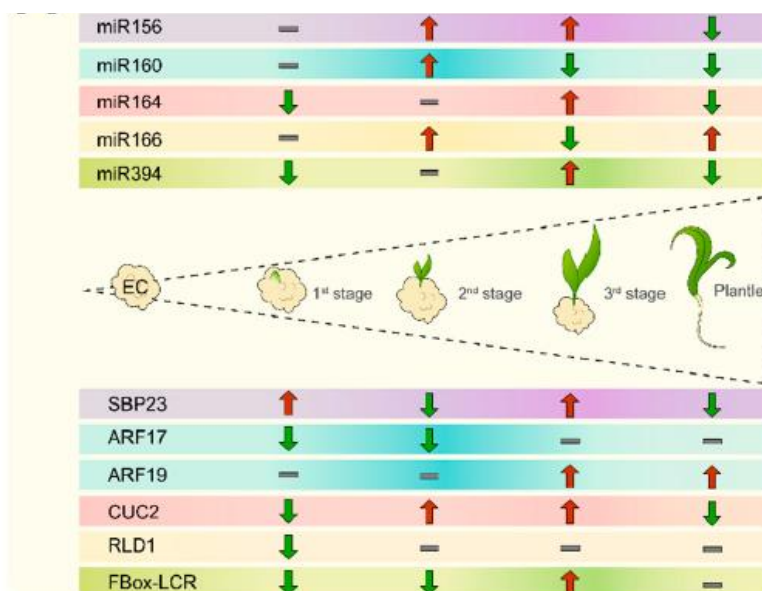


Fig. 26. A). Niveles de correspondencia entre la abundancia de miRNAs y sus transcritos blanco durante la regeneración *in vitro* de maíz usando el log₂FC a. CE, b. 1^a etapa, c. 2^a etapa, d. 3^a etapa y e. plántula B). Patrones de expresión de los miRNAs y sus blancos. La regeneración sigue un desarrollo basipetal para la formación de la plántula y los mayores cambios ocurren en la segunda y tercera etapa de regeneración.

3. Análisis de la expresión de los componentes de la vía tasiR-ARF en los tipos de callos y etapas de regeneración *in vitro*.

El objetivo principal de esta parte del trabajo fue el análisis de expresión a nivel de RNA de los componentes de la vía tasiR-ARF, para tratar de integrar dos diferentes mecanismos de regulación por sRNAs en nuestro modelo de estudio. Cabe recordar que las vías de miRNAs y tasiRNAs se encuentran interconectadas a nivel de biogénesis y también a nivel funcional durante el desarrollo de las plantas, incluyendo al maíz (Zhang *et al.*, 2019).

En este caso se usaron seis tejidos: el callo embriogénico (CE), el callo no embriogénico amarillo (abreviado aquí como CNE) y las cuatro etapas de regeneración (Fig. 27).

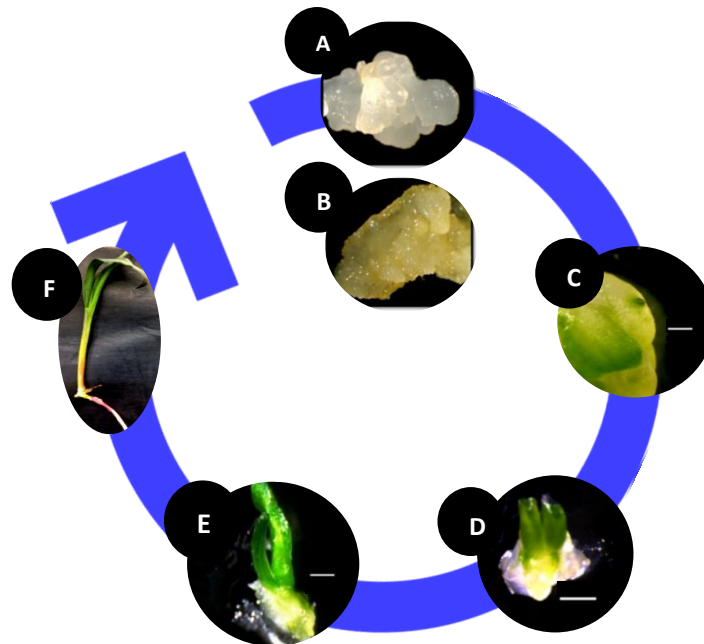


Fig. 27. Tejidos utilizados para evaluar la acumulación de los elementos de la vía tasiR-ARF. A. Callo embriogénico (CE). B. Callo no embriogénico (CNE). C. 1° etapa de regeneración. D. 2° etapa de regeneración. E. 3° etapa de regeneración. F. Plántula. Barra=1 mm.

Se analizaron siete genes TAS3 (*TAS3a/b/c/d/e/g/i*) precursores de los tasiRNAs, los cinco factores de respuesta a auxina (ARF), blancos de los tasiRNAs: *ZmARF24*, *23*, *11*, *12* y *26* y los precursores de miR390: MIR390A/B de maíz. La presencia de los transcritos se evaluó por RT-PCR de punto final en tres réplicas biológicas de CE, CNE y durante las etapas de regeneración previamente establecidas. De los genes *TAS3*, se observó que el precursor *TAS3g* muestra una expresión predominante en todos los tejidos. De los ARFs, los que mostraron mayor abundancia fueron: *ZmARF24*, *ZmARF11* y

ZmARF12. Además, parece que existe una preferencia para la expresión o procesamiento del pri-miRNA del precursor MIR390A, frente a MIR390B (Fig. 28).

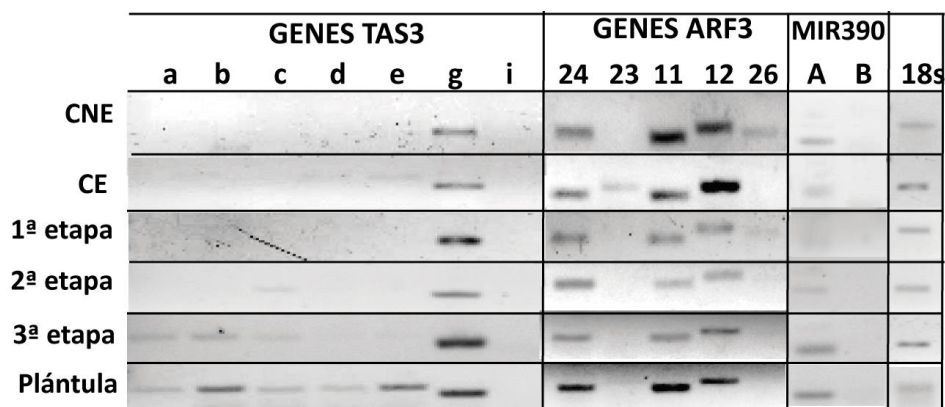


Fig. 28. Análisis de la expresión a nivel de RNA de los componente de la vía *tasiR-ARF*. Se analizaron siete genes *TAS3*, los cinco *ZmARF3* blancos de *tasiR-ARFs* y los dos precursores de *miR390*.

Los *tasiR-ARFs* que derivan de los precursores *TAS3g* y *TAS3b* se analizaron por RT-qPCR. El precursor *TAS3b* genera dos *tasiRNAs* nombrados *tasiR-ARFbD5* y *tasiR-ARFbD6* y el precursor *TAS3g* genera sólo un *tasiRNA* denominado *tasiR-ARFg* (Dotto *et al.*, 2014). Además, se cuantificó la abundancia de los transcritos de los componentes requeridos para la vía *tasiR-ARF*: *ZmLBL1*, *ZmAGO7*, *miR390* y los cinco *ZmARF3* blanco de los *tasiR-ARFs* (Fig. 29).

En la comparación entre CE y el CNE-A se observó que los transcritos de *TAS3b*, *LBL1* y *AGO7* son más abundantes en CE, mientras que *TAS3g* y *miR390* tienen mayor acumulación en CNE-A. De manera similar a sus precursores, los *tasiR-ARFbD5* y *tasiR-ARFbD6* tuvieron mayores niveles en el CE respecto al CNE-A ($p > 0.0001$), mientras que *tasiR-ARFg*, presentó mayor abundancia en el CNE-A. Interesantemente, todos los *ZmARF3* analizados mostraron una acumulación significativamente más alta en CE, sugiriendo que este tejido presenta mayor respuesta a las auxinas. De hecho, en la inmunolocalización de auxinas, se observa que el patrón de distribución de IAA es diferentes entre callos. En el CE las auxinas se encuentran dentro y fuera de las células, lo que parece indicar un transporte activo, corroborado por la expresión de los genes *PIN1*, *2* y *3* (Anexo VIII). En el CNE-A, por el contrario, las auxinas se distribuyen principalmente en la periferia de las células. Estos resultados indican que la vía *tasiR-ARF* se encuentra funcional en el CE y podría estar relacionada con la respuesta regenerativa del tejido (Fig. 30). En la 1ª etapa de regeneración la localización de las auxinas se polariza en la punta de la estructura regenerativa, lo que concuerda con una disminución de la abundancia de los *ARF3*. En la 2ª y 3ª etapa de regeneración las auxinas fueron únicamente localizadas en ciertas células, principalmente como puntos que rodeaban las células (Fig. 31).

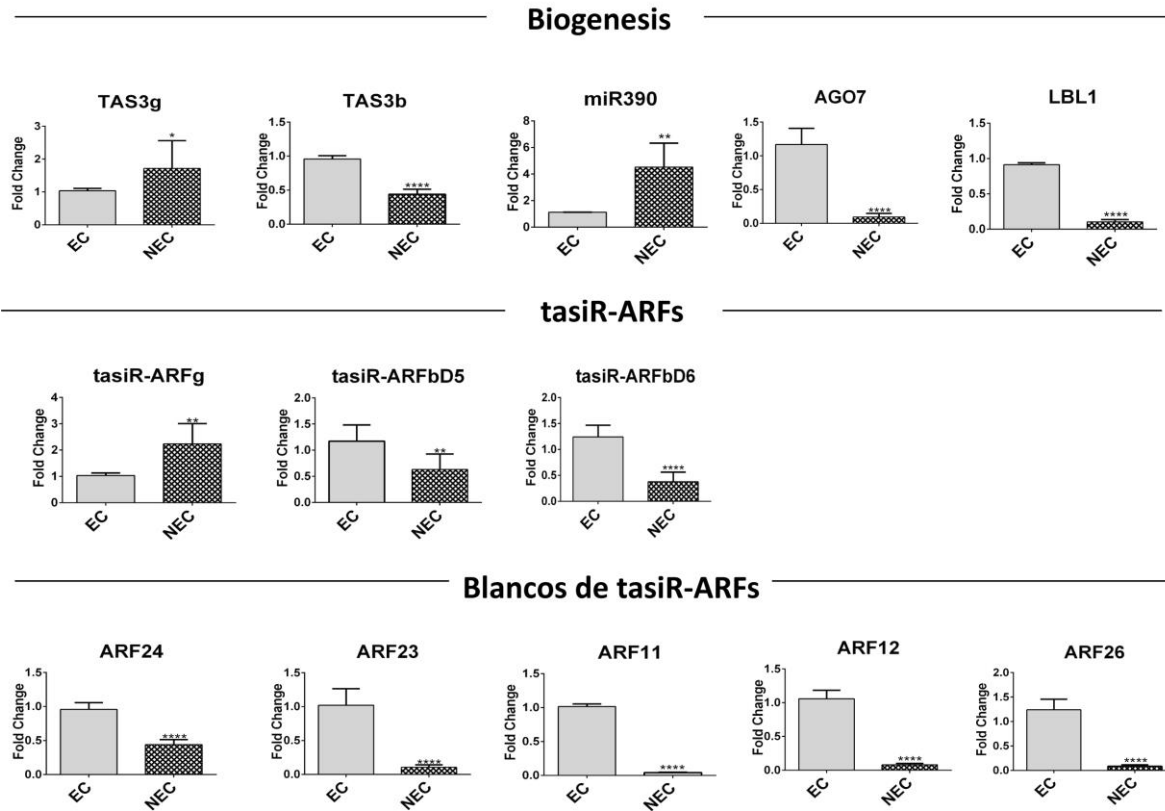


Fig. 29. Abundancia de los componentes de la vía tasiR-ARFs en los dos tipos de callos: embriogénico (*embryogenic callus*, EC) y no embriogénico (*non-embryogenic callus*, NEC) Los elementos se dividen en biogénesis, tasiRNAs maduros y los transcritos blancos de tasiR-ARFs. Las veces de cambio (*Fold change*) representan la abundancia relativa al CE y normalizado con el snRNA U6 o el RNA18s como controles internos. Los valores representan un promedio de dos réplicas biológicas y al menos seis réplicas técnicas con valores de DS \pm . Análisis mediante t-student: valores de expresión: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$.

Adicionalmente, se evaluó la localización de las citocininas en el CE, CNE-A y la 1ª etapa de regeneración, con el fin de comparar los dominios de auxinas-citocininas. Esto debido a que durante la regeneración *de novo* del SAM la distribución de las auxinas determinan la localización de las citocininas y esto es mediado por *AtARF3* (Cheng *et al.*, 2013).

En el CNE no se identificó señal de citocininas, mientras que en el CE la hormona se detectó rodeando a las células. Para la 1ª etapa, la señal se detectó ligeramente en la parte media del punto regenerativo. Esta distribución sugiere la presencia de dominios excluyentes para ambas hormonas (Fig. 30).

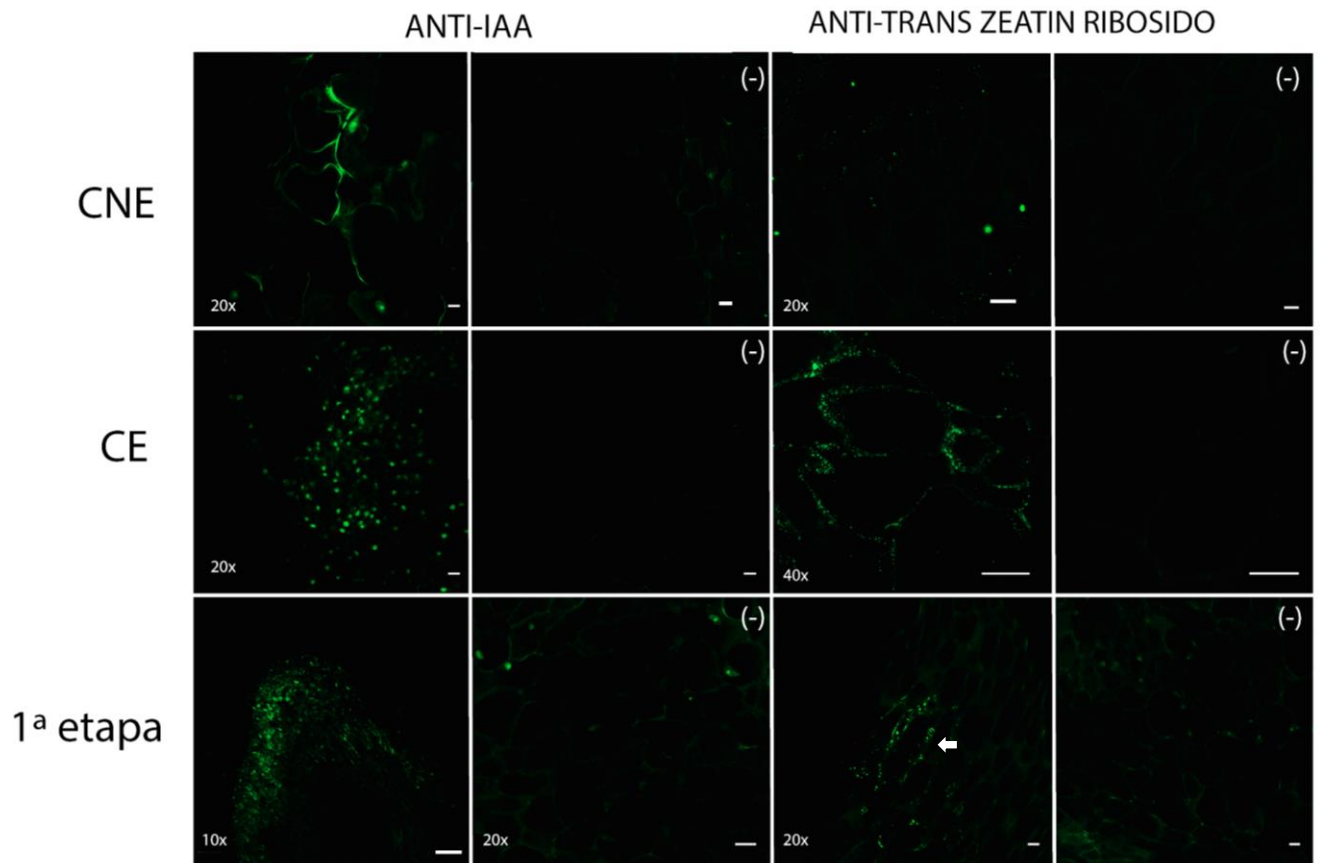


Fig. 30. *Inmunolocalización de auxinas y citocininas en CE, CNE-A y la 1ª etapa de regeneración usando los anticuerpos anti-IAA y anti-trans zeatina respectivamente.* El aumento del microscopio y los controles negativos (muestras incubadas sin el anticuerpo primario) se representan en cada figura. Barra=20μm, excepto en la localización de auxinas de la 1ª etapa donde la barra=100 μm.

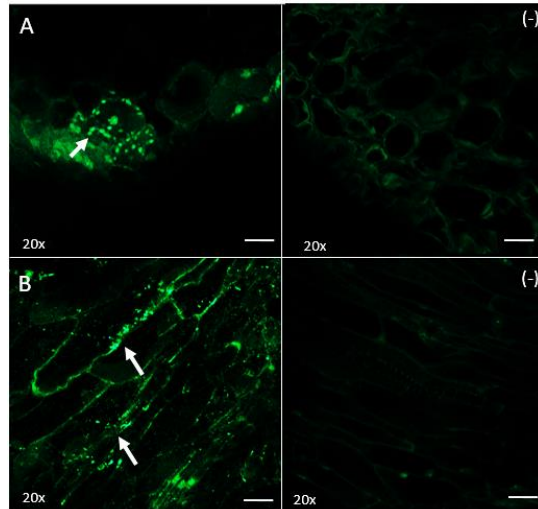


Fig. 31. *Inmunolocalización de auxinas en la 2ª y 3ª etapa de regeneración usando el anticuerpo anti-IAA.* El aumento del microscopio y los controles negativos (muestras incubadas sin el anticuerpo primario) se representan en cada figura. A. 2ª etapa de regeneración. B. 3ª etapa de regeneración.

Durante el proceso de regeneración *in vitro* para formar una plántula, el transcrito de *TAS3g* incrementó sus niveles en la primera etapa de desarrollo, al igual que su correspondiente tasiR-ARFg, posteriormente su abundancia disminuyó hasta la tercera etapa para luego incrementar en la plántula regenerada (**Fig. 32**). Este patrón es similar al observado para miR390 y diferente al precursor *TAS3b*. Los transcritos de *ZmLBL1* y *ZmAGO7* mostraron una importante disminución en las diferentes etapas regenerativas respecto al CE, lo que podría resultar limitante para la vía, a menos que el comportamiento de las proteínas correspondientes fuera diferente. Curiosamente, la acumulación de los dos tasiR-ARFs derivados de *TAS3b* mostró abundancias contrastantes en las diferentes etapas de regeneración, siendo tasiR-ARFbD5 más abundante entre la 3ª etapa de regeneración y la plántula. Por su parte, tasiR-ARFbD6 redujo su acumulación significativamente en la primera etapa de regeneración, pero se incrementó para la segunda etapa. Los perfiles de acumulación diferenciales de estos dos tasiRNAs sugieren regulación distinta de su acumulación por estabilidad y funciones no redundantes. Además, es necesario tomar en cuenta que su localización podría estar restringida a solo cierto tipo de células en las etapas iniciales de regeneración.

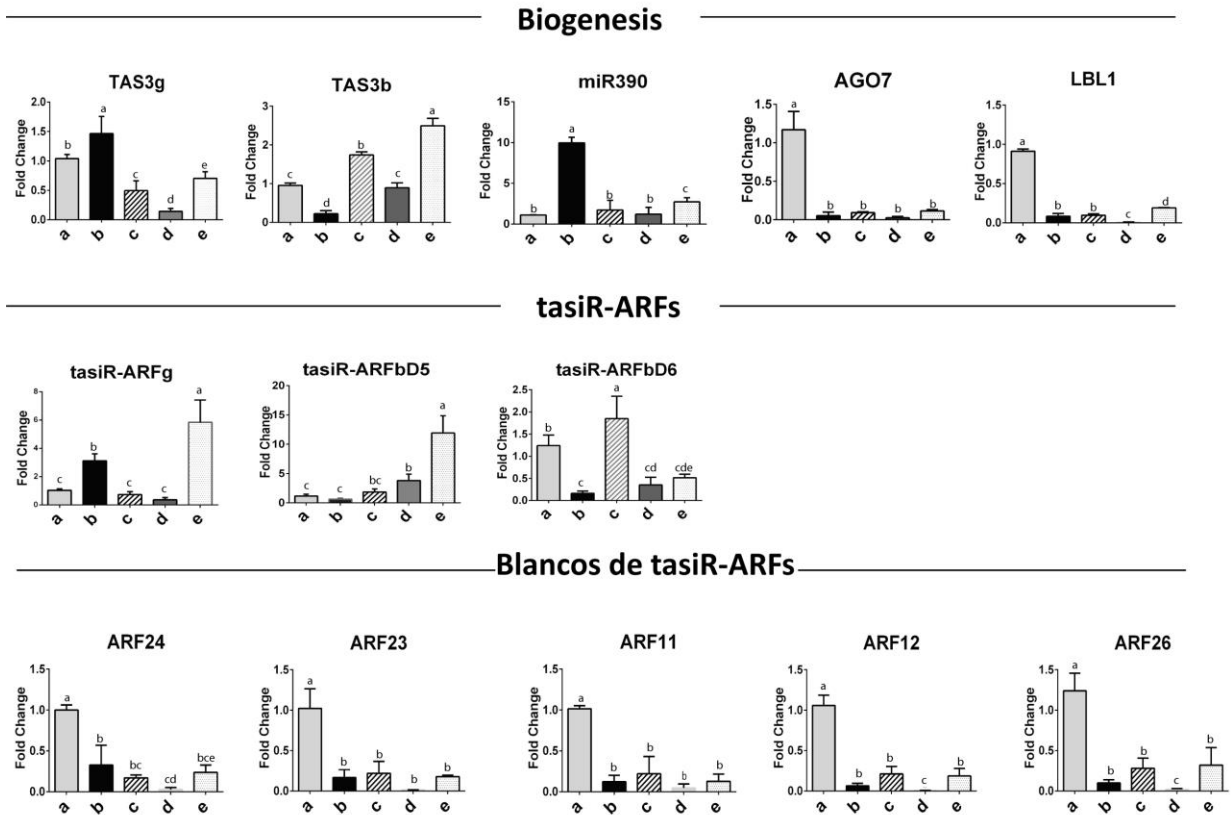


Fig. 32. Abundancia de los componentes de la vía tasiR-ARFs durante el proceso de regeneración. a. CE, b. 1ª etapa, c. 2ª etapa, d. 3ª etapa y e. plántula. Los elementos se dividen en biogénesis, tasiRNAs maduros y los transcritos blanco de tasiR-ARFs. Las veces de cambio (*Fold change*) representan la abundancia relativa al CE y normalizado con el snRNA U6 o el RNA18s como controles internos. Los valores representan un promedio de dos réplicas biológicas y al menos seis réplicas técnicas con valores de $DS \pm$. Barras que no comparten al menos una letra en común difieren significativamente. ANOVA de una vía. Prueba Post-hoc: Tukey ($p < 0.05$).

Con el fin de analizar los posibles eventos de procesamiento de los precursores TAS para formar sus respectivos tasiRNAs, se utilizó el logaritmo de las veces de cambio para identificar la correlación inversa (CI) entre los precursores *TAS3*, los tasiRNAs y miR390. Se observó que existe una CI en la 1ª etapa de desarrollo y la plántula para *TAS3g*, su tasiRNA y miR390, esto indica una menor acumulación de *TAS3g* y un aumento de tasiR-ARFg y miR390. De forma similar, esto se encontró para la 3ª etapa y la plántula, pero solamente entre *TAS3b*, tasiR-ARFbD5 y miR390 (**Fig. 33**).

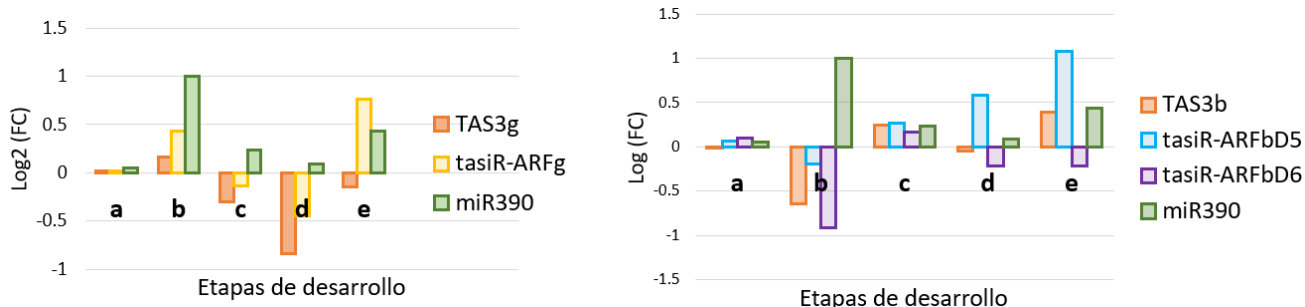


Fig. 33. Niveles de correspondencia entre la abundancia de los precursores *TAS3*, los *tasiRNAs* que producen y *miR390* durante el proceso de regeneración. . a. CE, b. 1ª etapa, c. 2ª etapa, d. 3ª etapa y e. plántula. La correlación inversa entre los genes *TAS3*, los *tasiRNAs* y *miR390* sugiere un evento de procesamiento de los precursores para la formación de *tasiR-ARFs*.

Por otra parte, la máxima acumulación de todos los *ZmARF3s* se da en el CE y su acumulación baja drásticamente hasta que se forma la plántula. *ZmARF24* es considerado un represor, por lo que quizá necesita ser reprimido durante la regeneración para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación celular (Weijers *et al.*, 2005). Es posible que la acumulación de estos factores transcripcionales se polarice durante las etapas del desarrollo. Al analizar la correspondencia inversa entre *tasiR-ARFs* y *ZmARF24* se observó mayor correlación negativa con la abundancia de *tasiR-ARFg* y *tasiR-ARFbD5*, dependiendo de la etapa de regeneración (Fig. 34).

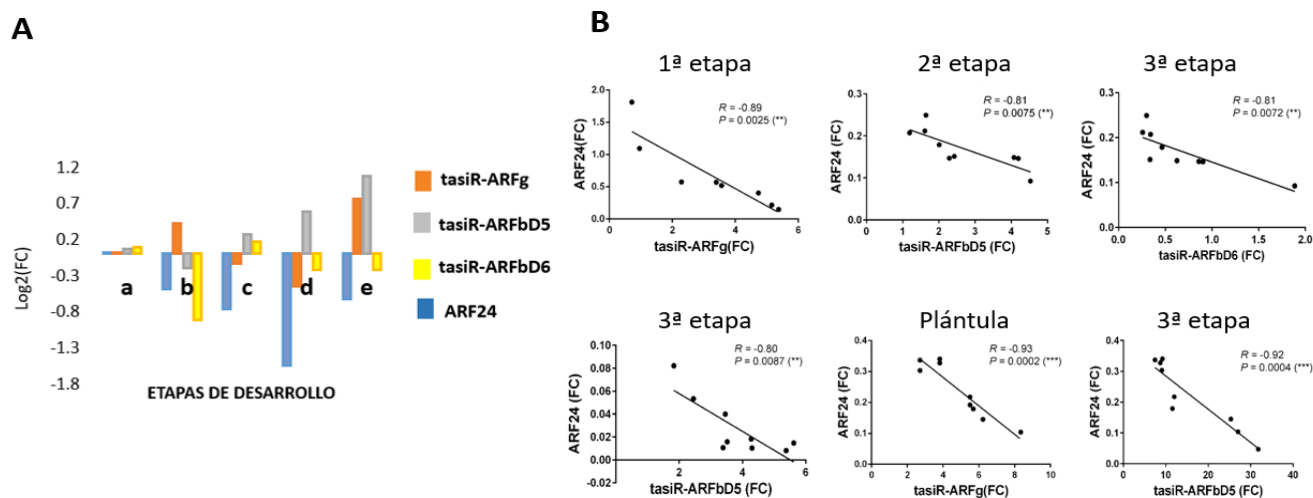


Fig. 34. A. Niveles de correspondencia entre la abundancia de los tres *tasiRNAs* analizados y *ZmARF24* durante el proceso de regeneración. a. CE, b. 1ª etapa, c. 2ª etapa, d. 3ª etapa y e. plántula. Se observa que la CI es dependiente de la etapa de desarrollo. Este comportamiento fue el mismo para los restantes *ARF3s*, sin embargo aquí solo se muestra para *ZmARF24*. B. La correlación negativa se validó mediante un análisis de *Pearson* entre los *tasiR-ARFs* y *ZmARF24*. Los valores de *R* y *P* se indican en cada figura.

De manera general, esta parte del trabajo permitió demostrar expresión diferencial de genes *TAS3* y producción de tasiR-ARFs en callos embriogénicos de maíz y durante el proceso de regeneración de plantas (**Fig. 35**). El análisis concomitante de componentes de la vía de biogénesis de tasiRNAs y la abundancia de transcritos *ZmARF3* sugiere que la expresión de esta vía en el CE puede estar relacionada con la capacidad regenerativa. La reducción drástica en los transcritos ARF desde la primera etapa de regeneración, indica que los tasiR-ARF pre-existentes en el CE podrían ser requeridos para ejercer su función inhibitoria sobre los *ZmARF3* en regeneración.

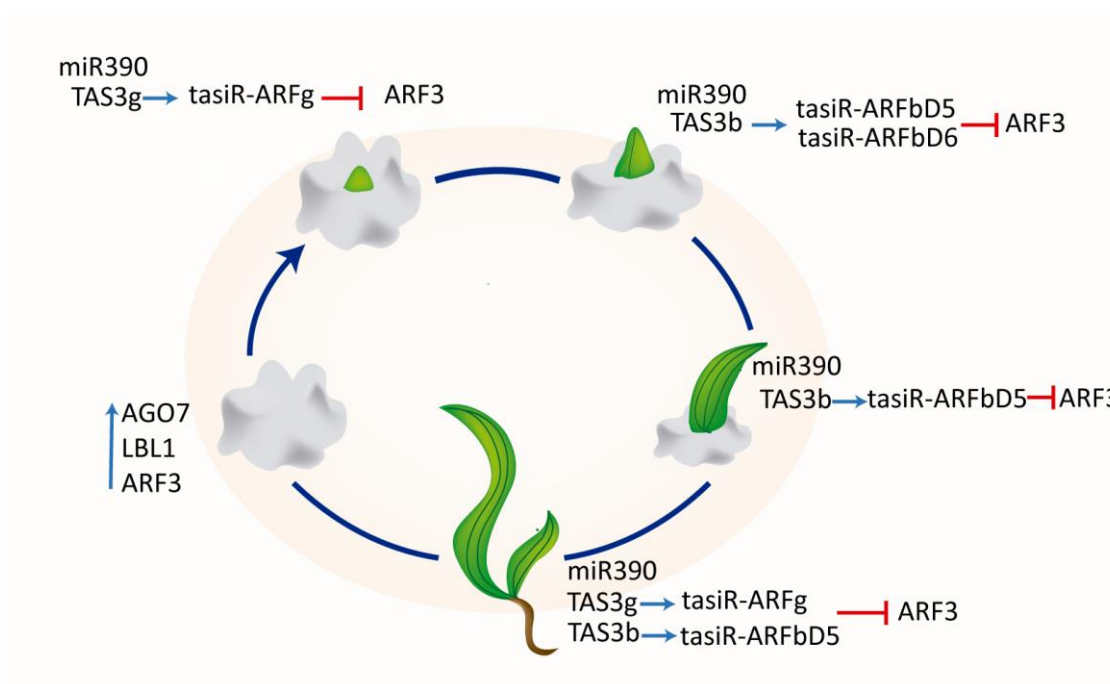


Fig. 35. Resumen de la acumulación de los tasiRNAs analizados que mostraron mayor abundancia en etapas de regeneración específicas y una correlación inversa con los ARF3. Los mayores niveles de los tasiRNAs corresponden a un decremento de los precursores TAS3 y aumento de miR390, lo que sugiere un evento de procesamiento para formar a los tasiR-ARFs.

4. Localización tisular de algunos elementos de la vía tasiR-ARF

Debido a que los tasiR-ARFs han sido descritos como sRNAs móviles que regulan a sus blancos mediante un gradiente de represión y así determinan la especificación celular (Husband *et al.*, 2009), se decidió evaluar la localización del precursor de tasiR-ARFg, el gen *TAS3g*, y *ZmARF24*. Esto porque *TAS3g* presentó una acumulación diferencial en las etapas de desarrollo analizadas que corresponden con la abundancia de su tasiRNA maduro.

1. Obtención de sondas para evaluar la localización tisular de transcritos *TAS3g* y *ZmARF24*

Para la síntesis de la sonda de *TAS3g* y *ZmARF24* se utilizó el cDNA del embrión inmaduro y la primera etapa de regeneración para la obtención de los amplicones de *ZmARF24* y *TAS3g* respectivamente (Fig.36)

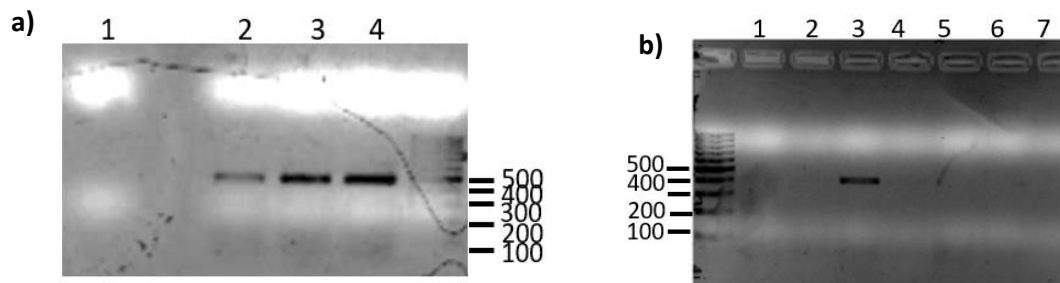


Fig. 36. a) Amplificación de *ZmARF24* a partir del cDNA de embrión inmaduro. 1. Control negativo. 2 -4. Embrión inmaduro. b) Amplificación de *TAS3g* a partir del cDNA de: 1. Callo no embriogénico, 2. Callo embriogénico, 3. 1° etapa de regeneración, 4. 2° etapa, 5. 3° etapa, 6. Plántula, 7. Control negativo.

Posteriormente se purificó la banda del gel, las concentraciones de DNA obtenidas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. DNA purificado del gel de agarosa

Gen	Tejido	[ng/ul]
<i>TAS3g</i>	1° etapa de desarrollo	21.4
<i>ZmARF24</i>	Embrión de 15ddp	21.3

El DNA purificado se ligó en el vector pGEM-T Easy vector y se transformaron bacterias *E.coli* JM109. Se analizaron 6 colonias blancas para verificar las que tenían el inserto mediante PCR de colonia (Fig.

37). Posteriormente, se aisló DNA plásmidico y se realizó la digestión con la enzima *EcoRI* (Fig. 38). En ambos casos se obtuvieron resultados positivos. Se descartó la colonia 4 con el inserto de *ZmARF24* porque presentaba una banda inespecífica (Fig. 37a. carril 2).

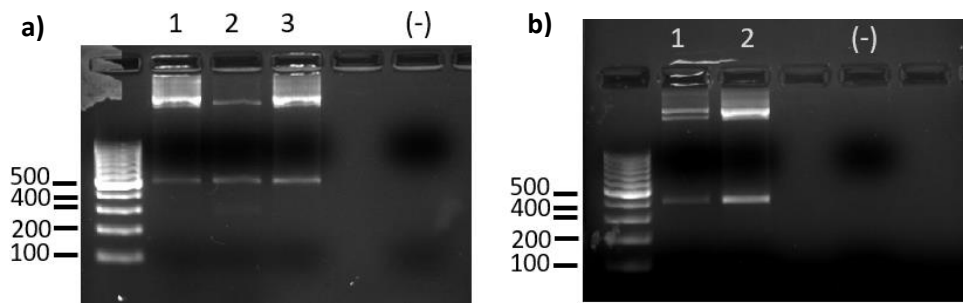


Fig. 37. a) Amplificación de *ZmARF24* de tres colonias. 1. Colonia 1, 2. Colonia 4, 3. Colonia 6. b) Amplificación de *TAS3g* de dos colonias. 1. Colonia 2, 2. Colonia 4.

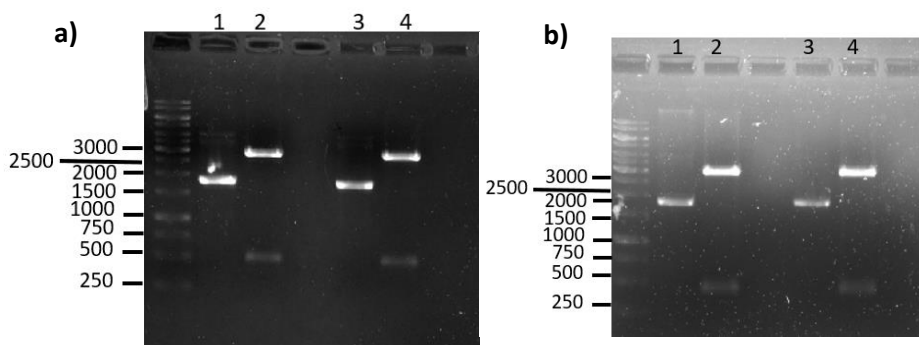


Fig. 38. a) 1. Plásmido sin digerir de la colonia 1, 2. Digestión del plásmido de la colonia 1 con *EcoRI* observándose dos fragmentos de 3023 y 507 pb. 3. Plásmido sin digerir de la colonia 6. 4. Digestión del plásmido de la colonia 6 con *EcoRI* observándose dos fragmentos de 3023 y 507 pb. b) 1. Plásmido sin digerir Colonia 2. 2. Digestión del plásmido de la colonia 2 con *EcoRI* observándose dos fragmentos de 3023 y 422 pb. 3. Plásmido sin digerir colonia 4. 4. Digestión del plásmido de la colonia 4 con *EcoRI* observándose dos fragmentos de 3023 y 422 pb.

Para las sondas que fueron utilizadas en la localización tisular de *TAS3g* y *ZmARF24* se respetaron los sitios de unión de miR390 y producción de los tasiRNAs, así como el sitio blanco del tasiR-ARF, respectivamente (Anexo VII). La secuenciación de los insertos en los plásmidos permitió verificar el sentido de la inserción del DNA, que fue bajo el promotor T7 para *ZmARF24* y SP6 para *TAS3g*.

Se generaron sondas sentido (S) y antisentido (A) para cada uno de los transcritos utilizando 5 µg de plásmido y la enzima de restricción apropiada para linearizar y luego transcribir con la RNA polimerasa correspondiente (Anexo VII). La sonda A es la que dará la señal positiva del transcrito, mientras que la sonda S se utiliza como control negativo. Cabe mencionar que en caso de *TAS3g*, se espera la

presencia de RNA de doble cadena en las células acorde al mecanismo de biogénesis de tasiRNAs (Fig. 9), por lo que la sonda S podría presentar señal en las hibridaciones.

La Fig. 39 y la tabla 12 muestran ejemplos del procedimiento de linearización y purificación del DNA a una concentración adecuada para realizar la transcripción *in vitro*.

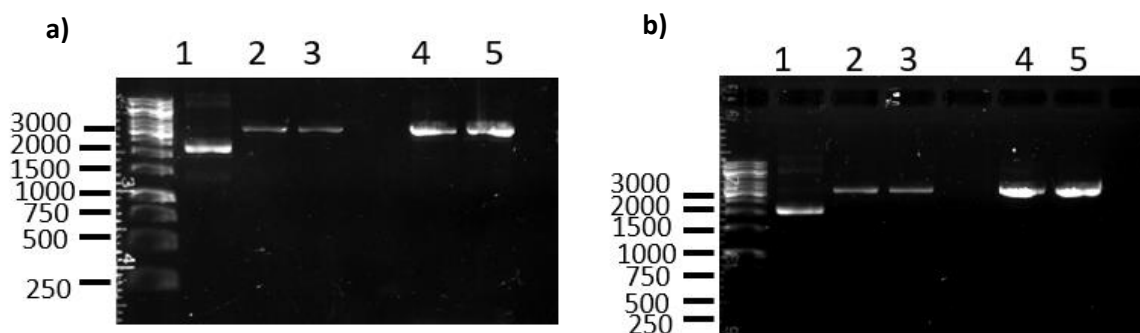


Fig. 39 a). 1. Plásmido sin digerir con el inserto *ZmARF24*, 2. Digestión del plásmido con el inserto *ZmArf24* con la enzima *NdeI*, 3. Digestión del plásmido con el inserto *ZmArf24* con la enzima *NcoI*. 4 y 5. Muestra de los carriles 2 y 3 después de la precipitación con acetato de sodio. **b)** 1. Plásmido sin digerir con el inserto *TAS3g* 2. Digestión del plásmido con el inserto *TAS3g* con la enzima *NdeI*, 3. Digestión del plásmido con el inserto *TAS3g* con la enzima *NcoI*. 4 y 5. Muestra de los carriles 2 y 3 después de la precipitación con acetato de sodio.

Tabla 12. Concentraciones de DNA obtenidas de la precipitación de los plásmidos.

Gen	Enzima usada	ng/μl	260/280
<i>ZmARF24</i>	<i>NdeI</i>	811.2	1.90
<i>ZmARF24</i>	<i>NcoI</i>	942.9	1.89
<i>TAS3g</i>	<i>NdeI</i>	1070	1.9
<i>TAS3g</i>	<i>NcoI</i>	956.4	1.88

Se realizó la transcripción *in vitro* usando 2 μg de DNA linearizado, con las enzimas de la tabla 11 y tratado previamente con DNasa (Fig. 40). Las concentraciones de las sondas de RNA obtenidas se muestran en la tabla 13.

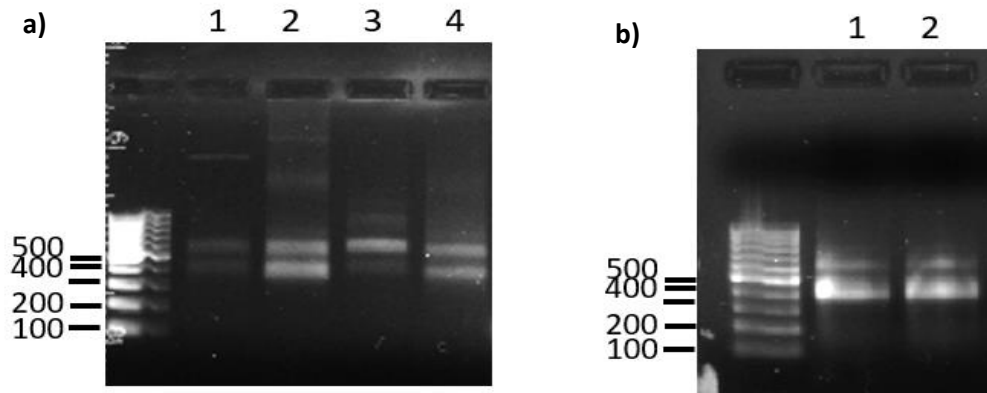


Fig. 40. Resultados de la transcripción in vitro. a) Transcripción del plásmido linealizado con el fragmento de *TAS3g* 1. Sonda sentido, 2. Sonda antisentido. 3 y 4. Muestras de los carriles 1 y 2 después del tratamiento con DNasa y precipitación con acetato de amonio. b) Transcripción del plásmido linealizado con el fragmento de *ZmARF24* 1. Sonda sentido, 2. Sonda antisentido después del tratamiento con DNasa y precipitación con acetato de amonio.

Tabla 13. Concentración de la sonda

Gen	Sonda	ng/ μ l	260/280
<i>ZmARF24</i>	Sentido	153.1	2.04
<i>ZmARF24</i>	Antisentido	145.5	1.97
<i>TAS3g</i>	Sentido	194.4	2.05
<i>TAS3g</i>	Antisentido	213.2	2.01

Se realizó un dot blot para determinar la cantidad de sonda a emplearse (**Fig. 41**). Se decidió que las diluciones que se emplearían son las que se muestran en la **tabla 14**. Esto con el fin que se pudiera detectar la señal y que alcanzara para los portaobjetos, debido a que el stock que se tiene por reacción es de 10 μ l y por portaobjetos se debe utilizar 150 μ l de sonda diluida.

