



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regulación de miembros de la familia ARF por sRNAs durante la embriogénesis somática de maíz”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

MAYRA AQUINO LUNA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

[Facultad de Química, UNAM](#)

Dra. Svetlana Shishkova

[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2021



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.

Agradecimientos

Este proyecto de Tesis fue realizado gracias al apoyo financiero de la UNAM, Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN218921.

También se agradece el apoyo complementario del Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9118.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto. Así como al Programa de Apoyo a Estudiantes del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos nacionales.

Gracias al apoyo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química y la asesoría técnica de M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores.

Finalmente, agradezco el uso de Equipos y servicios brindados por la USAII de la Facultad de Química, así como el apoyo técnico de la Dra. Karina Jiménez Durán (microscopía) y Biól. Jorge Herrera Díaz (PCR en tiempo real y digital).

A la memoria de Karen Calderón Valencia

*Lo mejor de este proyecto fue
habernos hecho amigas. Gracias por
enseñarme que aún en los
momentos más difíciles, nunca hay
que dejar de sonreír. Gracias por
inspirarme a ser mejor persona cada
día.*

*Tu luz brillará por siempre en mi
corazón.*

Índice

Resumen	5
Abstract	6
Índice de abreviaturas.....	7
Introducción	9
Maíz.....	9
Reproducción sexual de maíz	10
Embriogénesis cigótica	10
Embriogénesis somática	12
El papel de las auxinas en el desarrollo de las plantas	15
ARF durante el desarrollo	20
ARFs involucrados en la embriogénesis somática	24
Clasificación de sRNAs.....	25
microRNAs.....	26
Trans-acting small interfering RNAs	29
Antecedentes	32
Planteamiento del problema	34
Hipótesis	35
Objetivo general.....	35
Objetivos particulares	35
Materiales y métodos	36
Obtención de tejido.....	36
Diseño de oligonucleótidos.....	37
Histología de embriones de maíz	38
Extracción de RNA	38
Síntesis de cDNA	38
Cuantificación por PCR punto final	40
Cuantificación por PCR digital.....	41
Cuantificación por PCR cuantitativa	42
Curvas de disociación.....	42
Resultados.....	42
Los embriones inmaduros de maíz de 15 DDP inducen masas pro-embriogénicas. .	42
La acumulación de miR156, miR167 y sus blancos durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz es diferencial entre embriones de edad contrastante y poseen una mayor correlación inversa en la desdiferenciación de Ei.....	45

La acumulación de los <i>ZmARF</i> clase I es diferencial y correlaciona inversamente con la de tasiARF3b durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz a partir de Ei.	50
Los callos obtenidos de Ei son embriogénicos y capaces de regenerar plántulas de maíz.	56
Discusión.....	58
Conclusiones.....	69
Perspectivas	69
Referencias.....	70
ANEXO 1. Eficiencia de oligos y condiciones qPCR para cada gen de interés.	78
ANEXO 2. Inducción de masas pro-embriogénicas réplica 2.....	79
ANEXO 3. Tinción mediante verde rápido de Ei y EM réplica 2	80
ANEXO 4. Análisis de integridad de RNA Ei y EM.....	81
ANEXO 5. PCR punto final Ei y EM, genes control.....	82
ANEXO 6. Regulación de los genes <i>ZmARF</i> sRNAs.....	83

Resumen

La embriogénesis somática (ES) es un proceso alternativo a la embriogénesis cigótica mediante el cual se pueden obtener embriones por mecanismos que no requieren un proceso de fusión de gametos. A su vez, la ES es un modelo de gran importancia para el estudio de la totipotencia de células somáticas, así como para comprender los mecanismos celulares y moleculares que rigen la embriogénesis cigótica en plantas. En maíz, la capacidad de producir embriones somáticos depende del genotipo y del explante empleados; únicamente los embriones de 15 días después de la polinización poseen capacidad embriogénica regenerativa. Los perfiles transcripcionales de estos embriones se caracterizan por el enriquecimiento en procesos proliferativos y de división celular. En diversas especies de plantas, se ha visto que los RNAs pequeños (sRNAs) juegan un papel muy importante en la regulación de estos perfiles transcripcionales. Numerosos sRNAs regulan a factores de transcripción involucrados en la ES y, una gran parte de ellos se asocia a procesos de la vía de señalización de auxinas.

Con la finalidad de entender las diferencias que rigen el proceso de inducción de masas pro-embriogénicas (IMP) en embriones con distintas capacidades regenerativas, en este trabajo se analizaron cambios en la acumulación de sRNAs que regulan Auxin Response Factors (ARF) y sus blancos, en una ventana temporal durante la inducción de embriones inmaduros y maduros de maíz. Nuestros resultados sugieren que las vías de regulación sRNAs/ARF se encuentran activas durante la desdiferenciación de Embrión inmaduro (Ei) y Embrión maduro (EM) de maíz. La acumulación de sRNAs y sus blancos cambia durante el proceso de inducción; mientras que para el proceso a partir de Ei hay correlación inversa entre ARFs y sRNAs, esto no ocurre para el explante de EM, sugiriendo que esta regulación postranscripcional es relevante para el proceso de inducción de Callo Embriogénico (CE). Este trabajo nos aportó resultados preliminares sobre las diferencias en la acumulación de sRNAs y ARFs entre ambos procesos de desdiferenciación, con lo cual se espera plantear las bases para estudios futuros sobre la ES en maíz.

Abstract

Somatic Embryogenesis (SE) is an alternative process to Zygotic Embryogenesis by which embryos can be obtained through mechanisms that do not require a fusion of zygotes. Additionally, SE is an important model to study somatic cell totipotency and understand the cellular and molecular mechanisms that underlie plant zygotic embryogenesis. In maize, the ability to produce somatic embryos depends on the genotype and explant; only Immature Embryos of 15 days after pollination can embryogenically regenerate plants. The transcriptional profile of these embryos is characterized by the enrichment of proliferative and cell division processes. Small RNAs (sRNAs) play a critical role in the regulation of these transcriptional profiles in many plant species; numerous sRNAs regulate transcription factors (TF) involved in SE and associated to the auxin-signaling pathway.

In order to understand the differences underlying the induction of embryogenic masses from embryos with different regenerating capacities, we analyzed the changes in the accumulation of sRNAs that regulate the Auxin Response Factors (ARF), as well as their targets, in a temporary period during the immature and mature embryo induction. Our results demonstrated that the sRNA/ARF regulatory pathways are active during the dedifferentiation of maize Immature Embryos (IE) and Mature Embryos (ME). The accumulation of both sRNAs and their targets change during the induction process, showing an inverse correlation between ARFs and sRNAs only during the induction of IEs, but not during the induction of MEs. These results suggest that post-transcriptional regulation is relevant during the induction of Embryogenic Callus (EC).

Our study provided preliminary results of the differences between sRNA and ARF accumulation in both dedifferentiation processes, setting the basis for future maize SE studies.

Índice de abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABP1	AUXIN BINDING PROTEIN1
AD	Dominio de activación
AFB	AUXIN-SIGNALING-F-BOX
AGO	ARGONAUTA
AP2	APETALA 2
ARF	Factores de Respuesta a Auxina
ARR	AUXIN RESPONSE REGULATOR
Aux/IAA	AUXIN INDOLE ACETIC ACID
AUX/LAX	AUXIN1/LIKE-AUX1
AuxRE	Elementos de respuesta a auxinas
BA	Benciladenina
bHLH	basic helix-loop-helix
CE	Callo embriogénico
CI	Correlación inversa
CNE	Callo no embriogénico
CTD	Dominio carboxilo terminal
DBD	Dominio de unión a DNA
DCL1	DICER-LIKE1
DDI	Días después de inducción
DDP	Días después de la polinización
dsRNA	RNA de doble cadena
Ei	Embrión inmaduro
EM	Embrión disectado de semillas secas
ES	Embriogénesis somática
GH	GRETCHEN HAGEN
hc-siRNAs	siRNAs heterocromáticos
HEN1	HUA ENHANCER1
hpRNAs	Hairpin RNAs
HYL1	HYPONASTIC LEAVES1
IAA	Ácido indol acético
IMP	Inducción de masas pro-embriogénicas
LBL1	LEAFBLADELESS 1
LEC	LEAFY COTYLEDON
LRNAs	RNAs largos
miRNAs	microRNAs
MS	Medio Murashige and Skoog
N6I	Medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D
N6P	Medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D y 6-BA
NAA	Ácido naftalen acético
NAT-siRNAs	siRNAs naturales antisentido
ncRNA	RNAs no codificantes
PGP	<i>P</i> -GLYCOPROTEIN
PIN	PIN-FORMED
PLT	PLETHORA
pri-miRNA	miRNA primario
qPCR	PCR cuantitativa
RD	Dominio de represión
RDR6	RNA polimerasa dependiente de RNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa
SAM	Meristemo apical del tallo

SAUR	SMALL AUXIN-UP RNA
SCF	SKP-Cullin-F-box
SE	SERRATE
siRNAs	RNAs pequeños interferentes
snRNA	RNA pequeño nucleolar
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE
sRNAs	RNAs pequeños
tasiRNAs	trans-acting small interfering RNAs
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
WOX	WUSHEL-RELATED HOMEBOX
WUS	WUSCHEL

Introducción

Maíz

Zea mays, comúnmente conocida como maíz, es una planta perteneciente a la familia Poaceae o gramíneas. El maíz se originó hace 55-70 millones de años en las regiones que ahora abarcan México, Centro y Sudamérica. Hasta el momento no se ha identificado un ancestro directo del maíz, sin embargo, la especie más cercana es el teocintle (*Zea perennis*). El maíz es una planta anual, y a nivel global, es la planta con mayor producción de grano, seguida del trigo y el arroz. En 2013, se produjeron alrededor de 800 millones de toneladas en el mundo, representando el 32% de la producción total de cereales. Los granos de maíz sirven como alimento, además de ser útiles en la elaboración de productos industriales como espumas biodegradables, plásticos y adhesivos. Por otro lado, el rastrojo sirve como forraje y para la producción de biocombustibles y diversos químicos (Scott & Emery, 2016).

El maíz es una planta monoica, es decir, posee los órganos reproductivos femeninos y masculinos en el mismo individuo. En la parte superior del tallo se localiza la panícula, la cual es una inflorescencia ramificada que contiene las flores masculinas (Strable and Scanlon, 2009). Las flores femeninas se sitúan entre las ramas laterales y el tallo, localizándose en la parte media de este, a cinco o seis nodos por debajo de la panícula. Las flores femeninas se encuentran dispuestas en una ramificación lateral, cilíndrica y envuelta por hojas falsas, denominada mazorca. Los estilos de cada flor sobresalen de las hojas falsas o brácteas, formando las sedas. Cada flor fecundada formará un grano que estará agrupado en torno a un eje grueso (Levitus et al., 2010). Tanto la separación física de las flores masculinas y femeninas, como que la mazorca y panícula se pueden cubrir, facilitan realizar polinizaciones controladas lo cual es útil tanto para prevenir que la mazorca se contamine con polen así como para facilitar la recolección de polen (Strable and Scanlon, 2009).

Reproducción sexual de maíz

La reproducción sexual está acompañada de la unión de genomas de los padres que resulta de la fertilización: la fusión de un gameto femenino y masculino que forma un cigoto. En las plantas angiospermas, a diferencia de los animales, dos células espermáticas no móviles se encuentran encapsuladas en un grano de polen. Estas células son transportadas a través de un tubo que se extiende del grano de polen hasta un saco embrionario o gametofito femenino. En la mayoría de las angiospermas, el saco embrionario posee gametos femeninos dimórficos: una célula haploide (n) u óvulo, y una célula central homodiploide ($2n$). Además de los gametos femeninos, el saco embrionario contiene células sinérgidas, las cuales secretan quimioatrayentes que guían el crecimiento del tubo polínico hacia los gametos femeninos no fertilizados (Shin et al., 2020). La polinización del maíz consiste en la llegada de un grano de polen a los estigmas, los cuales son conductos largos y estrechos, que terminan cada uno en la base de un óvulo. La polinización continúa al llevarse a cabo un proceso denominado "doble fertilización", el cual es característico de las angiospermas. Una de las dos células espermáticas del grano de polen fertilizará el óvulo, originando un cigoto diploide ($2n$) que formará el embrión. La segunda célula espermática se combina con la célula central, generando el endospermo ($3n$). El endospermo nutre al embrión durante su desarrollo y en el caso de monocotiledóneas, mantiene los nutrientes necesarios para la geminación (Chettoor et al., 2016; Pessino & Ortiz, 2010). En el caso de las dicotiledóneas, existen plantas cuyas semillas poseen endospermo, como el tabaco, y plantas cuyas semillas carecen de este, como el frijol. En las semillas sin endospermo este tejido es completamente reabsorbido antes de que el desarrollo de la semilla finalice y los compuestos energéticos necesarios para la germinación son almacenados en los cotiledones (Khan et al., 2012).

Embriogénesis cigótica

El desarrollo embrionario en plantas es un proceso complejo que incluye una serie de eventos coordinados. Los embriones maduros de maíz consisten en un eje embrionario diferenciado, el cual se rodea de un único cotiledón llamado

escutelo. Un embrión maduro también incluye un primordio de raíz y algunas hojas (Fontanet & Vicent, 2008; Vollbrecht, Reiser & Hakem 2000) (Figura 1). A diferencia de la embriogénesis en *Arabidopsis*, en donde las divisiones celulares durante este proceso se llevan a cabo en orientaciones perfectamente establecidas, en la embriogénesis de maíz únicamente las primeras divisiones celulares son predecibles. Gracias a estas características distintivas, el maíz es un modelo para el estudio de la embriogénesis en plantas monocotiledóneas (Fontanet & Vicent, 2008).

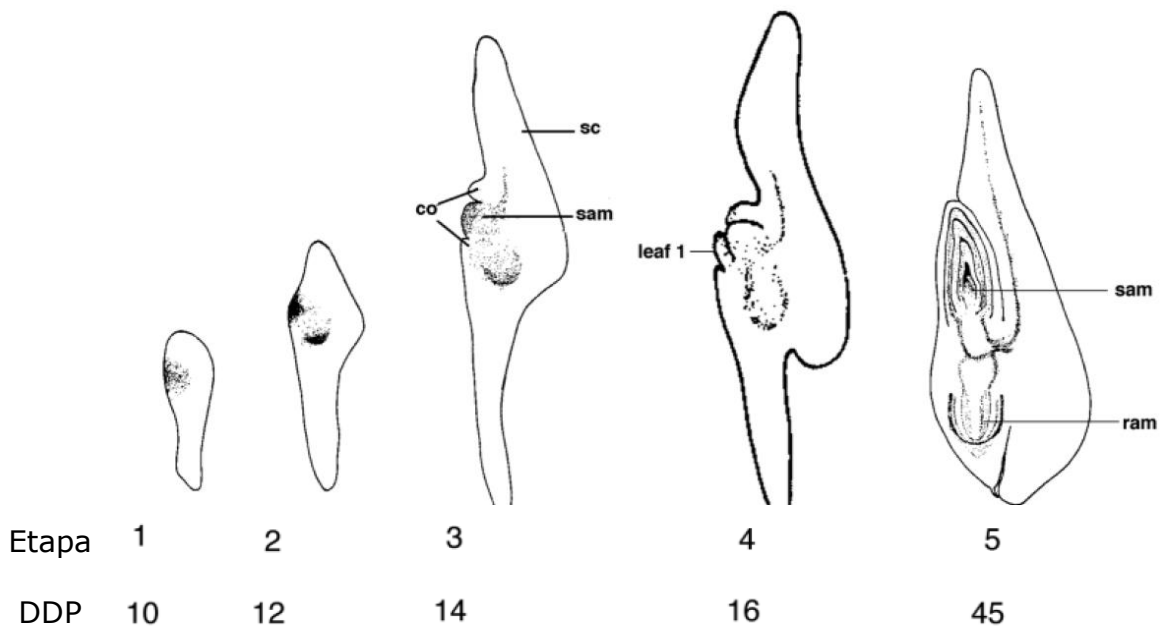


Figura 1. Ilustración esquemática de las etapas de la embriogénesis en maíz. La etapa 5 no está a escala. DDP, días después de la polinización, co, coleóptilo; sam, meristemo apical del tallo; sc, escutelo; ram, meristemo apical de la raíz. Tomada y modificada de Vollbrecht, E., Reiser, L., & Hake, S. (2000).

Dentro de la semilla, el embrión se encuentra embebido en el endospermo, con la raíz primaria dirigida hacia el extremo unido al olote. El escutelo es largo, reposa directamente sobre el endospermo y envuelve parcialmente el eje embrionario. Se han descrito ocho etapas de desarrollo embrionario en maíz, la primera etapa se denomina etapa de transición, en la cual se diferencian el suspensor y el embrión. La siguiente etapa es la coleoptilar, en la cual el escutelo se desarrolla y comienza a distinguirse el ápice del tallo. En esta etapa, además, comienza a surgir un primordio coleoptilar. Las siguientes seis etapas son

denominadas de acuerdo con el número de primordios de hojas; el escutelo comienza a alargarse y se puede distinguir un surco por donde el meristemo apical del tallo (SAM) protruye. El primer primordio de hoja se sitúa del lado opuesto al escutelo y cada primordio subsecuente se forma del lado opuesto a su predecesor (Emons & Kieft, 1995).

Embriogénesis somática

De manera alternativa a la embriogénesis cigótica es posible obtener embriones por mecanismos que no requieren un proceso de fusión de gametos, a este proceso se le denomina embriogénesis somática (ES).

La ES es un modelo importante para el estudio de la totipotencia de las células somáticas y para elucidar los mecanismos celulares y moleculares de la embriogénesis cigótica en plantas. Los embriones somáticos se pueden obtener a partir de diferentes tipos celulares diferenciados (óvulos, células embrionarias, células de las hojas) en respuesta a estímulos exógenos o endógenos. Debido a esto, la ES es una herramienta biotecnológica muy importante para la propagación y el mejoramiento genético de las plantas (Su et al., 2020).

La ES representa una vía única de desarrollo que incluye una gran cantidad de eventos característicos: desdiferenciación de células, activación de la división celular, reprogramación de la fisiología celular, del metabolismo y de los patrones de expresión de genes. La inducción de la ES parece consistir en la terminación del programa genético existente en el explante y su reemplazo por un patrón de expresión genética embrionaria, con el cual las células del explante darán origen a embriones somáticos (Jakubekova et al., 2011).

De manera general, la ES requiere de la aplicación de auxinas exógenas, lo cual ocasiona un cambio en el balance de auxinas endógenas, provocando cambios en la expresión génica y estimulando las divisiones celulares; el resultado de estas divisiones es la formación de agregados celulares conocidos como "callos", los cuales proliferan y participan como intermediarios en la transición del explante original y la obtención de embriones somáticos (Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Merkle et al., 1995). Después, la reducción de la concentración

de auxinas en el medio de cultivo induce la diferenciación de las células desdiferenciadas a embriones somáticos. Si se aplica el tratamiento adecuado hormonal, los embriones somáticos pueden regenerar a una planta completa (Fontanet & Vicent, 2008).

Un embrión somático puede derivar de una sola célula (ES directa) o de múltiples células (ES indirecta). En el caso del maíz, la ES se puede llevar a cabo de forma indirecta. Este mecanismo comienza con la formación de callo embriogénico (CE), una masa de células embrionarias que tiene el potencial de adquirir totipotencia. Es posible que, de esta masa de células, sólo algunos tipos celulares específicos sean los únicos capaces de adquirir la totipotencia para desarrollarse en un embrión somático. En *Arabidopsis*, el callo que da lugar a raíces y tallos adventicios posee identidad de raíz lateral y deriva de células del periciclo. Mientras que el CE se forma a partir tanto de células del periciclo y células no pericíclicas (Su et al., 2020). Bajo las condiciones apropiadas de inducción, las células somáticas diferenciadas pueden convertirse en células totipotentes que puedan llevar a cabo ES. Esto se puede observar por la formación ectópica de embriones somáticos en respuesta a varios estímulos. Las hormonas auxina y citocinina son reguladores clave para inducir ES; en algunos casos el ácido abscísico (ABA) y el etileno también pueden inducir embriones somáticos. Otras condiciones de estrés también son usadas para promover la ES, como el estrés osmótico, estrés por temperatura, los metales pesados y la radiación UV. La expresión ectópica de genes como *WUSCHEL (WUS)*, *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* y *LEC2* también puede reprogramar células somáticas al estado totipotente e inducir ES en ausencia de auxina exógena. Por lo tanto, se cree que la iniciación de la ES requiere de una señal inductiva que ocasione que una célula somática cambie su destino y se vuelva totipotente. En muchos tipos de ES, el estímulo inductivo promueve la biosíntesis endógena de auxinas, ocasionando un aumento en los niveles de auxinas e induciendo la totipotencia en células somáticas. De esta manera, las auxinas actúan como un inductor común en la reprogramación de células somáticas a células totipotentes o pluripotentes (Su et al., 2020).

El desarrollo de embriones somáticos recapitula algunos eventos morfológicos y del desarrollo que ocurren durante la embriogénesis cigótica; estos crecen a partir de pequeños agregados celulares 5 a 7 días después de ser subcultivados a un medio sin auxinas (Figura 2). En algunos casos se observa una estructura similar a un suspensor, y 2 a 3 días después la etapa globular es seguida por la etapa de corazón. La transición entre estas dos etapas es evidente gracias al desarrollo de los dos cotiledones, la elongación del hipocótilo y el comienzo del desarrollo de la radícula. Los procesos anteriores continúan a través de las etapas de torpedo y plántula, y aproximadamente 3 semanas después de la inducción, se pueden identificar plántulas con cotiledones verdes, hipocótilos elongados y radículas (Zimmerman, 1993).

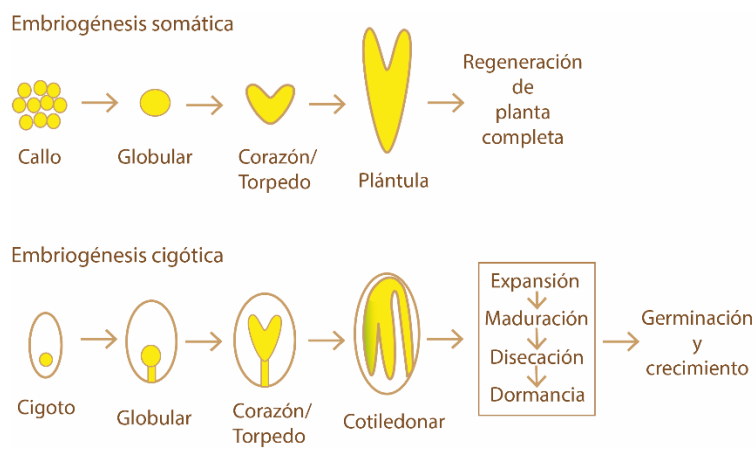


Figura 2. Comparación entre embriogénesis somática y cigótica. Tomada y modificada de J. L. Zimmerman, 1993.

Sin embargo, este modelo presenta algunas limitaciones, pues las plantas que han sido propagadas mediante esta técnica muestran diversos grados de capacidad embriogénica. Esta característica depende del tipo de tejido empleado, la fase de desarrollo del explante y del genotipo de la planta (Zimmerman, 1993; Armstrong & Green, 1985).

El papel de las auxinas en el desarrollo de las plantas

Para la iniciación y propagación de callos embriogénicos se usan algunas fitohormonas que regulan la reprogramación del desarrollo. Entre estos reguladores destacan las auxinas y citocininas (Jakubekova et al., 2011).

Las auxinas son un grupo importante de fitohormonas que ejercen múltiples funciones en los cambios que ocurren durante el ciclo de vida de una planta. El ácido indol acético (IAA) es la auxina endógena predominante en plantas, aunque existen muchos derivados sintéticos que son también muy usados a nivel agronómico, entre los cuales destaca el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 3). El efecto de las auxinas en el crecimiento de las plantas depende del tipo de auxina aplicada y su concentración. Estas hormonas influyen en diversos procesos como la división celular, la elongación de las células y la diferenciación (Teale et al., 2006).



Figura 3. Estructura química de las auxinas. A) 2,4-diclorofenoxiacético. B) Ácido indol acético

El 2,4-D comparte similitudes estructurales con el IAA (Figura 3). Sin embargo, a diferencia del IAA, el cual es rápidamente inactivado vía conjugación y degradación, los efectos del 2,4-D son más duraderos debido a su alta estabilidad dentro de las células vegetales. A su vez, el transporte polar de célula a célula es distinto entre ambas moléculas; si bien ambas auxinas pueden ser transportadas al interior de la célula mediante los acarreadores de influjo AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX) y exportadas a través de los acarreadores de eflujo PIN-FORMED (PIN) y *P*-GLYCOPROTEIN (PGP), el transporte del 2,4-D a través de los PIN es más limitado, resultando en una mayor acumulación de 2,4-

D dentro de la célula. Otra diferencia entre el IAA y el 2,4-D es que este último posee una baja afinidad por el receptor de IAA, AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) (Song, 2014; Wójcik et al., 2020). Sin embargo, al igual que el IAA, una vez dentro de la célula, el 2,4-D se une al receptor TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) /AUXIN-SIGNALING-F-BOX PROTEINS (AFB), el cual es parte del complejo de ubiquitin ligasas denominado SKP-Cullin-F-box (SCF) ($SCF^{TIR/AFBs}$) (Figura 4). La unión de las auxinas a su receptor ocasiona un incremento en la afinidad de las $SCF^{TIR/AFBs}$ por sus sustratos, las proteínas AUXIN INDOLE ACETIC ACID o Aux/IAA. De esta manera, las Aux/IAA son ubiquitinadas y enviadas a degradación por el proteasoma. Las proteínas Aux/IAA son proteínas nucleares inestables, las cuales se unen e inhiben a la familia de Factores de Respuesta a Auxina (ARF, por sus siglas en inglés). Cuando las proteínas Aux/IAA son degradadas en presencia de auxinas, los ARF son liberados y ocasionan cambios en la expresión de los genes cuyos promotores contienen sitios de unión para estos factores de transcripción. Los ARF se unen a los elementos de respuesta a auxinas (AuxRE) que consisten en la secuencia 5' TGTCTC 3'. Este elemento se encuentra presente en las regiones reguladoras de numerosos genes que son regulados por auxinas; de esta manera los ARFs son capaces de mediar la expresión génica en respuesta a la presencia de estas hormonas (Figura 4) (Teale et al., 2006; Rademacher et al., 2011).

Las proteínas ARF contienen un dominio de unión a DNA (DBD) en su región amino terminal, una región intermedia que funciona como dominio de activación (AD) o represión (RD), y un dominio carboxilo terminal de dimerización (CTD). Este último es similar a los dominios en el C terminal de las proteínas Aux/IAA, el cual es un dominio de interacción proteína-proteína que media la homo y heterodimerización de los ARFs con miembros de esta familia, así como con las Aux/IAA (Figura 5) (Xing et al., 2011).

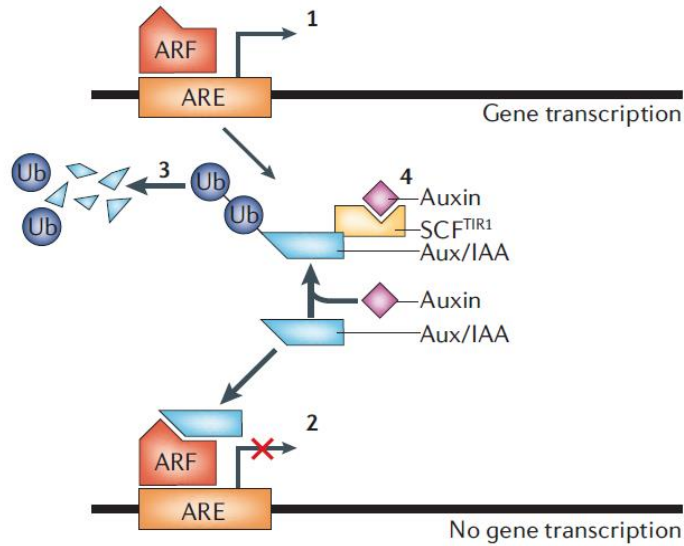


Figura 4. Señalización de auxinas mediada por SCF^{TIR1}. Los miembros de la familia ARF se unen a los elementos ARE que se encuentran en las regiones reguladoras de los genes de respuesta a auxinas y median su transcripción (paso 1). Los Aux/IAA son proteínas de respuesta temprana a auxinas que se unen a los ARFs e inhiben su actividad (paso 2). Los Aux/IAA son ubiquitinados (Ub) por una SCF E3 ubiquitin ligasa y degradados por el proteasoma (paso 3). La proteólisis de los Aux/IAA es estimulada por la unión de las auxinas a TIR1, un componente de la SCF E3 ligasa, la cual reconoce específicamente las proteínas que deben ser degradadas (paso 4). Tomada de Teale et al., 2006.

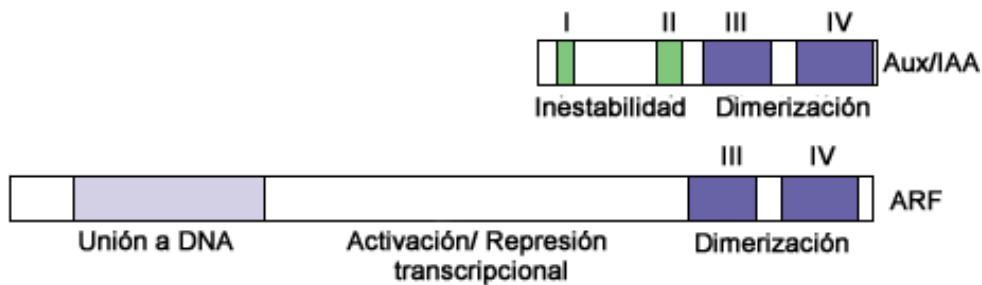


Figura 5. Estructura de las proteínas Aux/IAA y ARF. Se muestran los dominios conservados que están presentes en la mayoría de las proteínas Aux/IAA o ARF. Los dominios III y IV de los ARF son similares a los dominios correspondientes de las proteínas Aux/IAA. La región intermedia de algunos ARF puede activar la transcripción. Algunas proteínas Aux/IAA y ARF pueden carecer de uno o más dominios conservados. Por ejemplo, AtIAA20 carece del dominio II, y AtARF3 carece los dominios III y IV. Tomada y modificada de Reed, 2001.

Con base en la composición de aminoácidos en sus regiones intermedias, se ha propuesto que los ARF pueden ser clasificados como activadores o represores

(Mallory et al., 2005). Los represores transcripcionales AtARF1-4 y 9 poseen regiones intermedias ricas en Pro-Ser-Thr, mientras que los activadores transcripcionales AtARF5-8 poseen en abundancia Gln-Leu-Ser. En este sentido, el mecanismo de respuesta a auxinas antes descrito, reconocido como la forma canónica de respuesta, describe a los ARF activadores. Sin embargo, recientemente se ha propuesto un mecanismo alternativo mediante el cual se puede llevar a cabo la regulación transcripcional de sus blancos. Esta respuesta no canónica se ha estudiado para el represor AtARF3, el cual es considerado un ARF atípico debido a que no interactúa con los represores Aux/IAA (Simonini et al., 2018). AtARF3, también conocido como ETTIN, posee un dominio C-terminal intrínsecamente desordenado específico a este factor de transcripción llamado dominio ES (ETT-Specific) (Figura 6), mediante el cual podría unir directa o indirectamente auxinas, de forma dosis dependiente. Este dominio posee cinco motivos lineales cortos (SLiMs) altamente conservados, mediante los cuales podría interactuar con importinas (NLS), cinasas (parche de serinas) u otros factores de transcripción. Entre los factores de transcripción propuestos para su heterodimerización se encuentran los pertenecientes a las familias bHLH, HOMEODOMAIN, AP2-DOMAIN y YABBY. Esta interacción podría generar un "pocket" de unión a auxinas en la interface de heterodimerización o bien, de forma alostérica (Simonini et al. 2018).

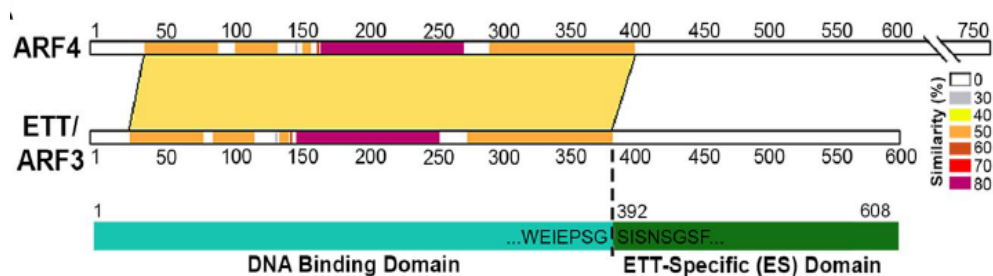


Figura 6. Alineamiento entre AtARF3 y su homólogo más cercano, AtARF4. La escala de colores indica el porcentaje de similitud. En la parte inferior se representa el límite del dominio de unión a DNA de AtARF3 (cian) y el dominio ES (verde oscuro). Tomada de Simonini et al., 2018.

La capacidad de los ARF de dimerizar con las proteínas Aux/IAA u otras proteínas a través de sus dominios III/IV, como es el caso de los AtARF7 y 6 que interactúan con los factores transcripcionales MYB77 y BIGPETAL respectivamente, podría impactar en su actividad activadora o represora (Rademacher et al., 2011). Además, esta vía de señalización se vuelve más compleja si consideramos que los Aux/IAA pueden activar o inhibir la respuesta a auxinas, dependiendo del Aux/IAA o el tejido en el que se expresa. Por ejemplo, las mutantes de ganancia de función *axr2-1* y *shy2-2*, generalmente ocasionan fenotipos de una reducción en la respuesta a auxinas, mientras que la mutante de ganancia de función *axr3-1*, ocasiona algunos fenotipos de hipersensibilidad a auxinas, como la formación de raíces adventicias (Reed, 2001).

A pesar de poseer diferente actividad transcripcional, algunos ARFs podrían tener una función redundante. Esto se vio en triples mutantes de los AtARF1,2 (represores) y AtARF6 (activador), lo cual ocasiona defectos en el desarrollo embrionario en comparación a las dobles mutantes (Rademacher et al., 2011). Por lo tanto, la clasificación de los ARF como activadores o represores no debe ser tomada como absoluta, estos pueden tener diversas funciones dependiendo de su contexto (Mallory et al., 2005; Rademacher et al., 2011).

Los ARF se encuentran ampliamente distribuidos en una gran cantidad de especies. En Arabidopsis se han identificado 23 proteínas pertenecientes a esta familia, mientras que en arroz existen 25 miembros. Estudios de divergencia génica han revelado que la mayoría de los OsARFs están relacionados a los AtARFs. Mientras tanto, en maíz existen 34 miembros de la familia ARF y todos poseen un dominio N-terminal correspondiente al DBD de los AtARFs (Xing et al., 2011; Grassius.org, 2011).

Los ARFs en maíz se clasifican en seis clases de acuerdo con su similitud a los ARFs en Arabidopsis (Figura 7): Clase I (AtARF3/4-like), II (AtARF10/16/17-like), III (AtARF1/2-like), IV (AtARF5-like), V (AtARF6/8-like) y VI (AtARF7/19-like).

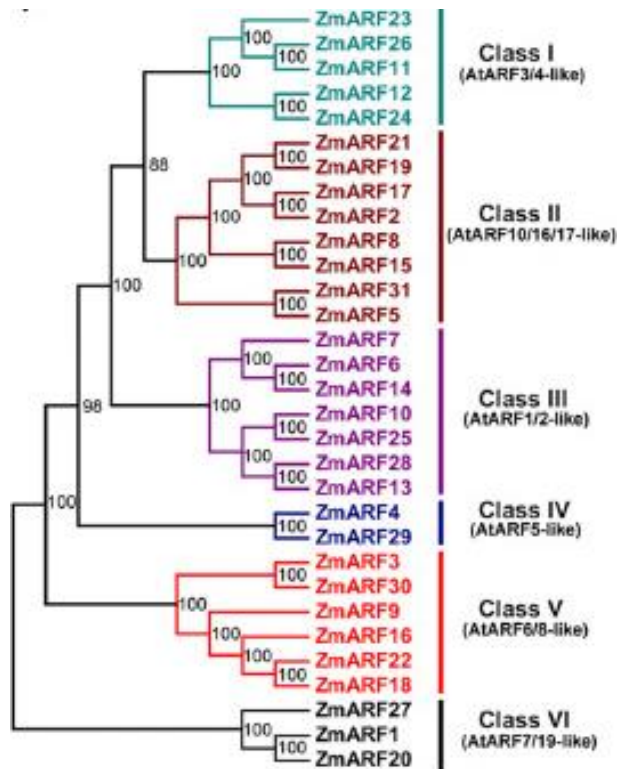


Figura 7. Relación filogenética entre las proteínas ZmARF. Las clases se indican con distintos colores. Tomado de Xing et al., 2011.

ARF durante el desarrollo

Dependiendo del sitio donde las auxinas se acumulen pueden ocurrir distintas respuestas, y esto ocasiona dudas de cómo se genera una respuesta específica. Es posible que todos los componentes involucrados en la respuesta a auxinas hayan diversificado y sean usados en combinaciones distintas (Rademacher et al., 2011). Por ejemplo, una misma concentración de auxinas puede promover la expansión celular en hipocótilos pero inhibir la elongación y promover la división celular en el meristemo apical de la raíz (RAM) (Overvoorde et al., 2010).

Muchos procesos llevados a cabo durante la embriogénesis son dependientes de la correcta actividad de los ARF. En Arabidopsis, la regulación transcripcional de los ARF genera un patrón complejo de su expresión durante las etapas octante, globular y de corazón. Los ARF1/2/9/13 y ARF6 son importantes para el desarrollo adecuado del suspensor, mientras que los ARF1/2, ARF5, ARF6 y ARF7

tienen un papel en las etapas subsecuentes del desarrollo embrionario. Los *AtARF12/14/15/20/23* y *AtARF17*, se expresan en el endospermo, mientras que los demás ARF (a excepción de los *ARF8/16* y *19*), se expresan en el embrión en alguna etapa de su desarrollo (Figura 8, A) (Rademacher et al., 2011).

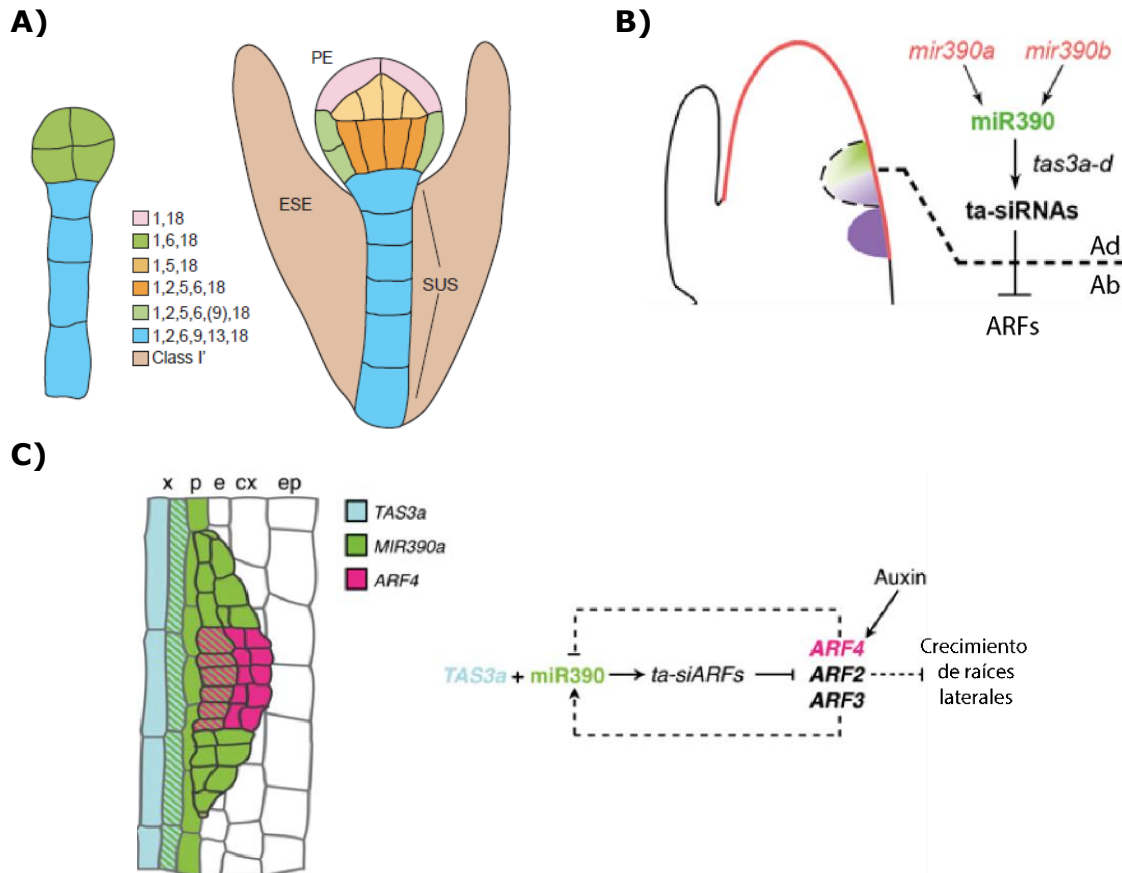


Figura 8. Representación esquemática de los patrones de expresión de los ARF durante el desarrollo. A) Etapas octante (izq) y globular (der) del desarrollo embrionario; cada combinación única de ARFs corresponde a un color. PE, proembrión; SUS, suspensor; ESE, endospermo. **B)** Establecimiento de la polaridad de las hojas en maíz; los precursores de *mir390* se acumulan en la capa L1 del SAM (rojo), mientras que *mir390* maduro (verde) se encuentra en las capas L1 y L2, únicamente en el lado adaxial de la hoja incipiente, restringiendo ahí la síntesis de los tasiRNAs. Los tasiR-ARFs se desplazan del lado adaxial al abaxial delimitando a sus ARF blancos mediante un gradiente de degradación en el lado abaxial. **C)** Primordio de raíz lateral; se indican las capas celulares de la raíz primaria (x, xilema; p, periciclo; e, endodermis; cx, cortex; ep, epidermis). *TAS3a* se acumula en la vasculatura, *miR390* en el xilema, el periciclo y en la base y costados del primordio. La retroalimentación positiva de los ARF sobre *miR390* apoya un modelo homeostático en el cual la acumulación de *miR390* y los ARF se encuentran altamente regulada, mientras que la represión mutua de *miR390* y *ARF4* refuerzan el patrón de expresión de *miR390* al removerlo del centro del primordio (Rademacher et al., 2011.; Nogueira et al., 2009; Marin et al., 2010).

Los ARF de la clase I regulan al gen *WUSCHEL* (*WUS*), el cual codifica una proteína que es crítica para el establecimiento del SAM y el mantenimiento del meristemo floral. AtARF3 reprime la expresión de *WUS* y determina el meristemo floral. AtARF3 se expresa en órganos vegetativos y reproductivos en desarrollo, y se puede detectar en células que dan lugar a nuevos meristemos florales en el meristemo de las inflorescencias (Liu et al., 2014). Otra función del AtARF3 es el establecimiento de la identidad abaxial-adaxial durante el desarrollo de hojas. Este proceso involucra además a los RNAs pequeños o sRNAs. *AtARF3* se transcribe en toda la hoja, sin embargo, sus transcritos y los de su homólogo *AtARF4* se encuentran restringidos al lado abaxial de la hoja gracias a la acción de los trans-acting small interfering RNAs (tasiRNAs) conocidos como tasiARFs (Figura 8, B) (Nogueira et al., Dotto et al., 2014). Estos ARF, junto con los tasiRNAs y los elementos implicados en su biogénesis, también regulan el crecimiento de raíces laterales (Figura 8, C) (Marin et al. 2010).

Se ha propuesto que los ARF también regulan los genes *LEAFY COTYLEDON* (*LEC*). Los *LEC* tienen un papel importante en el control de la morfogénesis y las fases de maduración durante la embriogénesis cigótica. En particular, se ha identificado un AuxRE en la región promotora del gen *LEC2*. *LEC2* codifica una proteína que tiene un dominio B3 específico de plantas, el cual se une a un motivo RY altamente conservado y regula la expresión de genes específicos de la embriogénesis cigótica. *LEC2* estimula la expresión de los genes *YUC1*, *YUC4* y *YUC10*, los cuales codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de auxinas (Stone et al., 2008), de esta manera *LEC2* contribuye a la inducción de la ES mediante el incremento de los niveles de auxinas endógenas, los cuales resultan en la activación de los genes de respuesta a auxinas que operan durante este proceso. Entre los ARF que potencialmente regulan a *LEC2* se encuentran los ARF de las clases I (AtARF3/4-like) y V (AtARF6/8-like) (Nowak and Gaj, 2016).