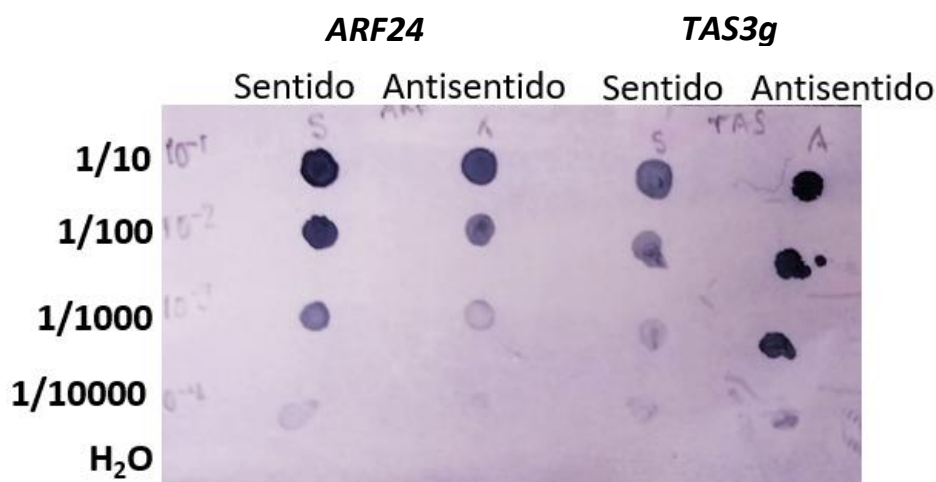


Fig. 41. Inmunodetección a pequeña escala para determinar la cantidad de sonda a emplear

Tabla 14. Diluciones empleadas para la hibridación *in situ*

ARF24		TAS3g	
Sentido	Antisentido	Sentido	Antisentido
1/500 (3.062 ng/μL)	1/50 (28.9 ng/μL)	1/50 (39.88 ng/μL)	1/5000 (0.4 ng/μL)

Para la hibridación *in situ* se utilizaron los tejidos descritos previamente: callo no embriogénico amarillo (CNE-A), callo embriogénico (CE) y la primera etapa de regeneración del lote de 1 año de regeneración.

2. Localización de *ZmARF24* y *TAS3g* en los diferentes tipos de callo y primera etapa de regeneración

Se realizaron dos experimentos cada uno con cuatro replicas. En la **figura 42** se observan los resultados para los dos tipos de callos. La señal de hibridación se detecta con una coloración más oscura en el tejido comparada con la sonda sentido. La expresión de *TAS3g* en el CE se distingue ligeramente en la periferia del callo, mientras que en el CNE se localiza en la parte media de la muestra analizada, probablemente asociado al tejido conductor. Para *ZmARF24* se observó señal fuerte en toda la muestra de CE comparado con la sonda sentido. En el CNE no fue posible distinguir la diferencia de ambos tipos de sondas. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por qPCR, donde *ZmARF24* se expresa más en CE, mientras que *TAS3g* está presente en ambos tejidos, ligeramente más abundante en CNE.

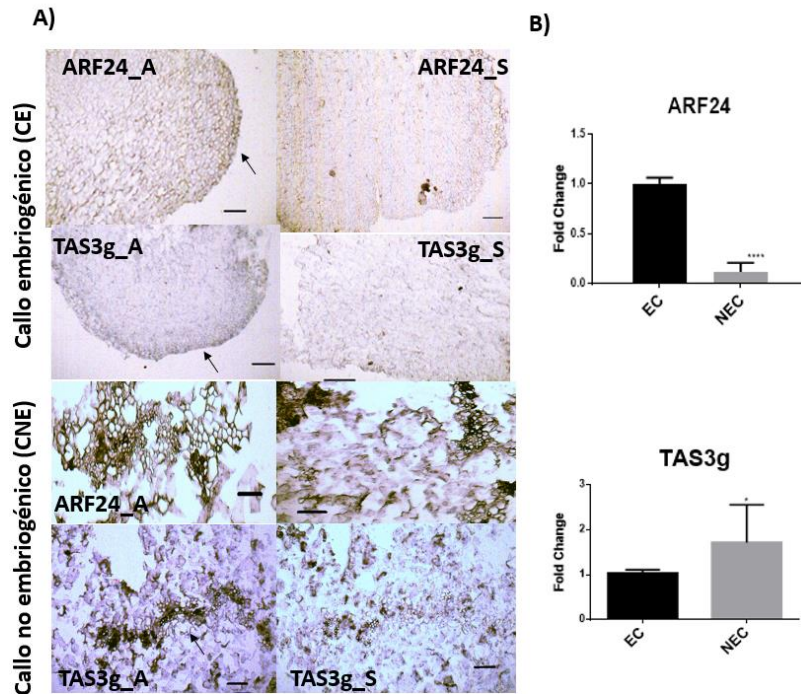


Fig. 42. a) Resultados de la hibridación *in situ* del CE y el CNE comparando la sonda sentido (S) y antisentido (A). Con las flechas se marca la señal de hibridación b) Acumulación de *ZmARF24* y *TAS3g* detectada por qPCR.

Respecto a la 1ª etapa de regeneración que corresponde al primordio foliar (Fig. 43) *TAS3g* tiene una localización en la punta y la base del tejido. Por su parte, la sonda A de *ZmARF24* muestra señal en los costados del punto regenerativo. Estos patrones de hibridación muestran que ambas señales se localizan en dominios excluyentes.

Comparando estos resultados con los obtenidos por RT-qPCR se observa que *ZmARF24* disminuye su acumulación en la 1ª etapa de regeneración respecto al CE. Esto se puede explicar debido a la restricción de *ZmARF24* en el costado del punto regenerativo. Por otra parte, la abundancia de *TAS3g* es mayor en la 1ª etapa de regeneración, sin embargo su detección por hibridación *in situ* fue muy limitada.

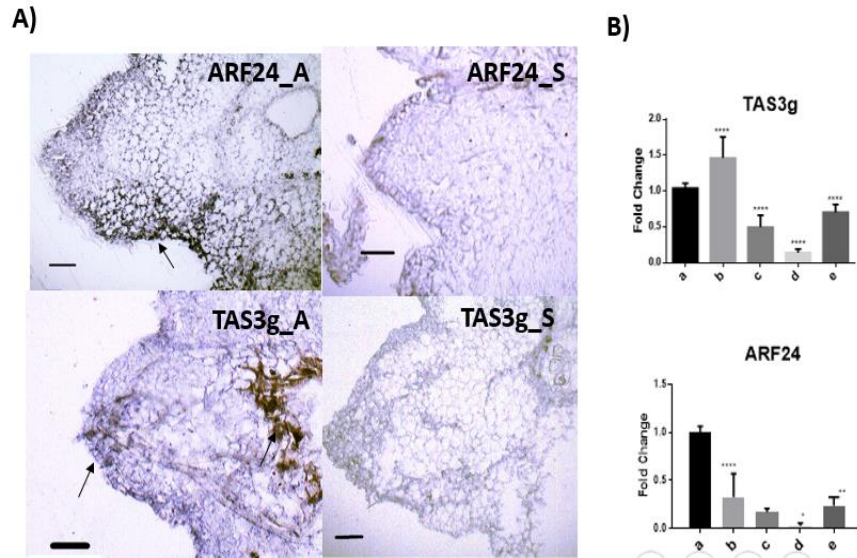


Fig. 43. **A)** Localización de transcritos *TAS3g* y *ZmARF24* mediante hibridación *in situ* de la 1ª etapa de regeneración utilizando sondas sentido (S) y antisentido (A). Con las flechas se marcan las señales de hibridación. **B)** Expresión de *ZmARF24* y *TAS3g* por qPCR (tomado de Fig.2; Artículo del Capítulo VI). a. CE, b. 1er etapa, c. 2da etapa, d. 3er etapa, e. plántula.

CAPÍTULO VI. Discusión general

La regulación de la expresión genética es la base de varios fenómenos biológicos, incluyendo el desarrollo, lo que crea la enorme diversidad de organismos que existen (Dueck, 2016). Desde el descubrimiento de los miRNAs que regulan el desarrollo post-embrionario en *C.elegans*, los sRNAs han sido descritos como reguladores del desarrollo en muchos organismos eucariontes, incluyendo las plantas. Su relevancia recae en que los sRNAs tienen como blanco factores transcripcionales esenciales para el desarrollo (D'Ario *et al.*, 2017). En las plantas, el desarrollo también depende de la comunicación intercelular mediante señales móviles que generen información posicional para coordinar el destino celular, de tal forma que puedan discernir su posición relativa dentro del organismo (Benhovic & Timmermand 2014).

Las señales móviles pueden ser hormonas, péptidos, factores de transcripción y, en los últimos años, también se han empezado a considerar a los RNAs pequeños, ya que pueden desplazarse entre las células para establecer patrones complejos (Chitwood *et al.*, 2009). Los sRNAs poseen propiedades totalmente diferentes a otras señales móviles. El apareamiento entre los sRNAs y sus transcritos blanco provee un alto grado de especificidad, particularmente en plantas, y la represión directa de los blancos permite una regulación rápida (Benhovic & Timmermand 2014).

Los primeros sRNAs descritos como señales instructivas fueron los tasiR-ARFs, los únicos tasiRNAs que tienen un rol en el desarrollo (Nogueira *et al.*, 2009, Dotto *et al.*, 2014). Actualmente, la función de la vía tasiR-ARF ha sido descrita únicamente en la regulación de la polaridad de la hoja en maíz y, potencialmente, en el mantenimiento del SAM (Nogueira *et al.*, 2007). Aunque posiblemente esta vía posea otras funciones, participando en el desarrollo de la raíz o en la transición de fase como *Arabidopsis* (Fahlgren *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2010).

En cambio, respecto a los miRNAs hay una amplia gama de evidencias en diferentes tipos de plantas relacionadas a su rol crucial a lo largo de todo el desarrollo y la conservación de este tipo de funciones a lo largo de la evolución (Cuperus *et al.*, 2011).

Los miRNAs y los tasiRNAs muestran roles relacionados en procesos como la formación del SAM, hojas, raíces y la respuesta a las auxinas (**Anexo IX**). Es por ello que es necesario visualizar su función integrada en el proceso de regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos ofreciendo la posibilidad de mejorar a futuro el cultivo *in vitro* de maíz.

Caracterización morfológica del modelo de estudio

En maíz se han descrito procesos de regeneración de plántulas en condiciones *in vitro*: tanto la embriogénesis somática (ES) como la organogénesis del brote. La ES es un proceso único en el desarrollo que representa la totipotencialidad de las células somáticas para formar una planta completa. Durante este proceso, se se han podido caracterizar estructuras similares a embriones somáticos (Conger *et al.*, 1987; Emons *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2015). Sin embargo, para maíz los diferentes estadios embrionarios no han sido fáciles de distinguir como ocurre para otras especies, como *Arabidopsis*, zanahoria, pino, etc. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue el de entender el modelo de estudio y describirlo morfo e histológicamente. Además, ya que la regeneración *in vitro* de maíz es altamente dependiente del genotipo y se ha detallado principalmente para variedades no utilizadas en México, fue necesario describirla para la variedad mexicana altamente embriogénica, Tuxpeño VS-535, que es ampliamente utilizada en cultivo *in vitro* en el país (Garrocho-Villegas *et al.*, 2012).

Durante el proceso de inducción de desdiferenciación se han descrito dos tipos de tejidos contrastantes: callos embriogénicos (CE) y callos no embriogénicos (CNE). Sin embargo, su aspecto y características morfológicas pueden diferir entre genotipos de maíz (González *et al.*, 2012). Por ejemplo, en la variedad sintética de Illinois H99, las características morfológicas e histológicas entre ambos tejidos son: el CE es amarillo, friable, con las células pequeñas con citoplasma denso y alta capacidad para la división celular, mientras que el CNE superficialmente es café, acuoso, esponjoso, las células son largas, con espacios entre las células (Sun *et al.*, 2013).

Para Tuxpeño VS-535 se observaron CE con capacidad de formar plántulas y características similares a las descritas en otros trabajos, pero también fue posible distinguir dos tipos de CNE con aspecto y características diferentes. En nuestro modelo, el origen celular de estos tipos de callo aún no está claro, pero es posible que el CNE-A surja del meristemo apical radicular, específicamente de células del periciclo, como se ha descrito en *Arabidopsis* (Sugimoto *et al.*, 2010) y que el CE se derive del epitelio del escutelo.

Se ha descrito que los embriones somáticos del pasto *Brachypodium distachyon* (o gramilla) se originan de los callos formados a partir de células protodermales del escutelo. El escutelo es una estructura única en los embriones de los pastos, como el maíz, que es considerado como un cotiledón que no emerge durante la germinación. El escutelo de monocotiledoneas y el cotiledón de eudicotiledoneas tienen funciones similares para la reserva de lípidos, proteínas y carbohidratos y ambos son propensos para llevar a cabo la morfogénesis *in vitro*. La razón no está bien entendida, pero ya que el escutelo posee una mayor área de contacto con el medio de cultivo, puede acceder fácilmente a las hormonas, sobre todo las células de la periferia. Esto se ve reflejado en una mayor actividad mitótica. Además, el gen *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), un marcador de la transición de células somáticas a células embrionarias, fue detectado en la periferia del escutelo, este gen está asociado a la proliferación, reprogramación celular y a la especificación de células pluripotentes.

Por otra parte, en *Arabidopsis* existen estudios que indican que las células del periciclo, un tejido que rodea al cilindro vascular de la raíz, pueden ser reprogramadas para formar callos (Sugimoto *et al.*,

2010). Por tanto, se hipotetiza que el origen celular de los tipos de callo es: la protodermis del escutelo para el CE y las células del periciclo para el CNE-A (Tabla 15).

Tabla 15. Hipótesis sobre el origen celular de los dos tipos de callo en maíz VS-535.

Tipo de callo Origen celular	CE Protodermis	CNE-A Células del periciclo
<i>Características del meristemo o tejido</i>	La protodermis es un meristemo primario que da origen a la epidermis del tallo, de los primordios foliares y desarrollará los tipos celulares como los tricomas. En <i>Arabidopsis</i> , usando cotiledones como explantes, las células de la protodermis muestran acumulación de auxinas durante la inducción de ES (Kurczyńska et al. 2007). De esta forma, las células de la protodermis que se dividen y acumulan auxinas son las primeras señales de adquisición de la competencia para cambiar de destino celular. Esta competencia se observa en células con características meristemáticas (Oliveira et al., 2017).	El periciclo es un tejido primario que consiste en una capa de células en la periferia del cilindro vascular. Las células del periciclo adyacentes al xilema especifican a las células fundadoras de las raíces laterales. Las células del periciclo mantienen la capacidad de ser reprogramadas después del tratamiento con auxinas exógenas y pueden formar callos (Perianez-Rodríguez & Moreno Risueno, 2014).

Durante el proceso de regeneración, se identificaron cuatro etapas de desarrollo que asemejan la formación de una hoja. En ninguna de las estructuras regenerativas analizadas a diferentes tiempos de subcultivo fue posible observar estructuras semejantes a embriones globulares o con polaridad definida. Esto puede ser debido a las condiciones de regeneración utilizadas, particularmente a la presencia de luz desde la primera etapa. En algunos trabajos de maíz, se ha utilizado, como etapa previa a la regeneración, la reducción de hormonas en condiciones de oscuridad para promover el desarrollo de embriones somáticos (González et al., 2012). Sin embargo, esto no necesariamente funciona igual para todos los genotipos.

Aunque se sabe que las plantas tienen la habilidad para censar la luz con el fin de asegurar su establecimiento exitoso, el efecto de la luz en la inducción de embriones somáticos se encuentra pobremente caracterizada y varía dependiendo de la planta estudiada. En *Arabidopsis* el tipo de explante tiene una respuesta contrastante en la formación de embriones somáticos. En embriones inmaduros de etapas tardías, usados como explantes, la luz no tiene efecto en la formación de embriones somáticos, sin embargo en embriones cigóticos, en etapas tempranas, la luz tiene un efecto represivo en su desarrollo (Gaj, 2012). En algunos otros casos, la oscuridad reprime la inducción de embriones somáticos (De la Peña et al., 2008; Milojevic et al., 2012), mientras que en otros la favorece (Michler & Lineberg, 1987).

En plántulas de maíz por ejemplo, la luz (cercana al espectro rojo o infrarrojo) tiene un efecto en la estimulación precoz de los nodos coleoptilares de la raíces nodales (Lopez-Frías et al., 2011). Por esta razón quizá, durante las primeras etapas de regeneración en nuestro modelo, al reducir las hormonas

exógenas y la presencia del fotoperiodo, se esté promoviendo el desarrollo de estructuras post-embrionarias.

Sin embargo, en el maíz VS-535 se siguió el protocolo de regeneración en oscuridad y en fotoperiodo. En ambos casos se apreció la formación de estructuras globulares, sin embargo durante el fotoperiodo estas estructuras se elongaban para desarrollar finalmente la plántula, mientras que en oscuridad solamente se observó la formación de raíces (Chávez-Hernández *et al.*, 2015). A pesar de esto se tendría que realizar un estudio morfo-histológico a profundidad para descartar la aparición de posibles embriones somáticos bajo estas condiciones.

Durante la primera etapa de regeneración se observaron pequeñas protuberancias verdes en el callo que comenzaban a diferenciarse en la punta de una hoja hasta desarrollarse en una plántula completa. Todavía no se entiende cómo y donde se establece la formación de puntos regenerativos en el callo y por tanto el inicio de la formación de la hoja.

Se ha descrito que la formación de traqueidas puede estar asociada con etapas tempranas en el desarrollo de los meristemas del brote (Sarkar, 2009). Estas características, concuerdan con nuestro modelo ya que desde la 1° etapa de desarrollo, debajo de la zona meristemática o de proliferación celular es posible distinguir haces vasculares (**Fig. 19**). Otra posibilidad es el restablecimiento del flujo de auxinas endógenas y su localización máxima en el sitio de formación de los primordios foliares, tal y como sucede cuando se lleva a cabo el proceso de organogénesis en el SAM (Sluis *et al.*, 2015).

Así mismo notamos que, en la formación de las plántulas, la raíz emerge del tallo, lo que refuerza el hecho de que la regeneración *in vitro* no forma estructuras que tienen un origen semejante al embrionario como lo es la raíz primaria y las raíces seminales, sino que este tipo de raíz que observamos asemeja más a las raíces nodales o adventicias (de origen post-embrionario).

La formación de órganos y de una planta completa está finamente regulada por factores de transcripción cuya distribución depende del control de sRNAs que establecen el sitio donde el primordio del órgano se desarrollará, la formación de límites del nuevo órgano en el meristemo y finalmente el desarrollo a través de un periodo de morfogénesis (Benkovics *et al.*, 2014; D'Ario *et al.*, 2017). Por tal motivo, otro objetivo fue evaluar la acumulación de sRNAs involucrados en estos procesos.

Acumulación diferencial de sRNAs y sus blancos durante la desdiferenciación y la regeneración *in vitro* de maíz

Los miRNAs y tasiRNAs son sRNAs producidos mediante mecanismos de biogénesis similares en las plantas. Sin embargo, sus funciones pueden diferir dependiendo del organismo estudiado. En el caso del maíz, estos dos tipos de sRNAs han sido asociados a importantes características agronómicas como la arquitectura foliar, desarrollo de la raíz y el grano, así como tolerancia al estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2019). A pesar de esto, comparado con *Arabidopsis*, las funciones conocidas de los sRNAs en maíz son todavía limitadas. Por esta razón, los estudios que abordan el análisis de sRNAs y sus blancos durante el cultivo *in vitro* de maíz resultan altamente relevantes tanto para la biología del desarrollo como en biotecnología.

En el cultivo *in vitro* se ha observado una modulación profunda tanto de factores de transcripción como de miRNAs y tasiRNAs que muestran su relevancia para la correcta formación *de novo* de una planta a partir de células somáticas (Xiang *et al.*, 2011; Lara-Chavez *et al.*, 2012; Gliwicka *et al.*, 2013; Seefried *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Szyrajew *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2017). De forma específica, los sRNAs estudiados en este trabajo (seis miRNAs y tres tasiRNAs) se han descrito como reguladores clave en el desarrollo, principalmente durante la formación del SAM y de hoja en diferentes especies (Fig. 44 y Anexo IX).

Además, se ha propuesto que estos miRNAs son factores clave durante la organogénesis del brote y la ES (Tian *et al.*, 2017; Wojcik *et al.*, 2017). No obstante, a pesar de ser sRNAs conservados evolutivamente, se requiere su estudio específico en maíz y en este proceso de desarrollo tan particular como es la regeneración *in vitro*, ya que se ha propuesto que los miRNAs y los tasiRNAs pueden variar en las funciones que desempeñan, sobre todo en las vías de regulación corriente abajo de sus blancos (Dotto *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2017).

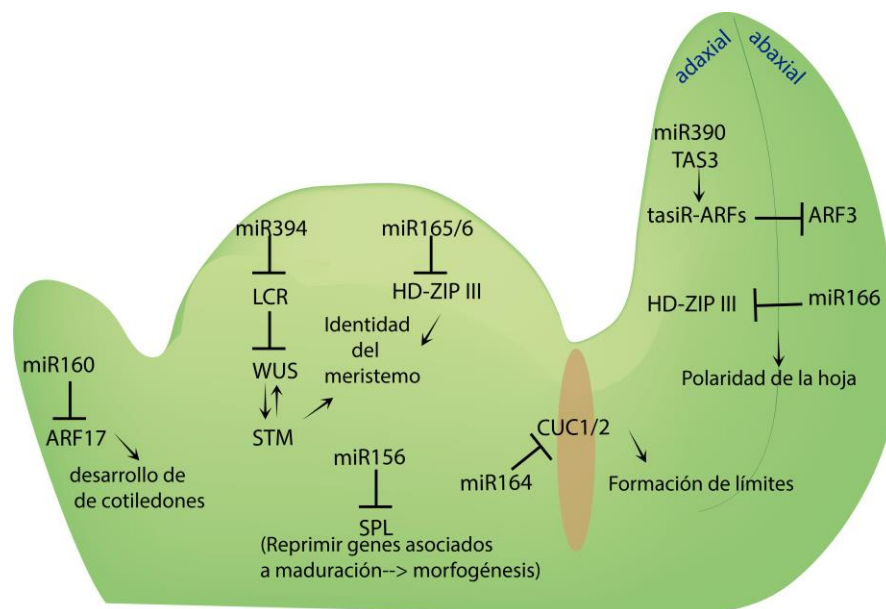


Fig. 44. Función de miRNAs y tasiRNAs durante el desarrollo del SAM y el primordio foliar. Modelo de regulación establecido principalmente para la planta *Arabidopsis thaliana*. La regulación por miR156, miR164 y tasiR-ARF ha sido demostrada también para maíz (Información de Yang *et al.*, 2018).

En este trabajo, se describieron patrones de acumulación diferencial de los elementos analizados tanto en los tipos de callos identificados, como en las etapas de desarrollo establecidas, lo que demuestra que entre los tejidos existen características particulares y distintivas tanto a nivel morfológico como molecular que pudieron ser evaluadas (Fig. 45).

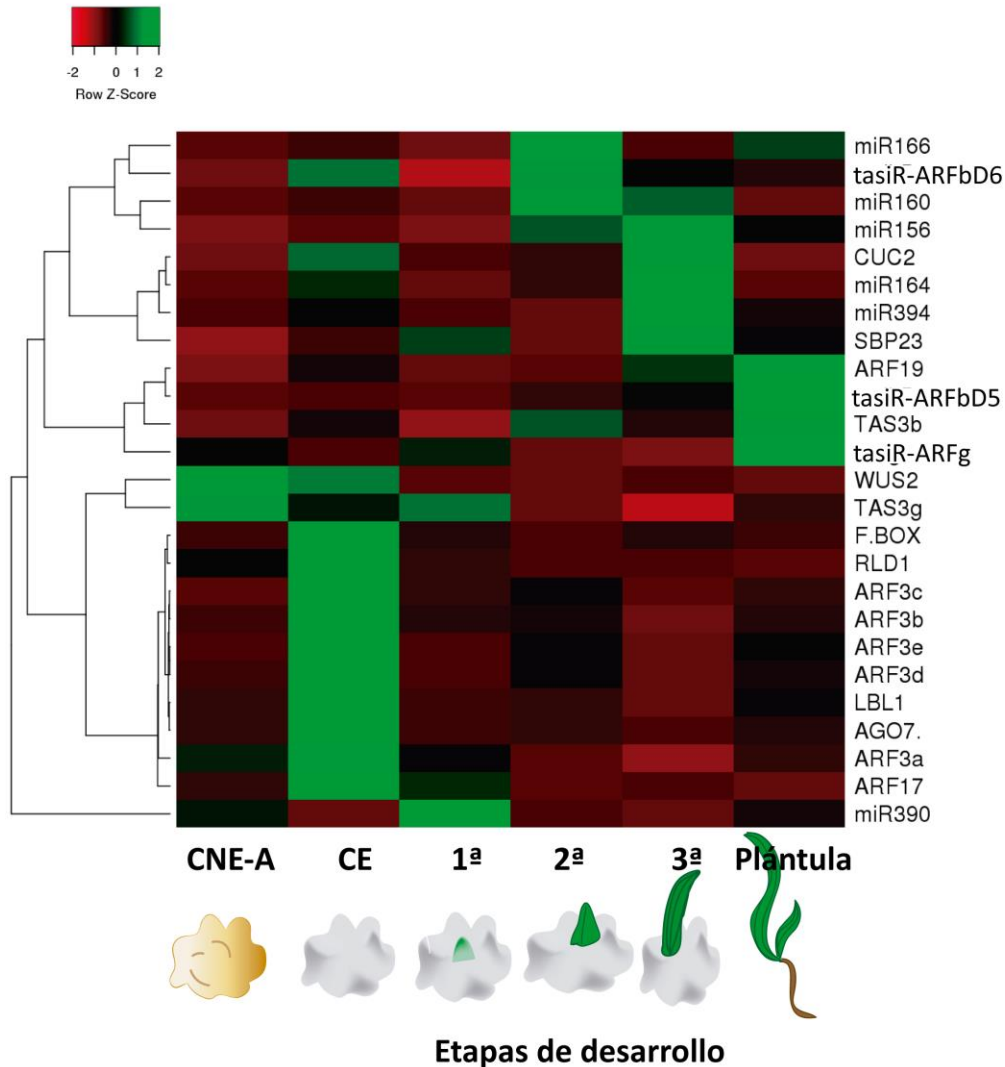


Fig. 45. Heatmap de los transcritos y sRNAs analizados por qPCR de los tejidos caracterizados. CNE-A: callo no embriogénico amarillo, CE: callo embriogénico, 1ª: primera etapa de desarrollo, 2ª: segunda etapa de desarrollo, 3ª: tercera etapa de desarrollo y plántula. El patrón de acumulación de los transcritos y sRNAs se analiza usando el *Row Z-Score* empleando las veces de cambio obtenidos por qPCR, usando como referencia el CE. Los valores arriba de la media se encuentran en color verde, es decir los elementos con mayor nivel en cada tejido a partir del promedio general (representado en color negro). En color rojo se muestran los valores debajo de la media.

De forma general, observamos que la mayoría de los sRNAs y sus blancos presentan mayor acumulación en el CE que en el CNE-A, sugiriendo que son elementos característicos de un tejido con capacidad pluripotente en el maíz VS-535. A pesar de la mayor acumulación de sRNAs-blancos en el CE, en ese tejido se detectó una correlación inversa entre miR164-*ZmCUC2*, miR160-*ZmARF17/ZmARF19* y miR166-*ZmRLD1*, donde existe una mayor abundancia de los transcritos blanco que de los miRNAs (Fig.24). Para miR156 y miR394 no se encontró dicha correlación inversa con sus respectivos blancos. Aunque todos los transcritos blanco de los sRNAs analizados en este trabajo han

sido validados como mRNAs que son escindidos por miRNAs particulares, no se descarta la posibilidad de que sean regulados a nivel de inhibición de la traducción.

Los miRNAs en plantas regulan sus transcritos blanco a través de dos modos de acción: el corte del mRNA y por inhibición de la traducción. En diversos estudios se ha demostrado que miRNAs como miR156, miR172, miR164 y miR165/miR166) presenten ambos modos de acción sobre los mismos transcritos (Gandikota et al., 2007; Schwab et al., 2005; Li *et al.*, 2013), lo que abre la interrogante de la relativa contribución de cada modo de acción en el desarrollo de la planta (Li *et al.*, 2013).

En el grupo de trabajo, durante la inducción y establecimiento proliferativo de callos de maíz Tuxpeño VS-535, se observó que uno de los blancos de miR528, *ZmPLC* (proteína tipo plastocianina) no exhibió una correspondencia inversa con la expresión de miR528 en muestras de RNA total. Por tanto, *ZmPLC* se consideró un candidato para ser regulado principalmente por inhibición de su traducción, sin embargo no se descarta su regulación mediante degradación por parte del miRNA, con base en resultados obtenidos mediante RLM-RACE (Amplificación de extremos de cDNA mediada por ligación de RNA) (Lujan-Soto, 2018).

Por otra parte, se han identificado miRNAs en tejidos proliferativos que han sido asociados a la capacidad regenerativa o totipotente. En *Arabidopsis*, por ejemplo, se han descrito dos tipos de callos: uno totipotente que puede formar brotes y otro no totipotente incapaz de regenerar, pero que puede proliferar. El callo totipotente deriva de explantes de plántulas (2 meses en un medio rico en auxinas) y el no totipotente deriva del callo totipotente subcultivado por 12 meses en el mismo medio de cultivo, que ha perdido su capacidad regenerativa (Qiao *et al.*, 2012). En el callo totipotente son más abundantes los miRNAs: miR397, 398, 774, 843 y 859, mientras que en el callo no totipotente son más abundantes: miR157, miR159, miR160, miR165, 166, 167, 319, 390, 393 y 394.

Por otra parte, en arroz, el CE posee mayor acumulación de miR159, miR168, miR397, miR319, miR564 y miR564. Estos resultados demuestran que, dependiendo de la especie, la acumulación de miRNAs en los callos con diferente capacidad regenerativa puede variar. En este trabajo de tesis, solamente se evaluaron cinco miRNAs por lo que se mantiene como perspectiva evaluar la acumulación de más miRNAs.

Por otra parte, respecto a las etapas de desarrollo en la variedad de maíz Tuxpeño VS-535, observamos una drástica disminución de la mayoría de los sRNAs en la 1ª etapa, con un incremento posterior en las etapas 2, 3 o plántula. De la misma forma, la mayoría de los blancos muestran también una disminución en su acumulación en la 1ª etapa que, en la mayoría de los casos, se mantiene durante las etapas subsecuentes. Con base en esto, se propone que, durante la 1ª etapa, existe una relocalización de transcritos en el callo, limitando su acumulación en la región que regenerará, promoviendo eventualmente la formación *de novo* del SAM y el inicio de primordio foliar tal y como se ha descrito en literatura para los transcritos de la familia *HD-ZIP III*, *AtARF3* y *AtCUC2* durante la formación *de novo* del brote (Gordo *et al.*, 2007; Cheng et al, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Sin embargo, en estos trabajos no se evaluó la localización de los sRNAs que los regulan, por lo que queda como un campo pendiente en investigación.

Regulación por miRNAs en los tipos de callo y las etapas de regeneración *in vitro* de maíz.

En este trabajo se examinó la abundancia de cinco miRNAs y sus blancos durante la regeneración de tejidos pluripotentes comparándola con un tejido incapaz de formar una plántula. Se analizó miR156 y a su blanco, el transcrito *ZmSBP23* que es ortólogo a *AtSPL10/11*. Se detectó que *ZmSBP23* y miR156 tienen una mayor abundancia en el CE, respecto al CNE-A. La inexistencia de una correlación inversa entre este miRNA y su blanco factiblemente se debe a la existencia de un nivel de regulación distinto, como la inhibición traduccional, además hay que recalcar que miR156 tiene otros blancos que no fueron evaluados en este trabajo (Gandikota *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2016).

MiR156, es un microRNA que se ha descrito como partícipe clave en diversos procesos de desarrollo, varios de ellos contrastantes. En la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis*, en el estadio de desarrollo de ocho células, miR156 reprime a sus blancos *AtSPL10/11* previniendo la acumulación de transcritos de genes inducidos durante la fase de maduración como las que codifican para oleocinas, proteínas necesarias durante el proceso de desecación (Vashisht & Nodine, 2014). Por tanto, la mayor abundancia en el CE puede estar relacionada a algunas características afines al estado desdiferenciado o a la totipotencia, como ha sido identificado en el callo de naranja, donde miR156-[Xy]*SPL* modulan el incremento del potencial embriogénico en subcultivos prolongados (Long *et al.*, 2018).

Además, observamos una mayor acumulación de miR156 en la 2ª etapa de desarrollo respecto al CE, lo que indica su posible requerimiento durante la diferenciación de la hoja. Resultados similares fueron encontrados durante la ES de maíz de VS-535 y H-565 al reducir a la mitad la concentración de hormonas del medio de cultivo, donde el callo regenerativo incrementa la acumulación de miR156 y disminuye la abundancia de *ZmSBP23*, aunque en este trabajo no se definieron etapas de desarrollo y el tejido era aún heterogéneo (Chavez-Hernandez *et al.*, 2015). Asimismo, en arroz, el callo diferenciado (20 días en fotoperiodo) presenta una mayor expresión de miR156 respecto al callo no diferenciado, lo que sugiere que este miRNA modula la identidad y la función del CE (Luo *et al.*, 2006). De la misma forma, miR164 se acumula más en el CE y posteriormente decreta su abundancia durante las primeras etapas de regeneración. Se sabe que este miRNA está asociado a la formación de límites durante la iniciación de órganos en los meristemas, reprimiendo a sus blancos *AtCUC1* y *AtCUC2*. De esta forma, *AtCUC1* y *AtCUC2* promueven la división celular y establecen el mantenimiento del meristemo apical. Mutaciones en estos genes, afectan la iniciación del SAM (Laufs *et al.*, 2004). Quizá por esta razón, *ZmCUC2* es más abundante en el CE, para mantener la identidad meristemática del tejido, lo que resulta necesario para el éxito durante la regeneración.

Durante la 1ª etapa de desarrollo, se observa una disminución en la acumulación de *AtCUC2*, similar a lo descrito en la literatura donde se ha establecido que un incremento de auxinas en el sitio de iniciación del primordio foliar, facilita la formación de órganos a través de la desregulación de *AtCUC1/2* (Shani *et al.*, 2006). Asimismo, observamos una acumulación importante de este miRNA y su blanco en la 3ª etapa de desarrollo, cuando la hoja ya está desarrollada. Aunque el módulo miR164-*AtCUC2* está involucrado en la serración de hojas en *Arabidopsis* (Nikovics *et al.*, 2006), en maíz aún no se ha asociado al desarrollo de la arquitectura foliar.

El CE también presentó una correlación inversa entre miR160 y sus dos blancos, donde se mostró una mayor acumulación de *ZmARF17* y *ZmARF19* que del miRNA. Respecto a esto, la función de miR160 en los procesos de desarrollo *in vitro* también ha sido estudiado. La represión de [Xy]*ARF10/16/17* mediada por miR160 en *D. longan* controla la respuesta embriogénica en el cultivo *in vitro* (Lin *et al.*, 2015).

En *Arabidopsis*, miR160 regula la reprogramación celular y la formación del callo, ya que sus blancos se encuentran más acumulados durante la desdiferenciación del tejido (Liu *et al.*, 2016; Wójcik *et al.*, 2017). Por otra parte, la mayor acumulación de miR166 en el CE que en el CNE-A indica que en este callo debe existir una fina regulación de sus blancos. De hecho, en este tejido existe una fuerte correlación inversa entre *ZmRLD1*, un factor transcripcional tipo HDZIP III, y miR166.

Se ha descrito que en la embriogénesis cigótica, miR166 juega un rol importante para restringir espacial y temporalmente a sus blancos de la familia HD-ZIP III para controlar la formación del SAM, RAM, así como la simetría bilateral del embrión (Williams *et al.*, 2005; Smith and Long, 2010; Miyashima *et al.*, 2013). Al igual que miR156, la vía miR166 y de transcritos de la familia HD-ZIPIII actúa en paralelo durante el desarrollo temprano del embrión para reprimir el programa de maduración, lo que previene la acumulación precoz de transcritos que promueven la diferenciación (Nodine & Vartel, 2010; Vashisht & Nodine, 2014). De esta forma, ámbos módulos podrían ser relevantes durante el mantenimiento del estado desdiferenciado del CE. Asimismo, en condiciones *in vitro* se reconoce que una expresión desregulada de miR165/miR166 y miR160 resulta en una elevada acumulación de auxinas debido a que los blancos de estos miRNAs (*AtARF10/16* y los transcritos tipo HDZIP-III) regulan positivamente a *AtLEC2*, que a su vez activa a los genes *AtYUC* para la activación de la vía de biosíntesis de auxinas con el fin de ayudar a los procesos morfogénicos del tejido (Wójcik *et al.*, 2017).

Finalmente, respecto a miR394, se sabe que la represión de su blanco *AtLCR*, que codifica para una ubiquitina ligasa con caja F-BOX, es esencial para la proliferación de las células troncales en el SAM (Knauer *et al.*, 2013). Sin embargo, en cultivo *in vitro* no se le ha asociado con funciones de pluripotencia o totipotencia de los callos embriogénicos.

Al contrario, en *Arabidopsis* y *Lilium pumilum*, miR394 se encuentra más acumulado en el CNE y por ende está asociado a la incapacidad de regenerar una plántula (Qiao *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017). En *Lilium*, la baja acumulación de miR394 en el callo se ha asociado al metabolismo de carbohidratos durante la embriogénesis somática, permitiendo la acumulación de otro blanco de este miRNA, una endo 1,3 beta glucosidasa, aunque su relevancia en el proceso todavía no se conoce (Zhang *et al.*, 2017).

Respecto a las etapas de regeneración, la disminución en la abundancia de miR166 en la 1ª etapa de regeneración sugiere un evento de relocalización del miRNA y posiblemente de su blanco. Se ha descrito que en cultivo *in vitro* miR166 restringe a uno de sus blancos en el sitio del explante donde se formaran los embriones somáticos. Es así que, la mayor acumulación de los transcritos HDZIP-III en estos sitios se asocia a eventos posteriores de diferenciación (Wójcik *et al.*, 2017).

De la misma forma, la mayor acumulación de miR166 y miR160 se observa en la 2ª etapa de desarrollo y en la plántula, donde miR166 podría estar llevando a cabo su función en la polaridad de la hoja, como ha sido previamente demostrado en maíz (Nogueira *et al.*, 2009) y en el desarrollo de raíz, como ha sido descrito en *Arabidopsis* (Carlsbecker *et al.*, 2010).

La regulación de miR160 y su blanco *AtARF17* ha sido asociada al desarrollo correcto de las porciones apicales del embrión incluyendo los cotiledones. La expresión de transcritos *AtARF17* insensibles al corte por miR160 provoca que los embriones desarrollen más cotiledones, además de presentar células epidermales alteradas en el lado abaxial (Mallory *et al.*, 2005).

En nuestro modelo, la mayor acumulación de miR160 y los bajos niveles del transcrito *ZmARF17* en la 2ª etapa podrían regular el desarrollo correcto de la hoja. Además, este módulo está involucrado en la formación de la caliptra en las raíces gracias a la regulación de sus blancos *AtARF16* y *AtARF17*, quienes participan en la restricción del nicho de células troncales y promueven la diferenciación de la caliptra (Wang *et al.*, 2005). Acorde a esto, el incremento en la expresión de *ZmARF19* y la regulación a la baja de miR160 en plántula sugiere su participación en el desarrollo de la raíz.

La correlación inversa entre miR394 y su blanco en la 3ª etapa de regeneración puede estar asociada a la morfología de la hoja. En la literatura se ha descrito que este módulo de regulación está asociado al fenotipo de hojas enroscadas (*curling*) en *Arabidopsis*. La sobreexpresión de *AtLCR* provoca un fenotipo de hoja curvada hacia abajo, mientras que el knock-down de *LCR* provoca que las hojas se curven hacia arriba. Tanto miR394 como *AtLCR* se coexpresan en las hojas, sin embargo los niveles de miR394 son débilmente detectados, aunque son suficientes para controlar a los transcritos de *AtLCR*. Además, en las mutantes sobreexpresoras de miR394 o deficientes de *AtLCR*, existe una afectación en el desarrollo de las venas de las hojas (sobre todo en el cotiledón), la vena principal no se ve afectada, sino las venas secundarias o terciarias (Song *et al.*, 2012).

Papel de la vía tasiR-ARF en el proceso de regeneración *de novo* de una plántula

La vía tasiR-ARF se encuentra conservada en plantas terrestres y ejerce su función silenciando a los transcritos ARF3/4 para la correcta formación de órganos como la emergencia de raíces laterales, formación del embrión, del SAM y la polaridad de la hoja. Estos dos últimos procesos se encuentran estrechamente relacionados tal como se explica más adelante (Xia *et al.*, 2017; Nogueira *et al.*, 2009; Marin *et al.*, 2010; Nagasaki *et al.*, 2007). Sin embargo, en cultivo *in vitro* únicamente se ha asociado la expresión de los precursores de esta vía o sus blancos con etapas de regeneración establecidas (Lin *et al.*, 2015).

En nuestro modelo, observamos la presencia de protuberancias que emergían del callo que corresponden a la punta de la hoja en formación, esa zona presenta una alta proliferación celular y se observa, además, una marcada señal de auxinas en el sitio. Se sabe que durante el surgimiento de los primordios foliares, el sitio donde se formará el nuevo órgano es en la zona periférica del SAM, donde las células se dividen de forma rápida, siendo competentes para la organogénesis. Además, existe una concentración máxima de auxinas en ese lugar debido a sus gradientes de concentración establecidos por un transporte polar dirigido por las proteínas de eflujo PIN (Sluis *et al.*, 2015).

Para la formación de hojas se necesita la presencia de un SAM, no solo para su origen sino también para establecer la polaridad de la hoja, ya que esta característica está dada por los elementos o señales que derivan del SAM. Experimentos de ablación muestran que si se separa el primordio foliar incipiente del SAM, éste pierde su polaridad, formando hojas abaxializadas, ya que se necesita una señal continua proveniente del meristemo. Incluso se ha especulado que la polaridad adaxial-abaxial

de la hoja incipiente es una manifestación de un pre-patrón apical-basal del meristemo (Sussex et al., 1951; Kidner *et al.*, 2010).

En nuestro modelo no observamos la morfología de un SAM descrita en la literatura (forma de domo, con diferentes zonas y capas y con los primordios foliares laterales). Esto puede ser debido a que el CE no presenta organización celular sino cúmulos de células pequeñas que asemejan las células meristemáticas. La prueba más cercana de la presencia de un SAM, fue la localización por hibridación *in situ* de ARF24 en el costado de la hoja en regeneración, ya que en Arabidopsis la localización de *AtARF3* (ortólogo de *ZmARF24*) marca la formación de novo del SAM (Cheng *et al.*, 2013). Debido a esto, se necesita la detección de marcadores de SAM en maíz que ayuden a identificar cómo se da la formación *de novo* del SAM y el posterior desarrollo de las hojas, tejido que fue detectado desde la regeneración incipiente.

Aunque es difícil determinar en qué momento se da la especificación de la polaridad de la hoja, en nuestro modelo se puede diferenciar que en la 1ª etapa únicamente observamos la punta de hoja sin polaridad aparente y ya en la 2ª etapa detectamos características morfológicas de la hoja indicativas del lado adaxial como es la presencia de macropelos (Juarez *et al.*, 2004).

En maíz, la polaridad de la hoja esta dada por una vía de regulación genética que involucra a dos sRNAs y sus blancos: tasiR-ARFs-*ZmARF3* y miR166-*ZmRLD1* (un gen de la familia HD-ZIP III). Antes del descubrimiento de la vía tasiR-ARF, se sabía que los factores de transcripción HD-ZIP III y ARF3/4 estaban involucrados en la polaridad de las hojas y el correcto desarrollo del SAM (Kidner *et al.*, 2010). Por qPCR observamos que los mayores cambios en la vía ocurren en la 1ª etapa, cuando se incrementa la acumulación del precursor *TAS3g*, tasiR-ARFg, miR390 y disminuye la abundancia de los RNAs mensajeros de *ZmARF3* y *ZmRLD1*. En la 2ª etapa se observaron aumentos de *TAS3b*, tasiR-ARFbD6, miR166. Esto sugiere que en las etapas tempranas de regeneración hay cambios a nivel de los elementos reguladores de la identidad de hoja, aún cuando el análisis histológico no permite establecer un patrón de diferenciación definido.

En la 3ª etapa, los elementos de la vía tasiR-ARF analizados presentan bajos niveles, mientras que en la plántula diferenciada se eleva la acumulación de tasiRNAs y de miR166 manteniendo bajos los niveles de *ZmARF3*. Además, en todas las etapas de regeneración la abundancia del transcrito de AGO7 se mantuvo en niveles similares, por lo que es necesario hacer una evaluación a nivel proteínico para confirmar estos resultados.

En maíz, se han detectado espacialmente mediante hibridación *in situ* algunos de los elementos de la vía tasiR-ARF en el SAM y los primordios de hoja (Nogueira *et al.*, 2009). En el SAM los precursores MIR390A y B se encuentran en la capa L1 y se ha postulado que migran al lado adaxial de la hoja, donde restringen posicionalmente a la biogénesis de los tasiR-ARFs (Nogueira *et al.*, 2009). De hecho, en la mutante *lbl1*, miR390 permanece aún adaxializado lo que lo convierte en un componente arriba de toda la vía tasiR-ARF (Husbands *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2009).