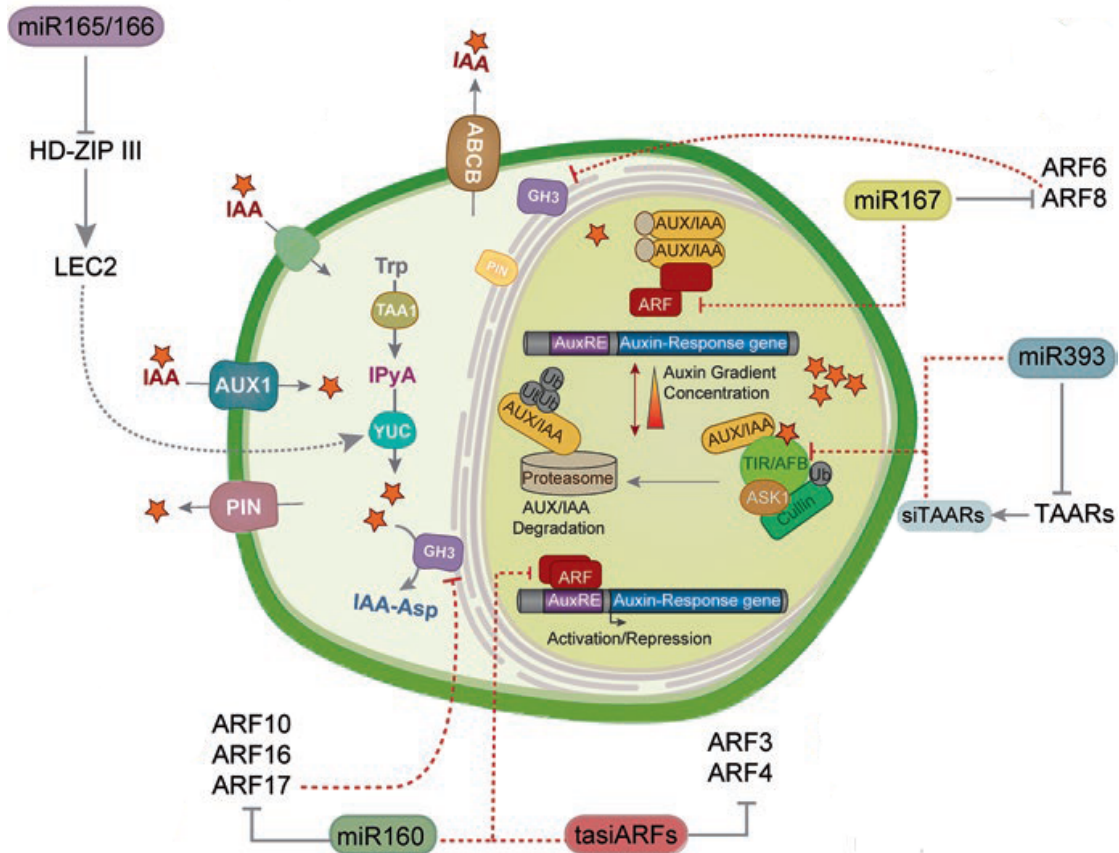


Figura 9. Regulación de las vías de señalización por auxinas. Imagen representativa de la vía principal de transducción de señales por auxinas en Arabidopsis. miR165/166 afectan indirectamente la biosíntesis de IAA al reprimir los factores de transcripción HD-ZIP III los cuales son necesarios para promover la expresión de LEC2 and YUC. Los ARF regulan los genes *GH*, los cuales conjugan Asp u otros aminoácidos a las auxinas. miR393 reprime la expresión de TAAR y promueve la generación de siRNAs derivados de TAAR-durante la formación de cotiledones. (Tomado y modificado de López-Ruiz et al., 2019b).

Por otro lado, los AtARF6/8-like ejercen su actividad en respuesta a auxinas mediante la activación de los genes *GRETCHEN HAGEN* (*GH*). Estas proteínas son IAA-amido sintetisas, las cuales se encargan de conjugar Asp u otros aminoácidos a las auxinas, mediando así su degradación (Figura 9) (Guilfoyle and Hagen, 2007). Otro grupo de genes que son blanco de los AtARF6/8 son los *SMALL AUXIN-UP RNA* (*SAUR*) y los genes *IAA3* e *IAA4* en tejidos florales (Nagpal et al 2005). La función principal de las proteínas SAUR es la inducción de la elongación celular, pero algunas también están involucradas en la senescencia de hojas o la división celular (Stortenbeker and Bemer, 2018). En cuanto a las proteínas IAA3 y 4, es posible que estas dimericen con los AtARF6

y 8 e inhiban su actividad promotora de la expresión génica, integrando así un mecanismo de retroalimentación negativa (Nagpal et al., 2005).

ARFs involucrados en la embriogénesis somática

Los transcritos que codifican a los ARF se encuentran altamente representados en los transcriptomas de la ES de Arabidopsis, trigo, algodón, café, maíz, entre otras especies. Los perfiles de expresión de estos genes son muy diversos y un mismo gen puede estar regulado positiva o negativamente dependiendo del organismo. La diversidad de los patrones de expresión de los ARF refleja la complejidad de la regulación transcripcional de estos genes, que se encuentra finamente regulada por numerosos factores incluyendo el estado hormonal de un tejido (Wójcik et al., 2020).

Aunque los estudios funcionales de genes específicos de la vía de señalización de auxinas durante la ES son limitados, en Arabidopsis se logró demostrar que mutantes *knock-out* o sobreexpresoras de algunos ARF, presentan defectos en su capacidad embriogénica. En el estudio anterior, se identificó a los AtARF1/2/3/5/6/8 y 11 como posiblemente involucrados en la inducción de la ES (Wójcikowska and Gaj, 2017).

De manera similar a la embriogénesis cigótica, ARF5 (MONOPTEROS) podría regular diversos aspectos de la ES. Mediante la regulación de *PHB* y *LEC2*, ARF5 podría controlar la vía de biosíntesis de auxinas TAA1-YUC que opera durante la ES. Otra posible función de ARF5 podría ser la regulación de los genes PIN, los cuales controlan el transporte polar de auxinas durante el desarrollo. Esto debido a que plantas mutantes de *pin1-7* muestran una capacidad embriogénica reducida, mientras que la sobreexpresión de ARF5 genera el mismo fenotipo de la mutante *pin1*, que es incapaz de inducir ES (Wójcik et al., 2020).

Para estimular la expresión de *PIN1* y controlar el desarrollo cigótico temprano, ARF5 coopera con miembros de la familia WUSHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX). En particular, *WOX2* es un blanco interesante de ARF5 durante la ES, ya que ayuda a mantener el balance de la vía de señalización de citocininas versus

auxinas durante el establecimiento de la identidad del tallo en el embrión cigótico (Zhang et al., 2017).

Por otro lado, ARF10 junto con ARF16 y miR160 podrían contribuir a la biosíntesis de auxinas mediante el control de la expresión de *LEC2* en tejidos inducidos mediante ES. Además de *LEC2*, otros blancos de estos ARF son los genes *PLETHORA (PLT)*, los cuales tienen una función esencial en la integración de las señales hormonales durante la embriogénesis temprana (Gliwicka et al., 2013).

Dentro de la red de regulación que controla la inducción de la ES, también se encuentran algunos sRNAs, los cuales tienen como blanco a diversos miembros de la vía de señalización de auxinas. Al ser reguladores negativos de la expresión génica, estas pequeñas moléculas pueden actuar como “switches” durante el desarrollo, apagando diversos programas de expresión génica (Marin et al., 2010).

Clasificación de sRNAs

Los sRNAs en plantas se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de sus precursores; aquellos que derivan de precursores de doble cadena, formados por la hibridación intermolecular entre dos cadenas de RNA complementarias, y aquellos derivados de precursores de cadena sencilla, los cuales forman una estructura tallo-asa dada por la complementariedad de bases dentro de la misma cadena. Los RNAs que derivan de precursores de doble cadena (dsRNA) se denominan RNAs pequeños interferentes (siRNAs), mientras que los derivados de precursores de cadena sencilla son llamados hairpin RNAs (hpRNAs). Ambos grupos se pueden subdividir en distintas clases dependiendo de sus mecanismos de biogénesis y/o su función (Figura 10) (Axtel, 2013).

microRNAs

Los microRNAs o miRNAs, pertenecen al grupo de hpRNAs. Los genes que codifican microRNAs (*MIR*) son transcritos por la RNA pol II, dando lugar a un miRNA primario (pri-miRNA). Estos pri-miRNAs contienen una estructura tallo-asa, y son procesados por las enzimas pertenecientes a la familia III de RNAsas, DICER-LIKE1 (DCL1), generando un dúplex de miRNA. Estos dúplex son 2'-O-metilados en el extremo 3' por la metiltransferasa HUA ENHANCER1 (HEN1). Los dúplex son transportados al citoplasma, en donde una de las hebras es incorporada en ARGONAUTA 1 (AGO 1) para formar un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Figura 10) (Yu et al., 2017).

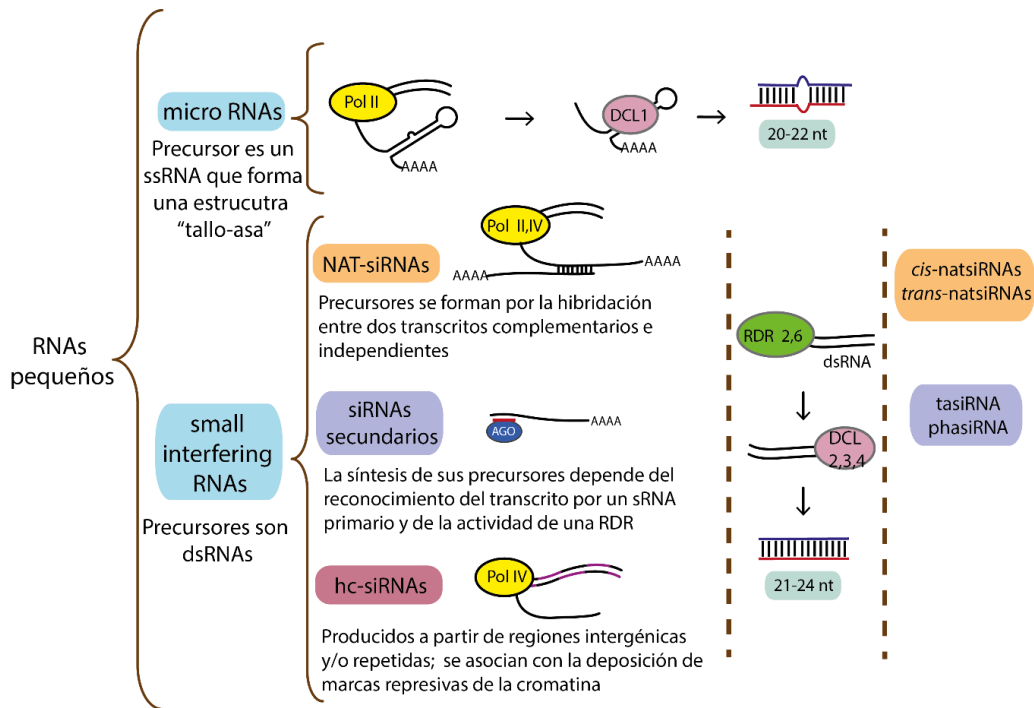


Figura 10. Clasificación de RNAs pequeños en plantas y sus vías generales de biogénesis. Los genes que codifican miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) y forman una estructura tipo tallo-asa, denominada pri-miRNA, la cual es procesada por una DICER-LIKE 1 (DCL1), dando lugar a una estructura más corta llamada pre-miRNA. Los pre-miRNAs son procesados nuevamente por DCL1 para dar lugar al dúplex maduro de miRNA. Durante el procesamiento del miRNA, diversas proteínas asisten a DCL1. Los siRNAs naturales antisentido (natsiRNAs) son producidos a partir de RNAs de doble cadena (dsRNAs) que se originan por el sobrelape de la transcripción (*cis*-natsiRNAs), o de transcritos altamente complementarios que se originan en distintos loci (*trans*-natsiRNAs). Los precursores de los siRNAs secundarios

son transcritos por la Pol II y pueden originarse de loci no-codificantes, genes codificantes o elementos transponibles. La RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) convierte estos transcritos en dsRNAs, y enseguida DCL2 y DCL4 producen siRNAs de 22 o 21 nucleótidos (nt), respectivamente. Los siRNAs secundarios se subdividen en *trans*-acting siRNAs (tasiRNAs), phased siRNA (phasiRNAs) and epigenetically activated siRNAs (easiRNAs). Los siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs) se derivan de elementos transponibles y repetidos que se localizan preferentemente en la cromatina pericentromérica. Su biogénesis requiere a la Pol IV y la síntesis de dsRNA por RDR2, el cual es procesado en siRNAs de 24-nt por DCL3. Modificado de Borges and Martienssen, 2015.

Funciones de los miRNAs durante el desarrollo

No todos los miRNAs poseen una acumulación ubicua, sino que su localización es específica a ciertos tipos de tejido y etapas de desarrollo, sugiriendo que estos sRNAs son regulados espacial y temporalmente y, por lo tanto, también lo es la expresión de sus blancos. A su vez, numerosos miRNAs se encuentran conservados entre las diversas especies de plantas, lo cual posiblemente se deba a que poseen un papel conservado evolutivamente. Muchos de los transcritos que son blancos de miRNAs codifican factores de transcripción involucrados en la determinación del destino celular. Lo anterior, junto con los defectos durante el desarrollo vegetativo y floral que presentan plantas mutantes de proteínas involucradas en la biogénesis de miRNAs, apoyan la idea de que los miRNAs tienen un papel fundamental en la regulación del desarrollo de plantas (Mallory et al., 2005). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, miR160 dirige el corte endonucleolítico de *ARF17*. En esta planta, la expresión de un transcrito resistente al corte de miR160 ocasiona un incremento en los niveles del mRNA, y con ello se presentan alteraciones en la acumulación de transcritos de *GRETCHEN HAGEN 3 (GH3)*. Estas mutantes presentan diversos defectos los cuales incluyen anomalías en el desarrollo embrionario, defectos en la forma de las hojas y el desarrollo de la raíz, desarrollo prematuro de inflorescencias, tamaño reducido de pétalos, entre otros (Mallory et al., 2005).

miR160 también tiene como blancos a los *ARF10* y *16*, los cuales están involucrados en la formación de la cofia de la raíz. La regulación del *ARF16* por miR160 es requerida para un crecimiento y desarrollo de órganos aéreos adecuados, así como para la formación de raíces laterales (Wang, 2005). Por

otro lado, miR167 regula a los ARF6 y 8, regulación que es necesaria para el desarrollo adecuado de las anteras y los óvulos. Estos ARFs activan la expresión de los genes *SAUR* y *Aux/IAA* en órganos reproductivos. Mientras que a ARF8 se le atribuye la activación de los genes *GH3* (Wu et al., 2006; Guilfoyle & Hagen, 2007).

miRNAs involucrados en la embriogénesis somática

Una gran parte de los miRNAs involucrados en la ES se encarga de regular la acumulación de genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización de auxinas. En diversos modelos como *A. thaliana*, *Z. mays*, *Dimocarpus longan*, *Gossypium hirsutum*, *Larix leptolepis*, *Oryza sativa*, *Pinus pinaster*, entre otras, se ha comprobado que miR165/166 y miR167 juegan un papel importante para la inducción de la embriogénesis somática. En Arabidopsis, la desregulación de la expresión de *MIR160*, *MIR165/166*, *MIR167* y *MIR393* afecta la acumulación de auxinas y la sensibilidad de los explantes a esta hormona (Su et al 2016; Wójcik & Gaj, 2016; Wójcik et al., 2017). Una posible función de los miRNAs en la ES podría ser regular el establecimiento de la polaridad del explante, lo cual se cree afecta la efectividad de inducir embriones somáticos. En Arabidopsis, el control de la biosíntesis de auxinas mediado por miR165/166, podría ser responsable de la respuesta embriogénica del lado adaxial de los cotiledones de embriones cigóticos. Estos miRNAs restringen a los transcritos de PHABULOSA/PHAVOLUTA (PHB/PHV) al lado adaxial de los cotiledones, resultando en la acumulación de auxinas debido a la estimulación que PHB/PHV ejercen sobre la vía de biosíntesis de auxinas mediada por LEC2. Al igual que en el desarrollo, en la ES las vías miR160/ARF10/ARF16 y miR167/ARF6/ARF8 parecen estar activas (Wójcikowska et al., 2020).

Trans-acting small interfering RNAs

Por otro lado, los siRNAs se pueden dividir en siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs), siRNAs naturales antisentido (NAT-siRNAs) y siRNAs secundarios. Los hc-siRNAs son sRNAs de 24 nt que están involucrados en el silenciamiento transcripcional a través de la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM). La biogénesis de estos siRNAs requiere la transcripción de la Pol IV, seguida de la síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA) por la RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2) y su procesamiento por DCL3. Los hc-siRNAs actúan suprimiendo elementos transponibles y regiones repetidas (Borges and Martienssen, 2015; Bélanger et al., 2020). Por otro lado, los NAT-siRNAs son siRNAs que derivan del corte de dsRNA formado por transcritos con alta complementariedad. Estos se subdividen en dos categorías: cis-NAT-siRNAs o trans-NAT-siRNAs, dependiendo de si los transcritos provienen del mismo locus o de distintos loci. Se ha propuesto que los NAT-siRNAs regulan la expresión de sus genes blanco a nivel transcripcional, procesamiento de mRNA, splicing, estabilidad de RNA, transporte celular, etc. En plantas, los cis-NAT-siRNAs tienen distintas funciones en la respuesta a estrés y en el mecanismo de doble fertilización (Yuan et al., 2015).

Entre los siRNAs secundarios, existe una subclase de sRNAs que tienen una función importante en la modulación de la respuesta a auxinas en plantas, los cuales se denominan trans-acting small interfering RNAs (tasiRNAs). Este nombre se debe a que ejercen su actividad en *trans*, es decir, sus blancos derivan de loci diferentes de los cuales se generan estos tasiRNAs (Axtell, 2013).

Los siRNAs secundarios se denominan como tal debido a que su síntesis depende del reconocimiento y corte de sus precursores mediado por un sRNA primario. El producto de este corte es convertido en un RNA de doble cadena mediante la actividad de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR6), y en seguida la actividad de endoribonucleasa de DICER-LIKE4 (DCL4) (Figura 10). En *Arabidopsis* se han identificado cuatro precursores de tasiRNAs, (TAS1-4). De estos precursores, TAS3 es el único que emplea específicamente la actividad del complejo miR390/ARGONAUTA7 (AGO7) para la producción de los tasiRNAs

(Marin et al., 2010). El transcrito de TAS3 posee dos sitios de unión para miR390, sin embargo, sólo se requiere el corte del extremo 3' para iniciar el procesamiento de los tasiRNAs. El transcrito es estabilizado por la proteína LEAFBLADELESS (LBL1) para impedir su degradación, posteriormente, se recluta la RDR6 para iniciar la síntesis de la segunda cadena de RNA. En seguida, el RNA de dos cadenas (dsRNA) es procesado por DCL4 para generar tasiRNAs de 21 nucleótidos. Estos fragmentos se cargan 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 (Figura 11) (López Ruiz, tesis doctorado 2019).

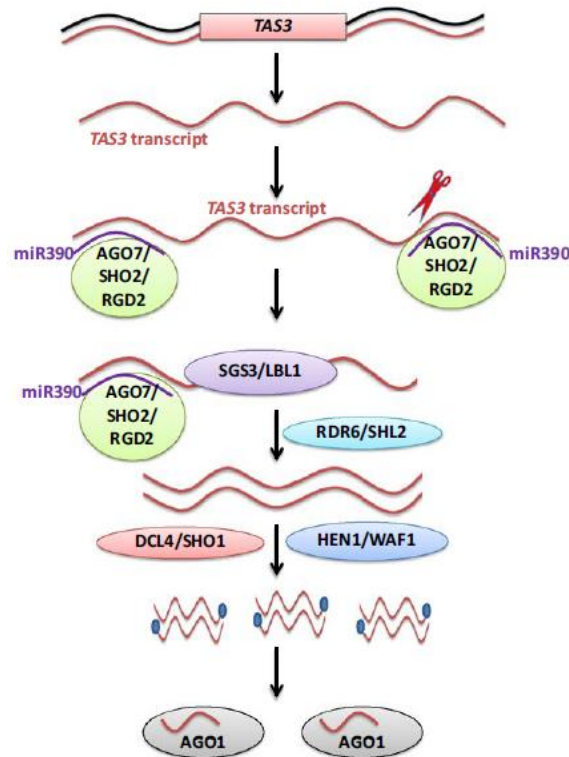


Figura 11. Biogénesis de ta-siRNAs. miR390 junto con *AGO7/SHO2/RGD2* reconocen el transcrito no codificante en los extremos 5' y 3'. El complejo miR390/AGO7 escinde el transcrito sólo en el extremo 3'. El producto es empleado para la producción de ta-siRNA mediante la actividad de SGS3/LBL1, RDR6 y DCL4 (Singh et al., 2018).

En maíz, existen once tasiR-ARFs que son procesados a partir de nueve loci pertenecientes a la familia TAS3. Los tasiRNAs generados tienen un papel muy importante en la regulación del patrón de hojas y el crecimiento de raíces laterales mediante la represión que ejercen sobre algunos miembros de la familia ARF, entre ellos ARF2/3/4. Debido a esta función este grupo de tasiRNAs también recibe el nombre de tasi-ARFs (Marin et al., 2010; Dotto et al., 2014).

tasiRNAs durante la embriogénesis somática

Pocos estudios han abordado la función de los tasiRNAs durante la inducción de la ES, sin embargo, algunos componentes de la vía han sido estudiados en organismos como *Dimocarpus longan*, *Larix leptolepis*, *Citrus sinensis* y *Gossypium hirsutum*. En *D. longan* se observó que la acumulación de miR390 se incrementa hacia la etapa torpedo de embriones somáticos. Mientras que los precursores *TAS3* y *TAS4* son transcritos poco abundantes en callos embriogénicos, aunque su expresión se incrementa en la etapa globular y vuelve a decaer en la etapa torpedo (Lin et al., 2015). En naranja y algodón los niveles de miR390 incrementan en la etapa globular, mientras que en *Larix leptolepis* los niveles de este miRNA y tasiARFs son abundantes en embriones somáticos en etapa cotiledonar (Wu et al., 2011; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2013).

En nuestro laboratorio, se ha estudiado la función de la vía tasiARF durante la regeneración de plantas de maíz. En callos no embriogénicos, los niveles de todos los componentes de la vía tasiARF son inferiores respecto a callos embriogénicos, con excepción de miR390, *TAS3g* y tasiARFg. Además, la distribución de auxinas difiere entre ambos tipos de callos, sugiriendo que existe una función diferencial de la vía tasiARF en ambos tejidos. En maíz, la vía tasiARF se encuentra activa en callos embriogénicos, pero no en callos no embriogénicos, manteniendo así el estado desdiferenciado de estos tejidos y, por lo tanto, el potencial embriogénico (López-Ruiz et al., 2020).

Antecedentes

En maíz, el tipo de explante y el fondo genético de la variedad son factores determinantes para el establecimiento de cultivos embriogénicos. En nuestro laboratorio se determinó que embriones de distintas etapas de desarrollo muestran fenotipos contrastantes al someterse a la inducción de la desdiferenciación. Los embriones en etapas tempranas de embriogénesis de la variedad VS-535 (etapas de desarrollo L1-L2 o de 15 DDP), proliferan mejor que explantes más desarrollados y poseen capacidades embriogénicas regenerativas (Juárez González et al., 2019; Luján-Soto 2019, Tesis de maestría). Mientras que los embriones de etapas más avanzadas de desarrollo (EM) se consideraron tejidos no embriogénicos (Juárez-González et al., 2019).