En diversas plantas, existe información respecto a la expresión de miR390. En nuestro modelo, el CE, al contrario de la mayor acumulación observada para los otros miRNAs analizados, fue el tejido que mostró la menor acumulación de miR390 y posteriormente incrementó drásticamente durante la 1ª etapa de desarrollo. Esto es algo muy importante, ya que detectamos el mismo comportamiento en el lote de 2 años de subcultivo (**Anexo VIII**), lo que sugiere que miR390 es un factor importante

durante la regeneración *in vitro* de maíz que debe incrementar su abundancia en la 1ª etapa de desarrollo.

Estos resultados concuerdan con la ES de *D. longan* donde el CE también fue el tejido con el menor nivel de miR390 y el embrión somático en estadio torpedo fue el tejido con la mayor abundancia. De manera similar, en algodón, el embrión somático globular presentó el mayor nivel de miR390, lo que sugiere que en estadios tempranos de diferenciación este miRNA resulta relevante.

Por el contrario, en la ES de naranja, el CE fue el tejido con la mayor acumulación de miR390 y durante el desarrollo de los embriones somáticos se mantuvo en niveles moderados (Yang *et al.*, 2013). En nuestro modelo, el CNE fue uno de los tejidos que presentó mayor abundancia de este miRNA, coincidiendo con la acumulación de miR390 en el callo no totipotente de *Arabidopsis* (Qiao *et al.*, 2012).

Por otra parte, en el grupo de trabajo se encontró una elevada acumulación de miR390 que correlaciona con la mayor cantidad de tasiRNAs derivados de *TAS3* durante la inducción de callos (cultivo de 1 mes) comparados con el embrión inmaduro y con otros callos subcultivados por 4 y 10 meses (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). Esto sugiere que estos tasiRNAs posiblemente sean requeridos durante la desdiferenciación del explante para producir células pluripotentes y no necesariamente para su mantenimiento.

Algunos componentes de la vía tasiR-ARF: *ZmLBL1* y *ZmAGO7* (*RAGGED SEEDLING*, *RGD2*) se acumulan principalmente en el CE, a diferencia de lo observado para miR390 o los tasiRNAs, lo que sugeriría que los complejos que promueven la biogénesis de tasiRNAs se encuentran limitantes.

Se sabe que *ZmAGO7* limita el movimiento de miR390 en el SAM de maíz, permitiendo que se localice solamente en las capas L1, L2 y en el lado adaxial del primordio foliar. En mutantes de *ago7*, miR390 se localiza en toda la parte apical del SAM. Al mismo tiempo, el hecho que los transcritos de *ZmAGO7* y *ZmLBL1* tengan el mismo patrón de acumulación en los tejidos analizados en nuestro modelo sugiere que sus requerimientos son similares. Por ejemplo, en la literatura se ha establecido que algunas funciones de *ZmRGD2* y *ZmLBL1* son redundantes o convergentes y son requeridas para el desarrollo del SAM (Douglas *et al.*, 2010).

LBL1 es el ortólogo *SGS3* en *Arabidopsis* y participa en la biogénesis de la tasiRNAs, sin embargo se ha propuesto que *LBL1* lleva a cabo funciones adicionales a la polaridad de la hoja en maíz (Douglas *et al.*, 2010). Las mutantes *lbl1* sobreacumulan transcritos de un parálogo de *AGO1* y de miR166 en el lado adaxial de la hoja, en un patrón que sobrelapa con la acumulación de *AGO1* (Brooks *et al.*, 2009). Esta sobrerregulación de *AGO1* en mutantes *lbl1*, en conjunción con la sobreacumulación ectópica de miR166, puede resultar en el incremento de la degradación posttranscripcional de los genes de la familia *HD-ZIP III* (Douglas *et al.*, 2010).

En este contexto, la mayor acumulación de *LBL1* permitiría mayor abundancia de las proteínas HDZIP-III, que son esenciales para evitar la acumulación precoz de transcritos que promueven la diferenciación, además de permitir la regulación positiva de *LEC2* y con esto la activación de la síntesis de auxinas (Nodine & Vartel, 2010; Vashisht & Nodine, 2014; Wójcik *et al.*, 2017). Esto posiblemente ayudaría a mantener el estado desdiferenciado y permitir la síntesis de auxinas en el CE (como se observó en la inmunolocalización de IAA).

Además, en un estudio en 2014, dónde Dotto *et al.*, al evaluar el contenido de sRNAs en ápices vegetativos de plantas mutantes en *lbl1* y silvestres, encontraron que *LBL1* afecta la acumulación de

sRNAs de todas las clases principalmente aquellos que regulan retrotransposones. De esta forma, LBL1 podría estar asociado a otras funciones, como la integridad del genoma mediante el silenciamiento de transposones. Esto se ajusta con lo encontrado en el laboratorio, ya que los sRNAs de 24 nts disminuyen durante la inducción, respecto en los embriones usados como explantes. Específicamente los hc-siRNAs de 24 nts, derivados de transposones, decrece su acumulación en el callo inducido (Juarez-Gonzalez *et al.*, 2019).

Respecto a los genes *TAS3*, se ha reportado una correlación inversa entre estos transcritos y miR390 asociándolos a su procesamiento (Zhang *et al.*, 2012; 2013). Nosotros observamos esta correlación inversa para los dos genes *TAS3* analizados, sobre todo en la 1ª etapa de regeneración, lo que sugiere un evento de procesamiento para la generación de tasiRNAs, aunque solo lo detectamos para tasiR-ARFg. En *D. longan* existe esta correlación inversa en las etapas globular y cotiledonar del desarrollo embrionario, así como una relación inversa entre $[Xy]TAS3$ y $[Xy]ARF3$. En *Larix leptolepis*, la abundancia de $[Xy]TAS3$ también presenta correlación inversa con la de miR390 en los embriones somáticos cotiledonares, que además concuerda con la mayor abundancia de tasiRNAs (Zhang *et al.*, 2012; 2013). De los siete genes *ZmTAS3*, *ZmTAS3g* fue el más abundante en nuestro modelo, lo que concuerda con la acumulación de su tasiRNA maduro en todos los tejidos analizados. En el ápice de maíz variedad B73, *ZmTAS3g* es el que presenta una mayor abundancia de sRNAs de 21 nt e incluso puede generar tasiRNAs cuyo blanco es el mismo transcrito *ZmTAS3g*, formando así un asa de regulación (Dotto *et al.*, 2014). La sonda para *ZmTAS3g* mostró una marcada señal en el CNE asociado a la vasculatura que corresponde con los datos observados por PCR cuantitativo, al ser el tejido que más lo acumula. Sin embargo, su función aún es desconocida. De igual forma en la 1ª etapa de desarrollo, se detectó señal en la punta y en la base del tejido en regeneración. La localización y función de este transcrito en otros tejidos o procesos aún es desconocida, solamente se ha descrito como un gen que, además de expresarse en el ápice de maíz, es desregulado durante el estrés por sequía (Lunardon *et al.*, 2016). Esto implica una conexión entre el control de desarrollo y las condiciones ambientales en las hojas de maíz, pero más información es requerida para entender dichos procesos.

Para *ZmTAS3b* se observó una mayor acumulación en la 2ª etapa y en plántula que corresponde parcialmente con la acumulación de sus dos tasiRNAs. La forma de explicar esto podría ser por la estabilidad de los tasiRNAs o por la presencia de los efectores de la vía a nivel celular. A nivel histológico, solamente se ha determinado que el transcrito del gen *TAS3a* se acumula en el lado abaxial del primordio de hoja de maíz, que es consistente con la biogénesis y función de tasiR-ARF en el dominio adaxial (Douglas *et al.*, 2010).

TAS3a-d se localizan en la capa L1 y L2 del SAM de maíz, la capa L1 origina la epidermis y la L2 forma el cuerpo del meristemo. La capa L1 es necesaria para la adecuada distribución de auxinas en el SAM (Kessler *et al.*, 2006). Alteraciones o ablaciones en estas capas provocan anomalías en el SAM y la hoja, ya que en ellas se encuentran las células fundadoras para producir tanto el primordio foliar como para establecer su polaridad (Kidner *et al.*, 2010). A pesar de esto, se desconoce si los otros *ZmTAS3* y los tasiRNAs que producen tienen una distribución especializada en el SAM o incluso en toda la planta.

De forma general, los tres tasiRNAs que analizamos tienen una mayor acumulación en la 1ª etapa (tasiR-ARFg), 2ª etapa (tasiR-ARFbD6) y en la plántula (tasiR-ARFbD5) y presentan una correlación inversa para todos los *ZmARF3* evaluados. No se había reportado con anterioridad su función en estadios de desarrollo correspondientes a la regeneración *in vitro* de maíz. En nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis por secuenciación masiva para determinar los sRNAs involucrados en el proceso de inducción de callos. Se encontraron dos grupos definidos de tasiRNAs antes y después de la inducción. De estos, tasiR-ARFg se encuentra entre los tasiRNAs más abundantes en el embrión de 15 dpp y tasiR-ARFbD5 y bD6 son los más expresados en el callo (Juarez-Gonzalez *et al.*, 2019).

Finalmente, los cinco ARF de maíz que son blanco de la vía tasiR-ARF mostraron un comportamiento similar, con mayor expresión en el CE que disminuye conforme avanza el proceso de regeneración. Este patrón podría sugerir que poseen funciones redundantes, sin embargo estudios del transcrito de estos ARFs han demostrado una expresión diferencial tanto a nivel de tejido como en procesos del desarrollo (Xing *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, la aplicación de auxinas exógenas (NAA) en plántulas sobrerregula a *AtARF3*, anticipando que el análogo de auxinas 2,4-D pudiera tener un efecto similar para el CE. También observamos en el CE, mediante inmunolocalización, una marcada señal de auxinas sin polaridad aparente, lo que también fue detectado para la localización de *ZmARF24* mediante hibridación *in situ*. Esto indica que *ZmARF24* y las auxinas tienen patrones de acumulación dispersa en tejido no diferenciado como el CE y posteriormente adquieren localización definida en la 1ª etapa de regeneración. En *Arabidopsis*, en el callo no diferenciado las auxinas y *AtARF3* comparten patrones de acumulación similares en la periferia, mostrando polarización posterior para marcar el inicio del SAM (Cheng *et al.*, 2013).

AtARF3 se ha identificado como un sensor atípico de IAA que no interactúa con los dominios de las proteínas represoras AUX/IAA, percibiendo de forma indirecta a las hormonas a través de su dominio específico ES (dominio específico de ETT). Se ha propuesto un modelo donde la concentración de auxinas determina la interacción de *AtARF3* con factores de transcripción. Cuando se incrementan los niveles de auxina, la interacción entre *AtARF3* y el factor de transcripción se debilita (Simonini *et al.*, 2016). Mediante ensayos de doble híbrido se determinó que el modelo de sensado de auxinas se basa en la heterodimerización de *AtARF3* con factores transcripcionales (por ejemplo, los que tienen los dominios bHLH, HOMEBOX, AP2 y de la familia YABBY) generando una conformación que sensa al IAA (el dominio ES por sí solo no une a la auxina y esto se atribuye porque *AtARF3* es una proteína intrínsecamente desordenada). Aunque los detalles moleculares no están claros, se especula que este mecanismo podría involucrar la formación de un bolsillo de unión a auxinas en la región interfacial del heterodímero o por un mecanismo alostérico (Simonini *et al.*, 2018). El triptófano y los aminoácidos ácidos como el ácido aspártico contribuyen a las interacciones proteína-proteína. Estos grupos son comunes a las características del IAA, específicamente con el anillo indol y el grupo ácido carboxílico, por tanto se sugiere que la auxina, a ciertas concentraciones, facilita la unión entre proteínas. Sin embargo, a altas concentraciones, el IAA debilita la interacción y libera a ARF3 del factor de transcripción (Kubes & Napier, 2019).

Por otra parte, en el modelo de ES y organogénesis, Wójcikowska & Gaj (2017) reportaron que *AtARF3* reduce su acumulación respecto al explante conforme empieza el proceso de formación de los embriones somáticos. Considerando la posible actividad represora de *AtARF3*, se propone la disminución de su abundancia durante la regeneración para permitir la diferenciación celular. La

respuesta transcripcional debe ser altamente específica no solo para los procesos de desarrollo sino para el tejido y tipo celular (Weijers *et al.* 2005), por lo que su localización debe ser polarizada. La polaridad de *ZmARF24* de maíz se ha observado únicamente en el lado abaxial de primordios foliares, pero no en el SAM de plántulas (Nogueira *et al.*, 2009). En nuestro modelo, observamos una señal de hibridación para *ZmARF24* en el costado del punto regenerativo que podría estar marcando el sitio del SAM o del brote regenerativo ya polarizado para la formación de la hoja. Algo similar se había observado en el proceso de regeneración *in vitro* de *Arabidopsis* (Cheng *et al.*, 2013).

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusión general

Durante la regeneración *in vitro* de maíz la mayoría de los componentes de la vía tasiR-ARF y los miRNAs mostraron una expresión diferencial en las etapas de desarrollo establecidas. De estos sRNAs, los miRNAs tuvieron una correlación inversa (CI) con sus blancos en etapas asociadas al desarrollo de la hoja. Los tasiR-ARFs, por su parte, presentaron una CI con los *ZmARF3s* en todas las etapas de regeneración.

Conclusiones particulares

- Durante la desdiferenciación celular del embrión inmaduro de maíz Tuxpeño VS-535 se identificaron morfológicamente tres tipos de callos, de los cuales solo el llamado callo embriogénico (CE) tiene la capacidad de regenerar plántulas. La regeneración *in vitro* del CE sigue un proceso de formación de hoja.
- Se obtuvieron patrones de acumulación diferencial de los elementos analizados (miRNAs-blancos y de la vía tasiR-ARF) tanto en los distintos tipos de callos, como en las etapas de desarrollo, lo que demuestra que entre los tejidos existen características de desarrollo particulares tanto a nivel morfológico como molecular.
- La mayoría de los sRNAs y sus blancos presentan mayor acumulación en el CE que en el CNE-A, sugiriéndolos como elementos que pueden caracterizar a un tejido con capacidad pluripotente en el maíz Tuxpeño VS-535. La mayoría de los transcritos, blancos de los sRNA analizados se reducen significativamente en todas las etapas de regeneración.
- De los miRNAs analizados, miR160 y miR166 tienen su nivel máximo en la segunda etapa de desarrollo justo cuando comienza el desarrollo adaxial de la hoja.
- miR156, miR164 y miR394 tienen su mayor nivel en la tercera etapa de desarrollo sugiriendo un papel en la diferenciación de la hoja monocotiledonea.
- En la vía tasiR-ARF, los mayores cambios se detectaron en la 1ª y 2ª etapa de regeneración debido al incremento de la acumulación del precursor TAS3g, tasiR-ARFg, miR390 y la disminución de la abundancia de los ARF3 y RLD1 en la 1ª etapa de desarrollo. En la 2ª etapa, al contrario se observó un aumento de la abundancia de TAS3b, tasiR-ARFbD6 y miR166.

Perspectivas

- Analizar el patrón de expresión de los marcadores para SAM, RAM y sRNAs analizados, así como a sus transcritos blancos mediante hibridación *in situ*. Esto permitirá un entendimiento profundo del proceso de especificación celular durante la regeneración *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la luz en el posible desarrollo de embriones somáticos a partir del CE.
- Crear mutantes en maíz Tuxpeño VS-535 deficientes en la producción de algunos de los sRNAs analizados o el uso de transgenes insensibles al corte de los sRNAs. Esto revelará si los sRNAs y transcritos blanco analizados están involucrados durante el proceso de dediferenciación o regeneración.
- Comparar la expresión de los elementos de la vía tasiR-ARF en plántulas obtenidas de germinación y las derivadas de regeneración *in vitro*, analizando por separado hojas y raíces (primarias y nodales).
- Evaluar la expresión de los sRNAs y transcritos de la vía tasiR-ARF en el teosintle, lo que permitirá comprender la conservación de esta vía en el ancestro del maíz y comparar sus funciones con las variedades de importancia económica.

REFERENCIAS

- Aguado-Santacruz, G. A., García-Moya, E., Aguilar-Acuña, J. L., Moreno-Gómez, B., Solís-Moya, E., Preciado-Ortiz, E. R., ... & Rascón-Cruz, Q. (2007). In vitro plant regeneration from quality protein maize (QPM). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(3), 215-224.
- Ahmadabadi, M., Ruf, S., & Bock, R. (2007). A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic research*, 16(4), 437-448.
- Al-Abed, D., Rudrabhatla, S., Talla, R., & Goldman, S. (2006). Split-seed: a new tool for maize researchers. *Planta*, 223(6), 1355-1360.
- Alejandri-Ramirez, N. D., Chavez-Hernandez, E. C., Contreras-Guerra, J. L., Reyes, J. L., & Dinkova, T. D. (2018). Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiology and Biochemistry*, 122, 78-89.
- Asahina, M., Azuma, K., Pitaksaringkarn, W., Yamazaki, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., ... & Koshiba, T. (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2. 6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16128-16132.
- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., ... & Chriqui, D. (2009). Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant Journal*, 57(4), 626-644.
- Barloy, D., & Beckert, M. (1993). Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(1), 45-50.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639-666.
- Benkovics, A. H., & Timmermans, M. C. (2014). Developmental patterning by gradients of mobile small RNAs. *Current Opinion in Genetics & Development*, 27, 83-91.
- Bian, H., Xie, Y., Guo, F., Han, N., Ma, S., Zeng, Z., ... & Zhu, M. (2012). Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 196(1), 149-161.
- Birnbaum, K. D., & Alvarado, A. S. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, 132(4), 697-710.
- Bohorova, N. E., Luna, B., Brito, R. M., Huerta, L. D., & Hoisington, D. A. (1995). Regeneration potential of tropical-subtropical-midaltitude and highland maize inbreds [Mexico]. *Maydica (Italy)*.
- Braybrook, S. A., & Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, 13(12), 624-630.
- Brooks III, L., Strable, J., Zhang, X., Ohtsu, K., Zhou, R., Sarkar, A., ... & Ware, D. (2009). Microdissection of shoot meristem functional domains. *PLoS genetics*, 5(5), e1000476.
- Bustillo-Avenidaño, E., Ibáñez, S., Sanz, O., Barros, J. A. S., Gude, I., Perianez-Rodriguez, J., ... & Pérez-Pérez, J. M. (2018). Regulation of hormonal control, cell reprogramming, and patterning during de novo root organogenesis. *Plant Physiology*, 176(2), 1709-1727.
- Calderon-Villalobos, L. I., Tan, X., Zheng, N., & Estelle, M. (2010). Auxin perception—structural insights. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a005546.
- Carlsbecker, A., Lee, J. Y., Roberts, C. J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., ... & Campilho, A. (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465(7296), 316.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., & Davies, B. (2012). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 158(1), 423-438.
- Chandler, J. W. (2016). Auxin response factors. *Plant, cell & environment*, 39(5), 1014-1028.
- Chávez-Hernández, E. C., Alejandri-Ramírez, N. D., Juárez-González, V. T., & Dinkova, T. D. (2015). Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 555.
- Che, P., Lall, S., & Howell, S. H. (2007). Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta*, 226(5), 1183-1194.
- Che, P., Love, T. M., Frame, B. R., Wang, K., Carriquiry, A. L., & Howell, S. H. (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Molecular Biology*, 62(1-2), 1-14.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 21-44.

- Chen, X., Cheng, J., Chen, L., Zhang, G., Huang, H., Zhang, Y., & Xu, L. (2016). Auxin-independent NAC pathway acts in response to explant-specific wounding and promotes root tip emergence during de novo root organogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *170*(4), 2136-2145.
- Cheng, Z. J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y. H., ... & Cheng, Y. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiology*, *161*(1), 240-251.
- Chitwood, D. H., Nogueira, F. T., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., & Timmermans, M. C. (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes & development*, *23*(5), 549-554.
- Conger, B. V., Novak, F. J., Afza, R., & Erdelsky, K. (1987). Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of Zea mays. *Plant Cell Reports*, *6*(5), 345-347.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., & Davies, B. (2012). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant physiology*, *158*(1), 423-438.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*, *23*(2), 431-442.
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., & Vachon, G. (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *136*(3), 3660-3669.
- D'Ario, M., Griffiths-Jones, S., & Kim, M. (2017). Small RNAs: big impact on plant development. *Trends in Plant Science*, *22*(12), 1056-1068.
- Daimon, Y., Takabe, K., & Tasaka, M. (2003). The CUP-SHAPED COTYLEDON genes promote adventitious shoot formation on calli. *Plant and Cell Physiology*, *44*(2), 113-121.
- Davidonis, G. H., Hamilton, R. H., & Mumma, R. O. (1980). Metabolism of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in soybean root callus: evidence for the conversion of 2, 4-D amino acid conjugates to free 2, 4-D. *Plant physiology*, *66*(4), 537-540.
- De-la-Pena, C., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2008). Possible role of light and polyamines in the onset of somatic embryogenesis of Coffea canephora. *Molecular biotechnology*, *39*(3), 215-224.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., ... & Estelle, M. (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental cell*, *9*(1), 109-119.
- Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E., ... & Laux, T. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(48), 18818-18823.
- Dotto, M. C., Petsch, K. A., Aukerman, M. J., Beatty, M., Hammell, M., & Timmermans, M. C. (2014). Genome-wide analysis of leafbladeless1-regulated and phased small RNAs underscores the importance of the TAS3 ta-siRNA pathway to maize development. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004826.
- Douglas, R. N., Wiley, D., Sarkar, A., Springer, N., Timmermans, M. C., & Scanlon, M. J. (2010). ragged seedling2 encodes an ARGONAUTE7-like protein required for mediolateral expansion, but not dorsiventrality, of maize leaves. *The Plant Cell*, *22*(5), 1441-1451.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., & Sangwan, R. S. (2011). De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science*, *16*(11), 597-606.
- Dueck A., M. Evers, S. Henz, K. Unger, N. Eichner, R. Merkl, E. Berezikov, J. Engelmann, D. Weigel, S. Wenzl and Gunter Meister. 2016. Gene silencing pathways found in the green alga Volvox carteri reveal insights into evolution and origins of small RNA systems in plants. *BMC Genomics*. 17:853
- Efroni, I., Mello, A., Nawy, T., Ip, P. L., Rahni, R., DelRose, N., ... & Birnbaum, K. D. (2016). Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell*, *165*(7), 1721-1733.
- Emerson, R. A., Beadle, G. W., & Fraser, A. C. (1935). Summary of linkage studies in maize.
- Emons, A. M. C., & Kieft, H. (1995). Somatic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II* (pp. 24-39). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Eyer, L., Vain, T., Pařízková, B., Oklestkova, J., Barbez, E., Kozubíková, H., ... & Strnad, M. (2016). 2, 4-D and IAA amino acid conjugates show distinct metabolism in Arabidopsis. *PLoS one*, *11*(7), e0159269.
- Fahlgren, N., Montgomery, T. A., Howell, M. D., Allen, E., Dvorak, S. K., Alexander, A. L., & Carrington, J. C. (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Current Biology*, *16*(9), 939-944.
- Fei, Q., Xia, R., & Meyers, B. C. (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant Cell*, *25*(7), 2400-2415.
- Feung, C. S., Loerch, S. L., Hamilton, R. H., & Mumma, R. O. (1978). Comparative metabolic fate of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in plants and plant tissue culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(5), 1064-1067.
- Finet, C., Fourquin, C., Vinauger, M., Berne-Dedieu, A., Chambrier, P., Paindavoine, S., & Scutt, C. P. (2010). Parallel structural evolution of auxin response factors in the angiosperms. *The Plant Journal*, *63*(6), 952-959.

- Gaj, M. D. (2002). Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant growth regulation*, 37(1), 93-98.
- Gallois, J. L., Nora, F. R., Mizukami, Y., & Sablowski, R. (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & Development*, 18(4), 375-380.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H., & Huijser, P. (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*, 49(4), 683-693.
- Garrocho-Villegas, V., de Jesús-Olivera, M. T., & Quintanar, E. S. (2012). Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. In *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 173-182). Humana Press, Totowa, NJ.
- Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., & Gaj, M. D. (2013). Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 8(7), e69261.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139(5), 883-893.
- González, G. A., Pacheco, M. G., Oneto, C. D., Etchart, V. J., Kandus, M. V., Salerno, J. C., ... & Lewi, D. M. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(1), 9-9.
- Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development*, 134(19), 3539-3548.
- Green, C. E., & Phillips, R. L. (1975). Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize 1. *Crop Science*, 15(3), 417-421.
- Guilfoyle, T. J., & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current opinion in plant biology*, 10(5), 453-460.
- Gupta, S., & Rashotte, A. M. (2012). Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Reports*, 31(5), 801-812.
- Gutierrez, L., Bussell, J. D., Păcurar, D. I., Schwambach, J., Păcurar, M., & Bellini, C. (2009). Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell*, 21(10), 3119-3132.
- Bennetzen, J. L., & Hake, S. C. (Eds.). (2009). *Handbook of maize: genetics and genomics*. Springer Science & Business Media.
- Harding, E. W., Tang, W., Nichols, K. W., Fernandez, D. E., & Perry, S. E. (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiology*, 133(2), 653-663.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. (2010). *Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practices*, 8th edn. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice Hall.
- Herrera-Ubaldo, H., & De Folter, S. (2018). Exploring cell wall composition and modifications during the development of the gynoecium medial domain in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 9, 454.
- Hibara, K. I., Karim, M. R., Takada, S., Taoka, K. I., Furutani, M., Aida, M., & Tasaka, M. (2006). Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *The Plant Cell*, 18(11), 2946-2957.
- Higuchi, M., Pischke, M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., ... & Helariutta, Y. (2004). In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8821-8826.
- Hisanaga, T., Miyashima, S., & Nakajima, K. (2014). Small RNAs as positional signal for pattern formation. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 37-42.
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., ... & Boutilier, K. (2017). The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175(2), 848-857.
- Hu, X., & Xu, L. (2016). Transcription factors WOX11/12 directly activate WOX5/7 to promote root primordia initiation and organogenesis. *Plant Physiology*, 172(4), 2363-2373.
- Huang, X. Q., & Wei, Z. M. (2004). High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*, 22(11), 793-800.
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138(19), 4117-4129.
- Hunter, C., Willmann, M. R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutiérrez-Nava, M., & Poethig, S. R. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development*, 133(15), 2973-2981.
- Husbands, A. Y., Chitwood, D. H., Plavskin, Y., & Timmermans, M. C. (2009). Signals and prepatterning: new insights into organ polarity in plants. *Genes & Development*, 23(17), 1986-1997.
- Ikeda, M., & Ohme-Takagi, M. (2014). TCPs, WUSs, and WINDs: families of transcription factors that regulate shoot meristem formation, stem cell maintenance, and somatic cell differentiation. *Frontiers in Plant Science*, 5, 427.
- Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., & Kamada, H. (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34(1), 107-114
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 377-406.

- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymer, B., Lambomez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., ... & Sakakibara, H. (2017). Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology*, *175*(3), 1158-1174.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, *143*(9), 1442-1451.
- Ioio, R. D., Galinha, C., Fletcher, A. G., Grigg, S. P., Molnar, A., Willemsen, V., ... & Tsiantis, M. (2012). A PHABULOSA/cytokinin feedback loop controls root growth in Arabidopsis. *Current Biology*, *22*(18), 1699-1704.
- Iowa State University of Science and Technology. 1993. How a corn plant develops. http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corn_grows.html
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2015). The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in Cell Biology*, *25*(11), 651-665.
- Iwase, A., Harashima, H., Ikeuchi, M., Rymer, B., Ohnuma, M., Komaki, S., ... & Grotewold, E. (2017). WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *29*(1), 54-69.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., ... & Ohme-Takagi, M. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Current Biology*, *21*(6), 508-514.
- Jakubeková, M., Pretová, A., & Obert, B. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *1*(4), 478.
- Javelle, M., Marco, C. F., & Timmermans, M. (2011). In situ hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (57), e3328.
- Juarez, M. T., Twigg, R. W., & Timmermans, M. C. (2004). Specification of adaxial cell fate during maize leaf development. *Development*, *131*(18), 4533-4544.
- Junker, A., Mönke, G., Rutten, T., Keilwagen, J., Seifert, M., Thi, T. M. N., ... & Ludwig-Müller, J. (2012). Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *71*(3), 427-442.
- Kamada, H., Tachikawa, Y., Saitou, T., & Harada, H. (1994). Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant Tissue Culture Letters*, *11*(3), 229-232.
- Kareem, A., Durgaprasad, K., Sugimoto, K., Du, Y., Pulianmackal, A. J., Trivedi, Z. B., ... & Prasad, K. (2015). PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Current Biology*, *25*(8), 1017-1030.
- Kasahara, H. (2016). Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *80*(1), 34-42.
- Kessler, S., Townsley, B., & Sinha, N. (2006). L1 division and differentiation patterns influence shoot apical meristem maintenance. *Plant physiology*, *141*(4), 1349-1362.
- Kidner, C. A., & Timmermans, M. C. (2010). Signaling sides: adaxial-abaxial patterning in leaves. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 91, pp. 141-168). Academic Press.
- Kiesselbach, T. A. (1999). *The structure and reproduction of corn*. Cold spring harbor laboratory press.
- Kim, J. H., Choi, D., & Kende, H. (2003). The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *36*(1), 94-104.
- Kim, J. Y., Yang, W., Forner, J., Lohmann, J. U., Noh, B., & Noh, Y. S. (2018). Epigenetic reprogramming by histone acetyltransferase HAG1/AtGCN5 is required for pluripotency acquisition in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, *37*(20), e98726.
- Kiyosue, T., Kamada, H., & Harada, H. (1989). Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. *Plant Tissue Culture Letters*, *6*(3), 162-164.
- Knauer, S., Holt, A. L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E. J., Hinze, A., Pisch, M., ... & Laux, T. (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Developmental cell*, *24*(2), 125-132.
- Kubeš, M., & Napier, R. (2019). Non-canonical auxin signalling: fast and curious. *Journal of experimental botany*, *70*(10), 2609.
- Kurczyńska, E. U., Gaj, M. D., Ujczak, A., & Mazur, E. (2007). Histological analysis of direct somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta*, *226*(3), 619-628.
- Lara-Chavez, A., Egertsdotter, U., & Flinn, B. S. (2012). Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *48*(3), 341-354.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., & Traas, J. (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development*, *131*(17), 4311-4322.
- Lee, K., Park, O. S., & Seo, P. J. (2017). Arabidopsis ATXR2 deposits H3K36me3 at the promoters of LBD genes to facilitate cellular dedifferentiation. *Sci. Signal.*, *10*(507), ean0316.
- Lee, K., Park, O. S., & Seo, P. J. (2018). JM30-mediated demethylation of H3K9me3 drives tissue identity changes to promote callus formation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *95*(6), 961-975.
- Li, C., & Zhang, B. (2016). MicroRNAs in control of plant development. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(2), 303-313.

- Lin, Y., Lai, Z., Tian, Q., Lin, L., Lai, R., Yang, M., ... & Zhang, Z. (2015). Endogenous target mimics down-regulate miR160 mediation of ARF10,-16, and-17 cleavage during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Frontiers in Plant Science*, 6, 956.
- Lin, Y., Lin, L., Lai, R., Liu, W., Chen, Y., Zhang, Z., ... & Lai, Z. (2015). MicroRNA390-directed TAS3 cleavage leads to the production of tasiRNA-ARF3/4 during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1119.
- Liu, B., Su, S., Wu, Y., Li, Y., Shan, X., Li, S., ... & Yuan, Y. (2015). Histological and transcript analyses of intact somatic embryos in an elite maize (*Zea mays* L.) inbred line Y423. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92, 81-91.
- Liu, D., Song, Y., Chen, Z., & Yu, D. (2009). Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 136(2), 223-236.
- Liu, H., Zhang, H., Dong, Y. X., Hao, Y. J., & Zhang, X. S. (2018). DNA METHYLTRANSFERASE1-mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 217(1), 219-232.
- Liu, J., Hu, X., Qin, P., Prasad, K., Hu, Y., & Xu, L. (2018). The WOX11-LBD16 pathway promotes pluripotency acquisition in callus cells during de novo shoot regeneration in tissue culture. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 739-748.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H., & Xu, L. (2014). WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(3), 1081-1093.
- Long, J. M., Liu, C. Y., Feng, M. Q., Liu, Y., Wu, X. M., & Guo, W. W. (2018). miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *Journal of Experimental Botany*, 69(12), 2979-2993.
- López-Frías, G., Martínez, L. M., Ponce, G., Cassab, G. I., & Nieto-Sotelo, J. (2011). Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Journal of experimental botany*, 62(13), 4661-4673.
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Chávez-Hernández, E. C., & Dinkova, T. D. (2018). MicroRNA expression and regulation during Maize somatic embryogenesis. In *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 397-410). Humana Press, New York, NY.
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Sandoval-Zapotitla, E., & Dinkova, T. D. (2019). Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during Staggered In Vitro Plant Regeneration of Tuxpeño VS-535 Maize Cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2079.
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Luján-Soto, E., & Dinkova, T. D. (2019). The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis. In *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications* (pp. 311-338). Springer, Cham.
- Lowe, K., Taylor, D. B., Ryan, P., & Paterson, K. E. (1985). Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. *Plant Science*, 41(2), 125-132.
- Lujan-Soto, E. (2018). Regulación de algunos mRNAs blanco de mir528 en embriogénesis somática de maíz (Tesis de maestría). UNAM, CDMX.
- Lunardon A., C. Forestan, S. Farinati, M. Axtell, and S. Varotto. 2016. Genome-Wide Characterization of Maize Small RNA Loci and Their Regulation in the required to maintain repression6-1 (rmr6-1) Mutant and Long-Term Abiotic Stresses. *Plant Physiology*. 170: 1535–1548.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943-950.
- Luo, Y. C., Zhou, H., Li, Y., Chen, J. Y., Yang, J. H., Chen, Y. Q., & Qu, L. H. (2006). Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryonic development. *Febs Letters*, 580(21), 5111-5116.
- Lup, S. D., Tian, X., Xu, J., & Pérez-Pérez, J. M. (2016). Wound signaling of regenerative cell reprogramming. *Plant Science*, 250, 178-187.
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, 17(5), 1360-1375.
- Mao, H. D., Yu, L. J., Li, Z. J., Yan, Y., Han, R., Liu, H., & Ma, M. (2016). Genome-wide analysis of the SPL family transcription factors and their responses to abiotic stresses in maize. *Plant Gene*, 6, 1-12.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A. S., Weijers, D., Vaucheret, H., ... & Maizel, A. (2010). miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant Cell*, 22(4), 1104-1117.
- Matsui A., K. Mizunashi, M. Tanaka, E. Kaminuma, A. Nguyen, M. Nakajima, J-M. Kim, DV. Nguyen, T. Toyoda, M. Seki. 2014. tasiRNA-ARF pathway moderates floral architecture in *Arabidopsis* plants subjected to drought stress. *BioMed Research International* 2014: 303451

- Melnyk, C. W., Schuster, C., Leyser, O., & Meyerowitz, E. M. (2015). A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, *25*(10), 1306-1318.
- Meng, W. J., Cheng, Z. J., Sang, Y. L., Zhang, M. M., Rong, X. F., Wang, Z. W., ... & Zhang, X. S. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL. *The Plant Cell*, *29*(6), 1357-1372.
- Michler, C. H., & Lineberger, R. D. (1987). Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. *Plant cell, tissue and organ culture*, *11*(3), 189-207.
- Milojević, J., Tubić, L., Pavlović, S., Mitić, N., Čalić, D., Vinterhalter, B., & Zdravković-Korać, S. (2012). Long days promote somatic embryogenesis in spinach. *Scientia horticultrae*, *142*, 32-37.
- Miyashima, S., Koi, S., Hashimoto, T., & Nakajima, K. (2011). Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development*, *138*(11), 2303-2313.
- Morocz, S., Donn, G., Nérneth, J., & Dudits, D. (1990). An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical and Applied Genetics*, *80*(6), 721-726.
- Nagasaki, H., Itoh, J. I., Hayashi, K., Hibara, K. I., Satoh-Nagasawa, N., Nosaka, M., ... & Nagato, Y. (2007). The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(37), 14867-14871.
- Nardmann, J., & Werr, W. (2009). Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. In *Handbook of Maize: Its Biology* (pp. 105-119). Springer, New York, NY.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., & Laufs, P. (2006). The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *18*(11), 2929-2945.
- Nodine, M. D., & Bartel, D. P. (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Development*, *24*(23), 2678-2692.
- Nogueira, F. T., Madi, S., Chitwood, D. H., Juarez, M. T., & Timmermans, M. C. (2007). Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes & Development*, *21*(7), 750-755.
- Oliveira, E. J., Koehler, A. D., Rocha, D. I., Vieira, L. M., Pinheiro, M. V. M., de Matos, E. M., ... & Otoni, W. C. (2017). Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Protoplasma*, *254*(5).
- Pareddy, D. R., & Petolino, J. F. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Science*, *67*(2), 211-219.
- Parry, G., Calderon-Villalobos, L. I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., ... & Estelle, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(52), 22540-22545.
- Pauluzzi, G., Divol, F., Puig, J., Guiderdoni, E., Dievert, A., & Périn, C. (2012). Surfing along the root ground tissue gene network. *Developmental Biology*, *365*(1), 14-22.
- Pekker, I., Alvarez, J. P., & Eshed, Y. (2005). Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *The Plant Cell*, *17*(11), 2899-2910.
- Perez-Garcia, P., & Moreno-Risueno, M. A. (2018). Stem cells and plant regeneration. *Developmental biology*.
- Perianez-Rodríguez, J., Manzano, C., & Moreno-Risueno, M. A. (2014). Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin?. *Frontiers in plant science*, *5*, 219.
- Pulido, A., & Laufs, P. (2010). Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *Journal of Experimental Botany*, *61*(5), 1277-1291.
- Qiao, M., Zhao, Z., Song, Y., Liu, Z., Cao, L., Yu, Y., ... & Xiang, F. (2012). Proper regeneration from in vitro cultured *Arabidopsis thaliana* requires the microRNA-directed action of an auxin response factor. *The Plant Journal*, *71*(1), 14-22.
- Quastel, J. H. (1950). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2, 4-D) as a selective herbicide.
- Rakshit, S., Rashid, Z., Sekhar, J. C., Fatma, T., & Dass, S. (2010). Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *100*(1), 31-37.
- Rakshit, S., Rashid, Z., Sekhar, J. C., Fatma, T., & Dass, S. (2010). Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *100*(1), 31-37.
- Raman, S., Greb, T., Peaucelle, A., Blein, T., Laufs, P., & Theres, K. (2008). Interplay of miR164, CUP-SHAPED COTYLEDON genes and LATERAL SUPPRESSOR controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *55*(1), 65-76.
- Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development*, *130*(17), 4073-4083.
- Rodríguez, R. E., Schommer, C., & Palatnik, J. F. (2016). Control of cell proliferation by microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *34*, 68-76.

- Rubio-Somoza, I., Zhou, C. M., Confraria, A., Martinho, C., von Born, P., Baena-Gonzalez, E., ... & Weigel, D. (2014). Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Current Biology*, 24(22), 2714-2719.
- Sairam, R. V., Parani, M., Franklin, G., Lifeng, Z., Smith, B., MacDougall, J., ... & Al-Abed, D. (2003). Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*, 46(2), 323-329.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 294(5546), 1519-1521.
- Sandoval, E. (2005). Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal (Vol. 38). UNAM.
- Sarkar A. (2009). Chapter 2: Basic Techniques in Plant Stem cells. Discovery Publishing House PVT. LDT. New Delhi. 17-51.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental cell*, 8(4), 517-527.
- Seefried, W. F., Willmann, M. R., Clausen, R. L., & Jenik, P. D. (2014). Global regulation of embryonic patterning in Arabidopsis by microRNAs. *Plant Physiology*, 165(2), 670-687.
- Sena, G., Wang, X., Liu, H. Y., Hofhuis, H., & Birnbaum, K. D. (2009). Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature*, 457(7233), 1150.
- Serwatowska, J. (2012). Aislamiento y caracterización de genes MADS-box en *Medicago truncatula*: duplicaciones génicas y subfuncionalización en el linaje euAGAMOUS (Doctoral dissertation). Universitat Politècnica de València. España.
- Shani, E., Yanai, O., & Ori, N. (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 484-489.
- Shen, C., Yue, R., Sun, T., Zhang, L., Xu, L., Tie, S., ... & Yang, Y. (2015). Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor gene family in *Medicago truncatula*. *Frontiers in plant science*, 6, 73.
- Shi, B., Zhang, C., Tian, C., Wang, J., Wang, Q., Xu, T., ... & Theres, K. (2016). Two-step regulation of a meristematic cell population acting in shoot branching in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 12(7), e1006168.
- Shimizu-Sato, S., & Mori, H. (2001). Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, 127(4), 1405-1413.
- Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P., & Duncan, D. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Reports*, 25(4), 320-328.
- Simonini, S., Deb, J., Moubayidin, L., Stephenson, P., Valluru, M., Freire-Rios, A., ... & Østergaard, L. (2016). A noncanonical auxin-sensing mechanism is required for organ morphogenesis in Arabidopsis. *Genes & Development*, 30(20), 2286-2296.
- Simonini, S., Mas, P. J., Mas, C. M., Østergaard, L., & Hart, D. J. (2018). Auxin sensing is a property of an unstructured domain in the Auxin Response Factor ETTIN of Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports*, 8(1), 13563.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. In *Vitro, Symp. Soc. Exp. Biol* (No. 11).
- Sluis, A., & Hake, S. (2015). Organogenesis in plants: initiation and elaboration of leaves. *Trends in Genetics*, 31(6), 300-306.
- Smith, Z. R., & Long, J. A. (2010). Control of Arabidopsis apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*, 464(7287), 423.
- Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. *Journal of integrative plant biology*, 56(2), 106-113.
- Stone, S. L., Braybrook, S. A., Paula, S. L., Kwong, L. W., Meuser, J., Pelletier, J., ... & Harada, J. J. (2008). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3151-3156.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., Bai, B., & Zhang, X. S. (2015). Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during Arabidopsis somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 792.
- Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D., & Zhang, X. S. (2009). Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 59(3), 448-460.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E. M. (2010). Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental cell*, 18(3), 463-471.
- Sun L., Y. Wu, H. Zou, S. Su, S. Li, X. Shan, J- Xi, Y. Yuan. 2013. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 113:103-119.
- Sussex, I. M. (1951). Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. *Nature*, 167(4251), 651.
- Szyrajew, K., Bielewicz, D., Dolata, J., Wójcik, A. M., Nowak, K., Szczygieł-Sommer, A., ... & Gaj, M. D. (2017). MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 8, 18.
- Tian, X., Zhang, C., & Xu, J. (2017). Control of cell fate reprogramming towards de novo shoot organogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 713-719.
- Ting, Y. C., Yu, M., & Zheng, W. Z. (1981). Improved anther culture of maize (*Zea mays*). *Plant Science Letters*, 23(2), 139-145.