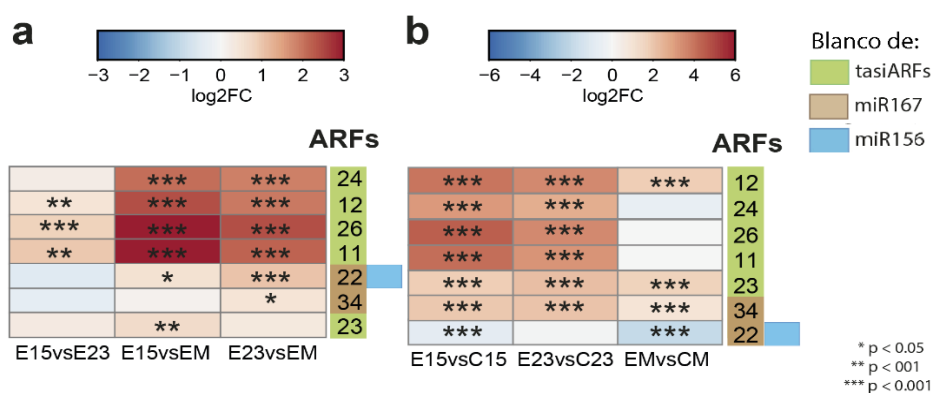


Figura 12. Expresión diferencial de los genes *AUXIN RESPONSE FACTOR* de maíz (*ZmARF*) blancos de sRNAs. a. Expresión diferencial de ARF durante la embriogénesis cigótica. **b.** Expresión diferencial de ARF durante la inducción de masas pro-embriogénicas. El color rojo indica mayor abundancia en el embrión más joven respecto al más maduro (A), o mayor abundancia en el embrión respecto al callo (B), el color azul indica el comportamiento inverso. Abreviaturas: **E15** (embriones de 15 DDP), **E23** (embriones de 23 ddp), **EM** (embriones maduros), **C15** (callos derivados de E15), **C23** (callos derivados de E23), **CM** (callos derivados de EM). Tomada y modificada de Juárez-González et al., 2019.

Por medio de un análisis de RNA-seq se determinaron los transcritos diferencialmente expresados entre embriones de distintas etapas de desarrollo y los callos de un mes de inducción producidos a partir de cada uno de estos tejidos. Los E15 DDP se caracterizaron por expresar transcritos involucrados en

procesos proliferativos y de división celular. Además, en estos tejidos, existe una fina regulación de sRNAs involucrados en el desarrollo y vías de señalización hormonales. Entre los genes que presentaron cambios en sus niveles de expresión se encuentran varios factores ARF que presentan regulación por miRNAs y tasiRNAs (Figuras 12 y 13). En el mismo trabajo se encontró que los niveles de sRNAs en el tejido explante parecen ser cruciales para el éxito de inducción de callos embriogénicos de maíz.

En los últimos años se ha estudiado el papel de los ARF en la inducción de la embriogénesis somática de diversos organismos (Lin et al., 2015; Wojcikowska et al., 2017), encontrando que su fina expresión es relevante para la eficiencia de este proceso. Sin embargo, su expresión temporal en maíz durante la inducción permanece inexplorada.

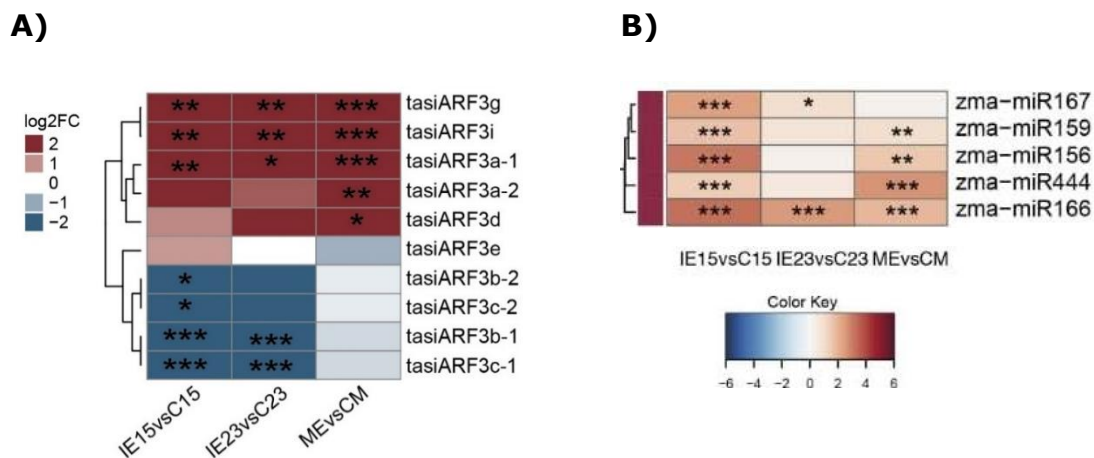


Figura 12. Expresión diferencial de sRNAs con blancos de la familia ARF durante la embriogénesis somática. A) tasiRNAs derivados de TAS3 que regulan a *ARF3* **B)** miRNAs diferencialmente expresados que regulan a *ARF6/8*. Comparaciones entre E15 vs. C15, E23 vs. C23, EM VS. CM. **E15** (embriones de 15 ddp), **E23** (embriones de 23 ddp), ME (embriones maduros), **C** (callos de un mes de inducción obtenidos de embriones en diferentes etapas de desarrollo). Tomado y modificado de Juárez-González et al., 2019.

Debido a que en los últimos años se ha descrito la importancia del silenciamiento genético mediado por sRNAs como mecanismo de regulación de la totipotencia en plantas, es de nuestro interés conocer cuál es la dinámica de expresión de los distintos ARFs que son regulados por sRNAs durante la inducción de CE de maíz. Además, comparar esta cinética con los cambios en un tejido que ha sido

caracterizado como no embriogénico nos proporcionará más información acerca de las diferencias que pueden estar regulando la capacidad embriogénica entre estos dos tejidos.

Planteamiento del problema

La vía de señalización de auxinas rige diversos procesos del desarrollo y su importancia en la ES no es la excepción. La complejidad de esta vía se incrementa debido a los distintos elementos involucrados en ella, como el silenciamiento genético por sRNAs. Debido a que la inducción de la ES es un proceso que involucra un estímulo exógeno dado por las auxinas, se cree que los elementos involucrados en esta vía de señalización podrían presentar diferencias durante la dediferenciación de distintos tejidos. Previamente se ha descrito una menor abundancia de los componentes de la vía tasi-ARF y algunos miRNAs en CNE respecto a CE de maíz, sin embargo, su acumulación durante el proceso de dediferenciación de embriones a callo permanece inexplorada. La ES no solamente es útil como modelo de estudio de la totipotencia en plantas, sino también es una herramienta ampliamente usada para la micropropagación comercial de plantas. Debido a que el maíz es un cultivo de gran interés agronómico, sentar las bases moleculares de este proceso en plantas nos permitirá obtener un mayor provecho de la ES.

Hipótesis

- ▶ La regulación de la expresión temporal de los Factores de Respuesta a Auxinas mediada por sRNAs, en la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz, es determinante para el potencial embriogénico del tejido explante.

Objetivo general

- ▶ Analizar la relación entre los niveles de acumulación de algunos *Auxin Response Factors* regulados por sRNAs y la capacidad embriogénica del tejido explante durante el proceso de inducción de callos embriogénicos de maíz.

Objetivos particulares

- ▶ Establecer cultivos in vitro de embriones de maíz, y evaluar la inducción de callos embriogénicos de maíz a partir de embriones de edad contrastante en una ventana temporal corta a partir del estímulo.
- ▶ Determinar los niveles de acumulación de ARFs asociados con la embriogénesis somática de maíz mediante la abundancia de sus transcritos en la inducción de callos embriogénicos de Ei y EM.
- ▶ Analizar la correspondencia entre los niveles de acumulación de sRNAs que regulan ARFs durante la inducción de callos embriogénicos de Ei y EM de maíz.
- ▶ Determinar si existe una correlación entre la acumulación de los ARF y sRNAs analizados y el alcance del potencial embriogénico de los Ei y EM de maíz.

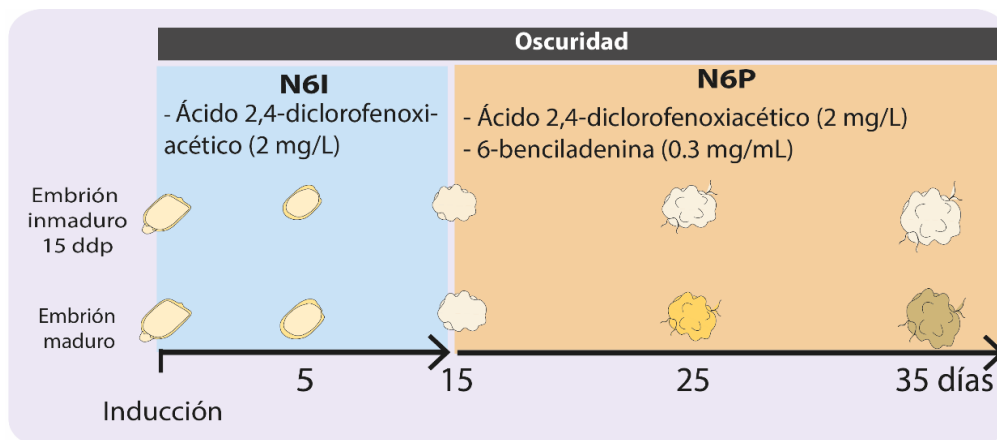
Materiales y métodos

Obtención de tejido

Se sembraron 3 lotes de maíz de la variedad VS-535 con periodos de separación de 3 semanas, cada lote constó de 16 plantas sembradas en costales con tierra Sunshine, crecidas en invernadero con luz del día y una temperatura entre 25-30°C. Aproximadamente a las 24 semanas de edad, comenzaron a salir las anteras del primer lote, y cerca de 3 semanas después se observó la aparición de mazorcas. En cuanto las mazorcas desarrollaron los estigmas, se cubrieron con bolsas de papel para evitar una polinización cruzada no controlada. Durante un periodo de 5 días se destaparon las mazorcas, y se promovió la propagación del polen desde las panojas, y al día 4 se realizó el corte de los estigmas; de esta manera al día 5 los estigmas desarrollan tricomas nuevos para finalmente realizar una última polinización manual. Al finalizar el día 5, se cubrieron las mazorcas y se contabilizaron los días para la recolección de embriones inmaduros de maíz y embriones maduros.

Una vez recolectadas las mazorcas, los embriones se sometieron a un proceso de desinfección, siguiendo el protocolo de López-Ruiz y colaboradores (2019). Posteriormente se transfirieron al medio N6 (Chu et al., 1975), el cual se encuentra enriquecido con 2,4-D (**N6I**), y se almacenaron en condiciones de oscuridad. Durante este proceso se colectaron muestras de acuerdo con el siguiente esquema:

Esquema de inducción de ES a partir de embriones de maíz



Transcurridos los 15 días, las masas pro-embriogénicas fueron transferidas a un medio N6 con 6-benciladenina (N6P), una citocinina que en conjunto con el 2,4-D potencia la división celular y proliferación de callos embriogénicos (Jakubekova et al., 2011), aunque la proliferación de masas no se establece bien sino hasta el tercer subcultivo en N6P (Luján-Soto, 2019 Tesis de maestría). En este nuevo medio se colectaron muestras a los diferentes tiempos indicados en el esquema anterior.

Diseño de oligonucleótidos

A partir de la base de datos phytozome.jgi.doe.gov se obtuvo la secuencia de mRNA de los *ZmARF* de interés. Estos se seleccionaron debido a que son blancos de sRNAs y mostraron ser diferencialmente expresados en la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz (Juárez-González et al. 2019). Se realizó el diseño de oligonucleótidos para regiones cercanas a los sitios de reconocimiento de sus respectivos sRNAs, de tal manera que se amplifiquen fragmentos menores a 200 pb (Tabla 1). Los oligonucleótidos específicos y stem loop de tasiR-ARFs fueron diseñados por López Ruiz, tesis doctorado 2019, y los de miR167 por Varkonyi-Gasic y colaboradores, 2007.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para determinar la expresión los Factores de Respuesta a Auxinas blancos de sRNAs.

AtARF	Transcrito/ Acceso	Secuencia	Amplicón
Clase I (AtARF3/4-like)	<i>ZmARF11</i> <i>GRMZM2G056120</i>	FW: AGCAGACTCGCAGTGCATAA RV: GCAGCCCATATCCTCCTTTT	166 pb
	<i>ZmARF12</i> <i>GRMZM2G437460_T01</i>	FW: CGGAGATTGTGCTTCCAAAT RV: TTGCTTCAGTTGCCTGAGAA	144 pb
	<i>ZmARF23</i> <i>GRMZM2G441325_T01</i>	FW: ATGCCACTGGGTTTGCTTAC RV: CTGCTGGAGAGCGTATCCTT	200 pb
	<i>ZmARF24</i> <i>GRMZM2G030710_T01</i>	FW: AATCTGCCCAATTCACAAG RV: ATCGTTGGAGCAACTTCGTT	140 pb
	<i>ZmARF26</i> <i>GRMZM5G874163_T03</i>	FW: GTGCCCCAGTTGCTGTTAAT RV: CCTGGCGGAGTAGATAGTGC	73 pb
	Clase V (AtARF6/8-like)	<i>ZmARF34</i> <i>GRMZM2G081158_T01</i>	FW: CTGCGCCTGGAGCGAGGATG RV: GCGGATGGCAAATCCTGCAA
<i>ZmARF22</i> <i>GRMZM2G089640_T01</i>		FW: CCCCAAGATTCGTCTCAAAT RV: CCTCCCTCATTAGCAGTGA	182 pb

Histología de embriones de maíz

Para establecer la etapa de desarrollo de los embriones se llevó a cabo la fijación, inclusión en parafina, cortes y tinción de contraste Safranina-Verde Rápido, de acuerdo con el protocolo establecido por Sandoval, 2005.

Extracción de RNA

Se descartaron las raíces seminales y regiones oxidadas y se congelaron en nitrógeno líquido únicamente las masas pro-embriogénicas.

El tejido se pulverizó en nitrógeno líquido en un mortero. La extracción de RNA total se realizó usando el método de TRIzol Reagent (Invitrogen). Se agregó 1 mL de TRIzol Reagent a cada tubo con aproximadamente 0.5g de muestra pulverizada. Se mezcló con vórtex y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 15,000 g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 500uL de isopropanol para precipitar el RNA, se agitó por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 10-15 min. En seguida, se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de RNA con 1 mL de etanol absoluto mezclando con vórtex. Finalmente, se centrifugó a 7500g por 5 min a 4°C, se dejó secar el pellet y se resuspendió en agua-DEPC.

El RNA posteriormente fue tratado con DNAsa (PROMEGA) y separado en long-RNAs (>200 nt) y small-RNAs (<200 nt) utilizando el kit RNA clean and concentrator TMZymo Research (Anexo 4).

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA de sRNA se utilizó la técnica descrita por Varkonyi (2007), la cual consiste en emplear un stem-loop primer (Cheng et al., 2005) al cual se le añaden los 6 nucleótidos complementarios del extremo 3' del sRNA maduro (Figura 13).

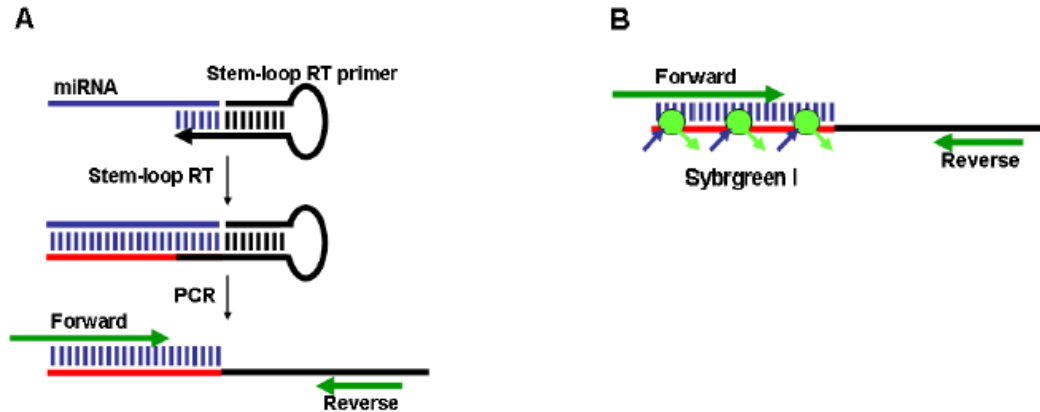


Figura 13. Stem loop RT-PCR. A. Stem loop RT seguida de una PCR en punto final. El Stem-loop RT primer se asocia al extremo 3' del miRNA iniciando la transcripción reversa del miRNA. Después, el producto de la RT es amplificado usando un primer forward específico para el miRNA y el primer universal reverse. **B.** Ensayo con SYBR Green. Tomada y modificada de Varykonyi et al. 2007.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el stem-loop primer de cuatro sRNAs, tasiARFbD5, tasiARFg, miR167, miR156 y el gen de referencia U6 en el mismo mix de reacción. De esta manera, el mismo cDNA es utilizado para la cuantificación de los sRNA y el snRNA U6.

El mix consistió en el siguiente:

Reactivo	Vol
Stem-loop RT primer por cada sRNA (1 μ M)	0.75 μ L
U6 snRNA primer (1 μ M)	0.25 μ L
dNTPs (10 mM)	1.0 μ L
H ₂ O	9.1 μ L

La mezcla se distribuyó en tubos de PCR y se adicionó 1 μ L de sRNAs (250 ng/ μ L). En seguida se incubaron a 65°C por 5 min, y se colocaron en hielo 2 min, posteriormente se añadió:

Reactivo	Vol
MgCl ₂ (25 mM)	2.4 µL
Buffer transcriptasa ImProm (Promega)	4 µL
RNasin 20 U	0.5 µL
Transcriptasa Reversa ImProm-II	1.0 uL

La reacción pulsada multiplex consistió en 30 min a 16°C, seguido de 60 ciclos de 30°C por 0:30 min, 42°C por 0:30 min y 50°C por 1s (Varkonyi et al., 2007).

Se llevaron a cabo los controles mediante PCR punto final, empleando oligos para el rRNA 18s para la fracción de LRNAs, y oligos para el snRNA U6 para la fracción de sRNAs (Anexo 5).

Cuantificación por PCR punto final

Para la amplificación de los blancos de sRNAs se emplearon los primers diseñados, los cuales hibridan cerca de la región predicha como sitio de reconocimiento por el sRNA (Anexo 1, Tabla de oligos). Por otro lado, para la amplificación por PCR se empleó un forward primer complementario a los primeros 12-17 nt del extremo 5' del sRNA (este primer posee otros 3-7 nt en el extremo 5' para alcanzar una T_m de 60°C +/- 1°C) en conjunto con un primer reverse que deriva del stem loop formado de la secuencia reportada por Cheng (2005). En seguida se muestra un ejemplo de mezcla de reacción:

Reactivo	Vol
Buffer	2.0 µL
MgCl ₂ (50 nM)	1.0 µL
dNTPs (10 Mm)	0.4 µL
Oligo FW (10 µm)	0.2 µL
Oligo RV (10 µm)	0.2 µL
Taq	0.5 µL
H ₂ O	14.7 µL
Muestra	1.0 µL

El programa usado consistió en 95°C 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C 0:45 min, 60°C 0:45 min, 72.0°C 1:00 min y finalmente a 72°C 7:00 min.

Cuantificación por PCR digital

Debido a la baja concentración a la cual se encuentran los ARF en los tejidos, se empleó el método de cuantificación mediante PCR digital. La ventaja de esta metodología es que se utiliza una mínima cantidad de muestra y se obtienen valores absolutos para la cantidad de transcrito (no es necesario emplear un gen normalizador). El ensayo se realizó en un equipo QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR) System (BIORAD). A continuación se muestra una tabla con las concentraciones finales de cada reactivo:

Reactivo	1 rxn (20µL)
2x QX200 ddPCR Eva Green	10 µL
Mix oligos (1µM)	4 µL
H ₂ O	6 µL

Al mix de reacción se añade 1 uL de muestra, y se carga en un cartucho, el cual se introduce en el equipo generador de gotas. Posteriormente, se cargan las muestras en una placa de 96 pozos y en seguida, se lleva a cabo la reacción de PCR.

El programa empleado consiste en someter las muestras a 95°C durante 10:00 min, esto permiten la polimerización del aceite que conforma las gotas y evita su ruptura. Seguido de 40 ciclos de 94°C 0:30 min, 60°C 1:00 min, y finalmente 4°C 5:00 min, 90°C 5:00 min y 12°C.

Al finalizar la reacción de PCR, las gotas de cada muestra son analizadas individualmente en el equipo detector. Las gotas positivas y negativas son contadas para estimar la concentración del blanco asumiendo una distribución de Poisson.

Cuantificación por PCR cuantitativa

El ensayo se realizó en un equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems, se empleó el kit Maxima SYBR Green/Rox (Thermo Scientific).

El programa empleado consistió en incubar las muestras a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 00:15 min y 60°C por 1:00 min

Curvas de disociación

Para obtener la curva de desnaturalización se empleó un gradiente de temperatura de 60-95°C realizando un incremento de 0.5°C.

Tanto para los *ZmARFs* y los sRNAs se obtuvo una curva de eficiencia realizando diluciones seriadas de cDNA.

Resultados

Los embriones inmaduros de maíz de 15 DDP inducen masas pro-embriogénicas.