- Tomas, A., Paponov, I., & Perrot-Rechenmann, C. (2010). AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends in plant science*, 15(8), 436-446.
- Vashisht, D., & Nodine, M. D. (2014). MicroRNA functions in plant embryos. *Biochemical Society Transactions*, 42(2), 352-357.
- Vernoud, V., Hajdich, M., Khaled, A., Depège, N., & Rogowsky, M. P. (2005). Maize embryogenesis. *Maydica*, 50(3/4), 469.
- Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., ... & Guédon, Y. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Molecular systems biology*, 7(1), 508.
- Wang J, Tian C, Zhang C, Cao X, Zhang T-Q, et al. 2017. Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation. *Plant Cell* 29(6):1373–87
- Wang, H., Caruso, L. V., Downie, A. B., & Perry, S. E. (2004). The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, 16(5), 1206-1219.
- Wang, J. W., Wang, L. J., Mao, Y. B., Cai, W. J., Xue, H. W., & Chen, X. Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(8), 2204-2216.
- Wang, Y., Deng, D., Shi, Y. et al. (2012). Diversification, phylogeny and evolution of auxin response factor (ARF) family: insights gained from analyzing maize ARF genes. *Molecular Biology Reports*, 39:2401–241
- Weijers, D., Benkova, E., Jäger, K. E., Schlereth, A., Hamann, T., Kientz, M., ... & Jürgens, G. (2005). Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *The EMBO journal*, 24(10), 1874-1885.
- Williams, L., Grigg, S. P., Xie, M., Christensen, S., & Fletcher, J. C. (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its ATHD-ZIP target genes. *Development*, 132(16), 3657-3668.
- Wójcik, A. M., Nodine, M. D., & Gaj, M. D. (2017). miR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 8, 2024.
- Xia, R., Xu, J., & Meyers, B. C. (2017). The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. *The Plant Cell*, 29(6), 1232-1247.
- Xiang, D., Venglat, P., Tibiche, C., Yang, H., Risseuw, E., Cao, Y., ... & Selvaraj, G. (2011). Genome-wide analysis reveals gene expression and metabolic network dynamics during embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(1), 346-356.
- Xing, H., Pudake, R. N., Guo, G., Xing, G., Hu, Z., Zhang, Y., ... Ni, Z. (2011). Genome-wide identification and expression profiling of *auxin response factor (ARF)* gene family in maize. *BMC Genomics*, 12, 178.
- Xu, C., Cao, H., Xu, E., Zhang, S., & Hu, Y. (2017). Genome-wide identification of Arabidopsis LBD29 target genes reveals the molecular events behind auxin-induced cell reprogramming during callus formation. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 749-760.
- Yamaguchi, T., Nukazuka, A., & Tsukaya, H. (2012). Leaf adaxial–abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant and Cell Physiology*, 53(7), 1180-1194.
- Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X (2013) Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 64:1521–1536
- Zhang J, Zhang S, Han S, Wu T, Li X, Li W, Qi L (2012) Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* 236:647–657
- Zhang, J., Wu, T., Li, L., Han, S., Li, X., Zhang, S., & Qi, L. (2013). Dynamic expression of small RNA populations in larch (*Larix leptolepis*). *Planta*, 237(1), 89-101.
- Zhang, T. Q., Lian, H., Tang, H., Dolezal, K., Zhou, C. M., Yu, S., ... & Wang, J. W. (2015). An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *The Plant Cell*, 27(2), 349-360.
- Zhang, T. Q., Lian, H., Zhou, C. M., Xu, L., Jiao, Y., & Wang, J. W. (2017). A two-step model for de novo activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration. *The Plant Cell*, 29(5), 1073-1087.
- Zhang, X., Wang, Y., Yan, Y., Peng, H., Long, Y., Zhang, Y., ... & Pan, G. (2019). Transcriptome sequencing analysis of maize embryonic callus during early redifferentiation. *BMC genomics*, 20(1), 159.
- Zhang, Z., Teotia, S., Tang, J., & Tang, G. (2019). Perspectives on microRNAs and phased small interfering RNAs in Maize (*Zea mays* L.): Functions and big impact on agronomic traits enhancement. *Plants*, 8(6), 170.
- Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., & Sun, M. X. (2017). Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players?. *Plant physiology*, 173(1), 130-142.
- Zheng, Y., Ren, N., Wang, H., Stromberg, A. J., & Perry, S. E. (2009). Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *The Plant Cell*, 21(9), 2563-2577.
- Zhou, G. K., Kubo, M., Zhong, R., Demura, T., & Ye, Z. H. (2007). Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 391-404.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S. H., Liou, L. W., ... & Zhang, X. (2011). Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, 145(2), 242-256.

Zubo, Y. O., Blakley, I. C., Yamburenko, M. V., Worthen, J. M., Street, I. H., Franco-Zorrilla, J. M., ... & Kieber, J. J. (2017). Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(29), E5995-E6004.

CAPÍTULO VIII. Anexos

Anexo I. Medios de cultivo.

Composición del medio N6P		Composición del medio MS	
Componente	g/L	Componente	g/L
KNO ₃	2.83	KNO ₃	1.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.463	NH ₄ NO ₃	1.65
KH ₂ PO ₄	0.4	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.44
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.185	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.166	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA.H ₂ O	0.0375	KH ₂ PO ₄	0.17
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0278	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.0373
MnSO ₄ .H ₂ O	0.00332	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0278
H ₃ BO ₃	0.0016	MnSO ₄ .4H ₂ O	0.0223
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0015	H ₃ BO ₃	0.0062
KI	0.00083	ZnSO ₄ .4H ₂ O	0.0086
Adenina	0.1	KI	0.00083
Prolina	2.5	CoCl ₂ .2H ₂ O	0.000025
Caseína	0.200	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.000025
Sacarosa	30	Inositol	0.1
2,4 D (2,4 diclorofenoxiacético)	0.002	Ácido nicotínico	0.001
6-BA (6-benciladenina)	0.0003	Tiamina	0.002
Cocktel 20 de vitaminas	*	Piridoxina	0.001
Agargel	7	Glicina	0.002
*Bajo patente (en el laboratorio de cultivo de tejidos se utiliza 10ml/L del stock)		Sacarosa	30
		Agargel	7

Nota: el medio N6I tiene la misma composición que el medio N6P excepto que no contiene BA.

Anexo II. Tinción con safranina “O”-verde rápido FCF

La safranina “O” tiñe de color rojo estructuras nucleares, paredes lignificadas, suberizadas y cutinizadas. El verde rápido FCF tiñe estructuras citoplasmáticas y paredes celulósicas (Sandoval, 2005).

Preparación de los colorantes

1. Safranina “O”

Safranina “O”	1 g
Metilcelosolve	50 ml
Alcohol 96%	25 ml
Agua destilada	25 ml
Acetato de sodio	1 g
Formaldehido 37%	2 ml

Disolver la safranina en el metilcelosolve y agregar los reactivos en el orden marcado. Mezclar y filtrar la solución

2. Verde rápido FCF

Solución A	Verde rápido	4 g
	Alcohol etílico absoluto	75 ml
	Metilcelosolve	25 ml
Solución B	Alcohol etílico absoluto	25 ml
	Aceite de clavo	75 ml

Mezclar ambas soluciones y posteriormente filtrar la solución final

Procedimiento

1. Insertar los portaobjetos con las muestras, obtenidas en los cortes por el micrótopo (12µm de grosor), en una canastilla y colocarla en un horno a 60°C por 10 min. (colocar debajo papel absorbente para que reciba el paraplast fundido)
2. Colocar la canastilla en xileno (el xileno se puede sustituir por *histochoice clearing agent*) durante 20 min.
3. Pasar a una solución de xileno-alcohol absoluto (1:1) por 15 min.
4. Rehidratar a través de alcoholes graduales: 100%, 95%, 70%, 50% y 30% durante 15 min en cada cambio.
5. Colocar las secciones en safranina durante 30 min.
6. Hacer dos lavados con agua destilada.
7. Deshidratar con alcoholes graduales de 30%, 50%, 70%, 95% y 100%. Dejar 2 min en cada solución.

8. Colocar las secciones en verde rápido durante un minuto
9. Hacer tres lavados con alcohol absoluto, de un minuto cada uno
10. Agregar aceite de clavo durante 10 min
11. Lavar el aceite de clavo con xileno. Tres cambios de 1 min cada uno.
12. Montar con resina sintética y colocar el cubreobjetos
13. Secar en un horno a 60°C.
14. Etiquetar los portaobjetos

Anexo III. 1. Cinética de crecimiento del CE y CNE-A.

Con el fin de comparar el crecimiento de los dos tipos de callo analizados, se realizaron cinéticas de crecimiento por 28 días en el mismo medio de cultivo. Se encontró que, usando el peso fresco de los callos, no existieron diferencias marcadas en el crecimiento entre los dos callos (**Fig.46**), sin embargo usando el peso seco se encontró que el CNE-A es capaz de almacenar más agua y su crecimiento es menor al CE (**Fig.47**). El crecimiento inicial del CNE-A posiblemente se deba al efecto de las auxinas exógenas del medio del cultivo que estimulan la división celular, sin embargo conforme pasa el tiempo, el crecimiento se detiene debido al metabolismo catabólico del 2, 4-D (Eyer *et al.*, 2016). El CE, por su parte, mantiene un crecimiento más continuo, debido al efecto del 2,4 D y a que, como se encontró en la inmunolocalización de IAA, es capaz de sintetizar sus propias auxinas endógenas, promoviendo su proliferación y además puede transportarlas (expresión de genes PIN1, 2, 3) (**Anexo IX**).

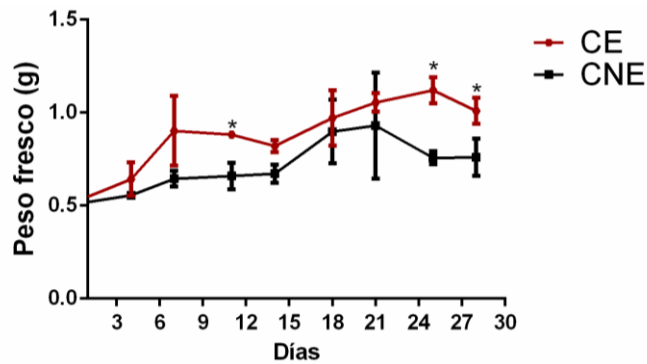


Fig. 46. Promedio de las cinéticas de crecimiento de los dos tipos de callos: CE y CNE con base en su peso fresco. La cinética fue realizada en medio N6P 100 %H. Los callos que se utilizaron fueron de un lote de 1 año de subcultivo. El asterico (*) indica diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) analizados con t-student multiples, $n=3$.

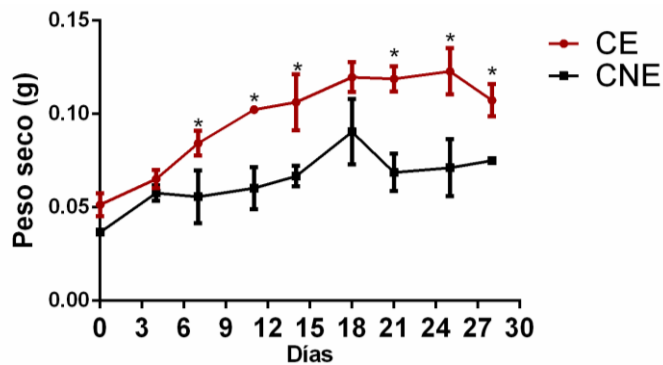


Fig. 47. Promedio de las cinéticas de crecimiento de los dos tipos de callos: CE y CNE con base en su peso seco. El asterico (*) indica diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) analizados con t-student multiples, $n=3$.

2. Morfología de las hojas de plántulas germinadas comparadas con las obtenidas de la regeneración *in vitro*

Con el objetivo de comparar la morfología de las hojas obtenidas de plantas de cultivo *in vitro* con las hojas de plántulas obtenidas por germinación de semillas, se germinaron catorce plántulas del maíz Tuxpeño VS-535 por dos semanas. Se midió el ancho y largo de la primera y la segunda hoja de la plántula germinada y solamente la primera hoja obtenida por regeneración *in vitro* (Fig.48). Se realizaron cortes histológicos para comparar la morfología y se realizaron observaciones con microscopia electrónica en el lado adaxial y abaxial de las hojas. Estos datos se compararon con las plántulas obtenidas de la regeneración *in vitro* (catorce días en medio MS, n=9).

Con los datos obtenidos se constató que la hoja obtenida *in vitro* es muy diferente a las primeras dos hojas obtenidas por germinación de semillas. La hoja de plántulas regeneradas *in vitro*, desarrolladas dos semanas en medio MS, posee una altura promedio de 9.83 ± 2.12 cm, semejante a la altura de la hoja obtenida de una plántula de dos semanas de edad (9.67 ± 0.69 cm), sin embargo el ancho de la hoja es mucho menor (Tabla 16). A pesar de esto, el corte transversal de la hoja *in vitro* reveló que es mucho más gruesa que la 2ª hoja de germinación y resulta más semejante a la 1ª hoja. Además, se observa que los haces vasculares no son tan definidos como en las otras dos hojas. Por otra parte, se observa por microscopia electrónica que los estomas de la hoja *in vitro* son mucho más pequeños (Fig. 49).

Finalmente se hicieron impresiones de las hojas empleando pasta de impresión (Mini Kombi) y se observaron al microscopio. Se observó que por campo existen más macropelos en las plántulas obtenidas en germinación que las obtenidas *in vitro* (Fig. 50).

En conjunto estos resultados muestran que existen diferencias marcadas entre las hojas obtenidas por diferentes procesos de desarrollo y se mantiene como perspectiva analizar hojas en estadios más desarrollados para saber si se restaura el fenotipo de las subsecuentes hojas obtenidas por cultivo *in vitro*.

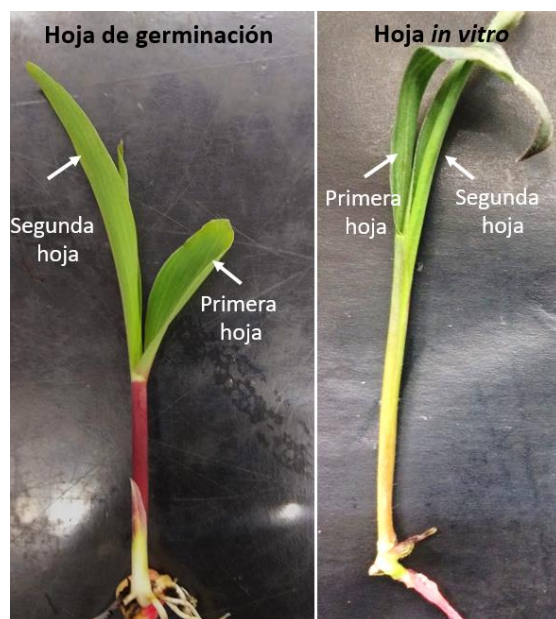


Fig. 48. Comparación entre una plántula germinada y la obtenida por regeneración *in vitro*.

Tabla 16. Comparación entre hojas obtenidas de germinación e *in vitro*

Tipo de hoja	Hoja completa		Corte histológico transversal
	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Ancho (μm)
Primera hoja de la plántula germinada	5.1 \pm 0.56	1.62 \pm 0.14	271 \pm 9.57
Segunda hoja de la plántula germinada	9.67 \pm 0.69	1.24 \pm 0.19	174.5 \pm 6.19
Cultivo <i>in vitro</i>	9.83 \pm 2.12	0.45cm \pm 0.072	325.1 \pm 60.15

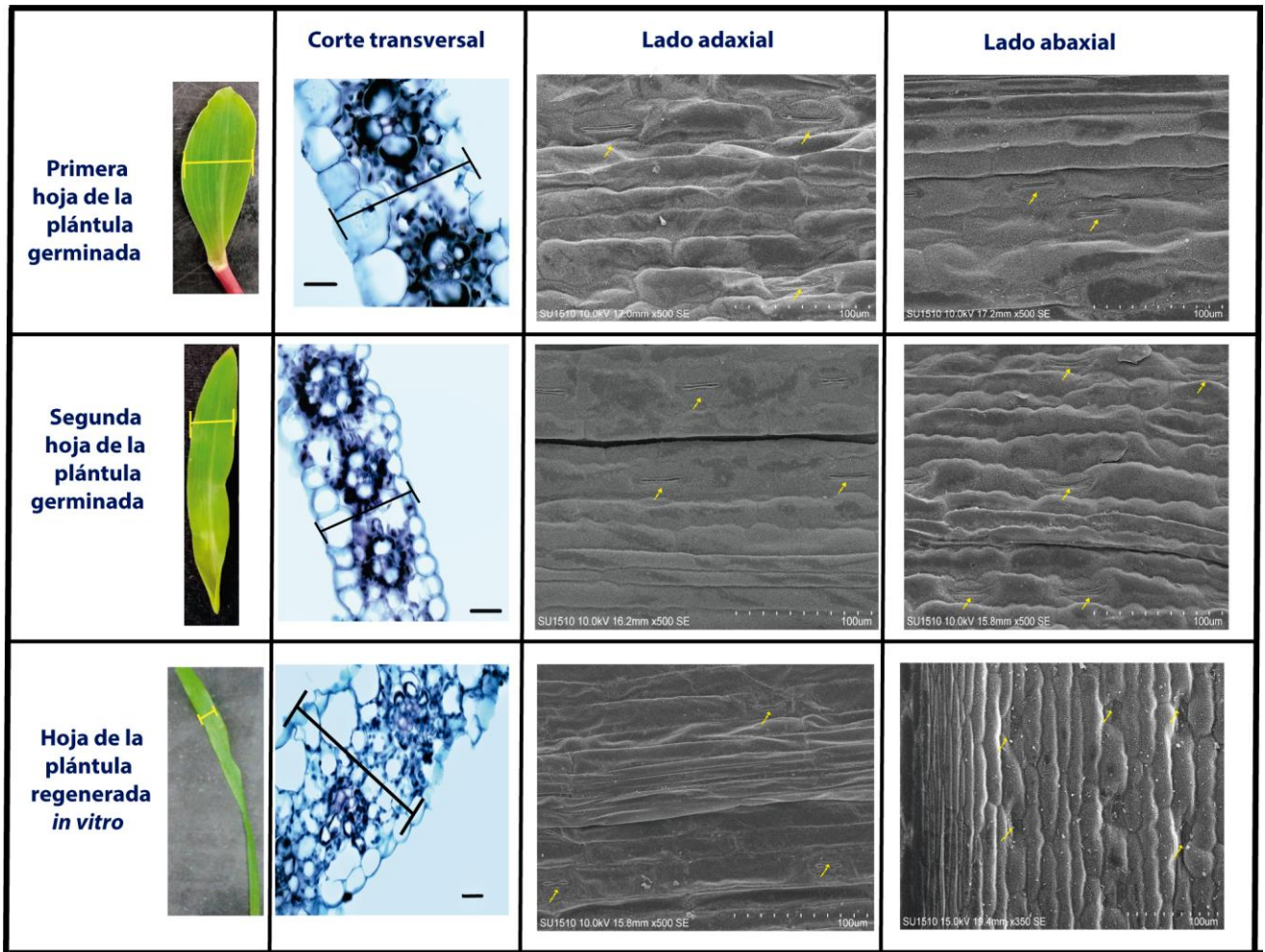


Fig. 49. *Morfología de las hojas de las plantas obtenidas por germinación y por regeneración in vitro.* La barra amarilla indica la parte de la hoja medido. La barra en los cortes histológicos= 50 μ m. En la hoja de la plántula obtenida por regeneración *in vitro* es posible observar que los haces vasculares presentan un arreglo diferente comparado a las otras hojas. En las micrografías las flechas indican los estomas.

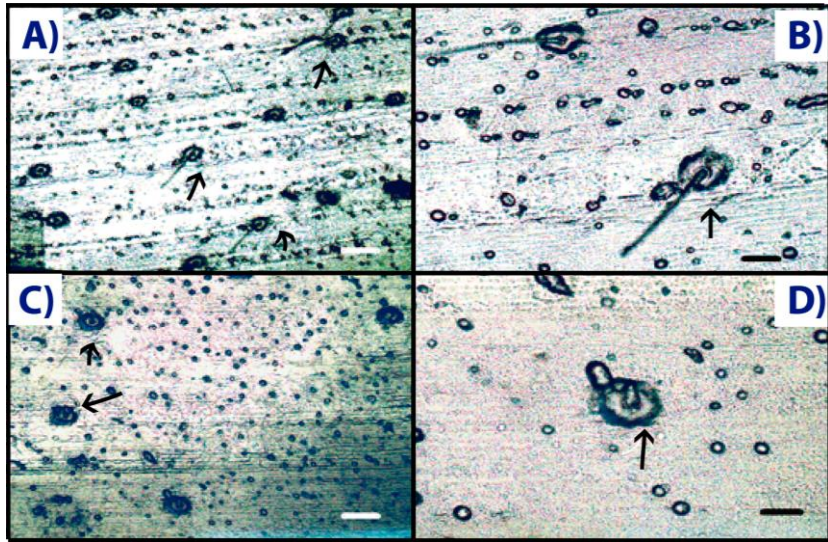


Fig. 50. Comparación entre la hoja de la plántula germinada y la obtenida por regeneración *in vitro*. A) Hoja de plántula germinada 4x, B) Hoja de plántula germinada 10x. C) hoja de plántula *in vitro* 4x, D) hoja de plántula *in vitro* 10x. Barra en A y C= 500 μm , en B) y D) = 100 μm . Las flechas indican los macropelos.

Anexo IV. Oligonucleótidos empleados y curvas de calibración

ID		PRIMERS
U6 snRNA	Primer stem loop	5'- GTG CAG GGT CCG AGGTTT TGG ACC ATT TCT CGAT -3'
	Forward primer	5'- GGA ACG ATA CAG AGA AGATTA GCA -3'
zma-miR156a-5p	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG TGC TC-3'
	Forward primer	5'- TGCTCGTGACAGAAGAGAGT-3'
zma-miR160a-5p	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GATA CGA CTG GCA T-3'
	Forward primer	5'- TTT GCC TGG CTC CCT GT -3'
zma-miR164a-5p	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT GCA CG-3'
	Forward primer	5'- CTA CTG GAG AAG CAG GGC A -3'
zma-miR166b-3p	Primer stem loop	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG GGA AT-3'
	Forward primer	5'- CGT CGC TCG GAC CAG GCT TCA -3'
zma-miR394a-5p	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG GAG GT-3'
	Forward primer	5'- TTC GTT TGG CAT TCT GTC CA -3'
Zma-mir390a-5p	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG GCG CT -3'
	Forward primer	5'-TCT GCG AAG CTC AGG AGG GAT -3'
tasiR-ARFbD5	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT TGG GT -3'
	Forward primer	5'- CGT CGC GTC TTG ACC TTG TAA G -3'
tasiR-ARFbD6	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAG GT -3'
	Forward primer	5'- CGG CGC TCT TGA CCT TGC -3'
tasiR-ARFg	Primer stem loop	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAG TC -3'
	Forward primer	5'- GAC CGG TTC TTG ACC TTG C -3'
Universal reverse primer		5'- GTG CAG GGT CCG AGG TA -3'
SPB23	GRMZM2G126018_T01	Forward 5'-ACACCAACGCGATGAATTGG-3' Reverse 5'-ACCCTGAAAAACCAGAACGG-3'
ARF19	AC207656.3_FGT002	Forward 5'-TCCCACTGTACCCGGAGCTT-3' Reverse 5'-GCATGCCTGGCTCCCTGTAT-3'
ARF17	GRMZM2G159399_T01	Forward 5'-TTTCTCGGACATCGCTCCTG-3' Reverse 5'-CCTTGGATATACGGGGCGTC-3'
CUC2	GRMZM2G393433_T01	Forward 5'-TTCGCTGCACTACATGGTTG-3' Reverse 5'-AACGACGACCCAGTCACTTAC-3'
RDL1	GRMZM2G109987_T01	Forward 5'-GCGATTGCAGAGGAGACCTT-3' Reverse 5'-TGGCCACGATACCAACTGAA-3'
F-BOX	GRMZM2G064954_T01	Forward 5'-GATGACATGCCTGGGCAACA-3' Reverse 5'-GCTTTTTCGGGCTGTATGGTA-3'
WUS2	GRMZM2G02862	Forward 5'-TTTACAGCAACAGCACCCAG-3' Reverse 5'-CAGGGTAAGGGGAGCACCAT-3'
TAS3a	GRMZM2G178686	Forward 5'-GTAAGGCCTCTTCTTGACCTTGT-3' Reverse 5'-CACAGGGTGAAAACATTAAGTGAAC-3'
TAS3b	GRMZM2G020468	Forward 5'-CTTGACCTTGTAAAGACCAACTCTA-3' Reverse 5'-TGTTTGTCTCATGCCTCACTCTAT-3'
TAS3c	GRMZM2G084821	Forward 5'-GGTTCACGTGGTTCATGTCTAGTAT-3'

		Reverse 5'- AAACATATAGTTGAACCCACAGC-3'
TAS3d	GRMZM2G124744	Forward 5'- GGTTTCTCGTGCCAGAATTAAC-3' Reverse 5'- AATAATTTCAACGCCACCAAAC-3'
TAS3e	GRMZM5G806469	Forward 5'- TGATTGACGCTATCCTCGTCG-3' Reverse 5'- AGGACTGTAGGAGTCGAGG-3'
TAS3g	GRMZM2G082055	Forward 5'- ACCTATTCACCACCGCTGC-3' Reverse 5'- TGCGAGAGTGTTCCAAGCTC-3'
TAS3g (sonda)	GRMZM2G082055	Forward 5'- CTGTTCTGTGATACGGCGCT -3' Reverse 5'- GCATGGACAAAGTTGAAGCCAA -3'
TAS3i	GRMZM2G512113	Forward 5'- TTCGCAGTCTTTGTTTCATCA-3' Reverse 5'- AGCGGTACAAGCTCAAGAGG-3'
ARF24	GRMZM2G030710	Forward 5'- CTTCCCATGTTAATCCAGACTAC-3' Reverse 5'- CAGCAGCATTGTCATGAGTTCTAT-3'
ARF24 (sonda)	GRMZM2G030710	Forward 5'- CTGCACCAATGCAAAGAGA -3' Reverse 5'- GCCACGAAAAGCACATCCAT -3'
ARF23	GRMZM2G441325	Forward 5'-AAGCTACTTATGCTGTCTGCTGTG-3' Reverse 5'- TCTGGTTCCAAGTAAAAGTGATA-3'
ARF11	GRMZM2G056120	Forward 5'- GCACAAAAGTGTTCATTTTCACATTC-3' Reverse 5'- TGTAAGTTGATCCTTGCTCCAATA-3'
ARF12	GRMZM2G437460	Forward 5'- ACTCCTATTCCTGCACCTCATAAC-3' Reverse 5'- TTGTGAACCTCCAATAGGGTACAA-3'
ARF26	GRMZM5G874163	Forward 5'- ATTTCAATAGTGACAGCACAAAGC-3' Reverse 5'- CTTCAGGAACTAGCGTATGGAAT-3'
AGO7	GRMZM5G892991	Forward 5'- CTGGCCTTGCTGTGTTAGGT-3' Reverse 5'- AGGTCAACATTGAGGGCAAG-3'
LBL1	GRMZM2G020187	Forward 5'- CCATAGTGGCTGGGAAACCA-3' Reverse 5'- CTGGCCTTGCTGTGTTAGGT-3'
MIR390A		Forward 5'-GCGAGGAGAAAGAAAGAGCCA-3' Reverse 5'-GATAGACAGAACCACGCCTCC-3'
MIR390B		Forward 5'-AGATTGGAGCCACGAAGAGG-3' Reverse 5'-CGCTTCGGATCGATTATCA-3'
18S		Forward 5'- TCC TAT TGT TGG CCT TCGG -3' Reverse 5'- TCC TTG GCA AAT GCT TTCGC -3'

Para llevar a cabo el análisis de expresión es necesario realizar curvas de calibración de eficiencia de los oligonucleótidos diseñados. En la siguiente tabla se muestran las curvas obtenidos empleando diluciones de cDNA.

Las curvas fueron evaluadas de tal forma que cumplieran los siguientes requisitos: eficiencia de 80-120% (pendiente de ~3.3) y tener un coeficiente de correlación >0.9. Para las curvas que no cumplieron con estos criterios se utilizó la fórmula para la corrección de la acumulación relativa:

$$RE = \frac{Ef(\text{Gen})^{CT(\text{Gen},un)-CT(\text{Gen},tra)}}{Ef(\text{ReGen})^{CT(\text{ReGen},un)-CT(\text{ReGen},tra)}}$$

En donde:

RE= Expresión relativa del gen

Ef= 10⁻¹/pendiente de la curva de eficiencia

Gen= Gen o miRNA a cuantificar

Nombre	Tejido	Diluciones cDNA (ng)	Pendiente	% eficiencia	r2
ARF24	Embrión inmaduro	50, 5, 0.5	-3.69	90.7	0.99
ARF23	Eje embrionario	50, 10, 2	-3.11	109.6	0.98
ARF11	Embrión inmaduro	50, 5, 0.5	-3.86	81.5	0.98
ARF12	Embrión inmaduro	50, 5, 0.5	-3.7	81	0.99
ARF26	Callo embriogénico	50,10,2	-3.83	82.3	0.99
TAS3g	Plántula	50,10,2	-3.36	98.2	0.99
AGO7	Plántula	50,10,2,0.4	-3.4	96.11	0.97
Lbl1	Callo no embriogénico	50,10,2,0.4	-3.2	118	0.98
miR390	Plántula	12.5, 2.5,0.5	-3.3	100.1	0.978
tasiR-ARFbD5	1°etapa	12.5, 6.25, 3.125	-2.47	153	0.99
tasiR-ARFbD6	1°etapa	12.5, 6.25, 3.125	-3.25	103	0.99
tasiR-ARFg	Callo embriogénico	12.5, 6.25, 3.125	-2.95	117	0.99
U6	Plántula	12.5, 2.5,0.5	-3.48	93.4	0.99
miR156	Callo embriogénico	12.5, 2.5,0.5	-3.04	113	0.99
miR160	Callo embriogénico	12.5, 2.5,0.5	-3.002	115	0.98
miR164	Callo embriogénico	12.5, 2.5,0.5	-3.329	100.02	0.99
miR166	Plántula	12.5, 2.5,0.5	-3.62	88.6	0.972
miR394	Callo embriogénico	12.5, 2.5,0.5	-2.92	120	0.99
ARF17	Callo embriogénico	50, 5, 0.5	-3.82	82.7	0.95
ARF19	Plántula	100, 20, 4	-4.06	76	0.99
RLD1	Callo embriogénico	50, 5, 0.5	-3.15	107	0.99
F-BOX (GRMZM2G064954)	Callo embriogénico	50, 5, 0.5	-2.95	118	0.99
WUS2	Callo embriogénico	100, 20, 4	-3.22	104	0.99
CUC2*	Hoja	100, 20, 4	-3.22	104.4	0.98
SBP23*	Hoja	100, 20, 4	-3.72	85.7	0.98

*Chavez Hernandez E. C. (2015). Expresión y función de miRNAs específicos durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz (Tesis de maestría). UNAM, CDMX.

Anexo V. Soluciones para la inmunolocalización de auxinas y citocininas

- MTBS (*Microtubule-stabilizing buffer*)

Preparación de la solución madre (2x MTSB):

- ✓ 15 g de PIPES (PM 302.4)
- ✓ 1.90 g EGTA (PM 380.4)
- ✓ 1.22 g MgSO₄·7H₂O (PM 246.5)
- ✓ 2.5 g KOH (PM 56.1)

Los componentes se disuelven en agua en un total de 500 ml a pH 7.0 (ajustado con KOH 10M)

- Solución de fijado
 - ✓ Paraformaldehido 3% y glutaraldehido 0.5% en MTSB 1x suplementado con Tritón X-100 0.1%. La solución madre se prepara con 2g de paraformaldehido disuelto en 20 ml de agua (conc 10%) calentado ligeramente a 65-70°C y con la adición de 1 gota de KOH 1 M. (Preparar en campana de extracción). Esta solución madre se puede guardar en alícuotas de 2 ml a -20°C.
- Etanol absoluto (o acetona).
- Technovit 7100.
- Solución de infiltración: 100 ml de *Technovit 7100 basic solution* más *Technovit 7100 hardener 1* (bolsa de 1g). Disolver durante 4 h. Mientras este cerrada la solución es estable hasta 4 semanas si se guarda a 4°C.
- Solución de polimerización: mezclar la solución de infiltración con *Technovit Hardener 2* en relación 15:1. Mezclar durante 3 minutos. Comienza a ponerse viscosa a los 5-10 min.
- Solución de bloqueo: BSA 2% en 1x MTSB
- Solución que le dará firmeza al bloque *Technovit 3040* 2:1 polvo: liquido v/v. Al preparar esta solución se cuenta con 0.5 minutos de periodo de manejo, luego de 2 minutos la solución se vuelve muy viscosa y se endurece totalmente a los 5 min a 22°C. (Preparar en campana de extracción). Preparar de la siguiente manera:
 - ✓ Colocar el líquido en un tubo Falcon de 50 ml.
 - ✓ Adicionar la mitad del polvo y agitar vigorosamente.
 - ✓ Adicionar el resto del polvo.
 - ✓ Mezclar el resto del polvo 40 s.
 - ✓ Dejar reposar 10 s.
 - ✓ Volver a agitar.
 - ✓ Agregar a los bloques rápidamente.

Anexo VI. Soluciones stock para la hibridación *in situ*

FAE 100 ml		
Componente	Stock	Volumen a utilizar
50% etanol	Absoluto	50 ml
5% ácido acético	100%	5 ml
3.7% formaldehído	37%	10 ml
Agua DEPC		35 ml

Tampón de hibridación		
Componente	Stock	Volumen a utilizar
6x SSC	20x	3 ml
3% SDS	20%	1.5 ml
50% Formamida	100%	5 ml
100 µg/ml tRNA	10 mg/ml	0.1 ml
Agua DPC		0.4 ml

Se mezclan los componentes, se calienta a 55°C y posteriormente se agrega el SDS. Se hacen alícuotas de 800 µl en tubos eppendorf que se encuentran en el termomixer a 55°C. Al finalizar, los tubos se colocan inmediatamente a -20°C, ya que el tampón precipita a temperatura ambiente

SSC 20x (1 L)	
Componente	Cantidad
NaCl	175.3 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Citrato de sodio)	88.2
Agua desionizada	800 ml
Disolver y ajustar el volumen a 1L y esterilizar	

PBS 20x (1 L)	
Componente	Cantidad
NaCl	160g
KCl	4g
Na ₂ HPO ₄	28.8 g
KH ₂ PO ₄	4.8g
Agua desionizada	700 ml
Disolver, ajustar el pH a 7.4 y el volumen a 1L. Verificar por dos días el pH y esterilizar.	

Buffer proteinasa K 5x (1 L)

Componente	Cantidad
Tris 0.5 M	60.55 g
EDTA 0.25 M	93.06
Agua desionizada	700 ml

Disolver, ajustar el pH a 8 y el volumen a 1L. Verificar por dos días el pH y esterilizar.

TBS 10x (1 L)

Componente	Cantidad
Tris 1 M	121.1 g
NaCl 4M	233.6 g
Agua desionizada	800 ml

Disolver, ajustar el pH a 7.5 y el volumen a 1L. Verificar por dos días el pH y esterilizar.

Tampón de detección solución A 10x (1 L)

Componente	Cantidad
Tris 1 M	121.1 g
NaCl 1 M	58.4 g
Agua desionizada	800 ml

Disolver, ajustar el pH a 9.5 y el volumen a 1L. Verificar por dos días el pH y esterilizar.

Tampón de detección solución B 10x (1 L)

Componente	Cantidad
MgCl ₂ (-6H ₂ O) 0.5 M	101.6 g
NaCl 4 M	58.4 g
Agua desionizada	800 ml

Disolver y ajustar el volumen a 1L. Esterilizar.

Tampón de detección (0.3 L)

Componente	Cantidad
Solución A	30 ml
Solución B	30 ml
Agua desionizada esteril	240 ml

HCl 0.2 M (0.5 L)

Componente	Cantidad
HCl 37%	8.3 ml

Disolver y ajustar el volumen a 0.5L. Esterilizar.

Formaldehido 4% (0.6 L)

Componente	Cantidad
Formaldehido 37%	60 ml
PBS 1x estéril	540 ml

Solución de lavado (1 L)

Componente	Cantidad
SSC 20x estéril	100 ml
Formamida 100%	500 ml
Agua desionizada estéril	400 ml

Blocking agent

0.5% Blocking agent ROCHE en TBS 1x
Se disuelve a 60°C. Se guarda a -20°C

Solución BTT (1L)

Componente	Cantidad
BSA 1%	10g
Tritón X-100 (comúnmente de forma comercial está a 10x, sino ajustarlo a esa concentración)	30 ml
Agua desionizada estéril	400 ml
TBS 1x	Aforar a 1 L

Anexo VII. Vector pGEM-T Easy y resultados de la secuenciación de plásmidos

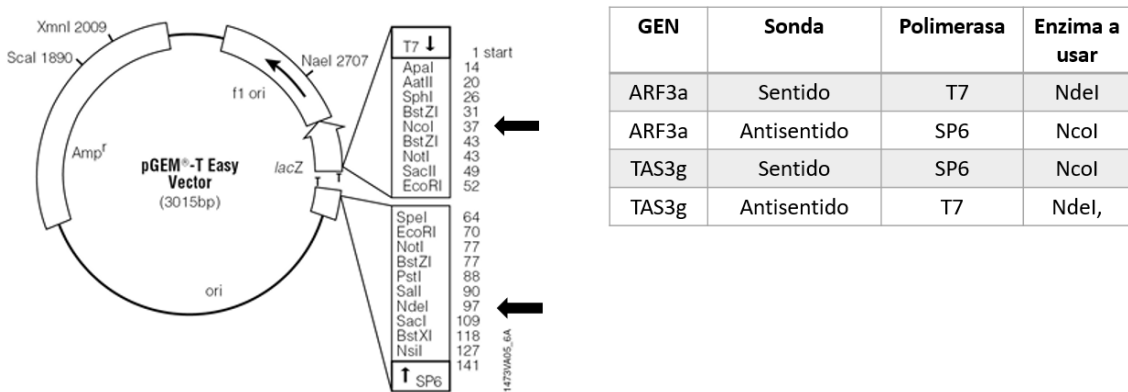


Fig. 51. En el mapa del vector PGEM-T Easy se indica las enzimas utilizadas para mantener los promotores para la Pol T7 o SP6 y así generar la sonda sentido o antisentido.

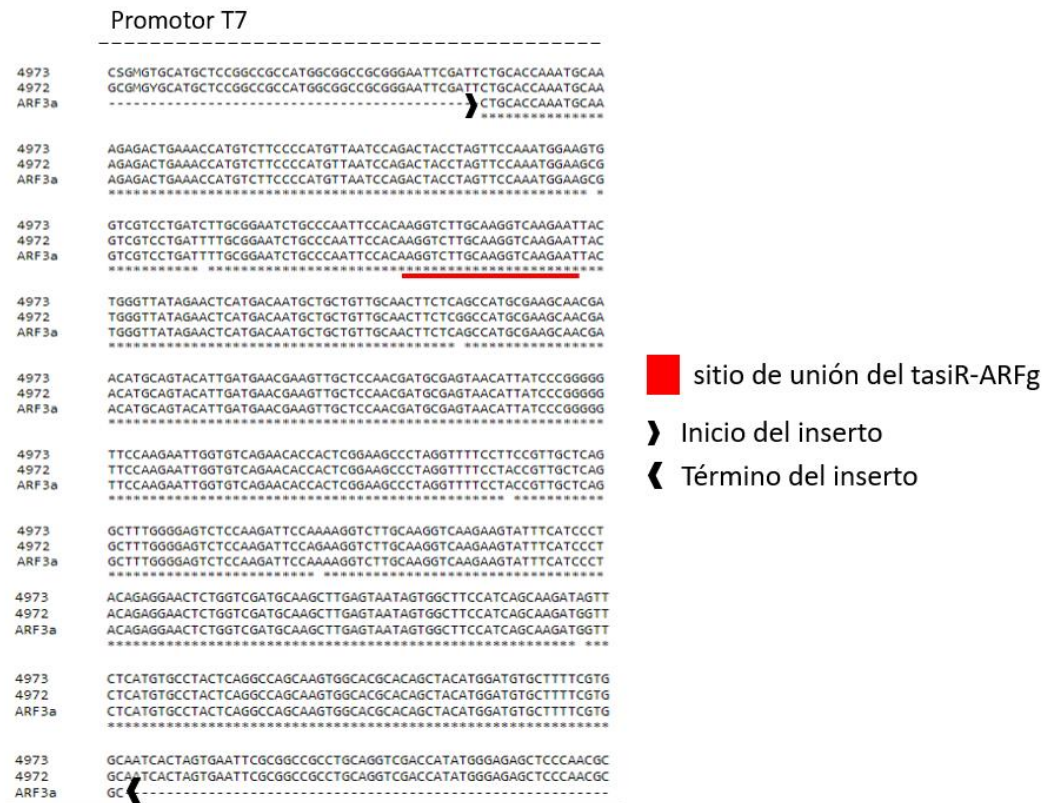


Fig. 52. Resultados de la secuenciación de los plásmidos con los insertos utilizados para la transcripción *in vitro*. El número de identificación 4973 corresponde a la Col.6 y 4972 a la Col.1. Se comparan estas secuencias con la del transcrito de *ZmARF24*. Se indican la posición de dónde estaría el sitio del promotor T7, el inicio y término del inserto, así como el sitio de unión de tasiR-ARFg.



Fig. 53. Resultados de la secuenciación de los plásmidos con los insertos utilizados para la transcripción *in vitro*. El número de identificación 4975 corresponde a la Col.4 con el inserto de *TAS3g*. Se indican la posición de dónde estaría el sitio del promotor SP6, el inicio y término del inserto, así como el sitio de unión de miR390 y la secuencia de tasiR-ARFg.

Anexo VIII. Acumulación de los componentes de la vía tasiR-ARF en el lote de dos años y expresión de los genes involucrados en la formación de SAM y hoja.

Con el fin de verificar la expresión de la vía tasiR-ARF en el CE y CNE-A subcultivados por dos años y las respectivas etapas de regeneración establecidas, se evaluó la acumulación de seis componentes de la vía: *TAS3g*, *ZmARF24*, miR390, tasiR-ARFg, tasiR-ARFbD5 y tasiR-ARFbD6. Aunque no se notaron diferencias morfológicas en los tipos de callo y etapas de regeneración de este lote (**Fig. 54**) si fueron perceptibles cambios en la acumulación de *ZmARF24* y tasiR-ARFg en ambos callos subcultivados por dos años, comparados con el lote de 1 año de subcultivo. En el lote de 2 años, *ZmARF24* mostró mayor acumulación en el CNE y tasiR-ARFg en el CE (**Fig. 55**).

Respecto a las etapas de regeneración las mayores diferencias se mostraron en la 1ª etapa para tasiR-ARFbD6, en la 2ª etapa de regeneración para *TAS3g*, *ZmARF24* y en la plántula para la mayoría de los componentes analizados, excepto para miR390 (**Fig. 56**). Estas diferencias se atribuyen a que ambos CEs de los dos lotes de subcultivo poseían contrastes en la acumulación de estos componentes, por lo que estas diferencias resultaban también visibles durante la regeneración (**Fig. 57**). Pese a esto, cabe recalcar que por ejemplo, miR390 mostró patrones de acumulación muy semejantes en ambos lotes. (**Fig. 32**) y (**Fig. 55**).

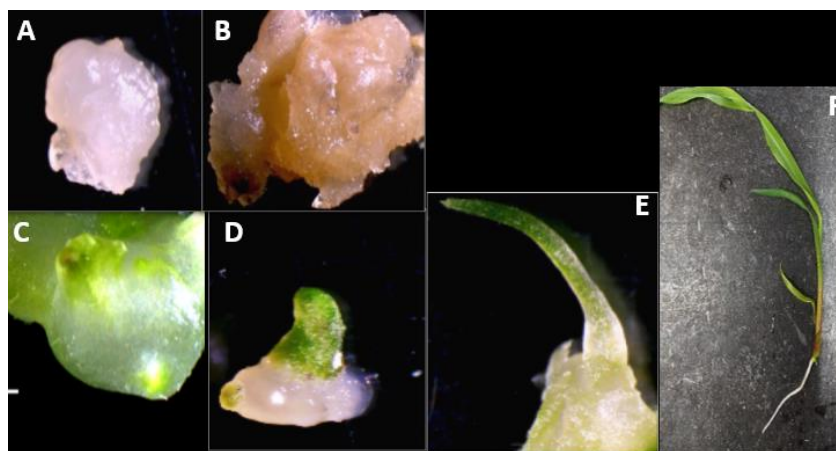


Fig. 54. Tipos de callos y etapas de regeneración de un cultivo de dos años. A. CE, B. CNE-A, C. 1ª etapa, D. 2ª etapa, E. 3ª etapa, F. Plántula.

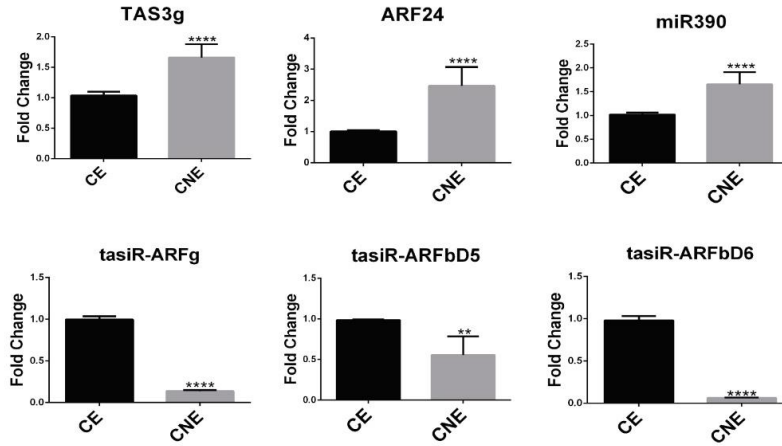


Fig. 55. Evaluación de la acumulación de transcritos y sRNAs de la vía tasiR-ARF en el callo embriogénico (CE) y callo no embriogénico (CNE) subcultivados por dos años.

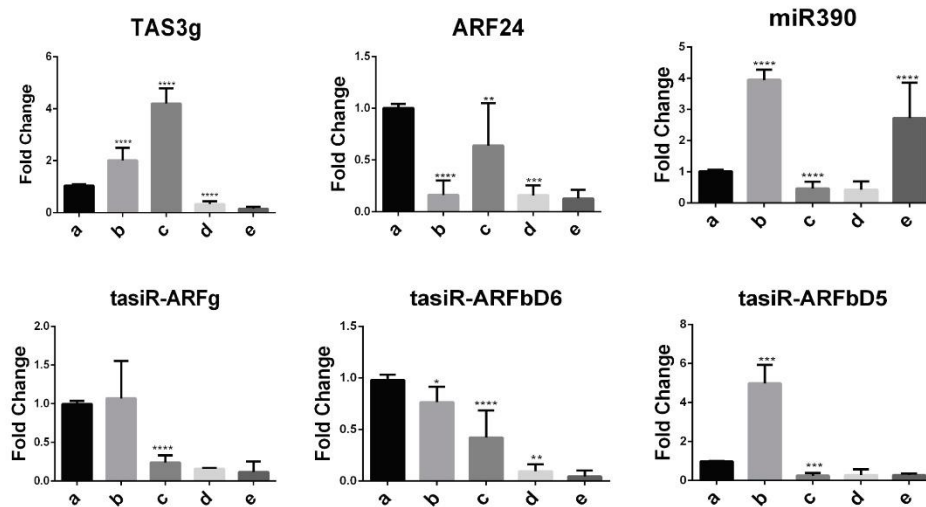


Fig.56. Evaluación de la acumulación de transcritos y sRNAs de la vía tasiR-ARF durante la regeneración del CE subcultivado por dos años. a) CE, b) 1ª etapa de regeneración, c) 2ª etapa de regeneración, d) 3ª etapa de regeneración, e) plántula.

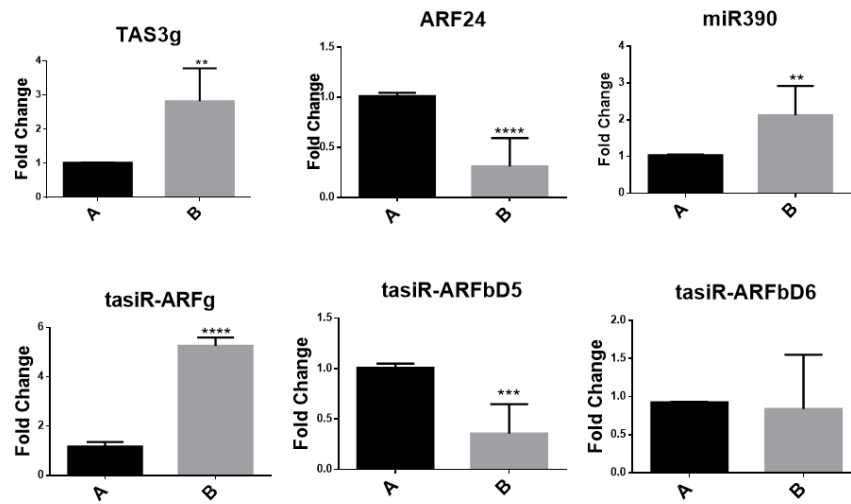


Fig.57. Expresión de seis componentes de la vía tasiR-ARF en los dos callos embriogénicos: de un año y dos años de subcultivo. A. CE de 1 año de subcultivo; B. CE de 1 año de subcultivo

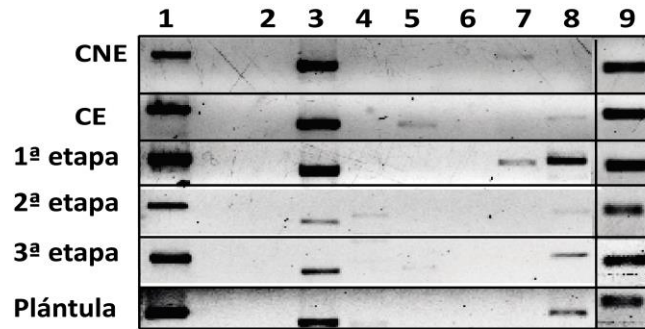


Fig.58. RT-PCR de los genes involucrados en la formación de SAM y hoja en maíz. 1. KNOTTED1 (KN1), 2. NO APICAL MERISTEM 1 (NAM1), 3. NAC type transcription factor 116 (NAC_116), 4. CUP-SHAPED COTYLEDON3 (CUC3), 5. PINHEAD 1, 2, 3 (PIN1, 2, 3), 6. WUSCHEL-related Homeobox 9A (WOX9A), 7. WOX5A, 8. WOX3A, 9. 18s.

Anexo IX. Vías de regulación compartidas entre miRNAs y tasiR-ARFs

La vía tasiR-ARF comparte nodos de regulación con diversos miRNAs y factores de transcripción durante la formación del SAM, la iniciación de la hoja y el establecimiento de su polaridad. En la Fig. 59 se muestran dichas vías de regulación.

Para el mantenimiento del SAM, el módulo miR394- *LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR)* media una vía autónoma de regulación, ya que miR394 se desplaza del protodermo para reprimir a *LCR* y así permite el mantenimiento de las células troncales, que a su vez requieren un loop de retroalimentación de *WUS* y *CLV3* (Knauer et al., 2013).

miR165/miR166 regulan la organización y el mantenimiento del SAM, que a su vez es regulado por AGO10. Esta argonauta secuestra a miR165/miR166, compitiendo con AGO1 y así protege a los transcritos *HD-ZIP III* de la degradación permitiendo el desarrollo adecuado del SAM (Zhu et al., 2011). Por su parte, *ARF10*, *16*, *17*, blancos de miR160 son requeridos para el mantenimiento de un pico de auxinas en el meristemo para el adecuado desarrollo de los cotiledones (Pulido & Laufs 2010).

La interacción de miR160 y miR165/miR166 contribuye a la embriogénesis somática mediante la activación de la biogénesis de auxinas mediada por *LEAFY COTYLEON 2 (LEC2)*. Sus blancos, *ARF10/16* y *PHAVOLUTA*, *PHV* (de la familia HD-ZIP IIIs) activan a la expresión de *LEC2* que finalmente provoca la acumulación de IAA (Wójcik et al., 2017).

El desarrollo de las dos superficies opuestas de la hoja es mantenido por dos reguladores de la polaridad: los determinantes adaxiales y los determinantes abaxiales. HD-ZIP III y *ASSIMETRIC LEAVES 1/2 (AS1; AS2)* son determinantes adaxiales donde AS1/AS2 promueve la expresión de HD-ZIP III. KANADIs y YABBYs son determinantes abaxiales, donde KANADIs activa a YABBYs (Chitwood et al., 2007; Yamaguchi et al., 2012). MiR165/miR166 degrada a tres transcritos de genes de la familia HD-ZIP III: *PHABULOSA (PHB)*, *PHV* y *REVOLUTA (REV)* que de forma redundante promueven el lado adaxial de la hoja. El módulo miR390-AGO7-TAS3 produce tasiR-ARFs que regulan negativamente a los ARF3/4 para regular la identidad abaxial de la hoja (Pekker et al., 2005). Además, AS1/AS2 reprimen ARF3/4 para estabilizar la polaridad de la hoja mediante tres formas: la unión directa al promotor *AtARF3*, de forma indirecta activando a miR390 y RDR6, lo que provoca el silenciamiento de ARF3/4, mediante el mantenimiento de la metilación de ARF3 en su región codificante (Iwasaki et al., 2013). Adicionalmente, *AtARF3* controla la síntesis de citocininas gracias a la regulación negativa de *AtIPT5* mediante la unión directa de su promotor durante la formación *de novo* del SAM (Cheng et al., 2013).

Por otra parte, miR164 está asociado a la formación de límites durante la iniciación de primordios de órganos en los meristemas reprimiendo a sus blancos *CUC1* y *CUC2*. Además, *CUC2* regula positivamente la expresión de *SHOOT MERISTEM LESS (STM)* en el SAM. *STM* se expresa en la zona central y periférica del SAM para mantener la división celular y prevenir la diferenciación celular. A su vez, *STM* regula la producción de citocininas mediante la activación de la ISOPENTENIL TRANSFERASA 7 (*IPT7*), enzima involucrada en la síntesis de estas hormonas (Gupta et al., 2012)

Por otra parte, miR156 está involucrado en la transición de fase juvenil a la reproductiva mediante la represión de sus blancos *SPL*. *SPL3/4/5* determinan la formación de tricomas y *SPL9/15* modula la morfología de la hoja adulta en *Arabidopsis* (Huijser and Schmid, 2011). De forma adicional, miR156

también está involucrado en la represión de sus blancos *SPL10/11* previniendo la acumulación de transcritos de genes inducidos durante la fase de maduración en las fases tempranas de la embriogénesis cigótica (Vashisht & Nodine, 2014).

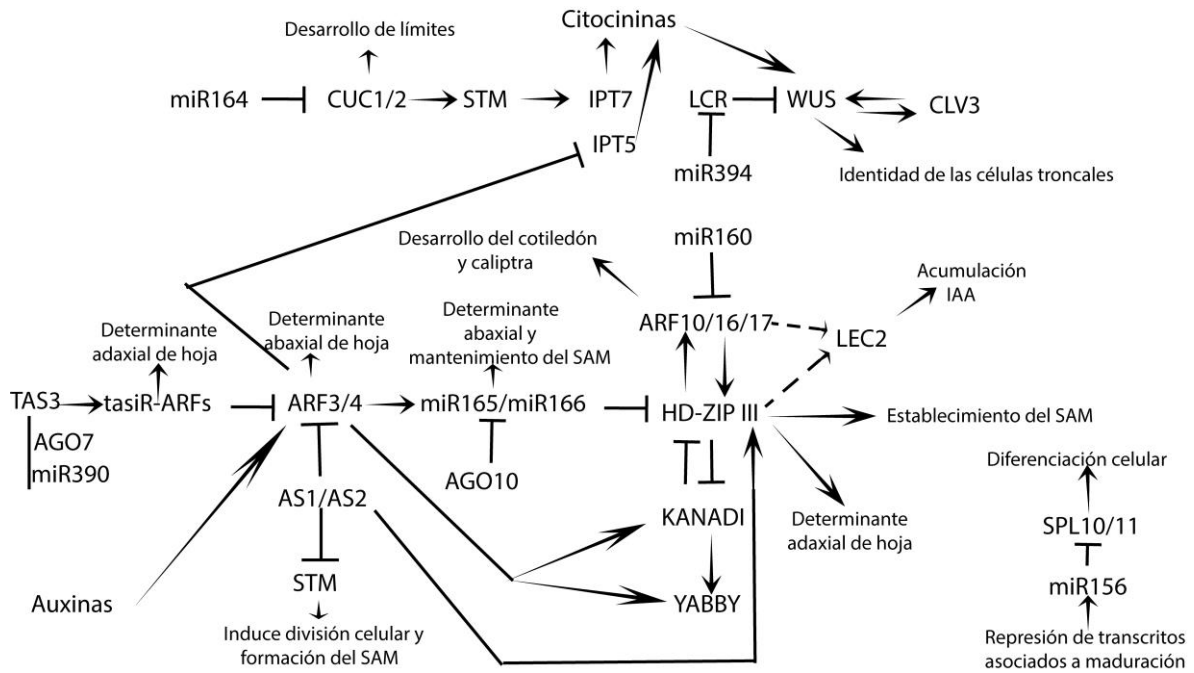


Fig. 59. Nodos de regulación que comparten miRNAs y tasiR-ARFs.

Anexo X. Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis.



Article

Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during Staggered In Vitro Plant Regeneration of Tuxpeño VS-535 Maize Cultivar

Brenda A. López-Ruiz ¹, Vasti T. Juárez-González ¹, Estela Sandoval-Zapotitla ²
and Tzvetanka D. Dinkova ^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico; ana_bell_89@hotmail.com (B.A.L.-R.); vasti.juarez.gonzalez@gmail.com (V.T.J.-G.)

² Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico; esz@ib.unam.mx

* Correspondence: cesy@unam.mx; Tel.: +52-55-56225277

Received: 28 March 2019; Accepted: 25 April 2019; Published: 27 April 2019



Abstract: In vitro plant regeneration addresses basic questions of molecular reprogramming in the absence of embryonic positional cues. The process is highly dependent on the genotype and explant characteristics. However, the regulatory mechanisms operating during organ differentiation from in vitro cultures remain largely unknown. Recently, miRNAs have emerged as key regulators during embryogenic callus induction, plant differentiation, auxin responses and totipotency. Here, we explored how development-related miRNA switches the impact on their target regulation depending on physiological and molecular events taking place during maize Tuxpeño VS-535 in vitro plant regeneration. Three callus types with distinctive regeneration potential were characterized by microscopy and histological preparations. The embryogenic calli (EC) showed higher miRNA levels than non-embryogenic tissues (NEC). An inverse correlation for miR160 and miR166 targets was found during EC callus induction, whereas miR156, miR164 and miR394 displayed similar to their targets RNA accumulation levels. Most miRNA accumulation switches took place early at regenerative spots coincident with shoot apical meristem (SAM) establishment, whereas miR156, miR160 and miR166 increased at further differentiation stages. Our data uncover particular miRNA-mediated regulation operating for maize embryogenic tissues, supporting their regulatory role in early SAM establishment and basipetala growth during the in vitro regeneration process.

Keywords: callus; de novo shoot regeneration; maize; microscopy; miRNA regulation

1. Introduction

In vitro plant regeneration is usually achieved through somatic embryogenesis (SE) or de novo shoot organogenesis [1]. Somatic embryo induction represents full expression of totipotency, while shoot regeneration reflects cell pluripotency [2]. Both regeneration pathways are dependent on phytohormone perception, cell division and dedifferentiation to acquire organogenic competence, organ initiation and development. SE and de novo shoot organogenesis are broadly used, either for basic research or practical applications. However, in contrast to the embryonic pathway, the de novo shoot organogenic pathway is more valued in biotechnological breeding methods because the plant explants and the in vitro conditions are comparatively simpler and more robust [3].

For maize, plant regeneration was early described using immature embryos as explants to produce embryogenic calli (EC) type II and subsequently somatic embryos [4]. Initially, high EC frequency was restricted to few inbred lines, such as Hi-II, resulting from A188 and B73 crosses, whereas

other genotypes produced mostly non-embryogenic callus (NEC) [5,6]. Further research reported *in vitro* maize regeneration via organogenesis [7,8]. Recently, other genotypes cultured in different geographic regions have proven to efficiently undergo SE and plant regeneration. Such is the case of a Chinese inbred elite line, 18-599R [9] and the Mexican improved variety VS-535 developed by Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) from the Tuxpeño landrace genotype [10,11]. The culture medium, photoperiod, phytohormone ratio and other conditions of the *in vitro* culture can be adjusted to promote either SE or organogenesis from the induced EC [12].

The molecular pathway to shoot regeneration primarily involves auxin-, cytokinin- and Shoot Apical Meristem (SAM)-related genes, including WUSCHEL (WUS), SHOOT MERISTEMLESS (STM) and CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2) [3,13]. Their expression appears regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. Many of the corresponding transcripts are targeted by microRNAs (miRNAs), which have been shown to act as mobile signals to restrict gene expression at particular plant tissues [14,15].

miRNAs are small (20–22 nt) non-coding RNAs that have shaped as master regulatory molecules for specific target mRNAs based on sequence complementarity. In *Arabidopsis thaliana*, identification of miRNA targets and the availability of mutants in the miRNA biogenesis pathway have evidenced their relevance in plant development [16–18]. Genome-wide studies have revealed major miRNA changes during EC induction in *Arabidopsis* [19], rice [20], wheat [21], maize [22] and many other plant species. In maize, particular miRNA levels do not only change during dedifferentiation, but also during the establishment of EC proliferation. A follow-up on development-related (miR156, miR164) and stress-related (miR398, miR408, miR528) miRNAs, as well as on their targets, showed contrasting patterns during VS-535 plant regeneration depending on hormone presence and light [23].

According to several recent reports, miR156, miR160, miR164, miR165/166 and miR394 are relevant for SAM development because they show specific spatio-temporal localization to inhibit mRNAs corresponding to transcription factors: SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL) 10/11, CUC1/2, AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) 10/16/17, HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP) III and LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR), respectively [14]. The overexpression of miR165a leads to a drastic reduction on HD-ZIP III transcript levels and failure of SAM formation [24]. It has been suggested that balanced regulation of miRNA165/166 abundance is essential for HD-ZIP III-mediated spatio-temporal induction of WUS expression and *de novo* SAM initiation [25]. Moreover, miR156 and its target SPL9 were related to age-dependent developmental decline of shoot regenerative capacity in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. Zhang et al. found that a reduction in miR156 levels and gradual increase of SPL9 lead shoot regenerative capacity by attenuating the cytokinin signal pathway [18]. In addition, it was found that miR160a negatively regulates shoot regenerative capacity through down-regulation of ARF10 and is more abundant in callus tissues unable to undergo *de novo* SAM initiation compared to those with shoot regenerative capacity [26].

Here we aimed to integrate miRNA-mediated regulation of key targets during *in vitro* maize plant regeneration for the Tuxpeño VS-535 cultivar using a previously established method of callus induction, proliferation and differentiation. To associate particular miRNA fates with regeneration capacity we compared the original explant (immature embryo, IE) with de-differentiated tissues displaying contrasting morphological and regenerative characteristics (EC and NEC), as well as during four reproducible phases of plant regeneration. According to our results, SAM formation-related miRNAs and their targets are significantly more abundant in EC than NEC, whereas WUS levels are similar in these tissues and higher than in the original explant. The regulation mediated by miR156, miR160 and miR166 nodes operates at early leaf differentiation, correlating with *de novo* SAM formation and reproducibly precedes root appearance. On the other hand, miR164 and miR394 decrease or relocate to specific regions in early regenerative spots and increase at later regeneration stages. According to this, we conclude that the initial miRNA and target levels in the callus underlie its regenerative potential and guide its ability to promote shoot appearance during plant regeneration from maize VS-535 *in vitro* cultures.

2. Results

2.1. Morphology of Dedifferentiated Tissues

According to previous reports, maize EC induction requires immature embryos (IE) at 15–18 days after pollination (DAP) as explant to obtain greater proportion of embryogenic dedifferentiated tissues, particularly EC Type II [6,11,27]. However, callus morphology might be heterogeneous, depending on the maize genotype. Tuxpeño VS-535 IEs collected at 15 DAP were 3–4 mm long and characterized by the suspensor absence (Figure 1; panels A and B). Upon induction, root protruded from the embryo and two kinds of cell masses became evident: one with waterish appearance at the side of the emerged root, in opposite orientation; the other localized at the scutellum side with clearly distinctive characteristics (Figure 1). Observation with scanning electron microscopy (SEM) showed a cumulus of smooth callus formed by small cells arising from the scutellum side (Figure 1E,F, arrowheads), whereas the one originating from the embryonic axis side, mostly from the root apical meristem (RAM), was characterized by the presence of enlarged cells (Figure 1E,F, arrows).

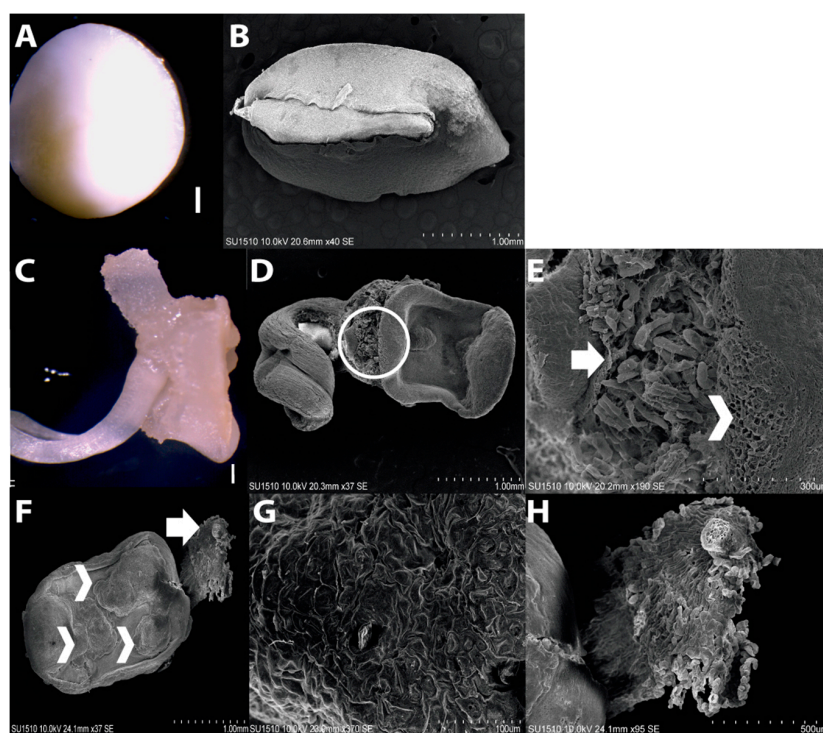


Figure 1. Origin of the different callus types for Tuxpeño VS-535. (A) Immature embryo (IE) at 15–18 days after pollination (DAP). (B) The IE observed with SEM. The embryonic axis and surrounding tissue are clearly distinguished. (C) The IE after seven days on N6I medium. Radicle protrusion and callus formation around the embryo are observed. (D) The IE after seven days on N6I medium observed with SEM. (E) Magnification of the circled area in D. The arrow points at non-embryogenic callus formation, whereas the arrowhead indicates pro-embryogenic callus tissue. (F) The IE after nine days on N6I medium observed with SEM. Cumulus of embryogenic masses formed on the scutellar epithelium are highlighted by several arrowheads, whereas an arrow points at non-embryogenic callus formed on the embryonic axis side. (G) Magnification of F in an arrowhead zone, (H) Magnification of G in the arrow zone.

Upon successive subcultures of the dedifferentiated tissues, three callus types were easily distinguished: embryogenic callus (EC), yellow-soft non-embryogenic callus (Y-NEC) and white-compact non-embryogenic callus (W-NEC). All three calli types were tested for plant regeneration, but only the EC was able to develop plantlets. The EC was translucent, compact and friable (Figure 2A). These

features were conserved through subsequent subcultures for over two years. According to the induction follow-up, the EC was generated on the upper (abaxial) surface of the scutellum placed in direct contact with the induction medium. Hence, it was likely scutellar-, epithelial-derived (Figure 1; panels E–G). The Y-NEC with watery yellowish to brownish appearance was able to massively proliferate during subculture passages (Figure 2D). It is possibly originated from coleorhiza (Figure 1; panels E, F and H) and was prone to form roots through organogenesis in the presence of light (Supplementary information Figure S1; panels C,D). The W-NEC showed an opaque smooth appearance and contrary to the EC was not friable (Figure 2G). It underwent aberrant development during plant regeneration (Figure S1; panel E). Both NEC types coexist with the EC during callus subcultures (Figure 2; panels J,K).

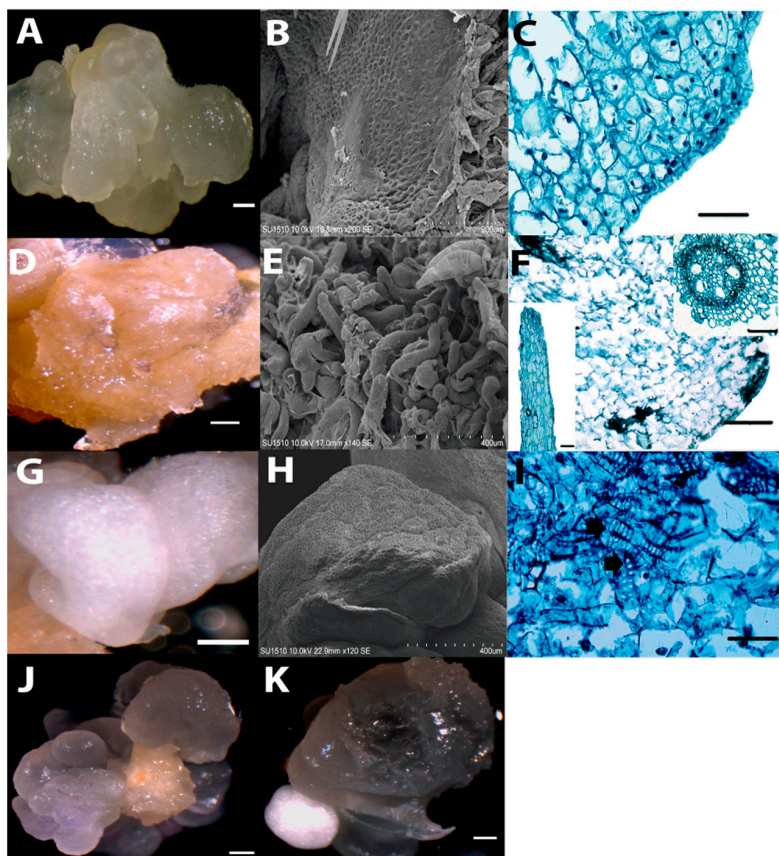


Figure 2. Different callus types observed during subcultures of Tuxpeño VS-535. (A) A portion of translucent embryogenic callus (EC). (B) EC observed with SEM. (C) Histological analysis of EC. Characteristic small isodiametric cells with prominent nuclei are observed at the callus surface. (D) A portion of yellow non-embryogenic callus (Y-NEC). (E) Y-NEC observed with SEM. (F) Histological analysis of Y-NEC. Larger cells with smaller nuclei can be appreciated. The inset images represent a root-like structure (right) and a vascular bundle (left) frequently observed for this callus type. (G) A portion of white non-embryogenic callus (W-NEC). (H) W-NEC observed with SEM. (I) Histological analysis of W-NEC. The arrows indicate tracheid structures present in this callus type. (J) and (K) Portions of callus tissues showing the co-existence of EC with Y-NEC and W-NEC, respectively. Histological analyses are shown at $\times 400$ magnification. Bar in A, D, G and H: 1 mm. Bar in C, F and I: 100 μm .

A morphologically distinct appearance for each callus type was evident by SEM analysis (Figure 2; panels B, E and H). The EC displayed small, isodiametric cells, while the Y-NEC consisted of large cells (200 μm), contributing to a rough surface appearance of the tissue. Histological analysis suggested the presence of meristematic zones in EC characterized by regular-shaped cells and dense nuclei (Figure 2C). As a distinctive feature, the W-NEC presented particular enrichment of tracheid-like

structures in a disorganized fashion (Figure 2I). During callus subcultures, the W-NEC was discarded, whereas the other two callus types remained and were separated during the plant regeneration process.

2.2. Plant Regeneration from Tuxpeño VS-535 EC

Plant regeneration consisted in staggered hormone depletion and exposure to a photoperiod. The first visual evidence of regenerating tissues was the location of green spots, approximately 0.3 mm wide, on the callus surface, as previously reported [11,28]. After two weeks on proliferation medium (N6P) with half-concentration hormones and photoperiod, the green regenerative spots resembled protrusions corresponding a leaf tip (Figure 3A). These were designed as the 1st stage of development in our study. SEM and histological analyses revealed dense small meristematic cells at the apical region of each spot (Figure 3; panels A–C, Supplementary information, Figure S2; panels A,B). Immediately under the regenerative spot, disorganized tracheid structures were observed (Supplementary information, Figure S2; panel C, arrow).

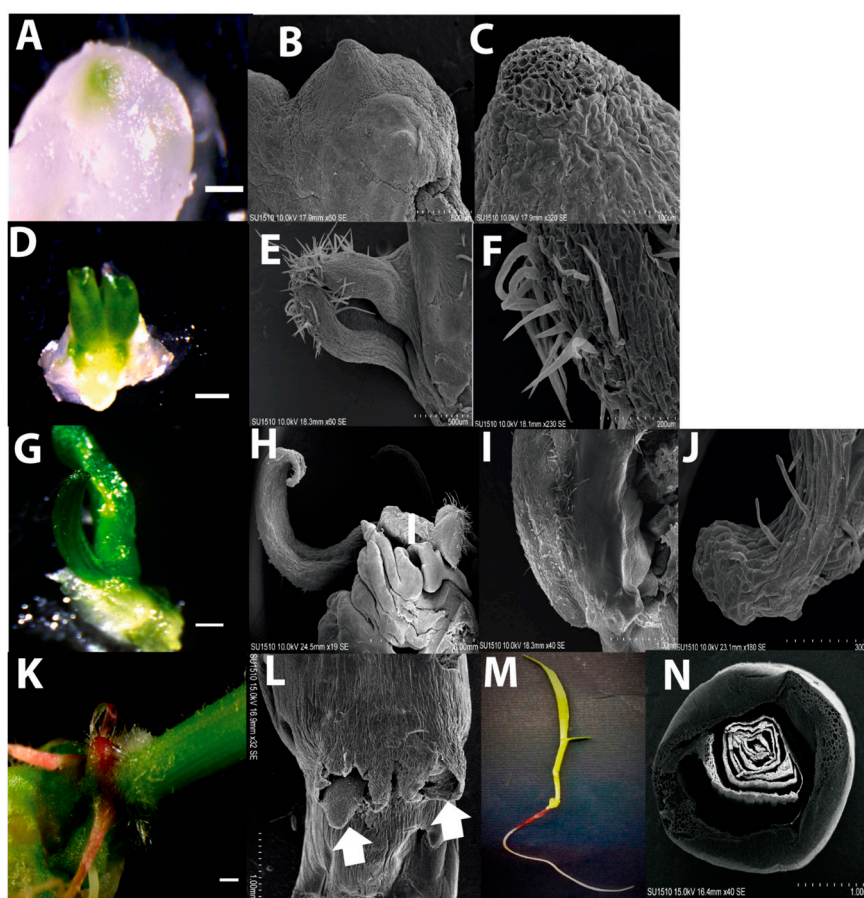


Figure 3. Developmental stages during Tuxpeño VS-535 plant regeneration from EC. (A) Regenerative spot observed on EC subcultured for two weeks in N6P with 50% hormones and photoperiod (1st stage). (B) The 1st stage of development observed with SEM. (C) Magnification of the regenerative spot tip with SEM. (D) Apical growth resembling leaf structure observed from a regenerative spot in N6P with 0% hormones (2nd stage). (E) The 2nd stage of development observed with SEM. (F) Magnification of the leaf-like structure exhibiting hairs the primordium. (G) Development of a differentiated leaf structure still adhered to the callus and without root emergence, in MS (3rd stage). (H) The 3rd stage of development observed with SEM. (I) Magnification of the basal portion of the leaf observed with SEM. (J) Magnification of the tip portion of the leaf observed with SEM. (K) The stem portion of a regenerated plantlet with visible roots grown in MS. (L) Roots emerging from the regenerated plantlet observed with SEM. Two arrows point at emerging roots. (M) Whole regenerated plantlet observed with SEM. (N) Cross section at the base of a plantlet stem observed with SEM. In A, D, G and K Bar= 1 mm.

After two additional weeks on N6P without hormones, considered as the 2nd stage of development, the regenerating tissue enlarged (1 mm of length) and acquired a subtle rolled leaf shape. Leaf primordium-like structures were covered by hairs and resembled epidermal cell type on the surface (Figure 3; panels D–F). Histology indicated high cell proliferation and presence of parenchyma throughout the tissue. More tracheid structures were visible immediately below the regenerating tissues (Supplementary information, Figure S2; panels D–F). This structure developed in a typical leaf shape upon two further weeks on MS medium and was designed as the 3rd stage of plant regeneration (Figure 3; G–J). At this stage, no evidence of root formation was detected. The leaf structure reached approximately 6 mm length and presented parallel veins characteristic of monocots. For the first time the tracheid structures appeared aligned and other cell types, such as chlorenchyma and amyloplasts-like, were readily distinguished (Supplementary information, Figure S2; panels G–I).

Whole plantlet development was initiated after a subsequent passage of the regenerative tissues on MS. At this last stage, emerging roots and several fully developed leaves were observed (Figure 3; panels K–N). Root structures resembled more crown roots than a primary root, and arose at lateral sides of the stem. The histological analysis showed a typical RAM anatomy for the roots, as well as dorso-ventral polarity and well-formed vascular bundles for the leaves. However, a cross section of a plantlet stem shows no evidence of central vascular bundles. (Supplementary information, Figure S2; panels J–N).

Under the above conditions, plant regeneration took about 42 days. It is important to strike that all stages were reproducibly observed at the indicated times for at least four independent regeneration batches. The number of regenerative spots per gram of callus is available in the (Supplementary Materials Figure S1; panel A,B). Interestingly, when root structures appeared before the leaf on callus, plant regeneration was not observed.

2.3. miRNA and Target Regulation in Tissues with Different Embryogenic Potential

We analyzed the abundances of miR156, miR160, miR164, miR166 and miR394, previously described as crucial factors in plant development [14]. The established Y-NEC (12 months of subculture) presented significantly decreased levels for all miRNAs, except for miR394, with respect to the original IE explant (Figure 4). However, only miR160 and miR166 were significantly reduced, whereas miR394 was highly accumulated in EC with respect to the explant. Particularly interesting observation was the higher abundance of miR156, miR164 and miR394 in EC than in Y-NEC suggesting a potential role regarding the embryogenic potential of dedifferentiated tissues (Figure 2).

All miRNA targets analyzed here have been experimentally confirmed through degradome data [29,30]. We found a noteworthy higher accumulation of miRNA targets in EC than in Y-NEC and IE (Figure 4; lower panels), except for SBP23 targeted by miR156, which was more accumulated in IE. According to this, for most miRNA targets there was no inverse correlation with the corresponding miRNA, particularly in Y-NEC. However, such correlation exists for miR160 and its targets AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) 17 and 19, as well as for miR166 and RLD1/HD-ZIP III in comparisons between IE and EC. These results support central molecular dissimilarities between calli with different embryogenic potential, which might correlate with the regenerative capacity of a tissue. It is interesting to notice that the SE marker WUS2 showed greater abundance in both dedifferentiated tissues than in IE, supporting the high proliferation status of established calli. Nevertheless, an important feedback loop on WUS2 through miR394 and its target F-box (LCR) seems to be operational only for EC.

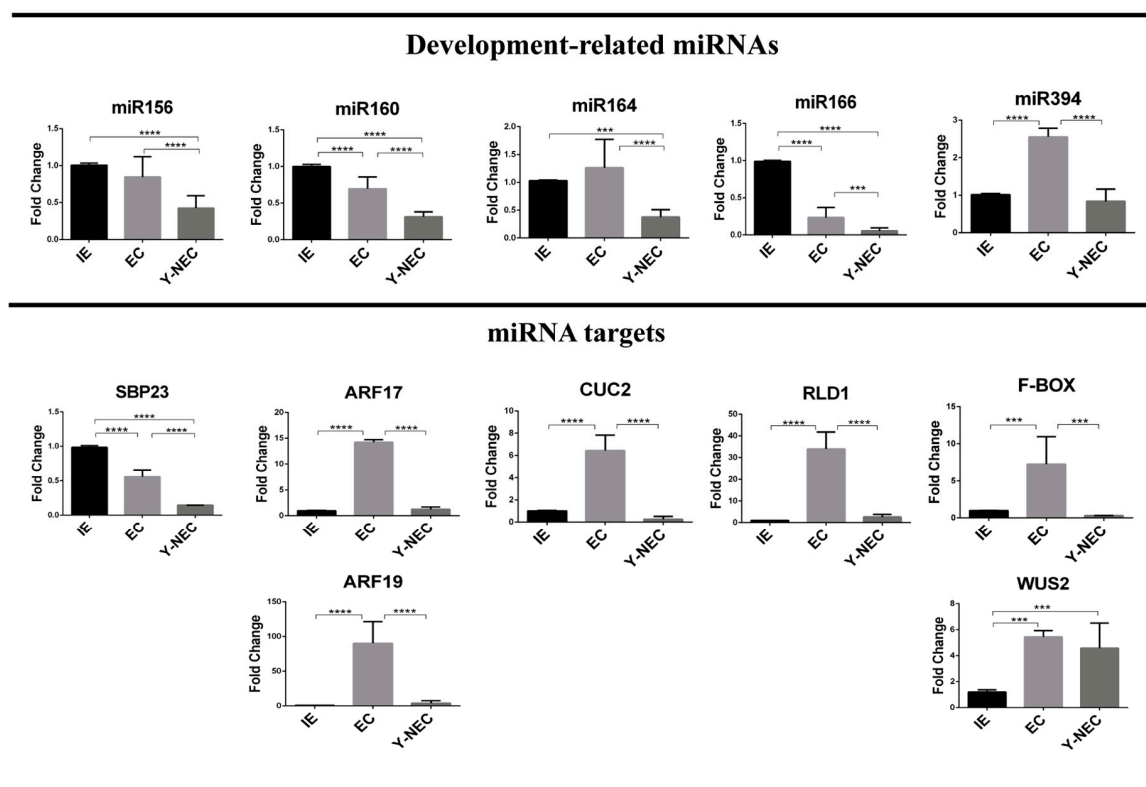


Figure 4. Development-related miRNAs and their target abundances in maize VS-535 SE. miRNA and mRNA abundances were analyzed by qRT-PCR in Tuxpeño VS-535 immature embryos (IE) used as explants to induce SE, and in established 12 month-old embryogenic (EC) and non-embryogenic (Y-NEC) callus tissues. Each miRNA target is shown below the corresponding miRNA, except for WUS2, which is not a direct target of miR394, but is instead regulated by an F-Box protein target of miR394. Fold change represents abundance relative to the IE and normalized by U6 snRNA internal control. Significant values are indicated as follows: (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$.

2.4. Embryogenesis-Related miRNA and Target Regulation During Plant Regeneration

At the 1st stage of plant regeneration from EC (two weeks on half-hormone depletion and photoperiod), a decrease was observed for most analyzed miRNAs although it was significant only for miR164 and miR394 (Figure 5; upper panels, lane b). During further regeneration stages we distinguished a burst in miRNA abundance at either the 2nd or the 3rd stage. While miR156, miR160 and miR166 increased at the 2nd stage, miR164 and miR394 did so at the 3rd stage (Figure 5; upper graphs, lanes c and d). Such behavior supports the notion that particular miRNAs operate in a development-dependent fashion during plant regeneration. According to the previously described morphology at each stage, embryogenesis-related miRNAs play a major role in leaf tip differentiation during VS-535 *in vitro* plant regeneration.

The highest levels of miR160 and miR166 were observed at the 2nd stage (six fold above EC), coincident with important reduction of ARF17 and RLD1 corresponding targets (Figure 5, lower panel). On the other hand, accumulation of miR156, miR64 and miR394 was appreciated at the 3rd stage of regeneration (four, two and three-fold above EC), but it was not mirrored by the reduction of their corresponding targets. On the contrary, an increase of SBP23 and CUC2, targeted by miR156 and miR164 respectively, was concomitantly found at this stage. As mentioned before, a negative correlation could not always be observed between a miRNA and its target. This could be due to a different regulatory mechanism (i.e., translation) or more likely, the inability to discern the miRNA action at particular cell types within the analyzed tissues.

A significant decrease in miR160 and miR166 levels was evident at the 3rd developmental stage when the regenerative structures acquired fully developed leaf shape. In fully regenerated plantlets, miR156, miR160, miR164 and miR394 levels were significantly down-regulated, whereas miR166 appeared again up-regulated if compared to the preceding stage (Figure 5; lane e). According to our physiological observations, the miR166 abundance pattern might be related to root formation, as well as to the development of new leaves (Figure 3K–N).

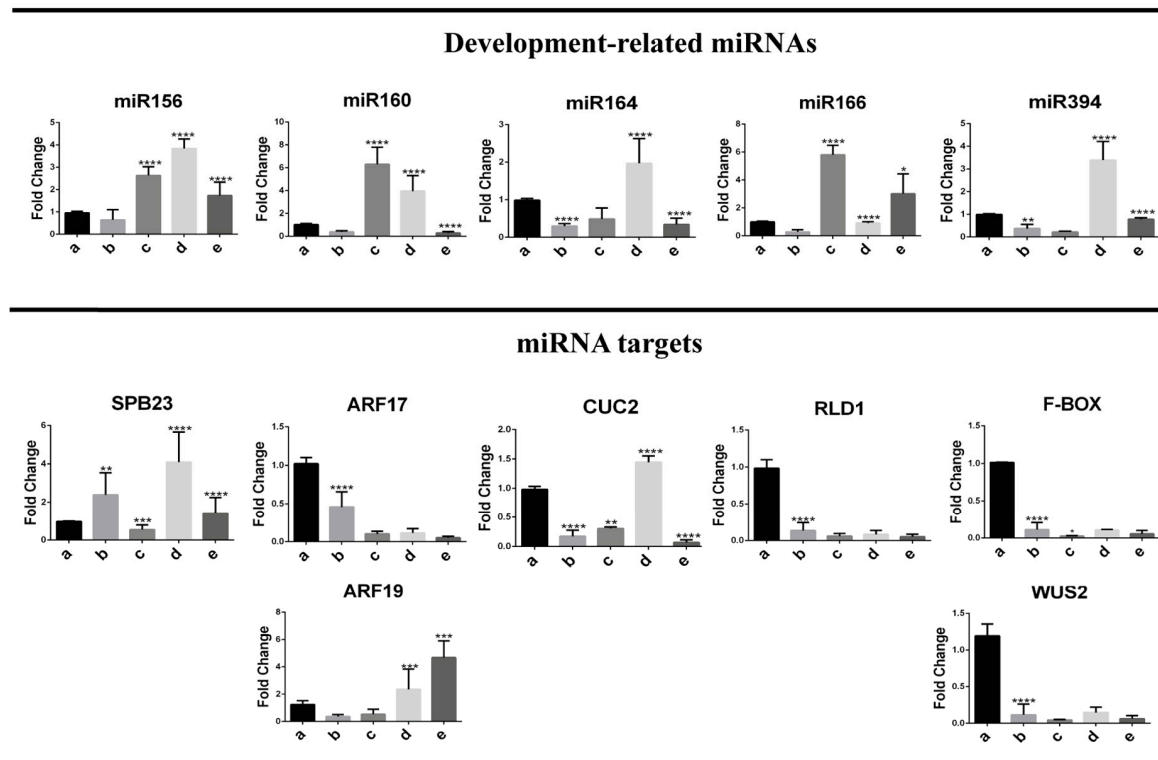


Figure 5. Abundance patterns of development-related miRNAs and their targets during maize VS-535 plant regeneration. miRNA and mRNA levels were analyzed by qRT-PCR during staggered hormone depletion and photoperiod for Tuxpeño VS-535 plant regeneration. (a) EC, (b) 1st stage of development, (c) 2nd stage of development, (d) 3rd stage of development, (e) Plantlet. Each miRNA target is shown below the corresponding miRNA, except for WUS2, which is not a direct target of miR394, but is instead regulated by an F-Box protein target of miR394. Fold change represents abundance relative to the EC and normalized by U6 snRNA internal control for miRNAs and 18S rRNA for targets. Significant values are indicated as follows: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$.

During the early stages of plant regeneration, targets of miR156, miR160 and miR166 showed strong inverse correlation patterns with the corresponding miRNAs. On the other hand, CUC2 and F-Box/LCR, targeted by miR164 and miR394 respectively, did not show inverse correlation with the miRNA at any regeneration stage. Interestingly, it was possible to observe contrasting behavior for ARF17 and ARF19, targeted by the same miRNA, at later regeneration stages. This further supports the possibility of target-specific regulatory mechanisms depending on development or spatial restriction of the miRNA action.

Most of the targets analyzed here correspond to transcription factors (TF) that regulate gene expression in response to developmental signals in particular tissues. Maize SBP23 is orthologous to Arabidopsis SPL10/11 family of TF involved in vegetative and reproductive plant transitions [16]. CUC2 is associated with the establishment of embryo apical-basal polarity, stem cell identity and boundary specification between SAM and lateral organ formation [3,13]. RLD1 is an HD-ZIP III TF crucial for vascular patterning and SAM development [24]. Taking advantage of previously constructed

gene regulatory networks based on maize RNA-seq expression data [31] we performed a search for miRNA targets as “regulators” in four tissues: seed, SAM, leaf and root (Supplementary information, Figure S3). The results indicated that SBP23 and RLD1 had more interactions in leaf, CUC2 in SAM and ARF 17 in root. All four TF presented relevant interactions in the SAM tissue, playing a crucial role during maize *in vitro* plant regeneration. Taking a closer look at the top six targets for each TF in the SAM, we found that SBP23 regulates signal transduction and metabolism-related genes crucial for SAM development, whereas CUC2 and RLD1 target growth regulators and other TF involved in apical meristem identity, such as LEAFY (LFY), NON APICAL MERISTEM (NAM) and ROLLED LEAF 2 (RLD2). Interestingly, RLD1 also interacts with ARGONAUTE 1 (AGO1), supporting its role in the miRNA biogenesis pathway. Taking into account the important number of SBP23 and RLD1 targets in leaf, a relevant observation was their respective regulation by miR156 and miR166 at later regeneration stages (Figure 5).

3. Discussion

In vitro organogenesis is a unique process that evidences the pluripotency of somatic cells to form a whole plant. It exhibits how differentiated cells become stem cells again. Morpho-histological studies of the maize SE in several inbred lines revealed variable behaviors in dedifferentiated callus tissues and plant regeneration programs [5,28,32–34]. Recent reports employing Mexican Tuxpeño VS-535 are beginning to unravel the molecular features of its particular *in vitro* culture process [23,35]. Because the cultivar displays favorable agronomic characteristics, it is a desirable target for biotechnological purposes. Additionally, the knowledge generated on the molecular basis underlying successful plant regeneration and SE is greatly contributing to further application in other relevant maize cultivars.

Calli originated from different maize varieties display distinct features. Sun et al. described H99 inbred maize EC as yellow, friable and composed of small cells with dense cytoplasm, whereas the NEC, as spongy, watery and brown, with large cells separated by evident gaps [36,37]. Otherwise, the maize inbred line A19 EC and NEC were merely distinguished by the presence of meristematic cell clusters and parenchymal cells without a visible core, respectively [38]. Liu et al. reported the inbred line Y423 NEC as elongated cells without plastids, with larger vacuoles and intracellular spaces than EC [28]. For VS-535 we could reproducibly characterize the classical type II EC [27] and two different NEC tissues, Y-NEC and W-NEC, unable to produce plants under the established regeneration. NEC tissues displayed different proliferation patterns and presented tracheids, that could contribute to the system transport. The origin of EC is restricted to scutellar epithelial cells of the explant, supporting the idea that only certain parts of the embryo have regenerative capability [5,39].