Anteriormente se ha descrito que los embriones en etapas tempranas de embriogénesis proliferan mejor que explantes más desarrollados y poseen capacidades embriogénicas regenerativas. Debido a esto, se llevó a cabo la inducción de masas pro-embriogénicas a partir de embriones inmaduros de 15 DDP (Ei) y embriones disectados de semillas secas (EM) de la variedad VS-535. Se llevaron a cabo dos réplicas biológicas independientes (réplica 1 y 2), y se obtuvieron masas pro-embriogénicas únicamente de la réplica 1 de Ei y ambas de EM (en el Anexo 2 se muestran fotografías de la réplica 2). Debido a que no se logró la inducción de masas pro-embriogénicas (IMP) a partir de Ei de la segunda réplica (Anexo 2), se llevó a cabo un análisis histológico de los explantes, en el cual, se observó que los Ei, a pesar de haber sido recolectados a los 15 DDP, se encontraban en etapa L1 (Anexo 3). En nuestro laboratorio se describió previamente que embriones en esta etapa exhiben una menor capacidad de generación de callo embriogénico, lo cual observamos en la segunda réplica de Ei (Luján Soto 2019, Tesis de maestría). A continuación, se muestran fotografías correspondientes a la réplica 1:

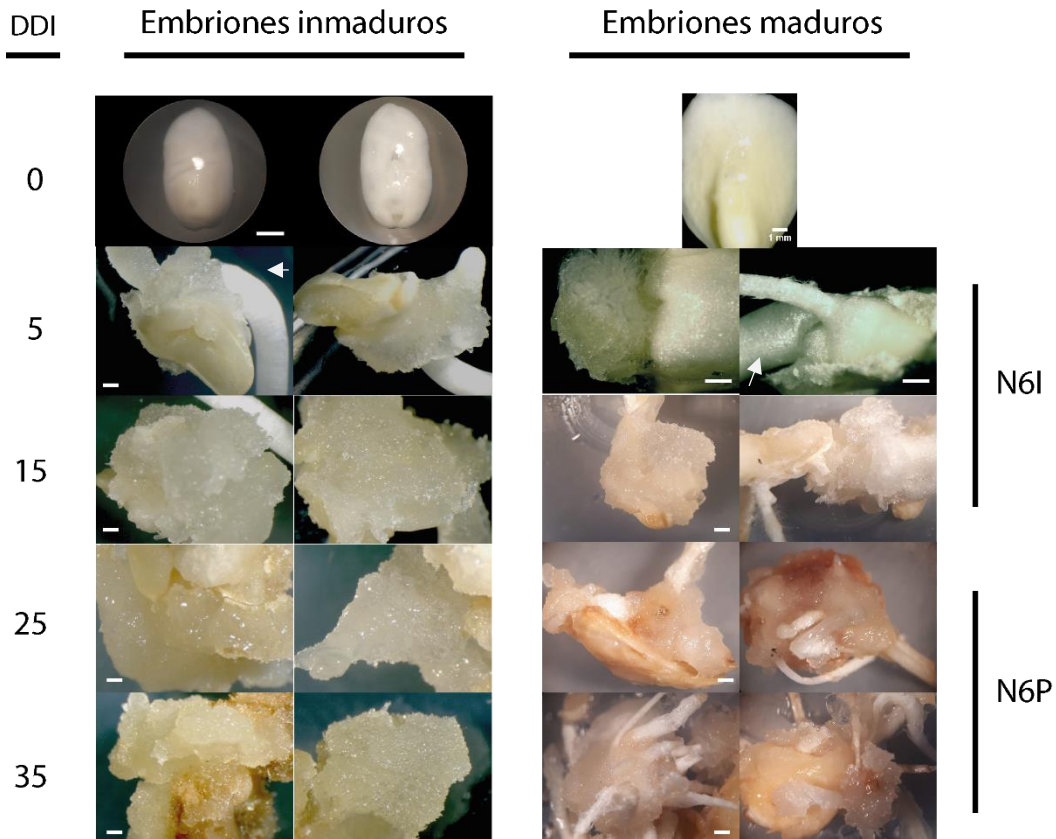


Figura 14. Los embriones inmaduros de maíz inducen masas pro-embriogénicas mediante el cultivo *in vitro* en medio N6 adicionado con 2,4-D. Izquierda, explante embriones 15ddp, derecha explante embriones de semilla seca. DDI (Días después de inducción). N6I: medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L). N6P: medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L) y BA (0.3 mg/L). Flechas indican el coleoptilo Barra indica 1 mm.

En la Figura 12 se observa que, a los 5 días de colocados en el medio de inducción ha comenzado la desdiferenciación de Ei, ya que, se ha formado un tejido translúcido de textura irregular. También se observó la elongación del coleóptilo (indicado con una flecha, Figura 14), el cual fue eliminado de las muestras para realizar los análisis posteriores. A diferencia de Ei, a partir de EM se observó escasa formación de callo a este tiempo, en cambio, el tejido en contacto con el medio se tornó blanquecino, y se observó la protrusión radicular y coleoptilar, semejando el proceso de germinación. Al día 15, el tejido desdiferenciado predomina en el Ei, y aunque su textura sigue siendo irregular, este comienza a tornarse ligeramente opaco, además el explante ha perdido su

morfología inicial. A los 15 días, en los EM se observó un callo con una textura similar al proveniente del Ei, sin embargo su coloración permaneció translúcida, aunque se observan algunas regiones blanquecinas cercanas al coleóptilo. En este día los callos se transfirieron al medio N6P, se eliminaron los coleóptilos, raíces y el remanente del explante (de ser posible), teniendo cuidado de no dañar el callo.

A los 25 días, los callos de Ei se observan con una textura más lisa, y algunas regiones presentan una coloración más opaca; esto se observó también en los callos de EM, aunque a diferencia de los Ei, se aprecian algunas regiones oxidadas, además de la formación de raíces seminales. Este callo proliferó en menor proporción respecto al de Ei, dado que no superó en tamaño al explante.

Finalmente, al día 35 los callos de Ei adquirieron una coloración más amarillenta, posiblemente debida a un proceso de oxidación. Se observó la aparición de regiones más lisas y traslúcidas, el callo aumentó y superó en tamaño los callos de los días anteriores. En los callos de EM se observó la formación de raíces, lo cual es característico del CNE (Figura 14) (Che et. al.,2006; Sun et. al.,2012).

La caracterización anterior nos indica que desde etapas tempranas de la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz a partir de embriones de distintas edades, el fenotipo de desdiferenciación varía de acuerdo a la edad del explante empleado.

La acumulación de miR156, miR167 y sus blancos durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz es diferencial entre embriones de edad contrastante y poseen una mayor correlación inversa en la desdiferenciación de Ei.

Se analizaron dos miRNAs previamente descritos como reguladores de la embriogénesis y el desarrollo, miR167 y miR156. miR167 tiene como transcritos diana ARFs de la Clase V (*AtARF6/8*), mientras que miR156 es conocido por regular a los factores de transcripción *SPL*, lo cual previene la expresión de genes de maduración durante etapas tempranas de la embriogénesis en *Arabidopsis* (Plotnikova et al, 2019). Interesantemente en maíz, *ARF22* posee un sitio de reconocimiento de miR156, aunque la regulación del miRNA sobre este ARF no ha sido comprobada experimentalmente (Juárez-González et al., 2019). La acumulación de miR167 y sus blancos se ha estudiado ampliamente en la ES de *Arabidopsis*; la sobreexpresión de este miRNA inhibe la ES, y a su vez disminuye la expresión de sus blancos *AtARF6/8*, por lo cual se piensa que ambos son relevantes para llevar a cabo este proceso. En maíz, existen seis genes ortólogos de *ARF6* y *ARF8* de *Arabidopsis* (Xing et al., 2011), sin embargo, únicamente dos de ellos, *ZmARF34* y *ZmARF22* mostraron expresarse diferencialmente durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz (Juárez-González et al., 2019). Debido a que la acumulación de miR156, miR167 y sus blancos no ha sido estudiada en etapas tempranas de la IMP de maíz Tuxpeño, decidimos analizarlos en este modelo. En la Figura 15 se muestran las veces de cambio, respecto al explante inicial, de la acumulación de estos dos ARF de maíz.

La acumulación de *ZmARF34* entre Ei y EM muestra un comportamiento muy diferente entre ambos explantes durante la IMP. *ZmARF34* se induce a los 5 días en Ei, y su acumulación disminuye al día 15, antes de que las masas pro-embriogénicas sean transferidas al medio N6P (Figura 15, A). La transferencia al nuevo medio que incluye BA induce sutilmente la acumulación de este ARF, y finalmente estos niveles disminuyen al día 35. De manera global, *ZmARF34* incrementa cerca de 2 veces respecto al explante inicial después de 35 días de iniciado el proceso. Por otro lado, durante la IMP a partir de EM, el comportamiento de *ZmARF34* contrasta con el comportamiento en Ei. En EM, la

acumulación de *ZmARF34* parece disminuir gradualmente durante todo el proceso, presentando un ligero incremento a los 15 días DDI respecto a la etapa previa (5 DDI) (Figura 15, B). Sin embargo, a nivel global, a los 35 DDI los niveles de *ZmARF34* han disminuido casi 4 veces respecto al explante inicial.

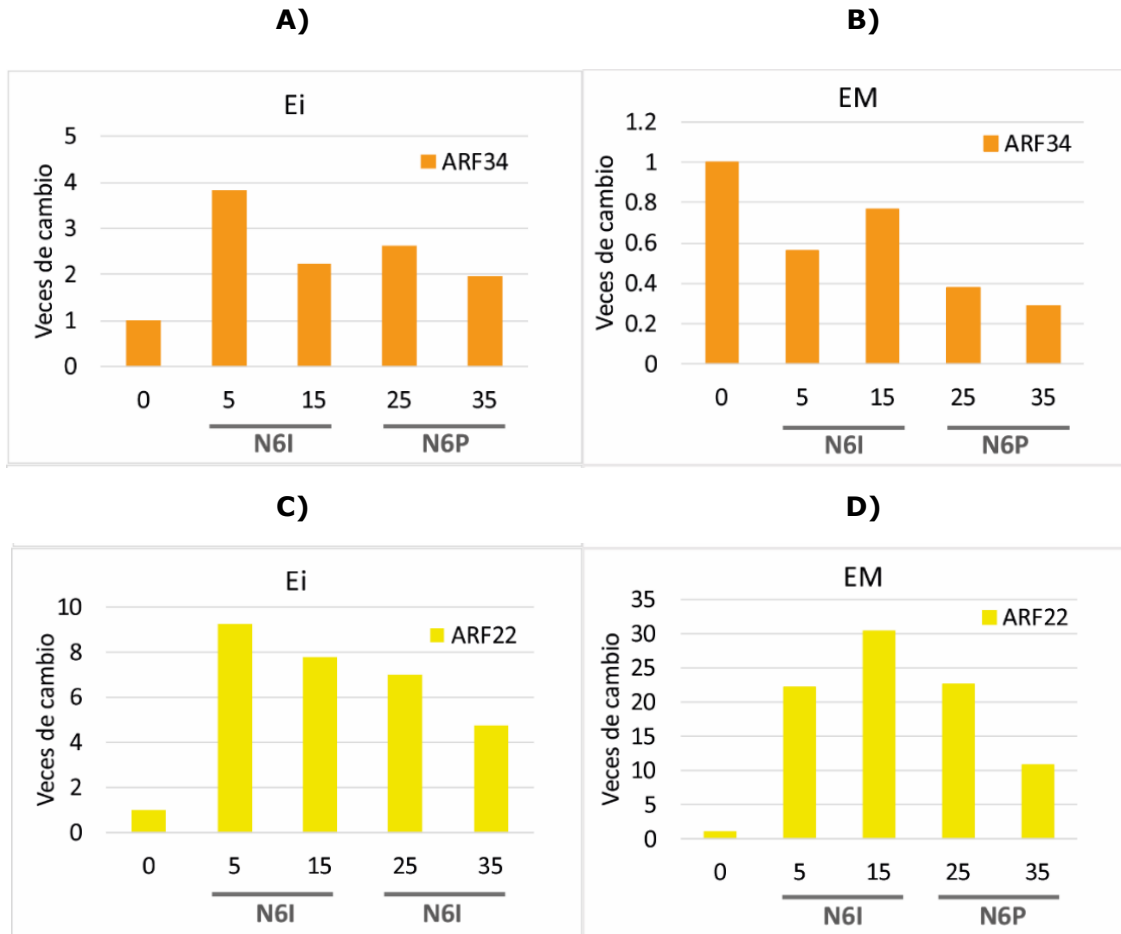


Figura 15. Acumulación de *ZmARFs* clase V a diferentes tiempos de inducción. Se muestran las veces de cambio respecto a la cantidad de transcrito presente en el explante (0 días) mediante reverso transcripción y PCR digital (ddPCR). **A)** y **B)** Acumulación de *ZmARF34* en la inducción a partir de embrión inmaduro 15 DDP (Ei) y embrión de semilla seca (EM), respectivamente. **C)** y **D)** Acumulación de *ZmARF22* en las mismas condiciones que A y B, respectivamente. N6I: medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D (2mg/L). N6P: medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L) y BA (0.3 mg/L). Los números indican días después de la inducción. Se muestran los valores correspondientes a una de dos réplicas técnicas.

Otro de los miembros de la clase V estudiado es el factor de transcripción *ZmARF22*. En la Figura 15, panel C, se observa que los cambios en la acumulación de *ZmARF22* son similares entre ambos procesos de inducción, aunque las veces de cambio son superiores en la inducción de EM. Además, a pesar de pertenecer a la misma clase, la acumulación de este ARF en EM es contraria a la de *ZmARF34*. La acumulación de *ZmARF22* incrementa a los 5 días en ambos procesos, sin embargo, en las masas pro-embriogénicas provenientes de Ei, tiende a disminuir de forma gradual hasta el día 35, y no se observa un cambio en esta tendencia cuando se transfieren a N6P. A diferencia de Ei, en la inducción de EM, a los 15 días *ZmARF22* presenta su mayor acumulación, siendo hasta 30 veces más abundante que en el explante. A los 25 días estos niveles disminuyen y esta tendencia continúa hasta el día 35. De manera global observamos que la acumulación de estos ARF de maíz, ortólogos de ARF6, no parece inducirse con el cambio del medio N6I al N6P, aunque su acumulación sí es rápidamente inducida por el medio que contiene únicamente 2,4-D. Estas tendencias coinciden con datos previos que indican una menor acumulación de *ZmARF34* y una mayor acumulación de *ZmARF22* en callo de 30 días respecto al EM de 40 DDP (Juárez-González et al. 2019).

Respecto a los miRNAs que podrían regular la acumulación de los *ZmARF34* y 22, se observa un comportamiento contrastante entre Ei y EM. En la IMP a partir de Ei se observa que miR167 disminuye a los 5 días y continúa a la baja hasta el día 15 (Figura 16). Con el cambio al medio N6P su acumulación incrementa ligeramente, aunque al día 35 sus niveles se mantienen inferiores a los iniciales. Por el contrario, en EM miR167 incrementa de forma gradual hasta el día 25, pero se reduce al día 35, aunque su acumulación permanece superior a la inicial en embrión.

Estudios previos en el laboratorio proponen a miR156 como un posible regulador de *ZmARF22* (Juárez-González et al., 2019). En la IMP de Ei, este miRNA se induce a los 5 días pero disminuye gradualmente hasta el día 35, siendo hasta 0.6 veces menor en el CE respecto al Ei. Mientras que en la inducción de EM, miR156 incrementa desde el día 5, y permanece con pocos cambios a los 15

días, aunque con la transferencia al medio N6P nuevamente incrementa. Finalmente su acumulación disminuye a los 35 días, aunque sus valores son superiores a los iniciales. Estos resultados coinciden parcialmente con el análisis transcriptómico realizado previamente en nuestro laboratorio.

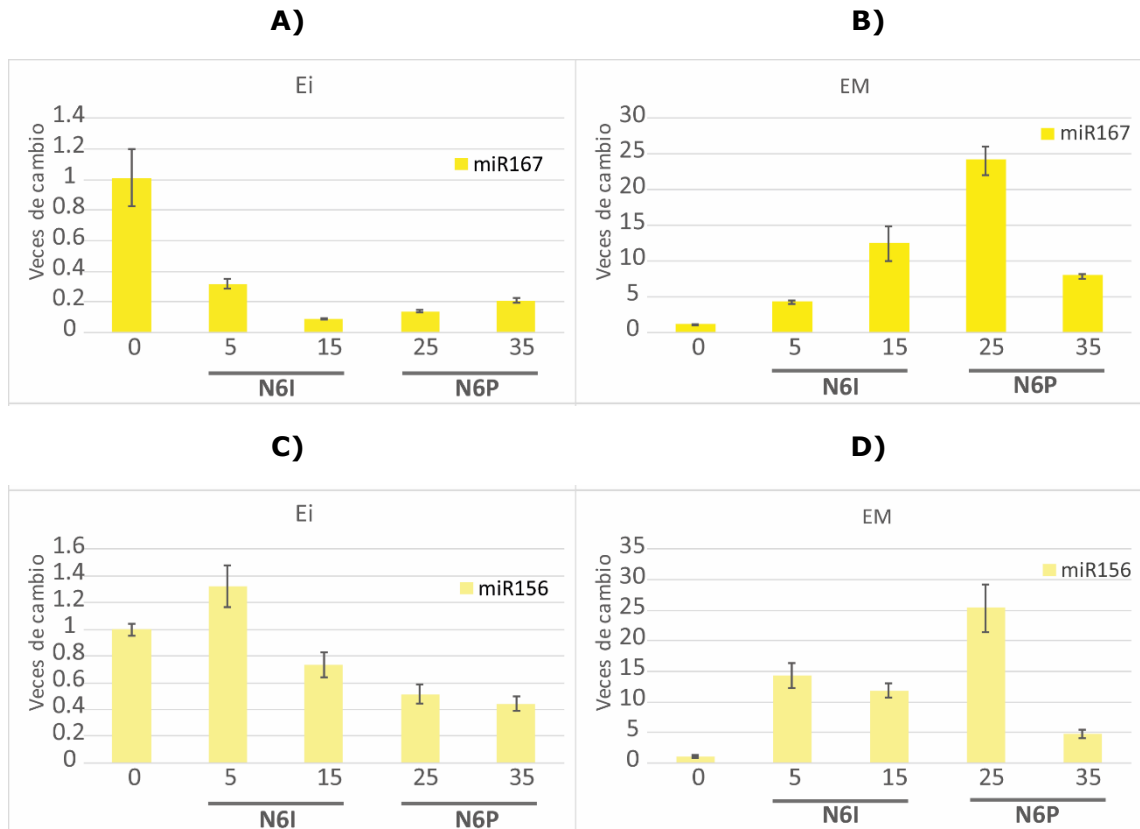


Figura 16. Acumulación de miRNAs en la inducción de masas pro-embriogénicas (IMP). **A)** y **B)** Acumulación de miR167 en la IMP de Ei y EM, respectivamente mediante RT-qPCR. **C)** y **D)** Acumulación de miR156 en la IMP de Ei y EM, respectivamente. Barras indican el error estándar de la media (EEM) de tres réplicas técnicas. N6I: medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D (2mg/L). N6P: medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L) y BA (0.3 mg/L). Los números indican días después de la inducción.

La acumulación de miR167 y *ZmARF34* parece correlacionar inversamente (CI) en ambos procesos de inducción, aunque la correlación es mejor para Ei, sugiriendo que el mRNA está sujeto a la regulación post-transcripcional del miRNA (Figura 17). A los 5 DDI, la acumulación de miR167 parece disminuir en las masas pro-embriogénicas de Ei, mientras que *ZmARF34* incrementa a este

tiempo; a pesar de que la acumulación de *ZmARF34* disminuye durante la desdiferenciación, la CI entre este ARF y miR167 se mantiene. De la misma forma, en la IMP de EM se observa una CI entre la acumulación de miR167 y *ZmARF34*. Sin embargo, la tendencia es opuesta a la observada en Ei; miR167 se induce durante la IMP de EM y su blanco parece disminuir durante el proceso. Este comportamiento contrastante entre ambos tipos de tejidos podría sugerir que la regulación de *ZmARF34* por miR167 es importante para el establecimiento del CE y CNE.

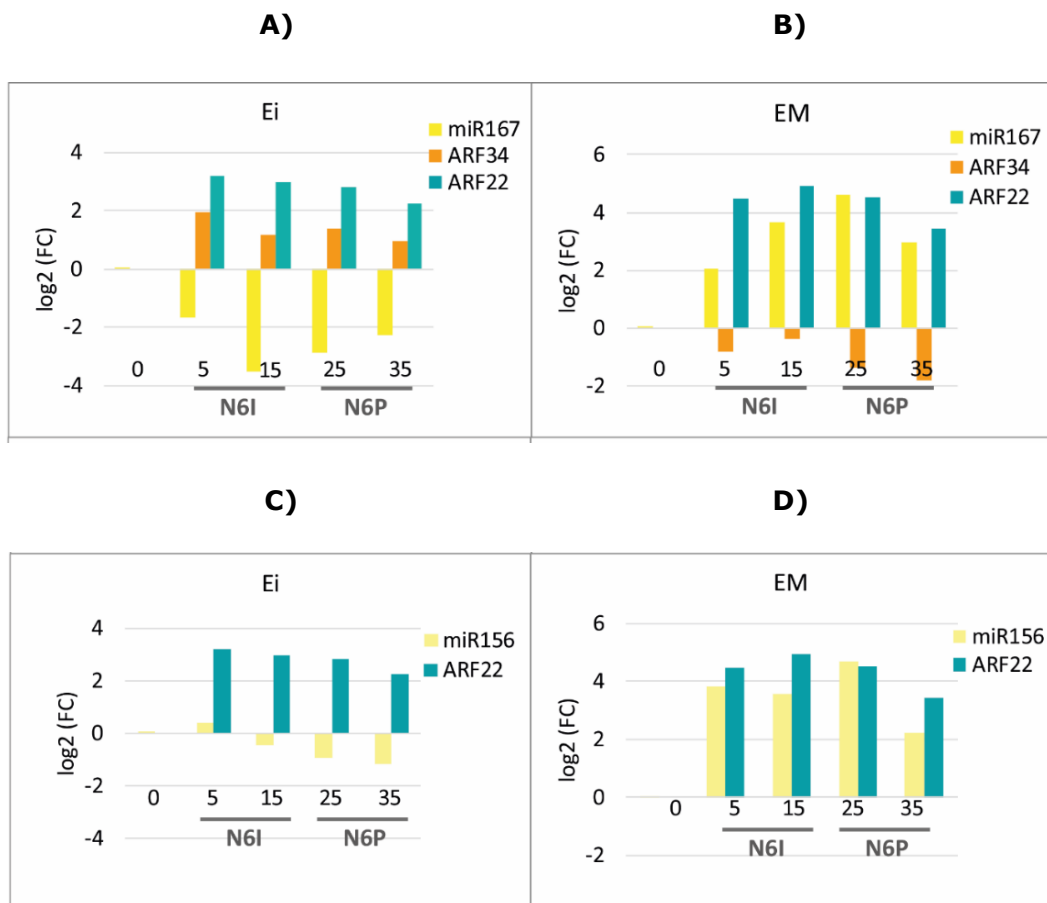


Figura 17. Correspondencia entre la abundancia de miRNAs y sus *ZmARF* blanco durante la IMP. Para analizar el comportamiento de la abundancia de miRNAs y transcritos *ZmARF* blancos de estos se utilizó el logaritmo base 2 de las veces de cambio respecto 0 días ($\log_2(FC)$). **A)** y **B)** miR167 y *ZmARF22/34* durante la IMP de Ei y EM, respectivamente. **C)** y **D)** miR156 y *ZmARF22* durante la IMP de Ei y EM, respectivamente. Los números indican días después de la inducción.

miR167 también podría regular a *ZmARF22*, y al igual que el comportamiento observado con su parólogo, existe una fuerte CI entre miR167 y *ZmARF22* en la inducción de Ei (Figura 17). Interesantemente, en la inducción de EM no se observa una CI, lo cual sugiere que en estos tejidos la acumulación de *ZmARF22* no es regulada por miR167, o bien, es posible que ambos transcritos se localicen en distintos sitios de las masas pro-embriogénicas. miR156 también muestra una CI respecto a la acumulación de *ZmARF22* en la IMP de Ei; los niveles de este sRNA disminuyen durante la inducción mientras que *ZmARF22*, como ya se mencionó, incrementa. Interesantemente, en la inducción de EM, los niveles de miR156 son muy altos y no correlacionan con los de *ZmARF22*.

En resumen, los resultados anteriores sugieren que al igual que en otras especies, en maíz el módulo miR167-ARF6/8 se encuentra activo durante la IMP y es posible que esta regulación del miRNA sobre sus blancos sea relevante para el potencial embriogénico de los Ei. Debido a la escasa CI entre miR156 y ARF22 este miRNA posiblemente no regula a ARF22 durante la IMP.

La acumulación de los *ZmARF* clase I es diferencial y correlaciona inversamente con la de *tasiARF3b* durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz a partir de Ei.

En otras especies como *A. thaliana* y *D. longan* se ha demostrado que ARF3 disminuye durante la desdiferenciación del explante y en etapas tardías de la ES, respectivamente, por lo cual decidimos explorar si esto ocurría maíz. Para ello se analizó la acumulación de los transcritos pertenecientes a la clase I (*AtARF3*) *ZmARF11*, *12*, *26*, *24* y *23*. De manera global, se encontraron dos comportamientos diferenciales entre los ARF en la inducción de Ei; un grupo formado por *ZmARF11*, *ZmARF12* y *ZmARF26* cuyos niveles a los 35 DDI son inferiores a los niveles en Ei. El segundo grupo formado por *ZmARF23* y *ZmARF24*, cuya acumulación presenta cambios durante la inducción pero cuyos niveles en callo son similares a los del explante. En la Figura 18 se muestra el primer grupo para su análisis.

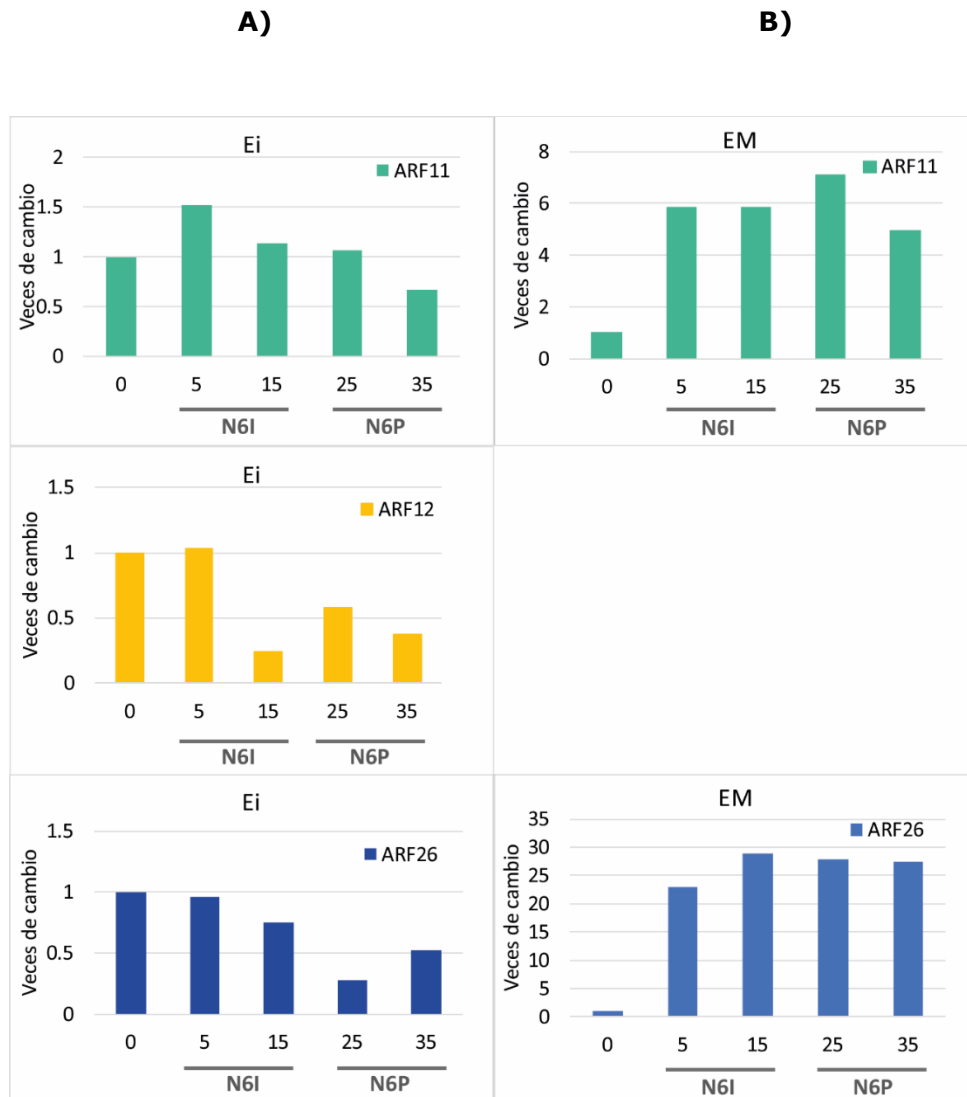


Figura 18. Acumulación de *ZmARF11*, *12* y *26* (clase I) durante la IMP. Se muestran las veces de cambio respecto a la cantidad de transcrito obtenida a los 0 días mediante ddPCR. **A)** Acumulación de *ZmARF11/12/26* durante la IMP de Ei. **B)** Acumulación de *ZmARF11/12/26* durante la inducción de EM. N6I: medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D (2mg/L). N6P: medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L) y BA (0.3 mg/L). Los números indican días después de la inducción. Se muestran los valores correspondientes a una de dos réplicas técnicas.

En Ei, la acumulación de *ZmARF11* parece inducirse en respuesta al medio N6I, mientras que *ZmARF12* y *26* no muestran grandes cambios (Figura 18). Esta respuesta inicial al medio que posee 2,4-D no es de extrañar, ya que los cinco miembros de la clase I poseen en sus promotores elementos AuxRE, y es posible que a este tiempo se observe la regulación a nivel transcripcional de estos genes. Interesantemente, al día 15 la acumulación de los tres *ZmARF* disminuye, y con el cambio a un medio nuevo adicionado con 2,4-D y BA a los 25 días, el único inducido es *ZmARF12*. Cabe mencionar que *ZmARF12* es el único de este grupo que posee un elemento de respuesta a citocininas (Auxin Response Regulator o ARR) en su promotor, lo cual podría explicar su incremento ante este medio nuevo. Finalmente, al día 35 *ZmARF11* y *12* disminuyen respecto al tiempo anterior, mientras que *ZmARF26* incrementa ligeramente, aunque los tres *ZmARF* se mantienen por debajo de los niveles iniciales.

En la IMP a partir de EM la acumulación de estos tres *ZmARF* es contrastante con lo observado en Ei. *ZmARF11* y *ZmARF26* incrementan hasta 6 y 20 veces respectivamente, y estos niveles altos respecto al explante se mantienen durante el proceso de inducción. El cambio global entre el explante y el callo a los 35 DDI coincide con datos previos que indican *ZmARF11* y *26* son más abundantes en Ei respecto a su callo, y presentan un comportamiento opuesto en EM (Juárez-González et al., 2019). Debido a algunas limitaciones derivadas de la pandemia COVID-19, no fue posible determinar la acumulación de *ZmARF12* en EM, sin embargo, este análisis será necesario en proyectos futuros para comprobar si su acumulación tiende a la alta como la de *ZmARF11* y *ZmARF26*.

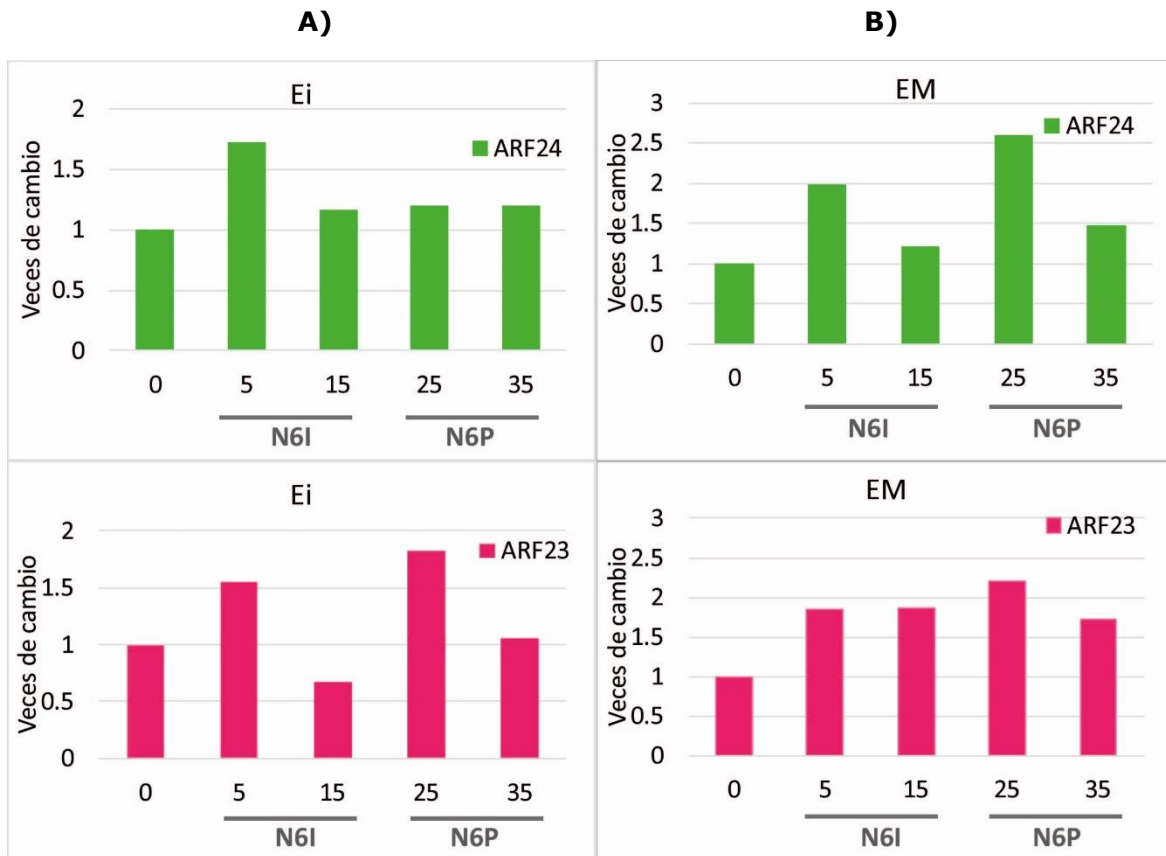


Figura 19. Acumulación de *ZmARF24* y *23* (clase I) durante la IMP. Se muestran las veces de cambio respecto a la cantidad de transcrito obtenida a los 0 días mediante ddPCR. **A)** Acumulación de *ZmARF24/23* durante la IMP de Ei. **B)** Acumulación de *ZmARF24/23* durante la inducción de EM. N6I: medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D (2mg/L). N6P: medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L) y BA (0.3 mg/L). Los números indican días después de la inducción. Se muestran los valores correspondientes a una de dos réplicas técnicas.

El siguiente subgrupo analizado es el formado por *ZmARF23* y *ZmARF24*. La acumulación de ambos se estimula con la transferencia del Ei al medio N6I (Figura 19). Recordemos que a este tiempo se observó el inicio de la desdiferenciación. Ambos reducen sus niveles al día 15 y con el cambio al medio N6P, únicamente *ZmARF23* parece incrementar hasta 2 veces. Este último posee un elemento ARR en su promotor, lo cual podría explicar su incremento con la adición de BA. Finalmente, *ZmARF24* se mantiene a niveles similares en callo de 35 días, mientras que *ZmARF23* reduce su acumulación respecto al tiempo anterior (Figura 19, A).

ZmARF24 y *23* también se muestran dinámicos en la inducción de EM. Ambos incrementan a los 5 días DDI, sin embargo, *ZmARF23* se mantiene en niveles similares a los 15 DDI, mientras que *ZmARF24* disminuye respecto al tiempo anterior (Figura 19, B). Ambos incrementan al día 25 y finalmente, al día 35 DDI, sus niveles disminuyen. De manera global, los niveles de ambos son aproximadamente 1.5 veces superiores en callo respecto al explante. La cinética de estos mRNAs es similar a lo observado en Ei, lo cual sugiere que su regulación podría ser similar o bien, podrían tener una función redundante durante el proceso de IMP de maíz.

Los *ZmARF* clase I están sujetos a la regulación post-transcripcional de los tasiRNAs, y de manera particular, a los derivados del precursor TAS3 (Dotto et al., 2014). Debido a que los ARF3 mostraron una acumulación diferencial en la IMP de Ei y EM, quisimos explorar si existía una correlación entre ellos y tasiARF3bD5, el cual es uno de los dos tasiARFs generados del gen *TAS3b*.



Figura 20. Acumulación de tasiARF3b en la IMP. A) Acumulación de tasiARF3b en la IMP de Ei. **B)** Acumulación de tasiARF3b en la IMP de EM. Barras indican EEM de tres réplicas técnicas. N6I: medio de inducción N6 adicionado con 2,4-D (2mg/L). N6P: medio de proliferación N6 adicionado con 2,4-D (2 mg/L) y BA (0.3 mg/L). Los números indican días después de la inducción.

En la inducción de Ei, tasiARF3b incrementa desde el día 5, y este comportamiento continúa hasta la formación de callo de 35 días (Figura 20, A).

Es notorio que la transferencia a N6P induce más su acumulación respecto los primeros 15 días.

Aunque en EM también se observa que este tasiARF incrementa, el aumento no es paulatino como en Ei, y este alcanza sus niveles máximos en tiempos previos, para finalmente disminuir en callo de 35 días (Figura 20, B).

Con el fin de analizar la CI entre tasiARF3b y sus blancos se empleó nuevamente el log2 de las veces de cambio (Figura 21). En Ei, a los 5 DDI se observa poca CI entre tasiARF3b y los ARF, sin embargo, a partir de los 15 días comienza a haber una mayor CI entre tasiARF3b y los cinco ARF. Los mRNAs de los cinco *ARF3* de maíz poseen dos sitios de reconocimiento de tasiRNAs separados por aproximadamente 200 nt. En plantas mutantes de *lbi1*, tasiARF3bD5 promueve el corte de únicamente *ZmARF23* y *26*, lo cual podría atribuirse a las diferencias de cada sitio (Anexo 6) (Dotto et al., 2014). Al alinear la secuencia de este tasiRNA con todos los sitios de los ARF, se observó que en la región 5' de ambos sitios de reconocimiento *ZmARF12* y *24* se generan tres desapareamientos con el tasiARF3bD5, lo cual ocasiona que su reconocimiento sea menos probable que para *ZmARF11*, *26* y *23* (Dai et al., 2011). A pesar de que *in silico* el reconocimiento de *ZmARF12* es de los menos probables, este ARF presenta la CI más fuerte al día 15, seguido de *ZmARF23* y *26* (Figura 21, A). En etapas más avanzadas, la CI se vuelve más dinámica, pero a los 35 días los niveles se equilibran entre *ZmARF11,12* y *26* (Figura 21, A). Las diferencias en los sitios de reconocimiento también podrían contribuir a los cambios observados en la acumulación de los ARF3 en Ei (Anexo 6).

A diferencia del Ei, en la IMP de EM no se observa una clara CI entre el tasiRNA y sus blancos (Figura 21, B). En cambio, se observa una abundancia más homogénea entre etapas para los ARF a pesar de los incrementos del tasiARF3b, por lo cual, este no parece estar regulando a sus blancos. Debido a que los tasiRNAs son elementos móviles y su localización es importante para su actividad, sería interesante estudiar a nivel histológico la expresión y/o acumulación de estos RNAs.

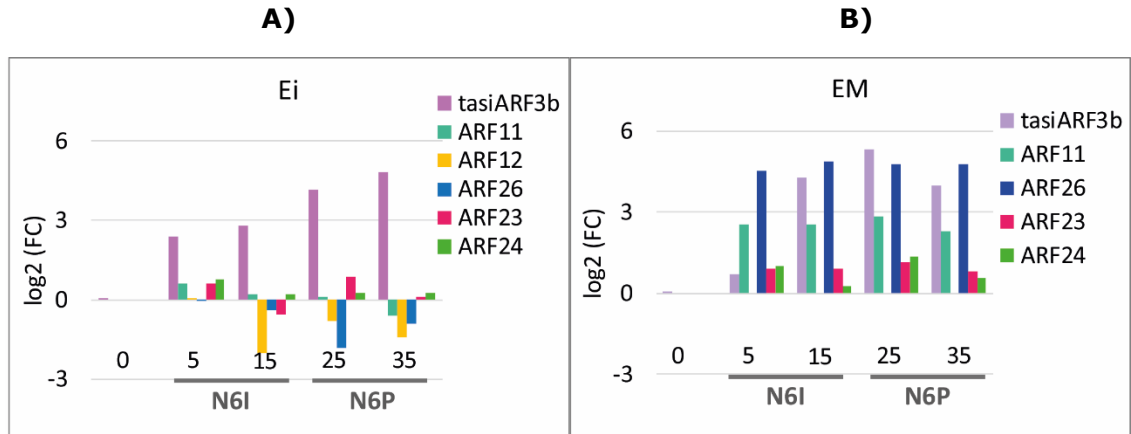


Figura 21. Correspondencia entre la abundancia de tasiARF3b y sus *ZmARF* blanco (Clase I) durante la IMP. Para analizar el comportamiento de la abundancia de miRNAs y transcritos *ZmARF* blancos de estos se utilizó el logaritmo base 2 de las veces de cambio respecto 0 días (\log_2FC). **A)** inducción a partir de Ei y **B)** inducción a partir de EM. Los números indican días después de la inducción.

Nuestros resultados indican que los ARF3 de maíz se acumulan diferencialmente en la IMP a partir Ei y EM y esta diferencia podría ser el resultado de su regulación por tasiARF3bD5 únicamente en la IMP de Ei, contribuyendo así a la capacidad embriogénica de este tejido.

Los callos obtenidos de Ei son embriogénicos y capaces de regenerar plántulas de maíz.

Para comprobar que los Ei empleados en nuestro estudio son capaces de generar callos embriogénicos (CE), se llevó a cabo el proceso de regeneración de plántulas a partir de los callos obtenidos de este lote, subcultivados durante 8 meses. Siguiendo la metodología descrita por López-Ruiz y colaboradores (2019), en siete frascos con medio N6P 50%, se colocó 1g de CE cada uno, los cuales fueron disgregados y subcultivados hasta su transferencia a sustrato. Al finalizar este proceso (60 días hasta el traspase a sustrato), se obtuvieron en promedio 4 plántulas por g de callo. En la Figura 22, se muestran imágenes correspondientes a cada etapa del proceso.

Como se describió previamente, a los 15 días en el medio N6P 50% H se observó la aparición de protuberancias alargadas y verdes. Al remover las hormonas se

observó la elongación de las hojas de las plántulas, posteriormente, en el medio MS las hojas adquirieron una mayor longitud y se observó la emergencia de raíces.

Finalmente, las plántulas fueron transferidas exitosamente a sustrato, con lo cual comprobamos que el proceso de dediferenciación de Ei que analizamos dio como resultado la generación de CE con la capacidad de ser propagados y regenerar plántulas de maíz hasta 8 meses después.

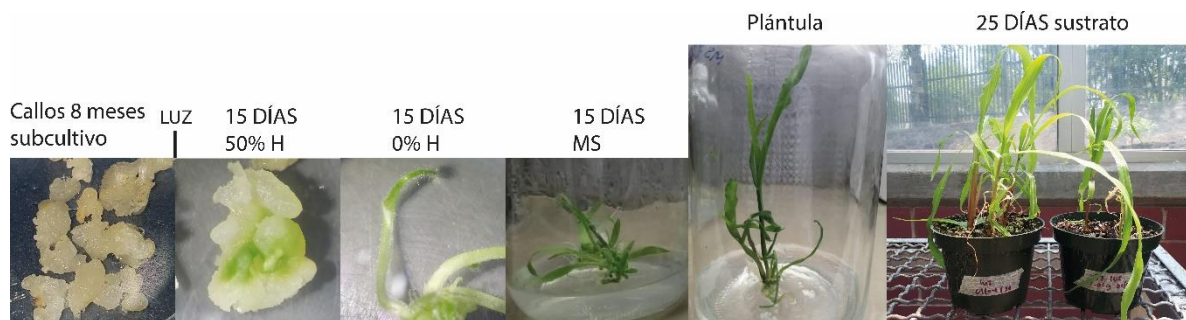


Figura 22. Regeneración de callos embriogénicos. Callos embriogénicos de maíz de 8 meses se subcultivaron cada quince días a los medios N6P 50%H, 0%H, MS respectivamente. N6P 50% H: medio N6 adicionado con 2,4-D (1.0 mg/L) y BA: (0.15 mg/L). N6P 0% H: medio N6 sin hormonas. MS: medio Murashige and Skoog.

Discusión

La ES es un proceso que ha sido ampliamente estudiado en diversas especies de plantas; *Arabidopsis*, zanahoria, arroz, algodón, maíz, etc. Este proceso nos provee de un modelo único con el cual se pueden estudiar los mecanismos moleculares que regulan la plasticidad en plantas. Estudiar la ES nos permitiría entender los mecanismos que contribuyen a la toti y pluripotencia en estos organismos. Este proceso comienza cuando una señal (auxinas) es percibida por el explante, el cual genera una respuesta (reprogramación génica), que da como resultado la formación de embriones somáticos (Wojcikowska et al, 2020).

La respuesta del explante a la señal depende tanto de factores exógenos (estrés, régimen hormonal, fotoperiodo) como endógenos (genotipo, explante, hormonas) (Chávez-Hernández et al., 2015). En los últimos años, el papel de los sRNAs en la ES ha sido de gran interés y de forma particular, nuestro laboratorio se ha dedicado a estudiar la función que ejercen los miRNAs en la inducción de callos embriogénicos y la regeneración de plántulas en la variedad mexicana Tuxpeño VS-535. Esta raza de maíz es altamente embriogénica y ampliamente utilizada en cultivo *in vitro* en nuestro país (Garrocho-Villegas et al., 2012). Muchos estudios han relacionado la función de estos ncRNAs en regular transcritos involucrados en la señalización de auxinas durante el desarrollo en la ES. Debido a la naturaleza del proceso, las auxinas son uno de los factores exógenos más relevantes para inducir embriones somáticos.

En nuestro laboratorio se ha visto que la acumulación de algunos miRNAs cambia de manera dinámica en el establecimiento de callos embriogénicos de maíz, y durante la regeneración de plantas. Además, estas moléculas influyen en la capacidad embriogénica del explante, ya que los cambios en su expresión también son relevantes durante la embriogénesis cigótica (Alejandri-Ramírez et al., 2018; López-Ruiz et al., 2019; Juárez-González et al., 2019). Los sRNAs contribuyen a la regulación post-transcripcional de la expresión génica, y en la ES se ha demostrado que los miRNAs juegan un papel importante en la respuesta a auxinas, puesto que regulan diversos elementos centrales de esta vía, entre

los cuales destacan los Factores de Respuesta a Auxina (Wójcikowksa et al., 2020).