During the staggered hormone depletion and photoperiod plant regeneration program for VS-535, many regenerative spots first develop in leaf structures before the root emergency. Their appearance on particular EC portion is still not well understood, but a plausible scenario involves an auxin maximum and the presence of stem cells derived from SAM. According to the literature, upon depletion of 2,4-D, auxin gradients restrict WUS expression to specific regions giving rise somatic embryos and shoot regeneration [40]. The morphological features described here, support plant regeneration taking place through a basipetal growth, that is, from the tip to the base of the leaf readily observed between the second and the third stages of development. Shoot growth becomes determined by the interplay between phytohormones, transcription factors and regulatory nodes operated by miRNAs [15,41]. On the other hand, plant root system results from the coordination between exogenous environmental factors and endogenous signal pathways. Possibly, the regenerative structure still adhered to the callus uses its conducting-like tissues (i.e., tracheids) to acquire nutrients from the culture medium. Hence, root development appears later, at a stage when the fully developed plantlet requires specific nutrient resources.

Although the role of miRNAs in SE has just started to arise, their involvement in almost any plant developmental process has been widely demonstrated [15]. Particularly, transcription factors and F-Box proteins targeted by miRNAs are crucial for cell division, spatial rearrangement, body

patterning and auxin signaling, as well as during in vitro plant shoot regeneration and de novo SAM formation [18,25,42,43]. Maize miR156 controls the SBP-box transcription factor TASSELSHEAT4 (TSH4) levels for lateral meristem initiation and maintenance [44] and at least 19 maize SBPs corresponding to known *Arabidopsis* SPLs are potentially targeted by miR156 [45]. In addition, miR156 was recently identified as enhancer of the callus embryogenic potential in *Citrus sinensis* [46]. Furthermore, transcription factors CUC1 and CUC2 regulated by miR164 participate in the establishment and maintenance of axillary meristem and organ boundary during embryogenesis [47,48].

Another miRNA that functions as a short-range positional signal in *Arabidopsis* SAM to ensure stem cell identity is miR394 [42]. It down-regulates LCR, an F-box protein acting as inhibitor of the WUS downstream activation signal, to promote stem cell identity acquisition [43,49]. Recently, maize WUS2 has been demonstrated to strongly improve SE of recalcitrant lines [50]. At the same time, early WUS expression was described as marker for in vitro shoot organogenesis in tobacco and Indian spinach [51]. In *Arabidopsis* and maize, miR166 spatially restricts the localization of HD-ZIP III transcription factors at the shoot apex to establish the abaxial pattern in the emerging leaf [52]. This miRNA also participates as mobile signal for proper SAM maintenance and root development [42,53]. On the other hand, ARFs regulation by miR160 restricts stem cell niche and columella differentiation during root cap formation [54].

Here, we found that each one of these miRNAs display particular accumulation patterns, during plant regeneration (Figure 6A). While miR156, miR160 and miR166 accumulate at early stages, miR164 and miR394 are first reduced and further increase their levels upon leaf differentiation. We could not find the expected negative correlation between miR394 and its F-Box/LCR target possibly due to restricted spatial regulation as previously described (Figure 6B; [42]). For miR164 and CUC2 we found similar pattern, suggesting that the miRNA acts as a feedback loop to control the accumulation of its target in response to developmental switches. Also, while opposite correlation is expected between miRNA and target accumulation, due to preferential degradation promotion in plants [55], some reports have indicated no correlation for particular miRNA targets and additional regulation at the translational level, depending on the target [56].

Interestingly, all miRNA targets showed strikingly higher levels in the EC, whereas the WUS transcript was equally present in both EC and Y-NEC and at higher levels than in differentiated tissues (IE and during plant regeneration). This is in agreement with the previously reported miRNA abundance in established Tuxpeño VS-535 in vitro cultured calli [22], but also reveals important molecular differences between the two classes of proliferating tissues (EC and Y-NEC). As shown in Figure 6B, we propose that only the EC maintains the program of pluripotency using a battery of miRNAs and transcription factors able to operate within the nodes for SAM initiation and further root development in response to hormone depletion and light. During the first stage of plant regeneration a decrease of most targets was observed probably due to miRNA relocation as mobile signals to determine regenerative spots (Figure 6A). Particularly, the levels of CUC-2, RLD-1 and F-Box/LCR sharply decreased during plant regeneration, as expected from their spatial restriction within the emerging SAM. In turn, miR166 levels boosted at the 2nd developmental stage and further in the regenerated plantlet corresponding to its role in RLD1 regulation during leaf development. Also, miR160 displayed the highest levels at the 2nd stage coincident with the lowest ARF17 and ARF19 levels. ARF17 has been described as negative regulator of adventitious roots and its down-regulation by light and miR160 precedes root appearance [57]. At the 3rd stage, and in the fully regenerated plantlet, miR160 accumulation decreased and ARF19 increased, supporting its distinct role during root formation. The expression pattern of these ARFs was similar to what reported for *Arabidopsis* SE [58] and maize zygotic embryogenesis [59]. However, further work is needed to dissect their role in the regeneration process.

According to our results and the model depicted in Figure 6, the VS-535 staggered plant regeneration process occurs in a basipetal way with miRNA-target most significant expression switches taking place at the 2nd and 3rd stages, in the absence of external hormones. It has been suggested

that during the embryonic patterning in *Arabidopsis*, aerial structures are more dependent on miRNA production since mutants in *dicer-like 1 (dcl1)* affected in all miRNA production display more striking phenotypes for SAM [17]. Hence, early miRNA function detected primarily for EC tissues prevents the over-accumulation of transcripts encoding differentiation-promoting factors [14]. Particularly, miR156-mediated repression of SPLs is required to avoid precocious expression of maturation phase genes, when active cell division program is still operating. At the same time, miR166/HD-ZIP III pathway acts in parallel to repress the embryonic maturation programme [16]. Although more targets for these miRNAs should be analyzed in the future, the behavior of SBP23 and RLD1 nicely support their role in key state of differentiation for VS-535 SE program, including shoot regeneration, leaf and root development.

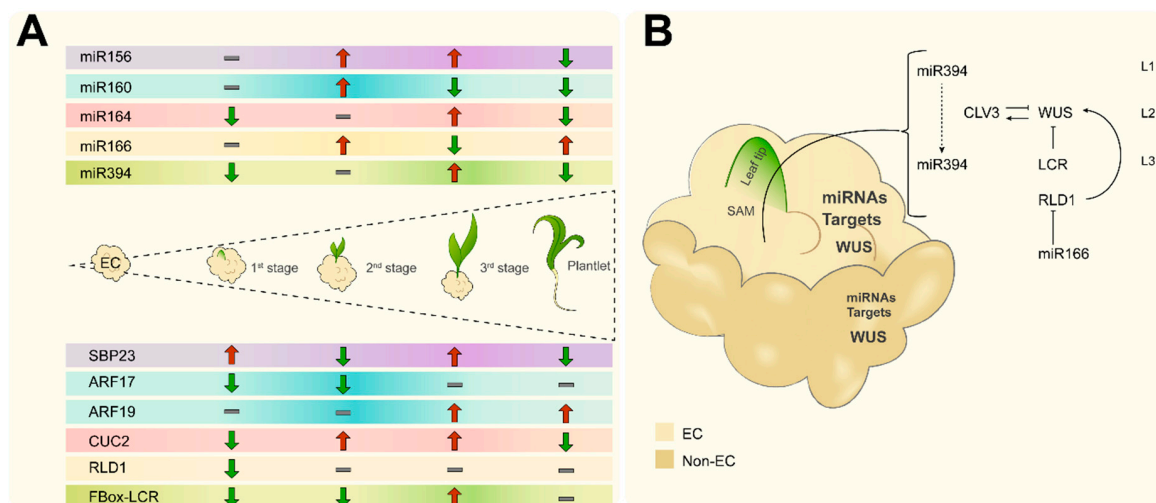


Figure 6. Proposed model for miRNA-target action during in vitro maize VS-535 Tuxpeño plant regeneration. (A) Maize VS-535 in vitro plant regeneration occurs in a basipetal way with the most noteworthy miRNA-target accumulation switches taking place at the 2nd and 3rd stages of regeneration. Opposite patterns between miRNA and targets are observed at these stages. (B) Distinctive miRNA-target accumulation between EC and Y-NEC (greater accumulation corresponds to bigger letter size) underlies the ability to develop regenerative structures under the appropriate stimulus. A highlighted node corresponds to miR394, which is proposed to relocate and negatively regulate LCR resulting in WUS spatial restriction and stem cell identity acquisition in SAM upon the regeneration stimulus. Likewise, miR166 participates as mobile signal for proper SAM maintenance and spatially restricts the localization of HD-ZIP III transcription factors at the shoot apex to establish polarity in the emerging leaf. Cell layers (L1–L3) and additional WUS regulation by CLAVATA (CLV3) are depicted according to the literature [42,43].

4. Material and Methods

4.1. Callus Induction and Subculture

Immature embryos from cultivar VS-535 were collected at 15–18 days after pollination of greenhouse-cultured plants. The ears were divided in portions of 6–8 cm, washed in sequential order with 70% ethanol, chlorine solution, and sterile deionized water. The embryos were carefully excised from each portion and placed in a solution of 0.25 g L⁻¹ cefotaxime. Callus induction was performed on callus induction medium containing 2 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as described previously [60]. Induced calli were subcultured on proliferation medium N6P, which included 0.3 mg L⁻¹ 6-BA in addition to 2,4-D. Details for medium compositions are available in (Supplementary Materials Table S1) Different calli types were identified and separated during the subsequent subcultures [60].

4.2. Plant Regeneration

Plant regeneration was carried out at different time points of callus subcultures. The procedure consisted of three culture medium changes under a light photoperiod (16 h light/8 h dark). Details for the method can be found in [60]. Briefly, the first change consisted of callus placement on N6P medium with half-reduction in hormone concentration (1 mg L^{-1} 2,4-D; 0.15 mg L^{-1} 6-BA). After two weeks, the calli were subcultured on N6P medium without hormones for two weeks (second change). For the third change, the regenerative structures were subcultured on Murashige and Skoog (MS) medium every two weeks until the formation of whole plantlets. The regeneration process was conducted in four different biological replicates to verify the morphology reproducibility for differentiation stages.

4.3. Morphological Characterization

The observations were made under a stereomicroscope (Olympus DF Plapo, Tokyo, Japan). Images were taken using a digital camera (Olympus U-cmad3, Miami, FL, USA) and edited with the Image-Pro Plus Software (Rockville, MD, USA). Callus induction was observed every week during a month, whereas the different types of calli and EC-derived tissues in plant regeneration were observed every two weeks to register the morphological changes taking place during differentiation.

4.4. Scanning Electron Microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), samples from immature embryo (IE), IE on N6I medium upon seven days, callus types subcultured for 8 and 12 months and selected developmental stages during plant regeneration were fixed with FAA (10% formaldehyde, 5% acetic acid, 50% alcohol) for 24 h at room temperature. The tissue was washed three times in distilled water and dehydrated in a graded ethanol series (10, 30, 50, 70, 90 and 100%) for 24 h. The samples were dried by critical point drying with liquid carbon dioxide. Finally, the tissues were coated with gold for 2 min in a coater (Q150RES, Quorum, East Sussex, UK). The prepared samples were examined and photographed in a Hitachi SUI510 scanning electron microscope (Tokyo, Japan) operating at 10–15 kV.

4.5. Histological Analysis

For light microscopy, samples corresponding to different callus types and developmental stages through plant regeneration from two independent subculture times, were fixed on HistoChoice Tissue Fixative (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions, dehydrated for 24 h through a graded series of ethanol at room temperature and embedded in paraplast at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, for 24 h. Longitudinal sections ($10 \text{ }\mu\text{m}$) were cut and stained in safranin-fast green [61], the photos were taken with a Motic BA210 trinocular compound microscope and edited with Motic Images Plus 2.0 Software (Motic, Wetzlar, Germany) and Jasc Paint Shop Pro (Jasc Software, Minneapolis, MN, USA).

4.6. RNA Isolation

RNA was isolated from immature embryo, EC, NEC and the four plant regeneration developmental stages in at least triplicate biological samples. Tissues used for all molecular analyses and the corresponding letter designations conserved throughout all figures are available in (Supplementary information Figure S4). RNA sized fractionation and clean-up were performed according to [60]. For the different plant regeneration developmental stages, callus surrounding regenerative tissues was kept at minimal. The RNA quality and concentration were determined using the NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.7. qRT-PCR

For large RNAs, reverse transcription (RT) was performed using an oligo (dT) primer and the ImProm-II™ reverse transcription system (Promega, Madison WI, USA). Specific primers for each

miRNA target were designed using Primer-BLAST optimized for real-time PCR (qPCR) and the amplification products were attempted to include the predicted miRNA-directed cleavage site. For small RNAs, the stem-loop RT and forward primers were designed according to [62]. All oligonucleotide sequences used in this study are available in (Supplementary Materials Table S2).

Pulsed stem-loop RT was performed for all miRNAs and the U6 snRNA as control in duplicate reactions [60]. Measurements by qPCR were performed Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix in a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Abundances were expressed as “fold change” using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [63], considering the EC tissue as reference and rRNA 18S or U6 snRNA as internal housekeeping controls, respectively. Results were averaged for the biological and technical replicates (6–12 independent measurements). Statistical analyses were performed using one-way ANOVA method.

5. Conclusions

Different calli types with contrasting morphology, molecular features and regenerative potential were identified upon maize VS-535 dedifferentiation induced from 15 DAP-immature embryos. The embryogenic callus showed significantly higher levels of development-related miRNAs and their targets, whereas WUS2 levels were similar in embryogenic and non-embryogenic tissues. During plant regeneration, the function of miR156, miR160 and miR166 regulatory nodes correlated with early de novo SAM formation and reproducibly preceded root appearance. Furthermore, miR164 and miR394 transiently increased their levels during leaf development. According to this, we conclude that the initial miRNA and target levels in the callus underlie its regenerative potential and guide its ability to promote shoot appearance during plant regeneration from maize VS-535 in vitro cultures.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2079/s1>. Figure S1. Number of regenerative spots per gram of calli. Figure S2. Histological analysis of developmental stages during Tuxpeño VS-535 plant regeneration from EC. Figure S3. Gene regulatory network for miRNA-targeted transcription factors (TF) analyzed during in vitro maize plant regeneration. Figure S4. Tissues used for the molecular analysis. Table S1. Medium composition. Table S2. Primers used in this study.

Author Contributions: Conceptualization, B.A.L.-R., V.T.J.-G. and T.D.D.; Methodology, B.A.L.-R.; E.S.-Z.; Formal Analysis, B.A.L.-R., V.T.J.-G., E.S.-Z., T.D.D.; Investigation, B.A.L.-R., V.T.J.-G. and T.D.D.; Writing—Original Draft Preparation, B.A.L.-R.; Writing—Review & Editing, T.D.D.; Visualization, B.A.L.-R., V.T.J.-G.; Supervision, T.D.D.; Project Administration, T.D.D.; Funding Acquisition, T.D.D. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This research was funded by Universidad Nacional Autónoma de México PAPIIT IN211215 and IN214118, PAIP 5000-9118 and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 238439.

Acknowledgments: The authors acknowledge M.Sc. Ma. Teresa de J. Olivera-Flores and M.Sc Araceli Arandal for technical support and advice provided regarding maize in vitro culture. We deeply thank to M.Sc María Berenit Mendoza Garfías for microscopy assistance. We also appreciate the use of core facilities at Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), as well as support from Dra. Karina Jiménez-Durán and Biol. Jorge Herrera-Díaz.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sugimoto, K.; Gordon, S.P.; Meyerowitz, E.M. Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 212–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Verdeil, J.L.; Alemanno, L.; Niemenak, N.; Tranbarger, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 245–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Duclercq, J.; Assoumou Ndong, Y.P.; Guerineau, F.; Sangwan, R.S.; Catterou, M. Arabidopsis shoot organogenesis is enhanced by an amino acid change in the ATHB15 transcription factor. *Plant Biol.* **2011**, *13*, 317–324. [[CrossRef](#)]
4. Green, C.E.; Phillips, R.L. Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize. *Crop Sci.* **1975**, *15*, 417–421. [[CrossRef](#)]
5. Lu, C.; Vasil, I.K.; Ozias-Akins, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* **1982**, *62*, 109–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Welter, M.E.; Clayton, D.S.; Miller, M.A.; E Petolino, J. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. *Plant Cell Rep.* **1995**, *14*, 725–729. [[PubMed](#)]
7. Marín-Méndez, W.; Sanchéz-Chacón, E.; Gatica-Arias, A.M.; Ramírez-Fonseca, P.; Freer-Bustamante, E.; Valdez-Melara, M. Ultrastructure and histology of organogenesis induced from shoot tips of maize (*Zea mays*, Poaceae). *Rev. Biol. Trop.* **2009**, *57*, 129–139.
8. Rakshit, S.; Rashid, Z.; Sekhar, J.C.; Fatma, T.; Dass, S. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2009**, *100*, 31–37. [[CrossRef](#)]
9. Shen, Y.; Jiang, Z.; Yao, X.; Zhang, Z.; Lin, H.; Zhao, M.; Liu, H.; Peng, H.; Li, S.; Pan, G. Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Márquez-Sánchez, F. De las variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) a los híbridos transgénicos. I: Recolección de germoplasma y variedades mejoradas. *Agríc. Soc. y Desarro.* **2008**, *5*, 151–166.
11. Garrocho-Villegas, V.; de Jesús-Olivera, M.T.; Quintanar, E.S. Maize somatic embryogenesis: Recent features to improve plant regeneration. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; pp. 173–182. ISBN 9781617798.
12. González, G.A.; Pacheco, M.G.; Oneto, C.D.; Etchart, V.J.; Kandus, M.V.; Salerno, J.C.; Eyherabide, G.; Presello, D.; Lewi, D.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electron. J. Biotechnol.* **2012**, *15*, 9.
13. Meng, L.; Zhang, S.; Lemaux, P.G. Toward molecular understanding of in vitro and in planta shoot organogenesis. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **2010**, *29*, 108–122. [[CrossRef](#)]
14. Vashisht, D.; Nodine, M.D. MicroRNA functions in plant embryos: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 352–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Singh, A.; Gautam, V.; Singh, S.; Sarkar Das, S.; Verma, S.; Mishra, V.; Mukherjee, S.; Sarkar, A.K. Plant small RNAs: Advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* **2018**, *248*, 545–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nodine, M.D.; Bartel, D.P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2678–2692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Seefried, W.F.; Willmann, M.R.; Clausen, R.L.; Jenik, P.D. Global Regulation of Embryonic Patterning in Arabidopsis by MicroRNAs. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 670–687. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, T.-Q.; Lian, H.; Tang, H.; Dolezal, K.; Zhou, C.-M.; Yu, S.; Chen, J.-H.; Chen, Q.; Liu, H.; Ljung, K.; et al. An Intrinsic MicroRNA Timer Regulates Progressive Decline in Shoot Regenerative Capacity in Plants. *Plant Cell Online* **2015**, *27*, 349–360. [[CrossRef](#)]
19. Szyrajew, K.; Bielewicz, D.; Dolata, J.; Wójcik, A.M.; Nowak, K.; Szczygieł-Sommer, A.; Szweykowska-Kulinska, Z.; Jarmolowski, A.; Gaj, M.D. MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chen, C.J.; Liu, Q.; Zhang, Y.C.; Qu, L.H.; Chen, Y.Q.; Gautheret, D. Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 538–547. [[CrossRef](#)]
21. Chu, Z.; Chen, J.; Xu, H.; Dong, Z.; Chen, F.; Cui, D. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during In vitro culture. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Alejandri-Ramírez, N.D.; Chávez-Hernández, E.C.; Contreras-Guerra, J.L.; Reyes, J.L.; Dinkova, T.D. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *122*, 78–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chávez-Hernández, E.C.; Alejandri-Ramírez, N.D.; Juárez-González, V.T.; Dinkova, T.D. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhou, G.K.; Kubo, M.; Zhong, R.; Demura, T.; Ye, Z.H. Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **2007**, *48*, 391–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tian, X.; Zhang, C.; Xu, J. Control of Cell Fate Reprogramming Towards de Novo Shoot Organogenesis. *Plant Cell Physiol.* **2018**, *59*, 713–719. [[CrossRef](#)]

26. Qiao, M.; Zhao, Z.; Song, Y.; Liu, Z.; Cao, L.; Yu, Y.; Li, S.; Xiang, F. Proper regeneration from in vitro cultured *Arabidopsis thaliana* requires the microRNA-directed action of an auxin response factor. *Plant J.* **2012**, *71*, 14–22. [[CrossRef](#)]
27. Armstrong, C.L.; Green, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **1985**, *164*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Liu, B.; Su, S.; Wu, Y.; Li, Y.; Shan, X.; Li, S.; Liu, H.; Dong, H.; Ding, M.; Han, J.; et al. Histological and transcript analyses of intact somatic embryos in an elite maize (*Zea mays* L.) inbred line Y423. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *15*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Shen, Y.; Jiang, Z.; Lu, S.; Lin, H.; Gao, S.; Peng, H.; Yuan, G.; Liu, L.; Zhang, Z.; Zhao, M.; et al. Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *44*, 425–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Liu, H.; Qin, C.; Chen, Z.; Zuo, T.; Yang, X.; Zhou, H.; Xu, M.; Cao, S.; Shen, Y.; Lin, H.; et al. Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 25. [[CrossRef](#)]
31. Huang, J.; Zheng, J.; Yuan, H.; McGinnis, C. Distinct tissue-specific transcriptional regulation revealed by gene regulatory networks in maize. *BMC Plant Biology* **2018**, *18*, 111. [[CrossRef](#)]
32. Conger, B.V.; Novak, F.J.; Afza, R.; Erdelsky, K. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Rep.* **1987**, *6*, 345–347. [[CrossRef](#)]
33. Emons, A.M.C.; Kieft, H. Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.). In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1995; p. 444. ISBN 978-3-642-78643-3.
34. Anami, S.E.; Mgtutu, A.J.; Taracha, C.; Coussens, G.; Karimi, M.; Hilson, P.; Van Lijsebettens, M.; Machuka, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2010**, *102*, 285–295. [[CrossRef](#)]
35. Garrocho-Villegas, V.; Aguilar, R.; de Jiménez, E.S. Contribution of the *Zea mays* insulin-like growth factor (ZmIGF) to the embryogenic competence of maize tissue cultures. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* **2017**, *53*, 122–132. [[CrossRef](#)]
36. Sun, L.; Wu, Y.; Su, S.; Liu, H.; Yang, G.; Li, S.; Shan, X.; Yuan, Y. Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays* L.) inbred line H99. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2012**, *109*, 271–286. [[CrossRef](#)]
37. Sun, L.; Wu, Y.; Zou, H.; Su, S.; Li, S.; Shan, X.; Xi, J.; Yuan, Y. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2013**, *113*, 103–119. [[CrossRef](#)]
38. Varhaníková, M.; Uvackova, L.; Skultety, L.; Pretova, A.; Obert, B.; Hajduch, M. Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *J. Proteomics* **2014**, *104*, 57–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lowe, K.; La Rota, M.; Hoerster, G.; Hastings, C.; Wang, N.; Chamberlin, M.; Wu, E.; Jones, T.; Gordon-Kamm, W. Rapid genotype “independent” *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* **2018**, *28*, 1998–2015. [[CrossRef](#)]
40. Su, Y.H.; Zhang, X.S. Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. *Plant Signal. Behav.* **2009**, *4*, 574–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wang, C.Y.; Chen, Y.Q.; Liu, Q. Sculpting the meristem: The roles of miRNAs in plant stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *17*, 2204–2216. [[CrossRef](#)]
42. Knauer, S.; Holt, A.L.; Rubio-Somoza, I.; Tucker, E.J.; Hinze, A.; Pisch, M.; Javelle, M.; Timmermans, M.C.; Tucker, M.R.; Laux, T. A Protodermal miR394 Signal Defines a Region of Stem Cell Competence in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Dev. Cell* **2013**, *24*, 125–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhang, T.-Q.; Lian, H.; Zhou, C.-M.; Xu, L.; Jiao, Y.; Wang, J.-W. A Two-Step Model for de Novo Activation of *WUSCHEL* during Plant Shoot Regeneration. *Plant Cell* **2017**, *29*, 1073–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chuck, G.; Whipple, C.; Jackson, D.; Hake, S. The maize SBP-box transcription factor encoded by tasselsheath4 regulates bract development and the establishment of meristem boundaries. *Development* **2010**, *137*, 1243–1250. [[CrossRef](#)]
45. Mao, H.D.; Yu, L.J.; Li, Z.J.; Yan, Y.; Han, R.; Liu, H.; Ma, M. Genome-wide analysis of the SPL family transcription factors and their responses to abiotic stresses in maize. *Plant Gene* **2016**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)]

46. Long, J.M.; Liu, C.Y.; Feng, M.Q.; Liu, Y.; Wu, X.M.; Guo, W.W. MiR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 2979–2993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Laufs, P. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **2004**, *131*, 4311–4322. [[CrossRef](#)]
48. Ikeda, M.; Ohme-Takagi, M. TCPs, WUSs, and WINDs: Families of transcription factors that regulate shoot meristem formation, stem cell maintenance, and somatic cell differentiation. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Meng, W.; Cheng, Z.J.; Sang, Y.L.; Zhang, M.M.; Rong, X.F.; Wang, Z.W.; Tang, Y.Y.; Zhang, X.S. Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Is Critical to the Specification of Shoot Stem Cell Niche by Dual Regulation of WUSCHEL. *Plant Cell* **2017**, *29*, 1357–1372. [[CrossRef](#)]
50. Lowe, K.; Wu, E.; Wang, N.; Hoerster, G.; Hastings, C.; Cho, M.-J.; Scelonge, C.; Lenderts, B.; Chamberlin, M.; Cushatt, J.; et al. Morphogenic Regulators Baby boom and Wuschel Improve Monocot Transformation. *Plant Cell* **2016**, *28*, 1998–2015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Sultana, M.; Gangopadhyay, G. Early expression of WUSCHEL is a marker for in vitro shoot morphogenesis in tobacco and Beta palonga. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2018**, *134*, 277–288. [[CrossRef](#)]
52. Nogueira, F.T.S.; Chitwood, D.H.; Madi, S.; Ohtsu, K.; Schnable, P.S.; Scanlon, M.J.; Timmermans, M.C.P. Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Carlsbecker, A.; Lee, J.Y.; Roberts, C.J.; Dettmer, J.; Lehesranta, S.; Zhou, J.; Lindgren, O.; Moreno-Risueno, M.A.; Vatén, A.; Thitamadee, S.; et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **2010**, *465*, 316–321. [[CrossRef](#)]
54. Wang, J.-W. Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **2005**, *409*, 363–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jones-Rhoades, M.W.; Bartel, D.P. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell.* **2004**, *14*, 787–799. [[CrossRef](#)]
56. Brodersen, P.; Sakvarelidze-Achard, L.; Bruun-Rasmussen, M.; Dunoyer, P.; Yamamoto, Y.Y.; Sieburth, L.; Voinnet, O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **2008**, *320*, 1185–1190. [[CrossRef](#)]
57. Gutierrez, L.; Bussell, J.D.; Pacurar, D.I.; Schwambach, J.; Pacurar, M.; Bellini, C. Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *Plant Cell* **2009**, *21*, 3119–3132. [[CrossRef](#)]
58. Wójcikowska, B.; Gaj, M.D. Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* **2017**, *36*, 843–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sekhon, R.S.; Lin, H.; Childs, K.L.; Hansey, C.N.; Robin Buell, C.; De Leon, N.; Kaeppeler, S.M. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* **2011**, *66*, 553–563. [[CrossRef](#)]
60. López-Ruiz, B.A.; Juárez-González, V.T.; Chávez-Hernández, E.C.; Dinkova, T.D. MicroRNA Expression and Regulation During Maize Somatic Embryogenesis. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: New York, NY, USA, 2018; pp. 397–410. ISBN 9781493985944.
61. Sandoval, E. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*; UNAM Instituto de Biología: D.F., México, 2005; p. 278. ISBN 9789703231317.
62. Chen, C.; Ridzon, D.A.; Broomer, A.J.; Zhou, Z.; Lee, D.H.; Nguyen, J.T.; Barbisin, M.; Xu, N.L.; Mahuvakar, V.R.; Andersen, M.R.; et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *8*, 538–547. [[CrossRef](#)]
63. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]





MicroRNA Expression and Regulation During Maize Somatic Embryogenesis

Brenda Anabel López-Ruiz, Vasti Thamara Juárez-González, Elva Carolina Chávez-Hernández, and Tzvetanka D. Dinkova

Abstract

MicroRNAs are tiny molecules that strikingly change their expression patterns and distribution during somatic embryogenesis induction and plant regeneration. It is of great relevance to analyze simultaneously the microRNA and target mRNA fates to understand their role in promoting an adequate embryogenic response to external stimulus in the regenerating tissues. Here we describe a method to evaluate the expression patterns of miRNAs or other sRNAs and their target regulation in distinctive tissues observed during maize plant regeneration. Key features of the method include the classification of regenerating plant material with reproducibly distinctive morphological characteristics and a purification procedure that renders high-quality small and large RNA separation from the same sample for qRT-PCR analysis.

Key words In vitro tissue culture, Maize, MicroRNA, Somatic embryogenesis

1 Introduction

MicroRNAs (miRNA) and other small RNAs (sRNA) are important regulators in plant development and stress responses, including the zygotic and somatic embryogenesis processes [1–3]. MicroRNAs are 21–22 nt RNAs derived from longer precursors by Dicer-like (DCL) endonuclease activity and recruited to protein complexes by Argonaute (AGO) to target specific mRNA repression, either through degradation or translation inhibition [4]. Their particular role in somatic embryogenesis (SE) has been highlighted through the regulation of their target mRNAs, including important transcription factors and key proteins for stress and hormone signaling pathways. For maize (*Zea mays* L.), SE is usually induced by the culture of immature embryos at 15–18 days after pollination in the presence of synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in darkness [5]. Plants can be regenerated when somatic embryos are depleted of external hormones and are exposed to a photoperiod. It is important to

discern different stages in plant regeneration and between non-differentiating and differentiating tissues during this process to better understand the role of miRNA-mediated target regulation. There are evidences that sRNAs are mobile elements that can affect neighboring tissues by target regulation [6, 7]. Hence, it is important to follow the expression profile of particular miRNAs along with the physiological response of the differentiating tissues and, more importantly, with the profile of their target mRNAs. In maize, miR528, miR156, miR166, miR168, miR390, miR164, miR167, miR398, miR397, miR408, and miR319 have been reported as important species during SE induction [8]. Recently, we followed the profile of miR156, miR159, miR164, miR168, miR397, miR398, miR408, miR528, and some of their predicted targets (*SBP23*, *GA-MYB*, *CUC2*, *AGO1c*, *LAC2*, *SOD9*, *GRI*, *SODIA*, and *PLC*) in response to hormone depletion and photoperiod during maize plant regeneration through SE [2]. Results from that work demonstrated that hormone depletion exerted a great influence on specific miRNA expression independently of the photoperiod, but their targets were additionally influenced by the presence of photoperiod. Here we provide detailed methods to analyze miRNAs or other sRNAs and their targets in distinctive tissues observed during maize plant regeneration. First, we provide a detailed description of the physiological analysis performed during plant regeneration through maize somatic embryogenesis to distinguish between the callus types used for the sRNA and target analysis. Then we describe a quantitative approach to measure the sRNA abundance in each tissue along with their target analysis using a single purification method that allows separating sRNAs (17–200 nt) and large RNAs (>200 nt).

2 Materials

Prepare all solutions with ultrapure deionized water and analytical grade reagents. Sterilize by autoclaving, and store all stock solutions at room temperature (unless indicated otherwise). Diligently follow all waste disposal regulations when disposing hazardous materials. All reagents are purchased from Sigma-Aldrich, except when indicated.

2.1 *In Vitro* Tissue Culture Media

1. Initiation medium (N6I): N6 salts [9], vitamin cocktail 20 [10], 2 mg L⁻¹ 2,4-D, 10 mg L⁻¹ adenine, 2.76 g L⁻¹ proline, 200 mg L⁻¹ casein hydrolysate, 30 g L⁻¹ sucrose, and 3.3 g L⁻¹ GelzanTM (*see Note 1*).
2. Proliferation medium (N6P): N6 salts [9], vitamin cocktail 20 [10], 2 mg L⁻¹ 2,4-D, 0.1 mg mL⁻¹ 6-furfurylaminopurine (kinetin), 10 mg L⁻¹ adenine, 2.76 g L⁻¹ proline, 200 mg L⁻¹

casein hydrolysate, 30 g L⁻¹ sucrose, and 3.3 g L⁻¹ GelzanTM (*see Note 2*).

3. Murashige and Skoog (MS) medium: Salts and vitamins are prepared as described by Murashige and Skoog [11] with the addition of 30 g L⁻¹ sucrose and 3.3 g L⁻¹ GelzanTM (*see Note 3*).

2.2 Plant Material

1. Immature embryos: We use maize (*Zea mays* L.) cultivar designed as “Tuxpeño VS-535” [12], which has been previously described to present high embryogenic potential [5].
2. 70% ethanol: Prepare with absolute ethanol in sterile water.
3. Chlorine solution: 50% chlorine bleach (commercially available), eight drops of Microdyn (colloidal silver 0.15%), and three drops of Tween 20 or Triton X-100 per 250 mL of solution in sterile water.
4. 0.25 g mL⁻¹ cefotaxime.
5. Scalpel and blade.
6. Tweezers.

2.3 Ribonucleic Acid Isolation and Purification

1. Quick-RNATM MiniPrep (Zymo Research) or TRIzol[®] Reagent (Invitrogen).
2. RNA clean and concentrator TM -5 (Zymo Research).
3. Diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water: incubate deionized water with 0.1% DEPC overnight under agitation, and then autoclave it at 120 °C for 15 min to ensure sterility and DEPC inactivation.
4. Sample loading buffer: 0.1% bromophenol and 0.1% xylene cyanol are dissolved in 100% formamide.
5. Resolving buffer 5x TBE: 54 g of Tris base, 27.5 g of boric acid, and 20 mL of 0.5 M EDTA (pH 8.0) are dissolved in 1 L of H₂O. The pH of the concentrated stock buffer should be ~8.3.
6. 1% agarose—0.5x TBE: 1 g of agarose in 100 mL of 0.5x TBE (100 mL of 5x TBE stock solution and 900 mL of sterile water).
7. Microcentrifuge.
8. Horizontal electrophoresis equipment.

2.4 Small RNA Analysis by qRT-PCR

1. RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (Promega).
2. Reverse transcriptase system ImProm-IITM (Promega).
3. Nuclease-free water.
4. dNTP mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP; 10 mM each) (Invitrogen).

5. Stem-loop RT primer (1 μM).
6. Forward specific small RNA primer (1 μM).
7. Reverse universal primer (1 μM).
8. Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific).
9. A thermal cycler for end-point PCR is used for reverse transcription and initial checking on amplifications. We use the Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific).
10. A real-time PCR equipment. We use the 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific).

2.5 Target mRNA Analysis by qRT-PCR

1. RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega).
2. Reverse transcriptase system ImProm-IITM (Promega).
3. Nuclease-free water.
4. Oligo-dT primer (10 mM).
5. dNTP mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP; 10 mM each) (Invitrogen).
6. Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific).
7. Specific primers for target mRNAs (10 μM).
8. Real-time PCR equipment. We use the 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific).

3 Methods

3.1 Somatic Embryogenesis Induction

1. Collect maize immature ears at 15–18 days upon pollination, and process them immediately (*see Note 4*).
2. Divide each ear in portions of 6–8 cm, wash them for 1 min with 70% ethanol, and rinse with sterile deionized water, then with a chlorine solution for 15 min, and finally three times with sterile deionized water, 5 min each.
3. Carefully excise the embryos from each kernel, and place them in sterile deionized water supplemented with 0.25 g mL⁻¹ cefotaxime.
4. Place 20–30 embryos faced down (meristems down, scutellum up) on N6I medium in Petri dishes (100 mm diameter) for 2 weeks at 25 \pm 2 °C in darkness.
5. Upon 2 weeks on N6I medium, callus induction should be observed on all embryos. Take with the tweezers the whole tissue (the callus + the original explant), and place it on N6P

medium in Petri dishes (100× 15 mm) for 2 weeks at 25 ± 2 °C in darkness.

6. After this time, most of the original explant degenerates and can be easily removed from the callus in further subculture.

3.2 Embryogenic Callus Proliferation

1. Upon somatic embryogenesis induction, subculture the generated callus masses on N6P medium in Petri dishes (100 × 15 mm) for 2–3 weeks twice (*see Note 5*).
2. After these subcultures, remove rusty brownish tissues, and perform monthly subcultures of the proliferating embryogenic callus on N6P in Gerber jars (*see Note 6*). During Tuxpeño VS-535 somatic embryogenesis, three distinguishable calli form (1) an embryogenic callus, (2) a yellow non-embryogenic callus, and (3) a white non-embryogenic callus (Fig. 1). While the embryogenic callus is able to regenerate plants, both the yellow and the white non-embryogenic calli are unable to regenerate plants and occasionally form roots through organogenesis.

3.3 Selection of Different Callus Tissues (Fig. 1)

1. Embryogenic callus: upon somatic embryogenesis induction, this callus appears as compact, friable, and translucent tissue and maintains these features during subsequent subculture passages on N6P. In plant regeneration, different regenerative spots appear on its surface and are able to develop into a whole plant.
2. Yellow non-embryogenic callus: upon somatic embryogenesis induction, this callus appears as watery yellowish to brownish tissue which is able to proliferate in subculture passages on N6P. In plant regeneration, this callus is unable to regenerate plants and is prone to oxidation. Occasionally, roots appear on its surface in darkness, but not under a photoperiod.
3. White non-embryogenic callus: upon somatic embryogenesis induction, this callus appears as white, opaque, and compact tissue, which is not friable. In plant regeneration, this callus is unable to regenerate plants, but it could develop aberrant organogenesis of leaves or roots both in darkness and photoperiod.

3.4 Plant Regeneration and Tissue Selection (Fig. 2)

1. Select the subculture time to start plant regeneration (*see Note 7*).
2. Place approximately 1 g of embryogenic callus on N6P medium with 50% hormone (2,4-D and kinetin) concentration in round glass Gerber jars (*see Note 8*). If you wish to assay separately the effect of hormone reduction and the photoperiod, place several (minimum 4) Gerber jars in darkness and several under a photoperiod (16 h light, 8 h darkness). In this first step of regeneration (1 week upon subculture), collect samples (Fig. 2a) and store them at -70 °C until used.

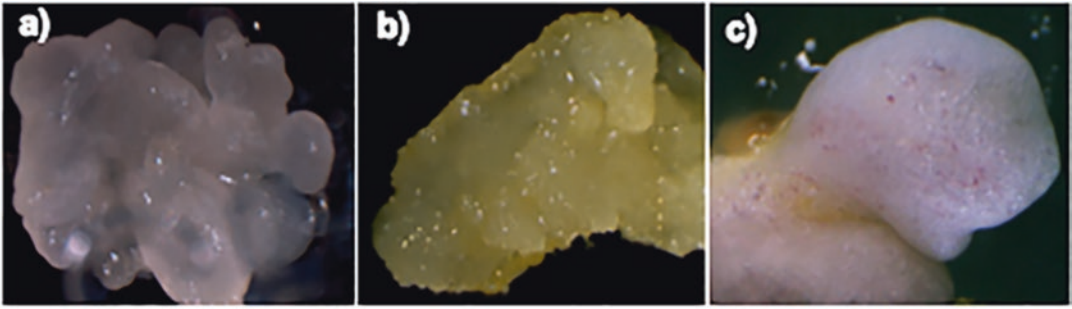


Fig. 1 Different callus types for Tuxpeño VS-535 somatic embryogenesis at N6P subcultures. (a) Translucent embryogenic callus. (b) Yellow non-embryogenic callus. (c) White non-embryogenic callus



Fig. 2 Developmental stages from maize plant regeneration through somatic embryogenesis considered for small RNA analysis. (a), (b) Representative regenerative spots observed in N6P with 50% hormones. (c) Apical growth from a regenerative spot in N6P with 0% hormones. (d) The regenerative spot has developed a differentiated leaf structure still adhered to the callus and without root in MS. (e), (f) Regenerated plantlets showing roots in MS (arrows). (g) Yellow non-embryogenic callus in MS after completing all the regeneration stages. (h) White non-embryogenic callus in MS showing and aberrant regeneration upon completing all stages

3. Two weeks later, subculture the callus on N6P without hormones (2,4-D and kinetin), and keep them under the same conditions (darkness or photoperiod) (*see Note 9*). Collect samples (Fig. 2c) and store them at -70°C until used.
4. Upon 2 weeks, excise any regenerated plantlet keeping the surrounding callus tissue, and place it on MS medium. Collect samples (Fig. 2e) from regenerated plantlet once you observe rooting in the medium (*see Note 10*). Store samples at -70°C .

3.5 Ribonucleic Acid Isolation and Purification

1. Homogenize in liquid nitrogen 100 mg of each sample of different tissues obtained during plant regeneration independently.
2. Isolate total RNA with the Quick-RNATM MiniPrep system (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions, including DNase I treatment (*see Note 11*).

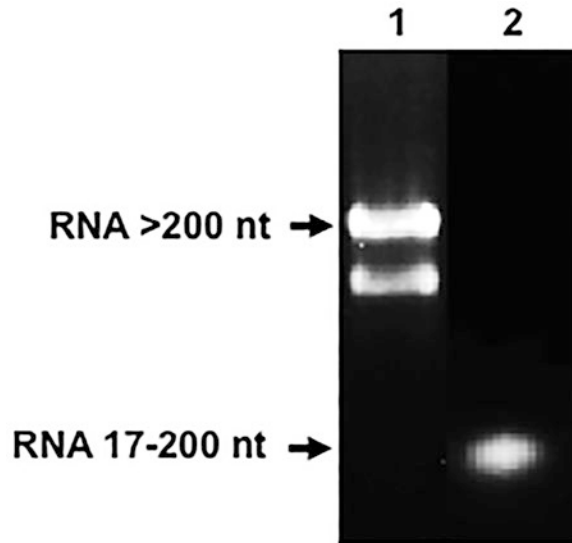


Fig. 3 Evaluation of RNA integrity and separation. Lane 1: Visible 28S and 18S rRNA represent the pool of large RNAs; no contamination of small RNAs is observed. Lane 2: small RNAs appear at the bottom of a 1% agarose gel as a single band; no contamination of 28S and 18S rRNAs is observed

3. The system allows the enrichment of small (17–200 nt) and large RNAs (>200 nt) into separate fractions.
4. Calculate the RNA concentration for each sample by measuring the absorbance at 260 nm in a NanoDrop (ThermoFisher Scientific).
5. Check the RNA quality by electrophoresis on 1% agarose—0.5× TBE gels (Fig. 3). Using ~100 mg of any tissue, the yield is ~600 ng for the large RNA fraction and ~150 ng for the small RNA fraction.
6. If you observe contamination between each kind of RNAs, use the RNA Clean & Concentrator™-5 to separate, in the same way, large and small RNAs, according to the manufacturer's instructions.

3.6 Small RNA Analysis by qRT-PCR

1. Design the stem-loop RT and forward primers for small RNA detection according to Chen et al. [13]. As an example, the sequences for miR390 are indicated in Table 1, and the graphic representation is observed in Fig. 4 (see Note 12).
2. Synthesize the stem-loop, forward specific, and universal reverse primers (Table 1) with the desired provider.
3. Prepare a master mix by scaling the volumes listed below to the desired number of reverse transcription reactions (see Note 13):

Table 1

The design of stem-loop, forward specific, and universal reverse primers in the case of miR390 as an example (see Note 12). Letters in *italics* correspond to the miRNA sequence.

miR390	miRNA sequence	5'- AAG CUC AGG AGG GAU AGC GCC -3'
	miRNA antisense sequence	5'- <i>GGC GCT ATC CCT CCT GAG CTT</i> -3'
	miRNA sense sequence	5'- <i>AAG CTC AGG AGG GAT AGC GCC</i> -3'
	miRNA stem-loop primer [13]	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG <i>GCG CT</i> -3'
	miRNA forward primer	5'- TCT GCG AAG <i>CTC AGG AGG GAT</i> -3'
	Universal reverse primer	5'- GTG CAG GGT CCG AGG TA -3'

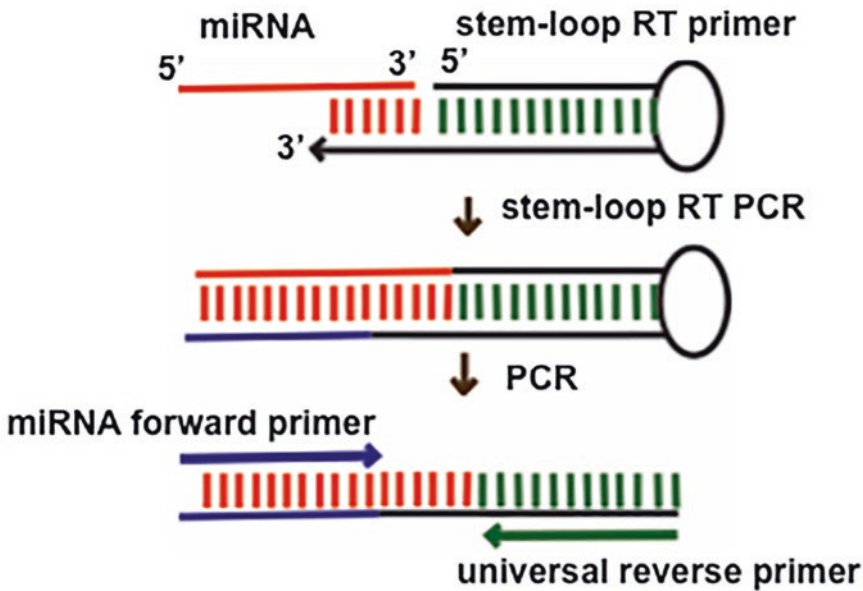


Fig. 4 Designing primers for small RNA qRT-PCR analysis through the stem-loop RT primer [13]. The stem-loop primer is shown in black and specific small RNA sequence in red. The universal reverse primer to be used is shown in green. For sequence details, see Table 1

- (a) 0.75 μL stem-loop RT primer (1 μM) for each small RNA.
 - (b) 0.25 μL U6 snRNA primer (1 μM).
 - (c) 1 μL 10 mM dNTP mix.
 - (d) 9.1 μL nuclease-free water.
4. Distribute 11.1 μL master mixes into PCR tubes, and add 1 μL of small RNAs (250 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$).