En la embriogénesis cigótica la actividad promotora de AtARF6 es visible desde el embrión octante y ésta se mantiene hasta la etapa globular (Rademacher et al., 2011). De la misma forma, en maíz la expresión de algunos de sus ortólogos es constante entre Ei y EM (Xing et al., 2011). A diferencia de este proceso, en la ES de Arabidopsis, *ARF6* y *8* incrementan en etapas tardías, y mutantes de ambos factores de transcripción muestran una menor eficiencia y productividad para inducir embriones somáticos (Wójcikowska & Gaj 2017). Aunque en maíz existen siete ortólogos de AtARF6/8, en el presente estudio se evaluó la acumulación de únicamente ARFs regulados por sRNAs, *ZmARF22* y *34* (Xing et al., 2011). Estos factores de transcripción presentan un 80% de identidad con AtARF6, y un 50% de identidad con AtARF8, por lo cual es posible que su función sea más relacionada a la de AtARF6. Al igual que en *A. thaliana*, en maíz los homólogos a *AtARF6* también mostraron un incremento durante la IMP, aunque en etapas tempranas de dicho proceso. A diferencia de la ES, en la organogénesis, un proceso donde también se lleva a cabo una desdiferenciación y rediferenciación, la expresión de *AtARF6/8* disminuye, sugiriendo que el aumento en su expresión es característico de la desdiferenciación vía ES (Wójcikowska & Gaj 2017). Un comportamiento similar se observó en nuestro estudio para *ZmARF34* en la desdiferenciación de EM. Nuestros resultados sugieren que en la IMP de maíz los homólogos a AtARF6 también juegan un papel importante y es posible que la inducción de *ZmARF34* sea relevante para el establecimiento de CE. Si bien, la regulación de *ARF6* y *ARF8* por miR167 se ha estudiado en la ES de múltiples organismos: *A. thaliana*, *O. sativa*, *D. longan*, *G. hirsutum*, (Su et al., 2016; Sinha et al., 2019; Lin et al., 2015; Yang et al., 2013), su papel en este proceso no ha sido del todo elucidado, aunque estudios en cultivos celulares de arroz revelan que su regulación permite ajustar los niveles de auxinas libres en las células (Yang et al., 2006).

miR167 se expresa durante la embriogénesis cigótica y en Arabidopsis, forma un gradiente en cotiledones, sugiriendo que actúa de forma no autónoma

durante el desarrollo embrionario (Ágyi and Havelda 2013). En otras especies como *Brassica napus*, miR167 se expresa preferencialmente en endospermo (Huang et al., 2013). Debido a las diferencias en su expresión entre especies se cree que las funciones de miR167 pueden ser distintas dependiendo del organismo.

En *Arabidopsis*, miR167 disminuye dramáticamente a los dos días de someter cultivos embriogénicos a la inducción de embriones somáticos, correlacionando inversamente con los niveles de sus blancos (Su et al., 2016; Yang et al., 2013). Mientras que en algodón, la acumulación de miR167 disminuye durante las primeras horas de desdiferenciación y muestra pocos cambios durante los 5 días subsecuentes (Yang et al., 2013). El decremento en la acumulación de miR167 también se ha observado en los primeros 5 días de desdiferenciación de Ei de maíz 18-599R (Shen et al. 2013). Nuestros resultados sugieren que en maíz Tuxpeño, miR167 sigue una tendencia similar a la del maíz 18-599R en la IMP de Ei, pero no en la inducción a partir de EM, lo cual podría tener relevancia para la desdiferenciación apropiada y alcance de potencial embriogénico. No obstante, es necesario explorar si este decremento se debe a que su expresión se vuelve más localizada, como se observó al evaluar la actividad promotora de *MIR167* en *Arabidopsis*, con lo cual se demostró que la expresión de miR167 cambia de capas subepidérmicas a epidérmicas, en las regiones del callo donde se iniciará el embrión somático (Su et al., 2016).

Mientras que en plantas WT de *Arabidopsis* la localización de auxinas se restringe a los sitios en donde se iniciarán los embriones somáticos, la sobreexpresión de miR167 altera el transporte local de auxinas, ocasionando una distribución menos localizada y más desorganizada de esta hormona (Su et al., 2016). Esto podría suceder en la IMP de EM de maíz, en donde observamos niveles altos de miR167 que correlacionan inversamente con *ZmARF34*, lo cual podría contribuir a la escasa capacidad embriogénica de estos tejidos. A pesar de que *ZmARF34* y *ZmARF22* poseen el mismo sitio de reconocimiento para miR167, los niveles de *ZmARF22* no correlacionan con los de miR167 en estos tejidos, sugiriendo que existen mecanismos adicionales que contribuyen al incremento de *ZmARF22* o bien, no permiten que el miRNA ejerza su actividad sobre *ZmARF22*. La

regulación espacio-temporal de los miRNAs se controla en diversos niveles, desde la regulación transcripcional de los genes *MIR*, la regulación de la maquinaria de procesamiento (*HYL1*, *SE*, *DCL1*) o del ensamblaje del RISC (*AGO*), así como la localización del sRNA, como se ha observado con los tasiARFs. Con ello se asegura una fina regulación de sus blancos (Wang et al., 2019). En maíz, la expresión de las enzimas involucradas en la biogénesis de miRNAs no ha sido explorada a detalle en la inducción de Ei y EM. Sin embargo, en otras especies, la expresión de algunos miembros de estas familias parece cambiar durante la ES. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se ha visto que *DCL1* y *AGO1* disminuyen en etapas tempranas de la ES (Szyrajew et al., 2017). Aunque la mayoría de las enzimas de la vía de silenciamiento de miRNAs se encuentran sobrerrepresentadas en etapas tempranas de la embriogénesis cigótica de maíz y tienden a disminuir durante este proceso y la IMP (Juárez-González, datos no publicados), entre callos podrían existir diferencias en los niveles de algunos transcritos. Esto también podría contribuir a los contrastes observados en la acumulación de miRNAs entre tejidos embriogénicos y no embriogénicos. Aunque la mayoría de los estudios se enfocan en entender la función de los miRNAs en la ES, estudiar los distintos componentes involucrados en esta vía de silenciamiento nos proporcionaría información adicional para entender los mecanismos que rigen la ES.

Al igual que miR167, miR156 también se encuentra activo en la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis*: desde etapas tempranas, miR156 regula la morfogénesis a través de su blanco *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL)*. En el embrión octante miR156 reprime a *SPL10* y *SPL11* y de esta forma previene la acumulación de transcritos de genes que normalmente se inducen durante la maduración del embrión (Plotnikova et al., 2019). En esta planta, la acumulación de miR156 disminuye gradualmente durante las primeras 48h de someter cultivos embriogénicos a la inducción de embriones somáticos. Sin embargo, en etapas más avanzadas se observó que este miRNA se localiza en cotiledones y la proximidad del SAM (Wójcik et al., 2018). Estos resultados coinciden con los altos niveles de expresión en el embrión somático cotiledonar de *D. longan* (Lin et al., 2013). Debido a su acumulación en etapas avanzadas

de la ES de Arabidopsis, algodón y naranja, se cree que miR156 podría tener funciones similares durante la embriogénesis somática y cigótica en estas especies (Wójcik et al., 2017; Wu et al., 2011; Yang et al., 2013). En maíz, miR156 es de los miRNAs más abundante en callos de Ei, aunque durante el proceso de IMP, al igual que miR167, su acumulación disminuye entre Ei y callo de 1 mes de inducción (Alejandri-Ramírez et al., 2018; Juárez-González et al., 2019). En nuestro estudio observamos que la acumulación de miR156 tiende a disminuir en los cultivos embriogénicos, aunque en los primeros 5 días parece inducirse en ambos cultivos. Al igual que miR167, los niveles de miR156 en los tejidos no embriogénicos son opuestos, tendiendo a una mayor acumulación.

En trigo los niveles de miR156 aumentan en los primeros 6 días de inducción de EM y Ei, sin embargo, en estos últimos disminuyen a los 15 días mientras que en EM se mantienen a la alza; este comportamiento podría ser comparable con nuestros resultados en maíz. Al igual que en maíz, en trigo la acumulación de miRNAs es mayor en etapas tempranas de inducción de Ei respecto a EM (Chu et al., 2016; Juárez-González et al., 2019). La inducción de miR156 en los primeros 5 días de IMP de maíz se asemeja a lo observado en trigo, sin embargo difiere de los resultados en Arabidopsis. Es importante notar que los estudios de la acumulación de miR156 en *A. thaliana* y *D. longan* se enfocaron al desarrollo del embrión somático y no en el proceso de inducción de callos embriogénicos (Lin & Lai, 2013; Su et al., 2016; Wojcik et al. 2018); además, es posible que la función de este miRNA difiera entre ambos procesos en mono y dicotiledóneas. En la dediferenciación de Ei de maíz 18-599R, miR156 disminuye a los 5 días pero incrementa al día 15, superando su acumulación inicial (Shen et al. 2013). Estos resultados contrastan con lo observado en maíz Tuxpeño, en donde podría existir una inducción de miR156 en etapas tempranas de dediferenciación pero una reducción en etapas tardías, sugiriendo que la función de este miRNA podría ser distinta entre variedades de maíz.

Aunque mediante herramientas bioinformáticas se predijo que miR156 podría regular a *ZmARF22*, esta regulación no ha sido validada (Juárez-González et al., 2019). Al analizar la CI entre miR156 y *ZmARF22*, se observa que cierta CI

prevalece conforme avanza la desdiferenciación de Ei. Mientras que, al igual que miR167, en EM existe una escasa CI entre este miRNA y *ZmARF22*, por lo cual, con esta primera aproximación, no es posible inferir si durante la IMP de maíz miR156 podría regular negativamente a *ZmARF22*.

Además de los miRNAs, a nivel transcripcional, las características de la región promotora también contribuyen en la expresión génica. Tanto *ZmARF22* y *ZmARF34* presentan más de un AuxRE, y ambos poseen elementos de respuesta a citocininas tipo ARR (Figura 23) (Chow et al., 2016). Este último elemento podría explicar por qué después de la transferencia al medio N6P se induce la acumulación de *ZmARF34* (Figura 15, A). Debido a sus altos niveles de acumulación durante la IMP de maíz, estos ARF podrían ser relevantes para la activación de genes necesarios para llevar a cabo los procesos de desdiferenciación y reprogramación (Nowak and Gaj 2016).

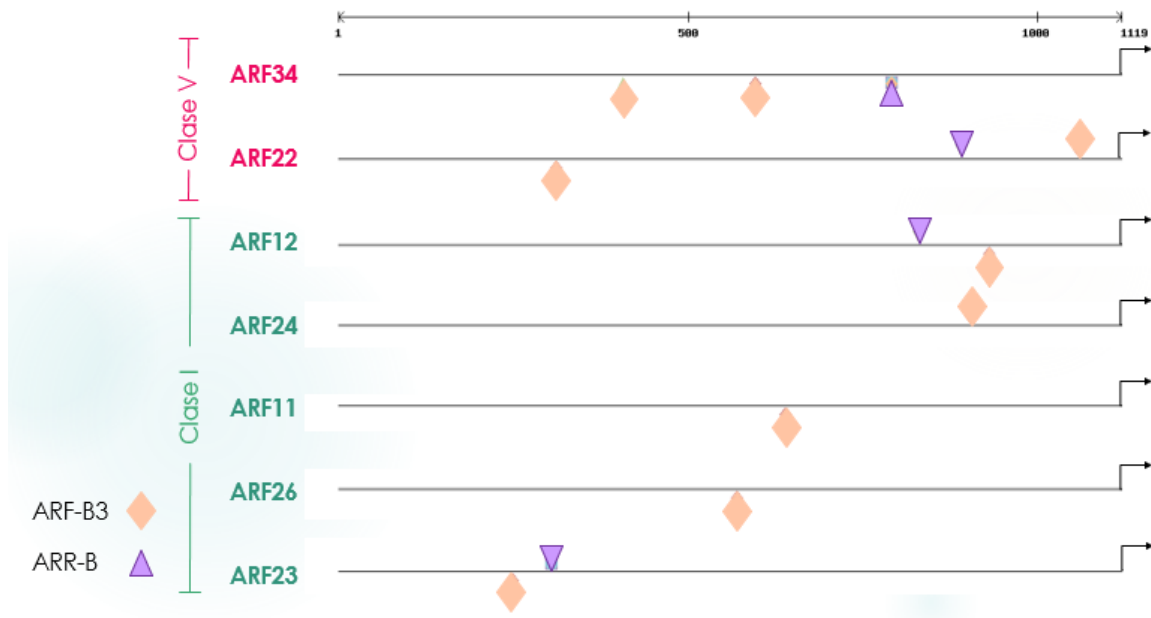


Figura 23. Promotores de *ZmARF* clase I y *ZmARF* clase V. Se muestra una región de 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción predicho en Plantpan 2.0 (Chow et al., 2016).

Nuestros resultados sugieren que, durante la IMP de Ei, la disminución de los niveles de miR156 y miR167 son necesarios para la regulación adecuada de sus blancos, permitiendo que el tejido sea capaz de responder al estímulo y llevar a cabo el proceso de desdiferenciación. Debido a que encontramos una mayor CI entre los niveles de acumulación de miRNAs y ARF en tejidos embriogénicos, es posible que este mecanismo de regulación se encuentre alterado en la inducción de EM.

Otro mecanismo de silenciamiento posiblemente involucrado en la regulación de los ARF en la ES es la vía TAS3-ARF3, la cual ha sido ampliamente estudiada en diversos procesos del desarrollo, como en la formación de raíces laterales y el establecimiento de la arquitectura floral (Chitwood et al., 2009). En maíz, la interrupción de la biogénesis de tasiRNAs en mutantes *lbi1*, proteína que estabiliza el transcrito *TAS3* para impedir su degradación e iniciar la síntesis de la segunda cadena de RNA, ocasiona que estas plantas desarrollen hojas abaxializadas, remarcando la importancia de esta vía para el establecimiento de la polaridad de la hoja (Dotto et al., 2014). Consistente con esta función, en *Arabidopsis* se ha detectado actividad promotora de *AtARF3* en el lado abaxial de los cotiledones de embriones en etapa corazón (Rademacher et al., 2011), no obstante, el papel de *AtARF3* en la embriogénesis cigótica permanece poco explorada. En la ES, la expresión de *AtARF3* disminuye durante la desdiferenciación del explante y mutantes de este factor de transcripción muestran una mejor eficiencia para inducir embriones somáticos (Wojcikowska & Gaj, 2017). En *D. longan* la expresión de *ARF3* permanece casi constante entre callos y cultivos pro-embriogénicos, pero disminuye hacia la etapa cotiledonar de la ES (Lin et al., 2015). En maíz, la expresión de sus parálogos durante el desarrollo embrionario parece discernir entre variedades; en maíz B73 los cinco miembros de esta clase presentan tres patrones de expresión entre los estadios Ei y EM, mientras que en VS-535 los cinco tienden a disminuir (Juárez-González et al., 2019; Xing et al., 2011).

A diferencia de lo observado en *A. thaliana* y *D. longan*, nuestros resultados sugieren que en maíz podría existir incrementos y decrementos en la expresión

de los *ARF3* durante la IMP. A pesar de pertenecer a la misma clase, la respuesta de los cinco diferentes miembros de la familia ARF3 ante el estímulo de inducción es diferencial. Estas diferencias se han descrito previamente para los miembros de esta clase ante el tratamiento con auxinas exógenas (Xing et al., 2011). En nuestro modelo, existe un grupo conformado por *ZmARF11*, *ZmARF12* y *ZmARF26* cuyos niveles finales disminuyen, y otro grupo conformado por *ZmARF23* y *ZmARF24* que se mantiene estable en la inducción de tejidos embriogénicos. La dinámica del primer grupo podría ser comparable con la expresión de *AtARF3* y *DIARF3* en la ES de estos organismos (Lin et al., 2015; Wojcikowska & Gaj, 2017). Aunque la acumulación del segundo grupo, conformado por *ZmARF23* y *ZmARF24*, no muestra grandes cambios entre Ei y callo, su respuesta ante el estímulo de inducción parece ser más dinámica, tanto en tejidos embriogénicos y no embriogénicos, mostrando incrementos y decrementos al subcultivar los tejidos.

A diferencia de los tejidos embriogénicos, en la IMP de EM todos los *ARF3* (a excepción de *ZmARF12*) parecen incrementar. El gen *ZmARF12* no se pudo cuantificar mediante PCR digital, sin embargo en PCR punto final parece ser un transcrito poco abundante desde el tiempo cero (EM) hasta callo (Anexo 5). El incremento de estos mRNAs en respuesta al estímulo de IMP parece corresponder con el incremento observado durante la germinación de maíz, el cual se ha visto desde las 24 h post-imbibición (Xing et al. 2011). Los cambios en la acumulación de *ZmARF23* y *ZmARF24* durante la IMP son interesantes debido a que muestran incrementos y decrementos en los mismos DDI en ambos procesos de desdiferenciación (con excepción de los días 15 y 25, para *ZmARF23* en EM y *ZmARF24* en Ei, respectivamente, figura 19). Lo anterior sugiere que la regulación de ambos ARF se mantiene entre los estadíos de Ei y EM. Los cambios de *ZmARF23* y *ZmARF24* durante la IMP podrían ser el resultado de una regulación compleja, la cual también involucra la regulación a nivel transcripcional, en donde los elementos ARE y ARR presentes en la región promotora de estos genes podrían jugar un papel importante (Chow et al., 2016). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la regulación de tasiARF3b sobre sus blancos no se sobrelapa, ya que, a pesar de que el tasiRNA aumenta

en la IMP, este incremento no afecta por igual a sus blancos, y además difiere entre Ei y EM.

Los tasiRNAs juegan un papel importante en la regulación de los *ARF3*. Su acumulación, y la de algunos elementos involucrados en su biogénesis, se ha evaluado en la embriogénesis somática. miR390 y tasiARF3 presentan un pico en su acumulación en embriones en etapa cotiledonar tardía de *Larix leptolepis* (Zhang et al., 2012, 2013), por lo cual se cree que la vía miR390-TAS3-tasiRNA podría ser importante durante la ES.

En nuestro estudio, se logró detectar la acumulación de un tasiRNA derivado de *TAS3b*, tasiARF3bD5. Aunque la abundancia de este tasiARF incrementó de forma gradual durante los procesos de desdiferenciación tanto de Ei como EM, en los tejidos no embriogénicos la acumulación de tasiARF3bD5 descendió en la etapa final, lo cual podría contribuir a las diferencias fenotípicas entre estos tejidos. Al analizar la CI entre el tasiRNA y los *ARF3* de maíz se observó que esta se vuelve más evidente durante la desdiferenciación de Ei, mientras que en EM no se observó CI en ninguna etapa. Esto podría explicar en parte el comportamiento diferencial de los ARF de clase I entre las IMP de Ei y de EM. A diferencia de la CI del módulo miR167/ARF6 que ha sido ampliamente reportada en la ES de diversas especies, existen pocos reportes acerca de una CI entre tasiRNAs/ARF3 para el correcto funcionamiento de la ES. Aunque en *D. longan* se observó el incremento del precursor *TAS3* en la ES, no hubo evidencias de una CI entre este y *DIARF3* bajo el tratamiento con 2,4-D, sugiriendo que los mecanismos moleculares de respuesta ante esta hormona son aún más complejos (Lin et al., 2015).

Si bien no existen reportes del papel de la vía tasiARF en la ES, el uso de tasiRNAs para regular la respuesta de un tejido heterogéneo a auxinas es un mecanismo conservado en diversas especies. En musgos se observó que la regulación de los *ARF3* mediante gradientes de tasiRNAs permite suprimir el "ruido" intrínseco de una respuesta a diversos estímulos ambientales, incrementando la sensibilidad y robustez de la red de regulación de auxinas. Al limitar la expresión de sus blancos hacia ciertas regiones del caulonema, en

Physcomitrella patens la vía tasiRNA permite que este tejido sea capaz de responder de diversas formas al NAA; este tipo de respuesta también se ha visto en la iniciación de raíces laterales de *Arabidopsis* (Plavskin et al., 2016). Debido a esta forma de regular la expresión de sus blancos, la vía tasiRNA-ARF podría otorgar ventajas en la respuesta a auxinas en diversos procesos, incluyendo nuestro modelo, y no sólo ser útil para la morfogénesis en una vía específica de desarrollo.

Debido a que la regulación transcripcional por sí sola no sería capaz de restringir la distribución de sus transcritos blancos, los sRNAs juegan un papel esencial en el establecimiento de patrones durante el desarrollo de las plantas (Wu et al., 2006). La red de regulación mediada por ARF durante la ES puede llegar a ser muy compleja gracias a la posible retroalimentación en la transcripción de los ARF propuestos, y pueden existir otras funciones de los ARF en la ES que simplemente la actividad activadora o represora de sus genes blancos. Tal puede ser el caso de ARF activadores o represores que se unen al mismo AuxRE en el mismo gen blanco (Chandler 2016). En nuestro estudio, todos los ARF analizados poseen AuxRE, y estos presentan distintas dinámicas de acumulación. Sería interesante analizar el comportamiento de un ARF que carezca de AuxRE; en *Arabidopsis* se ha visto que estos no se transcriben durante la ES. Es importante mencionar que además de las auxinas, diversos estreses abióticos también modulan la transcripción de genes *ARF*. Estos incluyen el estrés por especies reactivas de oxígeno, las cuales se producen de forma activa durante los cultivos embriogénicos y pueden controlar la expresión de *ARFs* durante la inducción de ES (Wojcikowska et al., 2017).

De manea general los resultados de este trabajo nos indican que durante la IMP de Ei, existe una mayor regulación de los sRNAs analizados sobre sus blancos. Aunque la acumulación de sRNA/blanco es dinámica en la desdiferenciación de ambos explantes, las tendencias son distintas. Tanto el módulo miR167/ARF6 como el módulo tasiARF/ARF3 parecen estar operando de forma adecuada en la IMP de Ei, no así, en la IMP de EM, sugiriendo que la regulación de la acumulación de estos ARF es necesaria para alcanzar el potencial embriogénico (Figura 24).