5. Incubate the reactions at 65 °C for 5 min and then on ice for 2 min.
6. Centrifuge briefly and add (*see Note 14*):
 - (a) 2.4 μ L MgCl₂ (25 mM; provided with ImProm-IITM).
 - (b) 4 μ L transcriptase buffer ImProm-IITM 5 \times (Promega).
 - (c) 0.5 μ L RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (20 units).
 - (d) 1 μ L ImProm-II[™] Reverse transcriptase.
7. Perform pulsed RT: load the thermal cycler, and incubate at 16 °C for 30 min, followed by pulsed RT of 60 cycles at 30 °C for 30 s, 42 °C for 30 s, and 50 °C for 1 s.
8. Terminate reactions by incubating at 85 °C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase.
9. Prepare Maxima SYBR Green/Rox qPCR 2 \times Master Mix (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instructions. The final reaction volume is 10 μ L. Include 10% overage to cover for pipetting errors.
10. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:
 - (a) 2 μ L nuclease-free water.
 - (b) 5 μ L 2 \times Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix.
 - (c) 1 μ L forward primer (2 μ M).
 - (d) 1 μ L universal reverse primer (2 μ M).
 - (e) 1 μ L RT product.
11. Mix gently and centrifuge.
12. Perform real-time PCR: incubate samples at 95 °C for 5 min, followed by 35–45 cycles of 95 °C for 5 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 1 s (Fig. 5a).
13. For melting curve analysis, denature samples at 95 °C, and then cool to 65 °C at 20 °C per second (Fig. 5b).
14. Collect fluorescence signals at 530 nm wavelength continuously from 65 to 95 °C at 0.2 °C per second [14].
15. Calculate relative abundances using the 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ method [15] (*see Note 15*).

3.7 Small RNA Target Analysis by qRT-PCR

1. Design specific primers for small RNA target sequences to span the predicted cleavage site in the mRNA using Primer3Plus [16].
2. Perform cDNA synthesis with the large RNA (>200 nt) sample, an oligo(dT) primer and the ImProm-II[™] Reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions.
3. Set up the Maxima SYBR Green/Rox qPCR 2 \times Master Mix (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instructions. The final reaction volume is 10 μ L. Include 10% overage

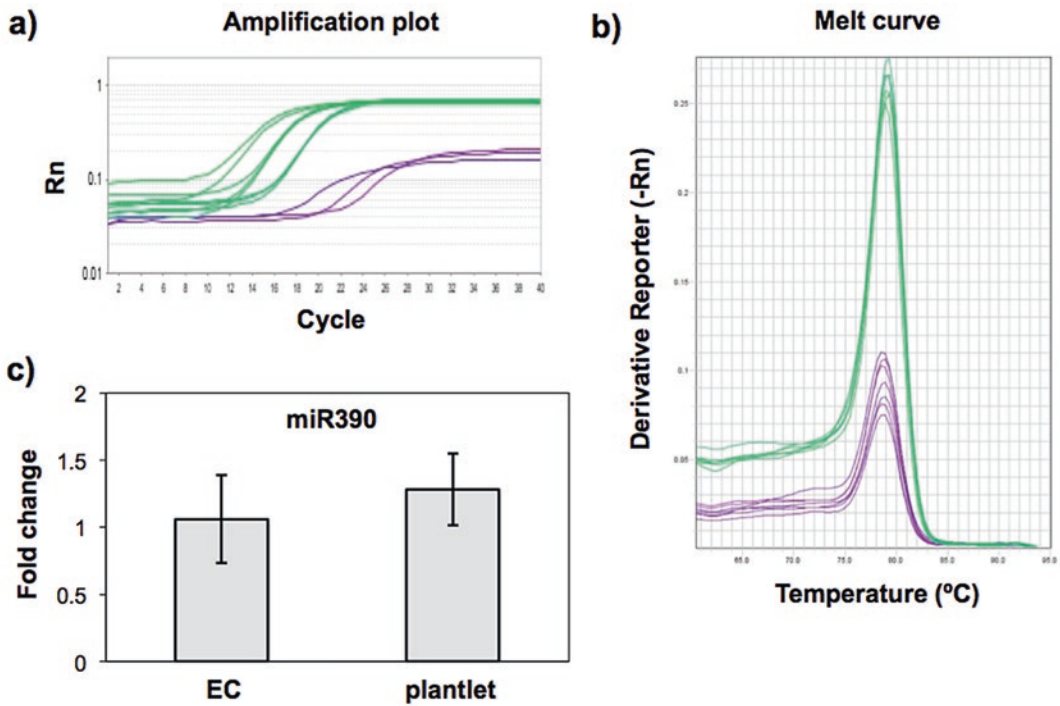


Fig. 5 miR390 analysis by qRT-PCR. (a) Amplification plots for different cDNA concentrations for miR390 (purple) and the housekeeping U6 snRNA (green) used in calibration curves (12.5, 2.5, and 0.5 ng of cDNA). (b) Melting curve for miR390 (purple) and U6 snRNA (green). (c) Fold change of miR390 levels between embryonic callus (EC, 100% hormones and darkness) and fully regenerated plantlet

to cover pipetting errors. Prepare triplicate reactions per sample including triplicate negative control reactions “non-template control,” with nuclease-free water instead of cDNA, for each primer pair.

4. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:
 - (a) 3.6 μL nuclease-free water.
 - (b) 5 μL Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2 \times).
 - (c) 0.2 μL forward primer (10 μM).
 - (d) 0.2 μL reverse primer (10 μM).
 - (e) 1 μL RT product.
5. Mix gently and centrifuge.
6. Perform real-time PCR in a Real-Time PCR System: incubate samples at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s and 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min.
7. Calculate relative abundance using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [16] (see Note 15).

4 Notes

1. Adjust pH at 5.7 before adding Gelzan™, and sterilize at 120 °C for 18 min in an appropriate Erlenmeyer flask (consider an appropriate volume of the flask 3:1 to the medium volume). Cool to 45 °C, and pour approximately 25 mL in Petri dishes (100 × 15 mm) under sterile conditions in a laminar flow hood. Let the medium solidify and keep at 4 °C until use (at most 1 week).
2. Adjust pH at 5.7 before adding Gelzan™, heat the solution to dissolve the Gelzan™, and pour 30 mL in second stage round glass Gerber jars (5.5 cm width × 6.7 cm height). Cover each jar with a polypropylene cap, and sterilize at 120 °C for 18 min. Let the medium solidify and keep at 4 °C until use (at most 1 week).
3. Adjust pH at 5.7 before adding Gelzan™, heat the solution to dissolve the Gelzan™, and pour 30 mL in third stage round glass Gerber jars (5.5 cm width × 9.2 cm height). Cover each jar with a polypropylene cap and sterilize at 120 °C for 18 min. Let the medium solidify and keep at 4 °C until use (at most 1 week).
4. Manual pollination is recommended to ensure the age of immature embryos in the maize ears. Collect immature maize ears early in the morning, and remove the leaves and stigmas for processing.
5. Upon induction, the three first subcultures on N6P medium are of utmost importance to produce healthy embryogenic callus. It is crucial to perform as less as possible tissue manipulation. Take with tweezers the tissue generated on the scutellum of the embryo, and carefully place it at the center of fresh N6P medium Petri dish. Repeat this process with all embryos until forming a central tissue heap. It is important to position the tissue in the same orientation as it was on the previous subculture.
6. During callus subcultures, take preferentially the embryogenic callus, distinctive by its features. However, it is not recommended to completely remove the yellow non-embryogenic callus, which is tightly interconnected with embryogenic tissues. Always remove the white non-embryogenic callus that could be easily separated from the rest of tissues.
7. All callus types are easily distinguished at the 6–8 months of subcultures, and there should be enough material for plant regeneration and RNA analysis.
8. The step of hormone concentration reduction in half (50%) could be avoided. However, we recommend its inclusion if

small RNAs are under analysis, since there is an important influence of hormone concentration on their levels [2]. At this point, separate embryogenic and non-embryogenic callus if you wish to analyze them independently. Each embryogenic callus portion measures approximately 1 cm and should be separated from another one by at least 0.5 cm. During the first week with hormone reduction, locate periodically (every 2–3 days) regenerating spots (Fig. 2a). In order to facilitate tissue separation, observe the callus with stereoscopic microscope.

9. During the subculture in hormone-free medium (N6P without 2,4-D and kinetin), you can notice that most structures acquire a leaf shape without the appearance of roots (Fig. 2c). Keep the callus together with the regenerative tissue, separating the rest of the surrounding callus (at this step callus is easily friable with the minimum effort). If you observe the appearance of roots before the leaf, keep in mind that this tissue will not complete the regeneration of a plantlet.
10. Upon 2 weeks of subculture in the absence of 2,4-D and kinetin (N6P, 0% hormones), place the regenerating callus on MS without hormones. The regeneration process takes about 42 days and is considered completed once both leaves and roots have differentiated (Fig. 2e, f).
11. As alternative, it is possible to use the Trizol Reagent (Invitrogen, USA) to isolate total RNA and then use the RNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research) to separate, in the same way, large and small RNAs, according to the manufacturer's instructions.
12. The specificity of stem-loop RT primers to small RNAs is given by six nucleotides extension at the 3' end of the standard stem loop [13, 17]. This extension is a reverse complement of the last six nucleotides at the 3' end of the small RNA. Forward primers are specific to the small RNA sequence but exclude the last six nucleotides at the 3' end of the small RNA. A 5' extension of 5–7 nucleotides is added to each forward primer to increase the melting temperature (~60 °C). These sequences are chosen randomly and are CG-rich. The use of primer design software is recommended to assess the quality of forward primers [14]. The universal reverse primer is derived from the stem-loop sequence [13] and is common to all designed stem-loop RT primers with this method (Fig. 4).
13. You can use up to four different stem-loop RT primers and the U6 snRNA stem-loop primer for normalization (Table 2). Setting up the reverse transcription in this way will allow using

Table 2**Primers for normalization of sRNA, U6 snRNA [17], and targets, 18S, in the qRT-PCR**

U6 snRNA	Primer stem loop	5'- GTG CAG GGT CCG AGG TTT TGG ACC ATT TCT CGA T -3'
	Forward primer	5'- GGA ACG ATA CAG AGA AGA TTA GCA -3'
	Reverse universal primer	5'- GTG CAG GGT CCG AGG T -3'
18S	Forward primer	5'- TCC TAT TGT TGG CCT TCG G -3'
	Reverse primer	5'- TCC TTG GCA AAT GCT TTC GC -3'

the same cDNA for quantification of several small RNAs and the U6 snRNA [18].

14. The final volume for the reverse transcription reaction is 20 μ L. It is recommended to include 10% overage to cover for pipetting errors. Include control reactions with “no RNA” and “no reverse transcriptase.”
15. To use the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, perform calibration reactions with different cDNA concentrations, and evaluate the qPCR efficiency of your primers [16]. An efficiency of around 100% implies that the change of one cycle in the threshold (C_t) corresponds to twofold change in the template (miRNA or target). Normalize the miRNA levels with U6 snRNA and the target levels with rRNA 18S as internal housekeeping controls. Then compare the levels for each tissue to that found in the starting sample (100% hormones, darkness). Express the results as fold change with respect to the starting sample (Fig. 5c).

Acknowledgment

Research performed in Dr. Dinkova's lab is supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 238439, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, IN211215, IN214118, and PAIP 5000-9118. The authors appreciate the technical assistance provided by Maria Teresa de Jesús Olivera Flores during in vitro plant tissue culture.

References

- Nodine MD, Bartel DP (2010) MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev* 24:2678–2692. <https://doi.org/10.1101/gad.1986710>
- Chávez-Hernández C, Alejandri-Ramírez NA, Juárez-González VT, Dinkova TD (2015) Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front Plant Sci* 6:555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00555>
- Szyrajew K, Bielewicz D, Dolata J et al (2017) MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 8:18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00018>
- Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant MicroRNAs. *Plant Cell* 25:2383–2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Garrocho-Villegas V, de Jesús-Olivera MT, Quintanar ES (2012) Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant cell culture protocols, methods in molecular biology*, vol 877. Springer, Heidelberg, pp 173–182. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_14
- Hisanaga T, Miyashima S, Nakajim K (2014) Small RNAs as positional signal for pattern formation. *Curr Opin Plant Biol* 21:37–42. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.06.005>
- Pyott D, Molnar A (2015) Going mobile: non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnol J* 13:306–318. <https://doi.org/10.1111/pbi.12353>
- Shen Y, Jiang Z, Lu S, Lin H et al (2013) Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 441:425–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.113>
- Chu C-C, Wang C-C, Sun C-S, Hsu C, Yin K-C, Chu C-Y, Bi F-Y (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *J Sci China Math* 18:659–668
- Loza-Rubio E, Rojas E, Gómez L et al (2008) Development of an edible rabies vaccine in maize using Vnukovo strain. In: Dodet B, Fooks AR, Müller T, Tordo N, Scientific and Technical Department of the OIE (eds) *Towards the elimination of rabies in Eurasia. Developments in Biologicals*, vol 131. Karger, Basel, pp 477–482
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- INIFAP (2010) *Reporte Anual 2009 Ciencia y Tecnología para el Campo Mexicano*, 1st edn. México DF
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ et al (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M et al (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Meth* 3:12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35:W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Turner T, Adhikari S, Subramanian S (2013) Optimizing stem-loop qPCR assays through multiplexed cDNA synthesis of U6 and miRNAs. *Plant Signal Behav* 8(8):e24918. <https://doi.org/10.4161/psb.24918>
- Romero-Pérez PS (2015) Análisis de microRNAs específicos de leguminosas de respuesta a déficit hídrico en *Medicago truncatula*. Master Thesis Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México

Raúl Alvarez-Venegas
Clelia De-la-Peña
Juan Armando Casas-Mollano *Editors*

Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications

Transcriptional Regulation and
Chromatin Remodelling in Plants

Second Edition

 Springer

Raúl Alvarez-Venegas • Clelia De-la-Peña
Juan Armando Casas-Mollano
Editors

Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications

Transcriptional Regulation and Chromatin
Remodelling in Plants

Second Edition

 Springer

Editors

Raúl Alvarez-Venegas
Departamento de Ingeniería Genética
Centre for Research and Advanced Studies
CINVESTAV
Irapuato, Guanajuato, Mexico

Clelia De-la-Peña
Centro de Investigación Científica de
Yucatán
Mérida, Yucatán, Mexico

Juan Armando Casas-Mollano
School of Biological Sciences
and Engineering
Universidad Yachay Tech
San Miguel de Urucuquí, Ecuador

ISBN 978-3-030-14759-4 ISBN 978-3-030-14760-0 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-14760-0>

© Springer Nature Switzerland AG 2014, 2019

This work is subject to copyright. All rights are reserved by the Publisher, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilms or in any other physical way, and transmission or information storage and retrieval, electronic adaptation, computer software, or by similar or dissimilar methodology now known or hereafter developed.

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, service marks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

The publisher, the authors, and the editors are safe to assume that the advice and information in this book are believed to be true and accurate at the date of publication. Neither the publisher nor the authors or the editors give a warranty, express or implied, with respect to the material contained herein or for any errors or omissions that may have been made. The publisher remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This Springer imprint is published by the registered company Springer Nature Switzerland AG.
The registered company address is: Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland

Contents

1 Epigenetic Mechanisms of Abiotic Stress Response and Memory in Plants	1
Iva Mozgova, Pawel Mikulski, Ales Pecinka, and Sara Farrona	
2 Plant Epigenetic Mechanisms in Response to Biotic Stress	65
Michael R. Roberts and Ana López Sánchez	
3 The Role of Germinally Inherited Epialleles in Plant Breeding: An Update	115
Megan House and Lewis Lukens	
4 Epigenetics and Heterosis in Crop Plants	129
Peter Ryder, Peter C. McKeown, Antoine Fort, and Charles Spillane	
5 Exploring the Role of Epigenetics in Cereal and Leguminous Crops Exposed to Abiotic Stress	149
Romesh Kumar Salgotra and Mehak Gupta	
6 Epigenetic Variation Amongst Polyploidy Crop Species	171
Andrew Bottley	
7 Canonical Histones and Their Variants in Plants: Evolution and Functions	185
Marlon S. Zambrano-Mila, Maria J. Aldaz-Villao, and Juan Armando Casas-Mollano	
8 Epigenetics of Light Signaling During Plant Development	223
Odalys Torres, Sofía Abad-Sojos, Karen Sánchez, Raquel F. Carvalho, and Sofia D. Carvalho	
9 Tomato Epigenetics: Deciphering the “Beyond” Genetic Information in a Vegetable Fleshy-Fruited Crop	247
Fabio T. S. Nogueira	

10 Targeted Epigenome Editing of Plant Defense Genes via CRISPR Activation (CRISPRa)	267
Alberto Cristian López-Calleja, Juan Carlos Vizuet-de-Rueda, and Raúl Alvarez-Venegas	
11 Chemical RNA Modifications: The Plant Epitranscriptome	291
Celso Gaspar Litholdo Jr. and Cécile Bousquet-Antonelli	
12 The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis	311
Brenda A. López-Ruiz, Vasti T. Juárez-González, Eduardo Luján-Soto, and Tzvetanka D. Dinkova	
13 Somatic Embryogenesis: Polycomb Complexes Control Cell-to-Embryo Transition	339
Fátima Duarte-Aké, Geovanny Nic-Can, and Clelia De-la-Peña	
14 An Overview of the Epigenetic Landscape of the Male Germline	355
Cristiane S. Alves	
15 Epigenetics in Forest Trees: Keep Calm and Carry On	381
María Carbó, Carolina Iturra, Barbara Correia, Francisco J. Colina, Mónica Meijón, Jose M. Álvarez, María Jesús Cañal, Rodrigo Hasbún, Gloria Pinto, and Luis Valledor	
Index	405

Chapter 12

The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis



Brenda A. López-Ruiz, Vasti T. Juárez-González, Eduardo Luján-Soto, and Tzvetanka D. Dinkova

Abstract In plants, differentiated somatic cells can revert their identity to pluripotent, reprogrammed cells in order to optimize growth and development depending on external conditions and in aid of overcoming their limitations as sessile organisms. Different modes of regeneration include tissue repair, de novo organogenesis and somatic embryogenesis (SE). The latter usually comprise the formation of proliferating pluripotent cell masses called callus. Identification and characterization of genes involved in the SE process allows the exploitation of distinctive features that make a tissue susceptible to change its normal cell fate and produce new plants massively.

Small RNAs (sRNAs) are non-coding RNA (ncRNA), 20–24 nucleotides long molecules involved in plant development, reproduction and genome reprogramming. Likely, the enormous variety of operating sRNA pathways contributes to the plant phenotypic plasticity. Two main sRNAs classes are defined by their modes of biogenesis: a class in which the precursor is a single-stranded, hairpin loop forming RNA (hpRNA), mainly represented by microRNAs (miRNAs) and a class in which the precursor is a dsRNA molecule (dsRNA) comprising several small interfering RNAs (siRNAs).

sRNAs, especially miRNAs, are common regulators of transcription factors (TFs) essential for plant meristem maintenance, growth and proliferation control, and with recently uncovered role in somatic to embryonic cell reprogramming. Although the siRNA function in plant development and SE has been much less explored, recent findings shape out their relevance in organ patterning and stress responses, both involved in cell plasticity. This review focuses on compiling and integrating the described function of miRNAs and siRNAs as a molecular basis in establishing cell dedifferentiation and further plant regeneration in economically relevant crops.

B. A. López-Ruiz · V. T. Juárez-González · E. Luján-Soto · T. D. Dinkova (✉)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico
e-mail: cesy@unam.mx

© Springer Nature Switzerland AG 2019

R. Alvarez-Venegas et al. (eds.), *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-14760-0_12

311

12.1 The SE Process

12.1.1 General Description

Somatic embryogenesis (SE) is an alternative plant reproduction process where embryos are produced from somatic tissues through an initial cell dedifferentiation promoted by exogenous signals (Elhiti et al. 2013). Dedifferentiated cells are able to proliferate maintaining their totipotential state (embryogenic masses or callus) and can further develop into a whole plant if the exogenous signal is removed.

SE has great impact on plant biotechnology and is widely used for clonal propagation, transformation or somaclonal variation. In addition it constitutes a valuable model to study early developmental features of embryogenesis, molecular aspects of cell transition during differentiation and hormone responses (De-la-Peña et al. 2015).

While zygotic embryogenesis initiates upon fertilization and comprises a series of molecular events underlying morphogenesis and embryo patterning, SE results from differentiated somatic tissues, which gain on embryogenic competence as a response to imposed external stimuli. For example, in maize, immature embryos have proven to display greater competence to achieve totipotency. In this plant species embryogenesis commitment requires dedifferentiation and further establishes cell proliferation prior to plant regeneration (Garrocho-Villegas et al. 2012).

12.1.2 Known SE Markers

The first step in SE induction is cell dedifferentiation where the cell fate of particular differentiated cells returns to a totipotent ground state as a response to external stimuli. The process is related to stressful conditions, such as temperature change, high phytohormone concentration, light deprivation and others (Elhiti et al. 2010; Kumar and Van Staden 2017). The imposed stress and exogenous hormones induce gene expression reprogramming, particularly through AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA), Helix-Loop-Helix (bHLH), LATERAL BOUNDARY DOMAIN (LBD) and other transcription factors (TFs) to direct cells towards dedifferentiation (Yang et al. 2012; Elhiti et al. 2013; Ge et al. 2016).

Upon promoting dedifferentiation, the achievement of embryogenic potential is crucial for further plant regeneration through SE. Several markers correlate with enhanced embryogenic potential. These include LEAFY COTYLEDON (LEC1 and LEC2), WUSCHEL (WUS) and BABY BOOM (BBM) genes (Su et al. 2009; Elhiti et al. 2010; Lowe et al. 2016). LEC1 and LEC2 are required to activate endogenous auxin biosynthesis, which consequently up-regulates the expression of WUS and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) (Elhiti et al. 2013).

Induced totipotent embryogenic tissues further activate signalling towards cell division and meristematic fate. Genes involved in successful proliferation program include cell cycle regulators and signal transduction components. Exogenous phytohormones, present in the callus proliferation medium, contribute to enhanced SHOOT APICAL MERISTEM (STM), CYCLIN DEPENDENT KINASES (CDKs) and WUS gene expression (Elhiti et al. 2010). On the other hand, negative regulators of WUS, such as CLAVATA (CLV1, CLV2 and CLV3) repress meristematic cell proliferation and promote differentiation (Elhiti et al. 2013).

More recently, small RNAs (sRNAs) have emerged as master regulators for most of the above-mentioned transcription factors. Their role in the SE process has been intensively studied in model and agronomical plant species over the last decade (Luo et al. 2006; Shen et al. 2013; Wu et al. 2015; Szyrajew et al. 2017).

12.2 sRNAs Classification, Biogenesis Pathways and Functions

12.2.1 sRNA Classification

Major sRNA groups include small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs). Further classification separates siRNAs in: hairpin-derived siRNAs (hp-siRNAs), natural antisense siRNAs (nat-siRNAs), secondary siRNAs and heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs). miRNAs and hp-siRNAs derive from single-stranded RNA precursors that form a stable hairpin loop, while other siRNAs originate from double-stranded RNA (Axtell 2013). Plant genomes usually present several individual genes encoding miRNAs from the same family and in few cases the miRNA originates from transcripts of protein-coding genes (reviewed in Budak and Akpınar 2015). Secondary siRNAs include phased- and trans-acting siRNAs. Phasing is a consequence of successive DCL processing that initiates at particular site within the dsRNA precursor determined by specific miRNA targeting (Fig. 12.1). Secondary siRNAs that act *in trans* to direct silencing of distinct mRNA targets are termed tasiRNAs. Most known tasiRNAs are also phased (Axtell 2013). Heterochromatic siRNAs commonly derive from plant transposable elements (TEs) and trigger important epigenetic mechanisms (Borges and Martienssen 2015).

12.2.2 sRNA Biogenesis Pathways

All sRNA production requires DICER-LIKE (DCL) enzymes to produce 21–24 nt long RNA duplexes with 2 nt overhangs at the 3' ends from precursors. Duplexes are protected by 2'-methylation at their 3' ends by HUA ENHANCER 1 (HEN1). These duplexes are recognized by ARGONAUTE (AGO) proteins in complex with

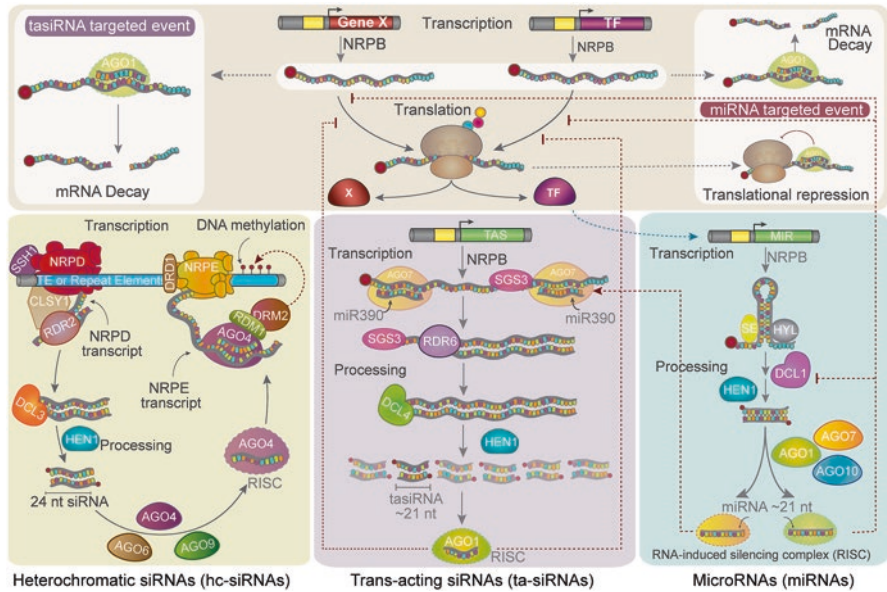


Fig. 12.1 Small RNA biogenesis pathways, interconnection and mechanisms of action. Lower panels represent the distinct origin (genetic loci) and biogenesis of hc-siRNAs, tasiRNAs and miRNAs (from left to right). The upper panel represents distinct modes of action and targets for tasiRNAs and miRNAs. Interconnection between miRNAs, tasiRNAs and targeted transcription factors (TFs) is shown by dotted lines. NRPB, RNA Pol II; NRPD, RNA Pol IV; NRPE, RNA Pol V; DCL, Dicer-like; AGO, Argonaute; RDR, RNA-dependent RNA polymerase; HEN1, sRNA methylase HUA enhancer 1; DRM2, domain rearranged methylase 2

other partners to select the mature sRNA strand and target protein-coding or non-coding RNAs by sequence complementarity. There are several comprehensive reviews on plant sRNA production and action (Bologna and Voinnet 2014; Borges and Martienssen 2015). Commonly, sRNA-charged AGO constitutes an RNA-induced silencing complex (RISC) that usually exerts post-transcriptional gene silencing (PTGS) by either transcript degradation or translational inhibition (Rogers and Chen 2013). However, the particular subclass hc-siRNAs promotes transcriptional gene silencing (TGS) and RNA-directed DNA methylation (RdDM), which is very important for TE control in plants. sRNAs originating from dsRNA precursors require the action of RNA-dependent RNA polymerase (RDR) and other stabilizing proteins for their biogenesis. The pathways depicted in Fig. 12.1 show major steps and particular DCL, AGO and RDR family members, as well as other enzymes required for miRNA, tasiRNA and hc-siRNA production, genetically dissected in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Several mutants for these proteins have also been identified in agronomical crops such as rice and maize, unravelling specialized functions for some of them (Nagasaki et al. 2007; Nobuta et al. 2008; Chitwood et al. 2009; Thompson et al. 2014).

12.2.3 *sRNA Mechanisms of Function*

Plant microRNAs regulate target RNAs by nearly perfect complementarity with sequences within any region of the transcript (Axtell 2013). miRNA-guided RISC preferentially induces target cleavage generating fragments at the targeted sequence that could follow up experimentally by degradome analyses (Ding et al. 2012; Yang et al. 2013). However, there are several examples of targets reduced at protein level, but not affected at mRNA level, due to miRNA action (Chen 2004; Brodersen et al. 2008; Beauclair et al. 2010). These studies suggested translational repression as a second way of action for plant miRNAs (Fig. 12.1). The extent of miRNA-target complementarity has been considered as premise to turn the balance towards either slicing (perfect) or translational repression (imperfect) in animals. However, the two modes of miRNA action have been shown to simultaneously operate in plants independently of the grade of complementarity (Aukerman and Sakai 2003; Beauclair et al. 2010).

Trans-acting small interfering RNAs (tasiRNAs) derive from precursor TAS genes transcribed by RNA pol II (Fig. 12.1). A miRNA drives the initial processing; the cleaved fragment is converted to dsRNA by RDR6 and sliced by DCL4 to 21-nucleotide siRNAs in a phased arrangement from the miRNA cleavage site (Xia et al. 2017). Four different TAS genes have been identified in *Arabidopsis thaliana* (Fei et al. 2013), but TAS3 is the most conserved and well-studied in different plants. Initial cleavage of TAS3 transcript is promoted by miR390 charged on AGO7, and some of the derived tasiRNAs target several members of the ARF3/4 family. This pathway is known as miR390-TAS3-ARF and related tasiRNAs are termed tasiR-ARFs (Dotto et al. 2014).

Heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs) originate from repeat-rich loci and TEs. Initial transcription by plant-specific RNA Pol IV (NRPD) and conversion of the transcript to dsRNA by RDR2 are required (Matzke and Mosher 2014). Then DCL3 processes the precursor to 23–24 nt duplexes, which are exported to the cytoplasm where they are loaded onto members of the AGO4 clade and returned to the nucleus (Borges and Martienssen 2015). AGO4-hc-siRNAs are recruited to homologous loci transcribed by plant RNA Pol V (NRPE) to deposit repressive chromatin marks, such as 5-methyl cytosine at asymmetric CHH context and histone H3K9 methylation. Usually 23–24 nt long hc-siRNAs represent the most abundant sRNA class in many plant species. In maize, mutation of RDR2 causes important reduction of 23–24 nt hc-siRNAs accompanied by increase of 21–22 nt siRNAs, including some miRNAs and tasiRNAs (Nobuta et al. 2008). This and other loss-of-function mutants in the RdDM pathway are not associated with major developmental defects suggesting that transcriptional silencing involves several layers of regulation.

12.3 miRNA Role in Plant Somatic Embryogenesis Induction

microRNAs are important regulators of plant developmental switches. Their role in SE induction relies on targeting central TFs that determine tissue differentiation. They also act as sensors of imposed stress conditions during dedifferentiation, phytohormone signalling and responses, as well as in embryogenic potential acquisition. In *Arabidopsis thaliana*, miR165 and miR166 target the CLASS III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP III) TFs PHABULOSA (PHB) and PHAVOLUTA (PHV), which are positive regulators for LEC2 expression. On the other hand, miR160 regulates ARF10, ARF16 and ARF17 involved in auxin signalling during SE induction (Wójcik et al. 2017). In addition, miR393 controls the levels of auxin receptors TIR1 and AFB2 (Wójcik and Gaj 2016). The relevance of these miRNAs in the context of auxin signalling pathways is described with more details below.

A pioneer study developed in rice revealed that some miRNAs are particularly enriched in dedifferentiated tissues (Luo et al. 2006). Such finding was followed by reports based on next-generation sequencing (NGS) techniques approaching miRNA abundances during SE embryogenesis induction, plant regeneration or between tissues with distinct embryogenic potential (Shen et al. 2013; Wu et al. 2015; Szyrajew et al. 2017). A common finding for these studies was that development-related miRNAs (miR156, miR159, miR164, miR166 and miR172) tend to decrease their levels upon dedifferentiation, while stress-related (miR319, miR396, miR397, miR398 and miR408) increase (Fig. 12.2). Other miRNAs related to auxin responses (miR160, miR167, miR169 and miR390) may show transient increases depending on the stage of dedifferentiation induction. On the other hand, during plant regeneration through SE, stage-specific miRNA patterns and their target regulation oppose the dedifferentiation status revealing important roles for miR156, miR159, miR164 and miR168 in *Citrus sinensis* (Wu et al. 2011), *Larix leptolepis* (Zhang et al. 2012), *Dimocarpus longan* (Lin and Lai 2013) and *Zea mays* (Chávez-Hernández et al. 2015). However, it is important to highlight that each plant species requires particular in vitro culture conditions and some of the conserved miRNAs might display species-specific patterns.

12.4 Relevance of sRNAs in Auxin Responses and Homeostasis

12.4.1 The Auxin Signal Transduction Pathway

Auxins are the most widely studied phytohormones in plants (Sanan-Mishra et al. 2013). They are involved in plant growth, cell division, elongation and differentiation, apical-basal axis formation, embryogenesis, meristem formation and tropism (Hrtyan et al. 2015; Kasahara 2016; Mutte et al. 2018). Indole-3-acetic acid (IAA)

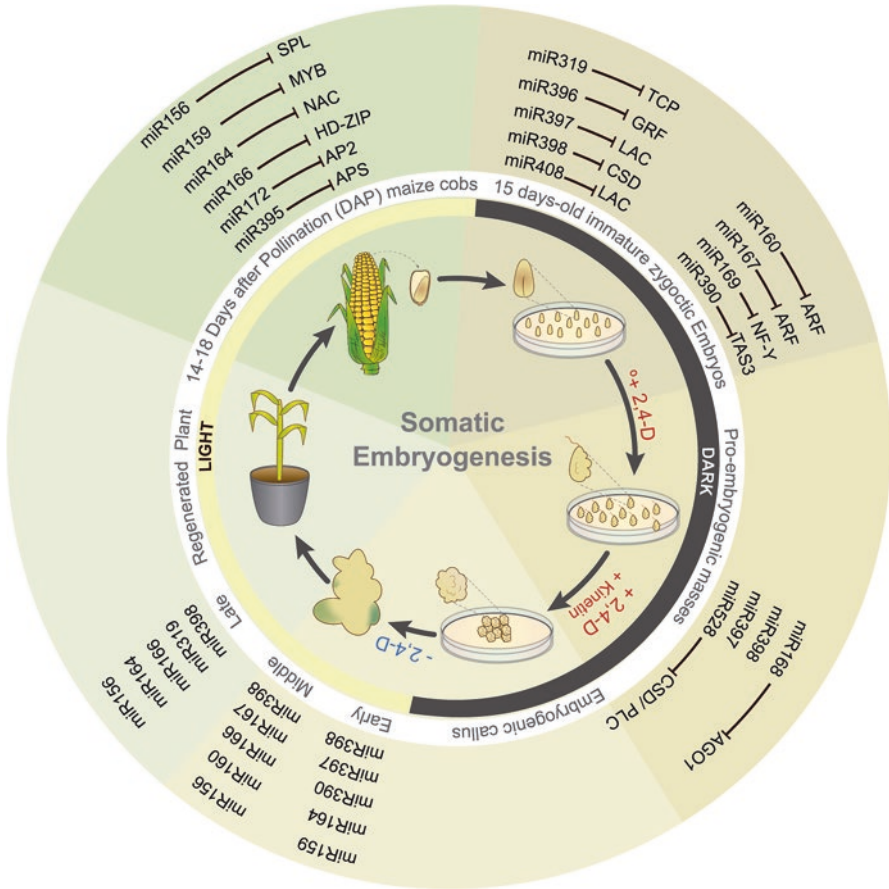


Fig. 12.2 sRNAs role in somatic embryogenesis (SE) and plant regeneration (exemplified with maize). SE induction and dedifferentiation is represented at the top of the circle using as explant immature embryos and 2,4-D/darkness as stimulus. Further embryogenic callus proliferation establishment includes kinetin in addition to 2,4-D (Garrocho-Villegas et al. 2012). The bottom part represents differentiation induction of proliferating callus by phytohormones removal in the presence of photoperiod. The circle is completed by plant regeneration and reproduction. At each stage, the most abundant miRNAs detected for maize and other plant species (details in Table 12.2) are shown on the external circle together with their proposed roles in regulating TFs or proteins crucial for the SE process

is the most common natural auxin and the final product of general auxin biosynthesis mechanisms. There are also synthetic auxins: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA). 2,4-D mimics IAA in the perception and signalling, except for cell-to-cell auxin transport mechanisms (Fukui and Hayashi 2018; Mutte et al. 2018).

Auxin regulatory networks operate by three dynamic processes: (1) auxin biosynthesis and inactivation; (2) cell-to-cell auxin transport (auxin polar transport)

and (3) final signal transduction (Fukui and Hayashi 2018). The first two are related with the balance of auxin concentrations in specific tissues at certain developmental stages, whereas the third one represents the final response to auxin perception, which consists in the transcriptional activation or repression of a wide range of genes (Sanan-Mishra et al. 2013).

Exogenous auxin influx takes place by passive diffusion or by AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUXIN (AUX1/LAX) transporters (Fig. 12.3). Auxin efflux is carried out through PIN-FORMED (PIN) efflux carriers and ATP-BINDING CASSETTE subfamily B/MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (ABCB/MDR/PGP). The influx/efflux conforms the auxin polar transport system responsible to maintain auxin levels and gradients between cells. The transporters (AUX/LAX, PIN and ABCB) have particular spatiotemporal expression and subcellular localization to determine the specific auxin gradients during plant growth and development (Barbosa et al. 2018; Fukui and Hayashi 2018; Zhao 2018).

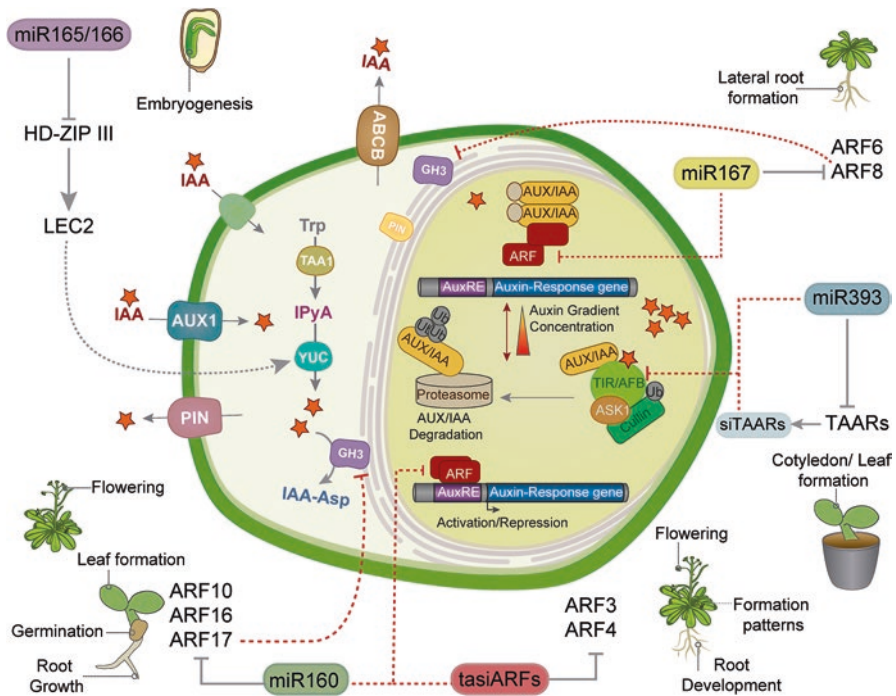


Fig. 12.3 sRNA-mediated regulation on plant auxin signalling pathway. The image represents the main Arabidopsis auxin signal transduction pathway explained in Sect. 12.4. miR160 controls IAA degradation by inhibiting ARF10/16/17 during seed germination and plantlet establishment. miR165/166 indirectly affects IAA biosynthesis by repressing HD-ZIP III TFs which are required to promote LEC2 and YUC expression. miR167 inhibits ARF6/8 involved in auxin-responsive gene expression, particularly during lateral root formation. miR393 represses TAAR expression and promotes generation of TAAR-derived siRNAs during cotyledon leaf formation. Opposite gradients of tasiR-ARFs and their ARF3/4 targets help to establish leaf pattern formation, appropriate root development and flowering

Auxin biosynthesis and inactivation has been characterized mostly in *Arabidopsis thaliana*. However, homologous pathways are highly conserved in plants. A Trp-dependent pathway produces endogenous IAA by Trp conversion in two sequential steps: (1) Trp is converted to indole 3-pyruvic acid (IPyA) by the TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TRYPTOPHAN AMINO TRANSFERASE RELATED (TAA1/TAR gene family); (2) Enzymes from the flavin monooxygenase family YUCCA (YUC) catalyse the conversion of IPyA to IAA (Fig. 12.3). The second conversion is the rate-limiting step because of strict YUC availability and spatiotemporal regulation. Auxin catabolism and inactivation are as well important to maintain optimal endogenous levels for certain processes. The Gretchen Hagen 3 (GH3) family of IAA-amide synthetases conjugate IAA to amino acids and in such form the auxin can be degraded. Conjugation is reversible depending on the amino acid identity (Kasahara 2016; Fukui and Hayashi 2018; Zhao 2018).

Auxin signal transduction triggers transcriptional regulation of many gene families. It involves intracellular receptors, transcriptional activators and repressors (ARFs) and auxin-responsive genes. The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALLING F-BOX (TIR1/AFB) receptor family are responsible for the perception of intracellular auxin levels. TIR1 is an F-box protein that conforms the SCF-type complex (Skp1, Cullin, and F-box protein-type), which act as ubiquitin-ligases responsible for protein ubiquitination and further degradation via the proteasome (Sanan-Mishra et al. 2013; Wang et al. 2018). At high auxin levels, TIR1/AFB receptors promote interaction between the SCF-type complex and the ARF inhibitors AUX/IAA. Such interaction promotes AUX/IAA degradation and ARF release to regulate auxin-responsive genes bearing DNA cis-elements (AuxRE) in their promoters (Leyser 2018; Kim et al. 2018; Wang et al. 2018). Auxin-responsive genes include GH3s, SAURs (SMALL AUXIN UP-REGULATED RANKs) and AUX/IAA. Gene repression or activation depends on ARF identity (Sanan-Mishra et al. 2013; Roosjen et al. 2018).

12.4.2 *miRNAs Related to Auxin Responses*

From the 23 ARF family members identified in *Arabidopsis thaliana*, at least five are regulated by miRNAs (Mallory et al. 2005). *Arabidopsis* miR160 targets ARF10, ARF16 and ARF17. The loss of miR160 target site in any of these ARFs results in developmental defects, such as reduced ABA sensitivity during germination (ARF10), defective root cap development and alteration in lateral root formation (ARF10 and ARF16); embryo symmetry anomalies, leaf shape defects, premature and abnormal inflorescence development and root growth impairment (ARF17) (Mallory et al. 2005; Wang 2005; Liu et al. 2007). Interestingly, ARF17 represses GH3 transcription, thereby affecting the intracellular auxin inactivation (Fig. 12.3). In addition, miR167 represses ARF6/ARF8, which also regulate GH3 transcription. Surprisingly, it has been reported that miR167 promoter displays AuxRE elements probably regulated by other ARFs. Therefore, miR160/167 nodes seem to have

complementary roles at least in root development (Rubio-Somoza and Weigel 2011; Sanan-Mishra et al. 2013; Hrtyan et al. 2015).

Another miRNA involved in auxin regulation is miR393. The targets of this miRNA belong to the family of F-box proteins, including four members of the TIR1/AFB2 clade of auxin receptors (TAARs). Cleavage of TAAR transcript promotes the production of secondary siRNAs (siTAARs) which regulate the final expression of each TAARs from where they were originated and other unrelated genes, generating auxin accumulation and developmental abnormalities of leaves and cotyledons (Si-Ammour et al. 2011; Singh et al. 2018). On the other hand, miR165/166 indirectly affect IAA biosynthesis through inhibiting the activation of YUC transcription by LEC2 (Fig. 12.3; Wójcikowska et al. 2013; Wójcik et al. 2017).

12.4.3 *tasiRNAs Involved in Auxin Responses*

As described in Sect. 12.2, tasiRNAs targeting ARF3/4 are commonly known as tasiR-ARFs (Dotto et al. 2014; Xia et al. 2017). The tasiR-ARF highly conserved regulatory mechanism is required for proper leaf development, as well as juvenile to adult phase changes (Guilfoyle and Hagen 2007). Other functions are related to flower development and lateral root formation under normal and salt stress conditions (Marin et al. 2010; Hrtyan et al. 2015; He et al. 2018). Before lateral root initiation, miR390 expression is activated in xylem cells and promotes tasiR-ARFs production to repress ARF3/4 transcripts in the new primordium. This provokes endogenous auxin level alteration at particular sites, required for lateral root formation and appropriate plant growth (Marin et al. 2010). A recent report in Poplar (*Populus* spp.) showed that osmotic stress inhibits auxin signalling to enhance lateral root formation through miR390 expression stimulation and tasiR-ARFs accumulation (He et al. 2018).

12.5 Other siRNAs in Cell Dedifferentiation and Proliferation Establishment

12.5.1 *Epigenetic Regulation in SE*

Epigenetic mechanisms coordinate gene reprogramming for the acquisition of totipotency during dedifferentiation of somatic cells (Miguel and Marum 2011; Elhiti et al. 2013). Such reprogramming is partly achieved by DNA methylation and histone modifications in response to environmental and stress conditions to achieve the developmental switching in somatic cells as adaptation to the external cues (Henderson and Jacobsen 2007; Huettel et al. 2007; Neelakandan and Wang 2012).

DNA methylation is an essential epigenetic mechanism that regulates and maintains gene expression programs (Milutinovic et al. 2003). In plants, cytosine methylation occurs in the context of CG, CHG and CHH (H = A, T or C) and is catalysed by METHYLTRANSFERASE (MET), CHROMOMETHYLASE (CMT) and DOMAIN REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) (Cao and Jacobsen 2002; Fehér 2015). Several factors influence DNA methylation during plant SE (Elmeer and Hennerty 2008; Joshi et al. 2008) and both, hyper- and hypomethylation, play crucial roles in somatic embryo development (Chakrabarty et al. 2003; Nic-Can et al. 2013). Early research in plant SE determined that high auxin concentrations and nitrogenous compounds like L-proline, commonly present in in vitro culture media, affect the DNA methylation status, and hence gene expression (LoSchiavo et al. 1989). DNA methylation inhibition correlates with SE competence impairment and loss of regeneration capacity in *Medicago truncatula* (Santos and Fevereiro 2002) and *Daucus carota* (Yamamoto et al. 2005). Therefore, certain levels of DNA methylation have to be maintained for a proper course of SE (De-la-Peña et al. 2015).

Chromatin remodeling has been widely reported for plant somatic cell dedifferentiation, organogenesis, embryogenesis and regeneration (Grafi et al. 2007; Valledor et al. 2010). This process allows TFs and chromatin modifiers to access DNA and exert gene expression control. The regulation is mediated by particular histone N-terminal methylations, acetylations, ubiquitinations and phosphorylations (Kouzarides 2007). During SE induction in *Coffea canephora* the H3K9me2 repressive mark was absent, while H3K4me2 and H3k4me3 activation marks increased. Additionally, after the first week of induction, the levels of H3K27me2 and H3k27me3 repressive marks were also substantially reduced (Nic-Can et al. 2013). Reduction in repressive histone modifications has been associated with genes encoding TFs involved in cell differentiation, such as BBM1, LEC1 and WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 (WOX4) to promote successful SE induction (Lafos et al. 2011). In addition, a mutant for the chromatin modifier PRC2, which directly binds H3K27me3 and promotes repressive chromatin remodeling, tends to develop embryo-like structures from differentiated tissues (Ikeuchi et al. 2015). This supports the role of transcriptional repression in preventing dedifferentiation of mature somatic cells and suggests de-repression is needed to achieve cellular dedifferentiation and SE progression. Although all these studies have pointed out the relevance of dynamical plant chromatin regulation during SE, the mechanisms underlying the epigenetic plasticity required for cell totipotent status have been still poorly explored.

12.5.2 *sRNA Impact on Epigenetic Landscapes*

Plant hc-siRNAs (Fig. 12.1) are involved in heterochromatin formation and transcriptional gene silencing by guiding sequence-specific DNA and histone methylation through RdDM (Matzke and Mosher 2014; Borges and Martienssen 2015). In

Arabidopsis thaliana, RdDM targets genomic loci for de novo DNA methylation through DRM2 (Zhang and Zhu 2011; Saze et al. 2012). Reports from several plant species have illustrated hc-siRNA-mediated epigenetic regulation, their role in chromatin organization and transcription silencing during different developmental stages and stimuli. It has been shown that hc-siRNAs participate as mobile elements for inter-tissue epigenetic regulation. In grafting experiments using wild-type and mutant plants, unable to produce hc-siRNAs, the movement of these sRNAs was detected from wild-type-to-mutant tissues to induce *novo* DNA methylation (Molnar et al. 2010; Tamiru et al. 2018). Also, hc-siRNAs mediate transgenerational epigenetic regulation. Prior fertilization, cells surrounding germline undergo DNA demethylation leading to the transcriptional activation of endogenous TEs (Zemach and Zilberman 2010). TE reactivation triggers the formation of hc-siRNAs that move into the germ cells and ensure epigenetic silencing of TEs in the embryo (Olmedo-Monfil et al. 2010; Kumar and Van Staden 2017). Also, mutants for components of hc-siRNA biogenesis were related to decondensation of pericentromeric repeats and depletion of H3K9me2 at chromocenters leading to genome instability (Pontes et al. 2009). The relationship between RdDM and chromatin remodelers has been demonstrated in maize (Fu et al. 2018). Mutants for CMT or the nucleosome remodeler DDM1 exhibited decrease in RdDM activity and nearly complete loss of both, 24 nt hc-siRNAs and CHH-methylation. Curiously, the loss of 24 nt hc-siRNAs was accompanied by a dramatic increase of 21 and 22 nt siRNAs mapping to heterochromatic loci in the genome. However, these siRNAs apparently are unrelated to DNA methylation and RdDM.

12.5.3 *hc-siRNAs and Other siRNAs during SE*

Despite all reports that have linked epigenetic regulation by sRNAs with plant development, to date very few studies have approached the implication of hc-siRNAs and other siRNAs in SE regulation. While investigating sRNA roles in synchronic SE of *Larix leptolepis*, an overrepresentation of 24 nt siRNAs was observed for synchronous embryos suggesting their participation in SE synchronism, a crucial hallmark in plant tissue culture (Zhang et al. 2014). Likewise, genome-wide analysis of sRNAs in non-embryogenic and embryogenic tissues of ‘Valencia’ sweet orange (*Citrus sinensis*) SE indicated that 24 nt siRNAs exhibited lower abundance in the non-embryogenic callus (Wu et al. 2015). In addition, plant regeneration through rice SE revealed DNA hypomethylation associated with 24 nt hc-siRNAs loss (Stroud et al. 2013). Also, in immortalized *Arabidopsis* cell suspension cultures, particular heterochromatic regions were hypomethylated and TEs became activated (Tanurdzic et al. 2008). However, the 24 nt hc-siRNAs were significantly reduced only for particular TEs.

In maize, the 24 nt sRNA population importantly decreased during the establishment and maintenance of embryogenic callus for the Tuxpeño VS-535 cultivar (Alejandri-Ramírez et al. 2018). However, 21–22 nt populations were not affected. Interestingly, the 24 nt-long hc-siRNAs derived from retrotransposons decreased

only transiently during callus proliferation establishment, concomitant with 22 nt increases. Unexpectedly, such changes were accompanied by reduction in the expression of some transposons, suggesting that TE regulation might be needed for proper establishment of embryogenic callus and the acquirement of proliferative status. Moreover, the role of other maize siRNAs was revealed while studying factors determining the frequency of embryonic callus formation in the Chinese maize inbred line 18-599R (Ge et al. 2017). Surprisingly, some 24 nt siRNAs mapping to promoter gene regions were significantly up-regulated and correlated with hypermethylation of the corresponding target genes during different stages of embryogenic callus induction and formation. This further resulted in decreased expression of the target genes. All these data only expose the tip of an iceberg that represents the largely unknown role of hc-siRNAs and other siRNAs for gene expression regulation during plant SE. Whether these siRNAs act through the RdDM pathway remains to be demonstrated.

12.6 sRNAs in Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis

12.6.1 Comparison Between Somatic and Zygotic Embryogenesis

Numerous studies have shown the resemblance between somatic and zygotic embryos in terms of morphological, histological, physiological, biochemical and genetic features. However, somatic embryos are more exposed to stress than their zygotic counterparts, accumulate less storage compounds and do not experience a growth arrest but germinate precociously (Winkelmann 2016).

Several proteins act as multifunctional regulators in both, zygotic and somatic embryogenesis. These include WUS, LEC1/LEC2, BBM1 and the AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15) TFs (Fehér 2015). Not only the key regulators are common, but also the overall gene expression patterns of somatic and zygotic embryos are similar. When the cotton somatic and zygotic embryo transcriptomes were compared, the expression patterns of genes associated with metabolism, cellular processes and embryo development were found to be greatly similar (Jin et al. 2014). However, the main gene expression difference for in vitro cultured embryos resided within the stress-related gene class.

The study of regulatory molecules and connected gene networks during SE is of great significance for the long-term understanding of embryogenic competence and plant regeneration capacity, which is indispensable for crop improvement. While key role of miRNAs in zygotic embryogenesis was early demonstrated for *Arabidopsis thaliana* (Nodine and Bartel 2010; Armenta-Medina et al. 2017), their central function in somatic embryogenesis is starting to shape for different plant species (Chen et al. 2011; Wu et al. 2011; Zhang et al. 2012; Li et al. 2012; Lin et al. 2015; Yang et al. 2013; Chávez-Hernández et al. 2015; Zhang et al. 2017b).

12.6.2 *Plant Regeneration Pathways*

Based on the capability to regenerate whole plants from a variety of tissues or cells, such as leaf, pollen, root and endosperm cells, it is often claimed that all plant cells are totipotent. However, experimental data are scarce to sustain this statement. In vitro regeneration may progress through pre-existing stem cells in the plant body, and totipotency has been demonstrated only for certain, mostly young or partly differentiated tissues (Fehér 2015).

Also it has been suggested that dedifferentiation process includes the developmental switch of the explant cells to a pericycle cell-like functioning (Sugimoto et al. 2010). This implies that the early step in organogenesis involves cell redifferentiation to a distinct cell type, rather than to an 'undifferentiated/dedifferentiated' state (Horstman et al. 2017).

Somatic embryogenesis mainly follows two paths of regeneration depending on the developmental stage of the explant and culture conditions. That means somatic embryos can develop directly from the explant or indirectly from callus. The development of embryos is regularly indirect going through a pro-embryogenic cell mass (PEM) or embryogenic callus phase and only limited cells of the callus can form embryos (Fehér 2015). For example, cells that have undergone only a few divisions, such as asymmetrically dividing stem cells, can rapidly re-establish a removed stem cell niche of the root tip, the callus induced on *Arabidopsis* immature zygotic embryos can produce somatic embryos and the callus initiated from pericycle stem cells retains its ability to regenerate shoots.

For successful shoot regeneration from in vitro induced callus, it has been shown that lateral root primordial features are required and precede de novo shoot formation (Radhakrishnan et al. 2018). Morphology, cellular organization and molecular markers, such as WUSCHEL-related homeobox 5 (WOX5), SHORT-ROOT (SHR), SCARECROW (SCR), PLETHORA (PLT1/2), PIN1 and others, support the root identity of callus tissues (Sugimoto et al. 2010; Kareem et al. 2015). This is in accordance with the crucial role of auxin concentration in callus formation and further plant regeneration.

12.6.3 *Pattern Formation During SE*

During plant regeneration through SE, stem cells need cues to establish the conventional plant developmental patterning. Coordinated cell division and differentiation are required throughout plant regeneration to obtain a whole plant. Due to the existence of rigid walls limiting cell migration and rotation, pattern formation depends on positional information. Hence, the 'on-site' differentiation of newly formed cells comprises fundamental cell-to-cell communication. Molecules facilitating such events include peptides, phytohormones, transcription factors and small non-coding RNAs (Hisanaga et al. 2014).

The beauty of sRNA-mediated cell-to-cell signalling resides in avoiding the use of specific receptors and energy consuming sequential steps of signal transduction pathways preceding gene expression responses. Instead, it utilizes highly specific nucleotide base pairing for direct suppression of target mRNA expression (Fig. 12.1). The mechanism underlying sRNA transference across the cell wall possibly involves plasmodesmata (PD).

12.6.3.1 sRNAs Involved in Shoot Apical Meristem Formation

Direct *in vitro* shoot regeneration is *de novo* committed by cytokinin (Radhakrishnan et al. 2018). This process is characterized by a clearance of epigenetic marks at the WUS locus. Upon transfer to cytokinin-rich medium, repressive histone mark H3K27me3 is gradually removed from the locus coincident with WUS expression at shoot regeneration sites. In *Arabidopsis thaliana*, WUS is expressed at the organizing centre (OC) located at the SAM inner stem cell layer (L3) and the corresponding protein moves to more external L2 and L1 layers to activate the production of CLV3, which eventually attenuates WUS expression (Schoof et al. 2000; Lee and Clark 2013). This feedback loop maintains the size of SAM stem cell pool constant, but does not explain how exactly the cellular organization operates in the context of stem cell division.

Recent reports have nicely demonstrated that both, CLV3 and B-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs) partnered by HD-ZIP III TFs, are required for WUS enhanced expression during shoot regeneration (Zhang et al. 2017a). Furthermore, regulation of HD-ZIP III TFs by miR165/166 restricts the regionalization of ARR and miR394 acts as a positional cue by repressing the F-box protein LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR) at the internal layer, where it interferes with CLV3 expression (Knauer et al. 2013). This repression allows stem cell maintenance and supports the precise interplay between cytokinin and auxin at the SAM.

Additional regulation by miR156 contributes to shoot regeneration potential. As *Arabidopsis* plants age, they lose their ability to regenerate shoots mostly due to reduced miR156 levels and up-regulation of its target SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) TFs (Zhang et al. 2015). Particularly, SPL9 directly interferes with the function of B-type ARR, impairing the cytokinin response and consequently shoot regeneration. Plants overexpressing miR156 showed increased shoot regenerative ability and for longer periods. Interestingly, miR156 also declines during long-term callus subculture in maize (Dinkova and Alejandri-Ramirez 2014) and citrus (Long et al. 2018). In the last study, it was demonstrated that miR156 overexpression or the SPL9 orthologous gene knockdown rescued the embryogenic capacity of aged citrus callus supporting the central role of this miRNA-target module in SE regulation.

12.6.3.2 sRNAs Implicated in Root Apical Meristem Development

Similar to shoot regeneration, plant root regeneration is also guided by spatial complementary hormone domains (Efroni et al. 2016). However, low cytokinin:auxin ratios can promote root organogenesis, but not shoot regeneration. The root apical meristem (RAM) formation occurs in an auxin-dependent fashion during the early globular embryonic stage. The meristematic region is formed by stem cells organized around mitotically inactive cells called quiescent centre (QC). The root meristem size varies between species. While *Arabidopsis* has a small meristem with only four QC cells, maize RAM has 500–1000 cells (Jiang et al. 2010). Most studies on RAM establishment regulation have been done in *Arabidopsis*. Auxin polar transport from shoot to the root is carried out by PIN efflux transporters and generates auxin maximum at the root tip for expression of TFs at the stem cell niche, PLTs, SCR, SHR and WOX5 (Honkanen et al. 2017).

Impairing the sRNA biogenesis machinery (null *dcl1* mutant) displays early embryo patterning defects, including both SAM and RAM establishment (Nodine and Bartel 2010). Such defects mostly occur due to a precocious up-regulation of TFs that promote differentiation before the pluri-potential cell state can give rise to different cell types. Most of the miRNAs involved in auxin signalling (Fig. 12.3) are crucial for root tissue patterning. Particularly, miR165/166 are produced in the endodermis layer of root meristem, and move into other cell layers where HD-ZIP III TFs dose-dependent suppression is required for protoxylem and metaxylem specification (Carlsbecker et al. 2010).

12.6.3.3 sRNAs Involved in Tissue Polarity

The tasiRNA class was the first described mobile sRNAs acting in a cell non-autonomous manner. Particularly, tasiR-ARFs participate in leaf polarity by establishing opposite gradients for ARF3/4 and HD-ZIP III TFs (Chitwood et al. 2009). miR390 promotes tasiR-ARFs production at the adaxial layers of leaf primordia and they are spread in a gradient decreasing towards the abaxial side. ARF3/4 promote abaxial identity through positive regulation of miR165/miR166, which in turn represses HD-ZIP III TFs. This pathway is conserved in land plants and it is involved in the normal development of leaves, lateral roots and flowers. Moreover, HD-ZIP III mRNA accumulation, defined by miR165/miR166-dependent suppression, is restricted to the central-apical domain of globular stage embryos to promote SAM specification and to ensure cells at the basal pole to be correctly destined to root meristem (Smith and Long 2010). miR165/miR166 act cell non-autonomously from the basal part of the heart stage embryos and subsequently promote the apical fate at the subsequent stages (Miyashima et al. 2013). As additional control mechanism, AGO10 sequesters miR165/miR166 to protect HD-ZIP III mRNA (Zhu et al. 2011). Such regulation provides a novel mechanism by which the graded distribution of sRNAs is translated into an array of cell fates through a miRNA-dependent gene expression control.

12.6.4 sRNAs Abundance Switches in Somatic Embryo Development

sRNA role in the development of somatic embryos and plant regeneration is often overlooked, while significantly more attention has been paid to these molecules during the induction phase of SE. Most of the available research has focused in comparing gene expression programs at dedifferentiated status (i.e. embryogenic callus and or non-embryogenic callus) versus globular, heart and torpedo somatic embryos differentiating upon appropriate stimulus. During most recent years, global analyses using microarrays or next-generation sequencing (NGS) technology compared the presence of conserved and species-specific miRNAs at particular developmental stages of somatic embryos. However, most of the studies use pooled sRNA from the somatic embryos and embryogenic cultures to generate their library, so considerable information might be lost (Table 12.1).

Somatic embryo developmental stages have been established according to each species-specific plant regeneration method. While some species display distinguishable globular, heart, torpedo and cotyledonary embryos, others have assigned early, mid, late embryo or first, second, third stages in a temporary line starting from the differentiation induction. In spite of such heterogeneity, available sRNA data suggest that plant conserved miRNAs exert common functions during somatic embryo development (Fig. 12.2). With greater detail, we have summarized characteristic miRNA abundances reported at different developmental stages of plant regeneration for several species in Table 12.2. All data correspond to the analyses of

Table 12.1 Developmental stages of SE in different crops and type of analysed sRNAs

Specie	Developmental stage	Methods	sRNA	Reference
<i>Oryza sativa</i> (rice)	Differentiated callus	Northern blot NGS	miRNAs, tRNA-derived	Luo et al. (2006) Chen et al. (2011)
<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. (orange)	Globular and cotyledon-shaped somatic embryo	qRT-PCR	miRNAs	Wu et al. (2011)
<i>Larix leptolepis</i> (larch)	Early, middle, late single embryo and cotyledonary embryo	NGS qRT-PCR	miRNAs	Zhang et al. (2012)
<i>Liriodendron tulipifera</i> (hybrid yellow poplar)	Stages of embryos: E5–E9	NGS Microarrays	miRNAs	Li et al. (2012)
<i>Dimocarpus longan</i> (longan)	Globular, torpedo-shaped, cotyledonary embryos	NGS, qRT-PCR	miRNAs tasiRNAs	Lin and Lai (2013) Lin et al. (2015)
<i>Gossypium hirsutum</i> (cotton)	Globular, torpedo, cotyledon-stage embryo	qRT-PCR	miRNAs	Yang et al. (2013)
<i>Zea mays</i> (maize)	First stage, second stage, plantlet	Northern blot qRT-PCR	miRNAs	Dinkova and Alejandri-Ramirez (2014) Chávez-Hernández et al. (2015)
<i>Lilium pumilum</i> DC. Fisch.	Globular, torpedo and cotyledon-stage embryos	NGS qRT-PCR	miRNAs	Zhang et al. (2017b)

Table 12.2 miRNA expression during somatic embryo differentiation in diverse plants

Different plant groups		Developmental stages of somatic embryo				Late stage
		Early stage	Middle stage	Torpedo	Cotyledonary	
Angiosperms	Dicots	Orange ^a	miR156 miR159 miR164	Heart miR394	Torpedo	Cotyledonary miR166 miR167 miR398
		Longan ^b	miR397a miR398b	miR159a,b,c,f miR160a miR398a,b	miR159a,b,c miR160a miR167a miR390a miR398b	miR156a miR159a,c miR167a
	Cotton ^c	miR164 miR390				miR156 miR167 miR390
	Lilium ^d	miR396 miR397 miR168 miR319			miR156 miR164 miR166 miR171	miR390 miR397 miR398 miR482
	Maize ^e	miR156 miR164 miR168 miR397	First stage	Second stage	Plantlet	miR156 miR164 miR397 miR398
	Monocots	Rice ^f	miR398 miR408 miR528 miR164 miR166 miR167 miR169 miR159	miR159 miR167 miR168	miR319 miR408 miR528	

Different plant groups	Developmental stages of somatic embryo			
	Early stage	Middle stage		Late stage
	<i>Globular</i>	<i>Heart</i>	<i>Torpedo</i>	<i>Cotyledonary</i>
Gymnosperms	Larch [§]	<i>Early embryo</i>	<i>Middle embryo</i>	<i>Cotyledonary embryo</i>
		miR162 miR168a, b miR171a,b,c	miR171a,b,c	miR159a,b,c miR160 miR162 miR166 miR167 miR168a,b

^aWu et al. (2011), Wu et al. (2015), and Long et al. (2018)

^bLin and Lai (2013), and Lin et al. (2015)

^cYang et al. (2013)

^dZhang et al. (2017b)

^eDinkova and Alejandri-Ramirez (2014), and Chávez-Hernández et al. (2015)

^fChen et al. (2011)

[§]Zhang et al. (2012)

bulk tissues composed mostly of heterogeneous cell types at each stage and might not reflect the precise miRNA expression switches. Recently, a new protocol was developed in *Arabidopsis thaliana* SE to visualize miRNA expression in a whole mount tissue using in situ hybridization (Wójcik et al. 2018). The application of such technique would be of utmost significance since, as discussed above, sRNA and target cell-specific distribution determines particular cell fates in tissues committed to the SE program.

For most plant species shown in Tables 12.1 and 12.2, early stages of differentiation are featured by the expression of miR159, miR164 and miR397. miR164 targets CUC2, a member of the plant-specific NAC domain (NAM, ATAF1/2 and CUC2) TF family, with important roles in plant development and stress responses (Aida et al. 1997). miR159 controls the transcript levels of MYB factors during seed germination and abiotic stress (Reyes and Chua 2007) and miR397, miR398 and miR408 regulate copper-dependent enzymes, such as superoxide dismutases (SOD) laccases and plantacyanin in response to copper deficiency (Abdel-Ghany and Pilon 2008; Sunkar et al. 2012).

It is well known that abiotic stress plays crucial role in modulating differentiation during SE. miR397 and miR398 are particularly abundant at early or late SE developmental stages for most of the analysed plant species. For example, miR398 increased during cotyledon-shaped embryo morphogenesis in orange and during formation of early staged embryo in larch. In *Dimocarpus longan* SE, miR398b, but not miR398a is highly expressed at heart-shaped and torpedo-shaped embryos. However, miR398b levels decreased during cotyledonary embryo development, leading to CSD accumulation and promoting embryo maturation (Lin and Lai 2013; Lin et al. 2015). For maize and rice, miR397, miR398, miR408 and the monocot-specific miR528 were present in both, dedifferentiated and differentiated tissues (Luo et al. 2006; Chen et al. 2011; Chávez-Hernández et al. 2015; Alejandri-Ramírez et al. 2018). Most of them were abundant at initial differentiation stages, but further decreased in the regenerated plantlet. Interestingly, laccases targeted by miR397 or miR528 have been associated with cell wall lignification and thickening during secondary cell growth (Constabel et al. 2000; Sun et al. 2018). Hence, miRNA-mediated down-regulation of laccases might associate with cell wall loosening in dedifferentiated tissues and early differentiation stages (Fig. 12.2).

The miR390-tasiR-ARF-ARF3/4 regulation also seems to operate in SE differentiation. miR390 was abundant at early globular-shaped embryo formation in *Citrus sinensis* (Wu et al. 2011) and *Gossypium hirsutum* SE (Yang et al. 2013), at heart and torpedo embryonic stages in *Dimocarpus longan* and in cotyledonary embryos for *Larix leptolepis* (Lin et al. 2015; Zhang et al. 2012). Correspondingly, *Dimocarpus longan* TAS3 and ARF4 exhibited their lowest expressions at the cotyledonary stage and reached their peaks in globular embryos. Interestingly, the miR390 primary transcript and TAS3 precursors were up-regulated by the synthetic auxin 2,4-D in a concentration-dependent manner (Lin et al. 2015).

Another miRNA participating downstream of auxin signalling, miR166, increased at later stages in *Citrus sinensis* cotyledon-shaped embryo morphogenesis (Wu et al. 2011, 2015), *Lilium pumilum* torpedo-shaped and cotyledonary embryos

(Zhang et al. 2017b) and *Larix leptolepis* cotyledonary embryos (Zhang et al. 2012). For *Dimocarpus longan* SE it was suggested that changes in miR166c* levels might be caused by alterations of endogenous gibberellin GA3 concentrations leading to the inhibition of early embryonic cell differentiation and globular embryo formation (Lin and Lai 2013). However, in *Oryza sativa*, miR166 increment was observed at early SE stages of differentiation (Chen et al. 2011).

The other two miRNAs that regulate ARFs, miR160 and miR167, would be expected to display auxin-dependent, tissue-specific expression patterns. Interestingly, miR160 was barely detectable at early, but highly expressed during heart- and torpedo-shaped embryonic stages of *Dimocarpus longan* SE (Table 12.2; Lin and Lai 2013). On the other hand, *Larix leptolepis* miR160 showed greater abundance at the cotyledonary embryo stage (Zhang et al. 2012). miR167 levels also increased during cotyledonary and mature embryonic stages for *Citrus sinensis*, *Dimocarpus longan*, *Gossypium hirsutum* and *Larix leptolepis* (Wu et al. 2011; Zhang et al. 2012; Yang et al. 2013; Lin et al. 2015). However, this miRNA showed contrasting behaviour in SE depending on the plant species and in vitro culture conditions. For example, rice miR167 decreased when cells, cultured in the presence of auxins, were transferred to an auxin-free medium (Yang et al. 2006), whereas Longan miR167 was undetectable in a medium containing 2,4-D (Lin and Lai 2013). In cotton and maize, miR167 also exhibited up-regulation in the dedifferentiated tissues (Yang et al. 2013; Alejandri-Ramírez et al. 2018). Whether miR167 participates in the SE process through regulating its targets ARF6/8 in response to external auxin levels remains to be elucidated.

As previously mentioned, miR156 mostly regulates tissue embryogenic potential through its SPL targets. It is required at early zygotic embryogenesis (Nodine and Bartel 2010) and during early SE (Long et al. 2018). However, its levels also progressively increased at later differentiation stages for cotton, Longan and maize SE (Table 12.2). A perfect inverse expression pattern was found for the SPL transcript and miR156 during cotton embryo development (Yang et al. 2013). On the other hand, in maize plant regeneration, miR156 also showed initial increase coincident with its target reduction during the differentiation process (Chávez-Hernández et al. 2015). Such behaviour supports its central role in SE for different plant species.

12.7 Conclusions and Perspectives

SE is a noteworthy model to study early developmental features of embryogenesis, molecular aspects of cell differentiation, and is a powerful tool for plant biotechnology. Exploring the role of different sRNA classes in this process constitutes a promising tool to understand the basis of totipotency as well as to achieve successful plant regeneration through the process. Recent progress of sRNA research in agricultural plants has been emphasized on trait regulation, stress responses and reproduction. Taking into account that SE covers a response of the plant to stressful conditions aiming to preserve its potential to further grow and reproduce in the

future, it represents a unique system to challenge our knowledge on developmental molecular cues. Although *Arabidopsis thaliana* has been a great model for sRNA pathways dissection, it urges to extend this research to diverse economically relevant plants. In this sense, SE represents an excellent model to understand sRNA cell-specific fate, target regulation, responses to phytohormones, stress and differentiation stages. Further exploration of particular to SE sRNA regulatory nodes would provide insights into the development of appropriate tools for crop improvement.

Acknowledgements We acknowledge the financial support from PAPIIT IN214118, PAIP 5000-9118 and CONACYT 238439.

References

- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283:15932–15945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801406200>
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9:841–857. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.6.841>
- Alejandri-Ramírez ND, Chávez-Hernández EC, Contreras-Guerra JL, Reyes JL, Dinkova TD (2018) Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiol Biochem* 122:78–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.013>
- Armenta-Medina A, Lepe-Soltero D, Xiang D, Datla R, Abreu-Goodger C, Gillmor CS (2017) *Arabidopsis thaliana* miRNAs promote embryo pattern formation beginning in the zygote. *Dev Biol* 431:145–151. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.009>
- Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15:2730–2741
- Axtell MJ (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants. *Ann Rev Plant Biol* 64:137–159
- Barbosa ICR, Hammes UZ, Schwechheimer C (2018) Activation and polarity control of PIN-FORMED auxin transporters by phosphorylation. *Trends Plant Sci* 23:523–538. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.009>
- Beauclair L, Yu A, Bouché N (2010) MicroRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J* 62:454–462
- Bologna NG, Voinnet O (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Biol* 65:473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728>
- Borges F, Martienssen RA (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:727–774
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185–1190
- Budak H, Akpinar BA (2015) Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Funct Integr Genomics* 15:523–531
- Cao X, Jacobsen SE (2002) Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12:1138–1144. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00925-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00925-9)

- Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueño MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465:316–321. <https://doi.org/10.1038/nature08977>
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci* 165:61–68. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00127-4)
- Chávez-Hernández EC, Alejandri-Ramírez ND, Juárez-González VT, Dinkova TD (2015) Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front Plant Sci* 6:555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00555>
- Chen CJ, Liu Q, Zhang YC, Qu LH, Chen YQ, Gautheret D (2011) Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biol* 8:538–547
- Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in arabidopsis flower development. *Science* 303:2022–2025
- Chitwood DH, Nogueira FT, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MC (2009) Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev* 23:549–554
- Constabel CP, Yip L, Patton JJ, Christopher ME (2000) Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 124:285–295
- De-la-Peña C, Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, Avilez-Montalvo R, Loyola-Vargas VM (2015) The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Front Plant Sci* 6:635. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00635>
- Ding J, Zhou S, Guan J (2012) Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10:264–275
- Dinkova TD, Alejandri-Ramírez ND (2014) MicroRNA expression and regulation during plant somatic embryogenesis. In: Alvarez-Venegas R, De la Peña C, Casas-Mollano J (eds) *Epigenetics in plants of agronomic importance: fundamentals and applications*. Springer, New York, pp 111–123. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07971-4_7
- Dotto MC, Petsch KA, Aukerman MJ, Beatty M, Hammell M, Timmermans MCP (2014) Genome-wide analysis of leafbladeless1-regulated and phased small RNAs underscores the importance of the TAS3 ta-siRNA pathway to maize development. *PLoS Genet* 10:e1004826. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004826>
- Efroni I, Mello A, Nawy T, Ip PL, Rahni R, Del Rose N, Powers A, Satija R, Birnbaum KD (2016) Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell* 165:1721–1733
- Elhiti M, Tahir M, Gulden RH, Khamiss K, Stasolla C (2010) Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of Brassica genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J Exp Bot* 61:4069–4085
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* 49:631–642
- Elmeer KMS, Hennerty MJ (2008) Observations on the combined effects of light, NAA and 2, 4-D on somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus*) hybrids. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:381–384. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9439-0>
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis-stress-induced remodelling of plant cell fate. *Biochem Biophys Acta* 1849:385–402
- Fei Q, Xia R, Meyers BC (2013) Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 25:2400–2415. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114652>
- Fu FF, Dawe RK, Gent JI (2018) Loss of RNA-directed DNA methylation in maize chromomethylase and DDM1-type nucleosome remodeler mutants. *Plant Cell* 30:1617–1627. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00053>
- Fukui K, Hayashi K (2018) Manipulation and sensing of auxin metabolism, transport and signaling. *Plant Cell Phys* 59:1500–1510. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy076>
- Garrocho-Villegas V, de Jesús-Olivera MT, Quintanar ES (2012) Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant cell culture protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp 173–182

- Ge F, Luo X, Huang X, Zhang Y, He X, Liu M et al (2016) Genome-wide analysis of transcription factors involved in maize embryonic callus formation. *Physiol Plant* 158:452–462. <https://doi.org/10.1111/ppl.12470>
- Ge F, Huang X, Hu H, Zhang Y, Li Z, Zou C et al (2017) Endogenous small interfering RNAs associated with maize embryonic callus formation. *PLoS One* 12:e0180567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180567>
- Grafi G, Ben-Meir H, Avivi Y, Moshe M, Dahan Y, Zemach A (2007) Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Developmental Biology* 306(2):838–846
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10:453–460. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.014>
- He F, Xu C, Fu X, Shen Y, Guo L, Leng M, Luo K (2018) The MicroRNA390 / TRANS-ACTING SHORT INTERFERING RNA3 module mediates lateral root growth under salt stress via the auxin pathway. *Plant Phys* 177:775–791. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01559>
- Henderson IR, Jacobsen SE (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447:418. <https://doi.org/10.1038/nature05917>
- Hisanaga T, Miyashima S, Nakajima K (2014) Small RNAs as positional signal for pattern formation. *Curr Opin Plant Biol* 21:37–42
- Honkanen S, Jones VAS, Morieri G, Champion C, Hetherington AJ, Kelly S et al (2017) The mechanism forming the cell surface of tip-growing rooting cells is conserved among land plants. *Curr Biol* 27:3238–3224. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.062>
- Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muino JM, Angenent GC, Boutilier K (2017) The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 175:848–857. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00232>
- Hrtyan M, Šliková E, Hejátko J, Růžička K (2015) RNA processing in auxin and cytokinin pathways. *J Exp Bot* 66:4897–4912. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv189>
- Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, Van der Winden J, Matzke AJ, Matzke M (2007) RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769:358–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.03.001>
- Ikeuchi M, Iwase A, Sugimoto K (2015) Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* 28:60–67. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.004>
- Jiang K, Zhu T, Diao Z, Huang H, Feldman LJ (2010) The maize root stem cell niche: a partnership between two sister cell populations. *Planta* 231:411–424. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1059-3>
- Jin F, Hu L, Yuan D, Xu J, Gao W, He L, Yang X, Zhang X (2014) Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnol J* 12:161–173. <https://doi.org/10.1111/pbi.12123>
- Joshi M, Sujatha K, Hazra S (2008) Effect of TDZ and 2, 4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 94:85–90. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9390-0>
- Kareem A, Durgaprasad K, Sugimoto K, Du Y, Pulianmackal AJ, Trivedi ZB et al (2015) PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Curr Biol* 25:1017–1030. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.022>
- Kasahara H (2016) Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:34–42. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1086259>
- Kim S, Mochizuki N, Deguchi A, Nagano AJ, Suzuki T, Nagatani A (2018) Auxin contributes to the intraorgan regulation of gene expression in response to shade. *Plant Phys* 177:847–862. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01259>
- Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M (2013) A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Dev Cell* 24:125–132

- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kumar V, Van Staden J (2017) New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiol Plant* 39:194. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>
- Lafos M, Kroll P, Hohenstatt ML, Thorpe FL, Clarenz O, Schubert D (2011) Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during Arabidopsis differentiation. *PLoS Genet* 7:e1002040. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002040>
- Lee C, Clark SE (2013) Core pathways controlling shoot meristem maintenance. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:671–684
- Leyser O (2018) Auxin signaling. *Plant Physiol* 176:465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
- Li T, Chen J, Qiu S, Zhang Y, Wang P, Yang L et al (2012) Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. *PLoS One* 7:e43451
- Lin Y, Lai Z (2013) Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS One* 8:e60337
- Lin Y, Lin L, Lai R, Liu W, Chen Y, Zhang Z et al (2015) MicroRNA390-directed TAS3 cleavage leads to the production of tasiRNA-ARF3/4 during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Front Plant Sci* 6:1119
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 52:133–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03218.x>
- Long JM, Liu CY, Feng MQ, Liu Y, Wu XM, Guo WW (2018) miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *J Exp Bot* 69:2979–2993. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery132>
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77:325–331
- Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho MJ, Scelonge C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J et al (2016) Morphogenic regulators Baby boom and Wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell* 28:1998–2015. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00124>
- Luo YC, Zhou H, Li Y, Chen JY, Yang JH, Chen YQ, Qu LH (2006) Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryonic development. *FEBS Lett* 580:5111–5116
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005) MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell Online* 17:1360–1375. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031716>
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD et al (2010) miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22:1104–1117
- Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet* 15:394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* 62:3713–3725. <https://doi.org/10.1093/jxb/err155>
- Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M (2003) Epigenomic stress response knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J Biol Chem* 278:14985–14995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213219200>
- Miyashima S, Honda M, Hashimoto K, Tatematsu K, Hashimoto T, Sato-Nara K et al (2013) A comprehensive expression analysis of the Arabidopsis microRNA165/6 gene family during embryogenesis reveals a conserved role in meristem specification and a non-cell-autonomous function. *Plant Cell Physiol* 54:375–384

- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328:872–875. <https://doi.org/10.1126/science.1187959>
- Mutte SK, Kato H, Rothfels C, Melkonian M, Wong GK-S, Weijers D (2018) Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *eLife* 7:1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.33399>
- Nagasaki H, Itoh J, Hayashi K, Hibara K, Satoh-Nagasawa N, Nosaka M, Mukouhata M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M et al (2007) The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14867–14871
- Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep* 31:597–620. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z>
- Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Peña C (2013) New insights into somatic embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One* 8:e72160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072160>
- Nobuta K, Lu C, Shrivastava R, Pillay M, De Paoli E, Accerbi M, Arteaga-Vazquez M, Sidorenko L, Jeong DH, Yen Y et al (2008) Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: evidence from deep sequencing in the mop1-1 mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14958–14963. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808066105>
- Nordine MD, Bartel DP (2010) MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev* 24:2678–2692
- Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature* 464(7288):628. <https://doi.org/10.1038/nature08828>
- Pontes O, Costa-Nunes P, Vithayathil P, Pikaard CS (2009) RNA polymerase V functions in Arabidopsis interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway. *Mol Plant* 2:700–710. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp006>
- Radhakrishnan D, Kareem A, Durgaprasad K, Sreeraj E, Sugimoto K, Prasad K (2018) Shoot regeneration: a journey from acquisition of competence to completion. *Curr Opin Plant Biol* 41:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.001>
- Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 49:592–606
- Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant MicroRNAs. *Plant Cell* 25:2383–2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Roosjen M, Paque S, Weijers D (2018) Auxin response factors: output control in auxin biology. *J Exp Bot* 69:179–188. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx237>
- Rubio-Somoza I, Weigel D (2011) MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci* 16:258–264. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.001>
- Sanan-Mishra N, Varanasi SPRM, Mukherjee SK (2013) Micro-regulators of auxin action. *Plant Cell Rep* 32:733–740. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1425-2>
- Santos D, Fevereiro P (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 70:155–161. <https://doi.org/10.1023/A:1016369921067>
- Saze H, Tsugane K, Kanno T, Nishimura T (2012) DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol* 53:766–784. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs008>
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G, Laux T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100:635–644
- Shen Y, Jiang Z, Lu S, Lin H, Gao S, Peng H, Yuan G, Liu L, Zhang Z, Zhao M, Rong T, Pan G (2013) Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 441:425–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.113>

- Si-Ammour A, Windels D, Arn-Boulidoires E, Kutter C, Ailhas J, Meins F, Vazquez F (2011) miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 157:683–691. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180083>
- Singh A, Gautam V, Singh S, Sarkar Das S, Verma S, Mishra V, Mukherjee S, Sarkar AK (2018) Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* 248:545–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2927-5>
- Smith ZR, Long JA (2010) Control of Arabidopsis apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature* 464:423–426. <https://doi.org/10.1038/nature08843>
- Stroud H, Ding B, Simon SA, Feng S, Bellizzi M, Pellegrini M, Wang GL, Meyers BC, Jacobsen SE (2013) Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. *Elife* 2:e00354. <https://doi.org/10.7554/eLife.00354>
- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Plant J* 59:448–460
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* 18:463–471
- Sun Q, Liu X, Yang J, Liu W, Du Q, Wang H, Fu C, Li WX (2018) MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Mol Plant* 11:806–814. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.013>
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci* 17:196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.010>
- Szyrajew K, Bielewicz D, Dolata J, Wójcik AM, Nowak K, Szczygieł-Sommer A, Szwejkowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Gaj MD (2017) MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 8:18
- Tamiru M, Hardcastle TJ, Lewsey MG (2018) Regulation of genome-wide DNA methylation by mobile small RNAs. *New Phytol* 217:540–546. <https://doi.org/10.1111/nph.14874>
- Tanurdzic M, Vaughn MW, Jiang H, Lee TH, Slotkin RK, Sosinski B, Thompson WF, Doerge RW, Martienssen RA (2008) Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biol* 6:e302. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060302>
- Thompson BE, Basham C, Hammond R, Ding Q, Kakrana A, Lee TF, Simon SA, Meeley R, Meyers BC, Hake S (2014) The dicer-like1 homolog fuzzy tassel is required for the regulation of meristematic determinacy in the inflorescence and vegetative growth in maize. *Plant Cell* 26:4702–4717. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132670>
- Valledor L, Meijón M, Hasbún R, Cañal MJ, Rodríguez R (2010) Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *J Plant Physiol* 167:351–357
- Wang JW (2005) Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 17:2204–2216. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033076>
- Wang Y, Zhang T, Wang R, Zhao Y (2018) Recent advances in auxin research in rice and their implications for crop improvement. *J Exp Bot* 69:255–263. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx228>
- Winkelmann T (2016) Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. *Methods Mol Biol* 1359:25–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2
- Wójcik AM, Gaj MD (2016) miR393 contributes to the embryogenic transition induced *in vitro* in Arabidopsis via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta* 244:231–243. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2505-7>
- Wójcik AM, Nodine MD, Gaj MD (2017) miR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02024>
- Wójcik AM, Mosiolek M, Karcz J, Nodine MD, Gaj MD (2018) Whole mount *in situ* localization of miRNAs and mRNAs during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 9:1277. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01277>

- Wójcikowska B, Jaskóła K, Gąsiorek P, Meus M, Nowak K, Gaj MD (2013) LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta* 238:425–440. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1892-2>
- Wu XM, Liu MY, Ge XX, Xu Q, Guo WW (2011) Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* 233:495–505
- Wu XM, Kou SJ, Liu YL, Fang YN, Xu Q, Guo WW (2015) Genome-wide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA- and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. *Plant Biotechnol J* 13:383–394. <https://doi.org/10.1111/pbi.12317>
- Xia R, Xu J, Meyers BC (2017) The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. *Plant Cell* 29:1232–1247. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00185>
- Yamamoto N, Kobayashi H, Togashi T, Mori Y, Kikuchi K, Kuriyama K, Tokuji Y (2005) Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *J Plant Physiol* 162:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.013>
- Yang JH, Han SJ, Yoon EK, Lee WS (2006) Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic Acids Res* 34:1892–1899
- Yang X, Zhang X, Yuan D, Jin F, Zhang Y, Xu J (2012) Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biol* 12:110. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-110>
- Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X (2013) Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 64:1521–1536
- Zemach A, Zilberman D (2010) Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Curr Biol* 20:R780–R785. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.007>
- Zhang H, Zhu JK (2011) RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* 14:142–147. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.003>
- Zhang J, Zhang S, Han S, Wu T, Li X, Li W, Qi L (2012) Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* 236:647–657
- Zhang J, Xue B, Gai M, Song S, Jia N, Sun H (2017b) Small RNA and transcriptome sequencing reveal a potential miRNA-mediated interaction network that functions during somatic embryogenesis in *Lilium pumilum* DC. *Fisch. Front Plant Sci* 8:566
- Zhang JH, Zhang SG, Li SG, Han SY, Li WF, Li XM, Qi LW (2014) Regulation of synchronism by abscisic-acid-responsive small noncoding RNAs during somatic embryogenesis in larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 116:361–370. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0412-1>
- Zhang TQ, Lian H, Tang H, Dolezal K, Zhou CM, Yu S et al (2015) An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell* 27:349–360. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135186>
- Zhang TQ, Lian H, Zhou CM, Xu L, Jiao Y, Wang JW (2017a) A two-step model for de novo activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *Plant Cell* 29:1073–1087. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00863>
- Zhao Y (2018) Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in Adaptation to environmental changes. *Annu Rev Plant Biol* 69:417–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040226>
- Zhu H, Hu F, Wang R, Zhou X, Sze SH, Liou LW et al (2011) *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* 145:242–256