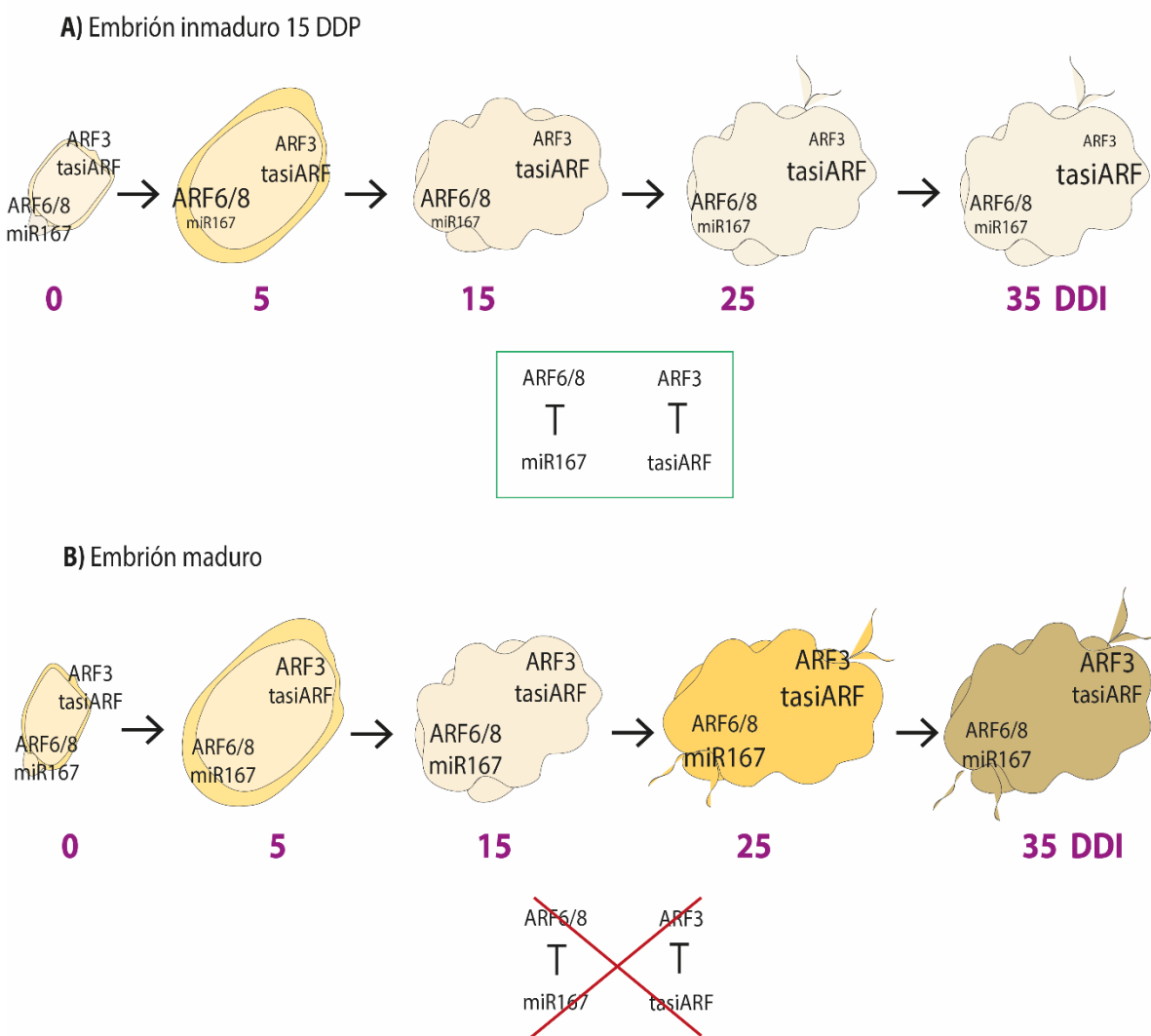


Figura 24. Modelo propuesto para la actividad de sRNAs y sus blancos durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz Tuxpeño VS-535. A) En Ei, la correspondencia inversa entre el sRNA y su blanco se observa desde etapas tempranas de la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz. **B)** En EM, el cultivo en medio N6 adicionado con 2,4-D induce la acumulación de la mayoría de los transcritos y no se observa CI entre el sRNA y su blanco. La acumulación de los mRNAs analizados es diferencial entre ambos tejidos. Nuestros resultados sugieren que los módulos miR167-ARF6/8 y tasiARF-ARF3 se encuentran operando adecuadamente únicamente en la IMP de Ei.

Conclusiones

- *ZmARF34* muestra un comportamiento diferencial en la inducción de masas pro-embriogénicas de EM y su correlación inversa con miR167 es evidente sólo para Ei, lo cual sugiere que este módulo es importante para el establecimiento de callos embriogénicos.
- *ZmARF11/12* y *26* (clase I, *ARF3*) disminuyen durante la IMP de Ei, sugiriendo que su regulación es parcialmente redundante durante este proceso. Debido a las diferencias observadas en la cinética entre Ei y EM, es posible que su reducción sea necesaria para el establecimiento de CE, mientras que el incremento de estos mRNAs en EM podría afectar la desdiferenciación hacia un tejido embriogénico.
- La cinética de acumulación de *ZmARF24* y *23* (clase I, *ARF3*) en la IMP es distinta al resto de su clase, debido a que sus niveles permanecen similares o ligeramente superiores en callo respecto al explante.
- La acumulación de tasiARF3bD5 incrementa hasta los 35 días después de la inducción, sin embargo, en tejidos embriogénicos los niveles de este tasiRNA se mantienen elevados en etapas tardías, mientras que en tejidos no embriogénicos presentan un decaimiento.
- Existe una mayor correlación inversa entre los sRNAs y *ZmARF* estudiados en la IMP de Ei, sugiriendo que esta regulación postranscripcional es relevante para el proceso de inducción de CE.

Perspectivas

- Confirmar si *ZmARF12* tiene cambios durante la IMP de EM.
- Realizar una segunda réplica biológica de los elementos analizados para comprobar las tendencias observadas.
- Comprobar si miR167 y tasiARF3b se encuentran activos y regulando a *ARF6* y *ARF3*, respectivamente, durante la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz.
- Evaluar si la expresión y/o acumulación de miR167 y tasiARF3bD5 afectan la inducción de masas pro-embriogénicas de maíz.

Referencias

- Ágyi Á, Havelda Z (2013) Analysis of gradient-like expression of miR167 in *Arabidopsis thaliana* embryonic tissue. *J Plant Biol* 56(5):336–344. doi:10.1007/s12374-013-0097-3
- 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.
- Armstrong, C. L., & Green, C. E. (1985). Establishment and maintenance of friable,embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 164(2), 207-214.
- Axtell, M.J. (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants. *Ann Rev Plant Biol* (64),137-59.
- Bélanger, S., Baldrich, P., Lemay, M. A., Marchand, S., Esteves, P., Meyers, B. C., & Belzile, F. (2020). The commitment of barley microspores into embryogenesis correlates with miRNA-directed regulation of members of the SPL, GRF and HD-ZIPIII transcription factor families. *Plant Direct*, 4(12), e00289.
- Borges, F. & Martienssen, R. A. The expanding world of small RNAs in plants (2015) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (16), 727-741
- Chandler, J. W. (2016) Auxin response factors. *Plant Cell Environ* 39:1014–1028
- 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 Mol Biol* 62 (1-2): 1-14
- Chettoor, A. M., Phillips, A. R., Coker, C. T., Dilkes, B. & Evans, M. M. (2016). Maternal Gametophyte Effects on Seed Development in Maize. *Genetics*, 204(1), 233-48.
- Chow, C. N., Zheng, H. Q., Wu, N. Y., Chien, C. H., Huang, H. D., Lee, T. Y., Chiang-Hsieh, Y. F., Hou, P. F., Yang, T. Y., & Chang, W. C. (2016). PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1154–D1160.

- Dai X, Zhao PX. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Web Server issue): W155-W159. doi:10.1093/nar/gkr319
- Dotto, M.C., Petsch, K.A., Aukerman, M.J., Beatty, M., Hammell. M. & Timmermans M.C.P. (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): e1004826. doi:10.1371/journal.pgen.1004826
- Emons, A.M.C. & Kieft, H. (1995). Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.). In: Bajaj Y.P.S. (eds) *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 31. Springer, Berlin, Heidelberg
- Fontanet, P. & Vicent, C. M. (2008). Maize embryogenesis. In *Plant embryogenesis* (pp.17-29). Humana Press
- Garrocho-Villegas, V., de Jesús-Olivera, M. T., & Quintanar, E. S. (2012). Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. *Plant cell culture protocols*, 173-182.
- Gliwicka, M.; Nowak, K.; Balazadeh, S.; Mueller-Roeber, B.; Gaj, M.D. Extensive Modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 2013, 8.
- Guilfoyle, T.J. & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10:453–460. doi:10.1016/j.pbi.2007.08.014
- Huang D, Koh C, Feurtado JA, Tsang EW, Cutler AJ (2013) MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. *BMC Genom* 14:140. doi:10.1186/1471-2164-14-140
- Jakubekova, M., Uvačkova, L., & Obert, B. (2011). Callus induction from mature maize (*Zea mays* L.) embryos-effect of plant growth regulators. In *Climate change: challenges and opportunities in agriculture. AGRISAFE Final Conference, 21-23 March 2011, Budapest, Hungary. Proceedings* (pp. 304-307). Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences.
- Juárez-González, V. T., López-Ruiz, B. A., Baldrich, P., Luján-Soto, E., Meyers, B. C., & Dinkova, T. D. (2019). The explant developmental stage profoundly impacts small

- RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. *Scientific reports*, 9.
- Khan, I., Twyman, R. M., Arcalis, E., & Stoger, E. (2012). Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins. *Biotechnology journal*, 7(9), 1099-1108.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- 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(4): e60337.
- Lin, Y., Lai, Z., Lin, L., Lai, R., Tian, Q., Ye, W., ... & Zhang, Z. (2015). Endogenous target mimics, microRNA167, and its targets ARF6 and ARF8 during somatic embryo development in *Dimocarpus longan* Lour. *Molecular breeding*, 35(12), 227.
- Lin, Y., Lin, L., Lai, R., Liu, W., Chen, Y., Zhang, Z., XuHan, X. & Lai, Z. (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, X., Dinh, T. T., Li, D., Shi, B., Li, Y., Cao, X., Guo, L., Pan, Y., Jiao, Y. & Chen, X. (2014) AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy. *The Plant Journal*, 80, 629–641
- López Ruiz, B. A. (2019a) Función de la vía tasiRNAs durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz (Doctorado) Universidad Nacional Autónoma de México.
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Gómez-Felipe, A., De Folter, S., & Dinkova, T. D. (2020). tasiR-ARFs Production and Target Regulation during In Vitro Maize Plant Regeneration. *Plants*, 9(7), 849.
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Luján-Soto, E., Dinkova, T. D., (2019b). The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis. En Alvarez-Venegas, R., De-

la-Peña, C., & Casas-Mollano, J. A. (Eds.). Epigenetics in plants of agronomic importance: fundamentals and applications: transcriptional regulation and chromatin remodelling in plants (p. 318). Springer.

López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Sandoval-Zapotitla, E., & Dinkova, T. D. (2019c). 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.

Luján Soto, E. (2018) Regulación de algunos mRNAs blanco de miR528 en Embriogénesis Somática de Maíz (Maestría) Universidad Nacional Autónoma de México.

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. *Plant Cell Online*, 17:1360-1375. doi:10.1105/tpc.105.031716

Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. & Maizel, A. (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.

Merkle, S. A., Parrott, W. A., & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 155-203). Springer, Dordrecht.

Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R. & Reed, J. W. (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, 132 (18) 4107-4117

Nic-Can, G. I. & Loyola-Vargas V. M. (2016) The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In V.M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo (eds.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Springer International Publishing, Switzerland

- Nogueira, F. T., Chitwood, D. H., Madi, S., Ohtsu, K., Schnable, P. S., Scanlon, M. J., & Timmermans, M. C. (2009). Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet*, 5(1), e1000320.
- Nowak, K. & Gaj, M. D. (2016) Transcription Factors in the Regulation of Somatic Embryogenesis In: V.M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo (eds.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Springer International Publishing, Switzerland
- Overvoorde, P., Fukaki, H., & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6), a001537.
- Pessino, S. C. & Ortiz, J. P. (2010) Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires.
- Plavskin, Y., Nagashima, A., Perroud, P. F., Hasebe, M., Quatrano, R. S., Atwal, G. S., & Timmermans, M. C. (2016). Ancient trans-acting siRNAs confer robustness and sensitivity onto the auxin response. *Developmental Cell*, 36(3), 276-289.
- Plotnikova, A., Kellner, M. J., Schon, M. A., Mosiolek, M., & Nodine, M. D. (2019). MicroRNA dynamics and functions during Arabidopsis embryogenesis. *The Plant Cell*, 31(12), 2929-2946.
- Rademacher, E. H., Moller, B., Lokerse, A. S., Llavata-Peris, C. I., van den Berg, W. and Weijers, D. (2011) A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *The Plant Journal*, 68: 597–606
- Reed, J. W. (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *TRENDS in Plant Science*, 6(9), 1360-1385
- Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal (Vol 38)* UNAM.
- Scott, M. P., & Emery, M. (2016). Maize: overview. *Encyclopedia of food grains*, 99-104
- Shen, Y., Jiang, Z., Lu, S., Lin, H., Gao, S., Peng, H., ... & Rong, T. (2013). Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 441(2), 425-430.

- Shin, J. M., Yuan, L., Ohme-Takagi, M., & Kawashima, T. (2020). Cellular dynamics of double fertilization and early embryogenesis in flowering plants. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*.
- 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), 1-11.
- Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Das, S. S., Verma, S., Mishra, V., ... & Sarkar, A. K. (2018). Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta*, 248(3), 545-558.
- Sinha, A.; Solanki, M.; Shukla, L.I. Evidences for differential expression of miR167d-5p, target, positional nucleotide preference, and its role in somatic and diferent stages of regenerating calli of *Oryza sativa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2019**, 136, 537–548.
- 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., Hsieh, T., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. and Harada, J. J. (2008) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *PNAS*, 105: 8 3151–3156
- Stortenbeker, N. & Bemer, M. (2018) The *SAUR* gene family: the plant's toolbox for adaptation of growth and development. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/ery332
- Strable, J. & Scanlon, M. J. Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Emerging Model Organisms, Volume 2*. Cold Spring Harb Protoc; 2009; doi:10.1101/pdb.emo132
- Su, Y. H., Liu, Y. B., Zhou, C., Li, X. M., & Zhang, X. S. (2016). The microRNA167 controls somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through regulating its target genes ARF6 and ARF8. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(2), 405-417.
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2020). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*.

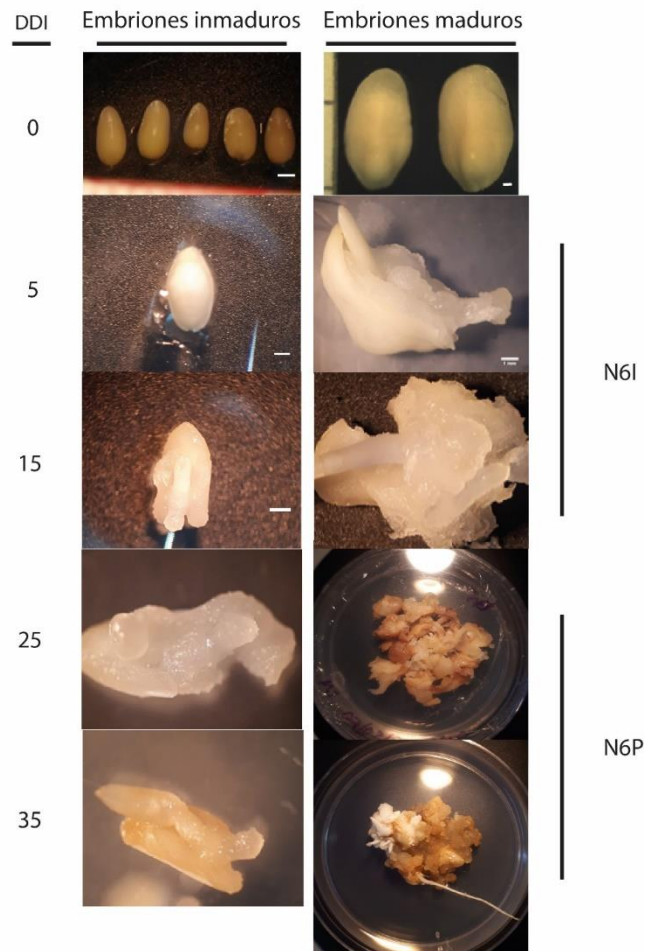
- Sun, L., Wu, Y., Su, S., Liu, H., Yang, G., Li, S., Shan, X. & Yuan, Y. (2012). Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays* L.) inbred line H99. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:271-286
- Teale, W.D., Paponov, I. A. & Palme, K. (2006) Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs *Plant Methods* 3:12
- Vollbrecht, E., Reiser, L., & Hake, S. (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development*, 127(14), 3161-3172.
- Wang, J.W. (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *Plant Cell Online* 17:2204-2216. doi:10.1105/tpc.105.033076
- Wójcik, A. M., Mosiolek, M., Karcz, J., Nodine, M. D., & Gaj, M. D. (2018). Whole mount in situ localization of miRNAs and mRNAs during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 9, 1277.
- Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2020). Current Perspectives on the Auxin-Mediated Genetic Network that Controls the Induction of Somatic Embryogenesis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1333.
- Wójcik, A.M.; Gaj, M.D. miR393 contributes to the embryogenic transition induced in vitro in Arabidopsis via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta* 2016, 244, 231–243.
- Wójcik, A.M.; Nodine, M.D.; Gaj, M.D. MiR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 2017, 8, 1–17.
- Wojcikowska, B. & Gaj, M. D., (2017). Expression profiling of *AUXIN RESPONSE FACTOR* genes during somatic embryogenesis induction in Arabidopsis *Plant Cell Rep*, 36(6), 843–858. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2114-3>

- Wu, M.F., Tian, Q. & Reed, J.W. (2006) Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression and regulates both female and male reproduction. *Development* 133:4211-4218.
- Wu, X. M.; Liu, M. Y.; Ge, X. X.; Xu, Q.; Guo, W. W. Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* 2011, 233, 495-505
- Xing, H., Pudake, R. N., Guo, G., Xing, G., Hu, Z., Zhang, Y., Sun, Q. & Ni, Z. (2011) Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize. *BMC Genomics*, 12:178
- Yang, J.H., Han, S.J., Yoon, E.K. & Lee, W.S. (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., 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(6), 1521-1536.
- Yu, Y., Jia, T. & Chen, X. The 'how' and 'where' of plant microRNAs (2017) *New Phytol.* 216(4): 1002-1017. doi:10.1111/nph.14834.
- Yuan, C., Wang, J., Harrison, A. P., Meng, X., Chen, D., & Chen, M. (2015). Genome-wide view of natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *DNA research*, 22(3), 233-243.
- Zhang, Z.; Tucker, E.; Hermann, M.; Laux, T. A molecular framework for the embryonic initiation of shoot meristem stem cells. *Dev. Cell* 2017, 40, 264-277.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell*, 5(10), 1411.

ANEXO 1. Eficiencia de oligos y condiciones qPCR para cada gen de interés.

Nombre	Tejido	Diluciones de RNA (ng)	Pendiente	Eficiencia	Conc. Oligos
ARF11	Embrión inmaduro	100, 20, 4	-3.7388	0.851	50 nM
ARF12	Embrión inmaduro	50, 5, 0.5	-3.7983	0.836	50 nM
ARF23	Embrión inmaduro	100, 20, 4	-3.7722	0.841	50 nM
ARF24	Embrión inmaduro	50, 5, 0.5	-3.9033	0.804	50 nM
ARF26	Embrión inmaduro	50, 5, 0.6	-3.3683	0.981	50 nM
ARF22	Plántula	50, 5, 0.5	-3.4917	0.934	50 nM
ARF34	Plántula	50, 5, 0.5	-3.6333	0.885	50 nM
miR167	Callo embriogénico	12.5, 2.5, 0.5	-2.9877	1.161	50 nM
tasiARF3bD5	1era etapa de reg	12.5, 6.25, 3.125	-2.472	1.53	200 nM
miR156	Callo embriogénico	12.5, 2.5, 0.5	-3.0435	1.13	200 nM
U6	Plántula	12.5, 2.50.5	-3.48	0.934	200nM

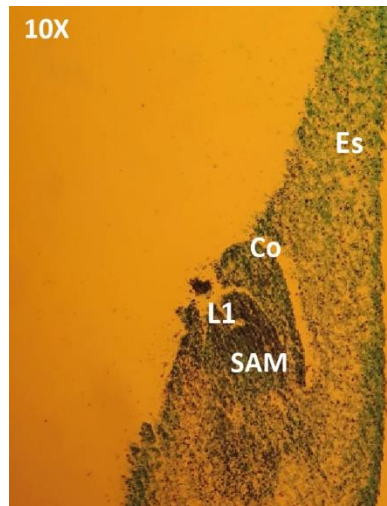
ANEXO 2. Inducción de masas pro-embriogénicas réplica 2



Inducción de masas pro-embriogénicas de maíz, réplica 2. Izquierda, explante embriones 15ddp, derecha explante embriones de semilla seca. DDI (Días después de inducción). Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico MOTIC.

ANEXO 3. Tinción mediante verde rápido de Ei y EM réplica 2

A)

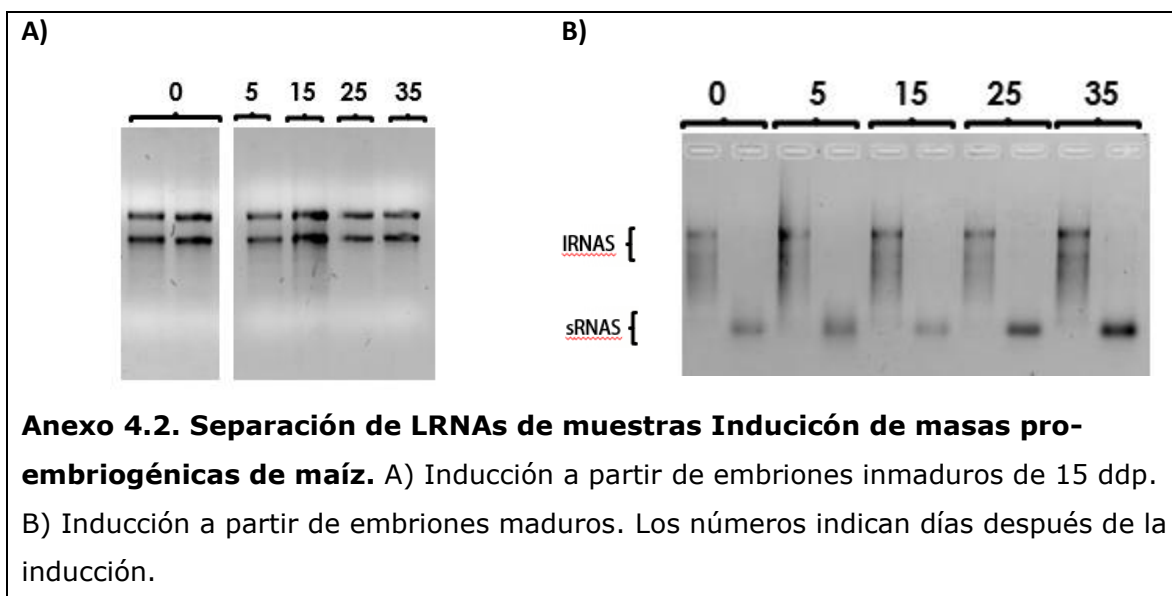
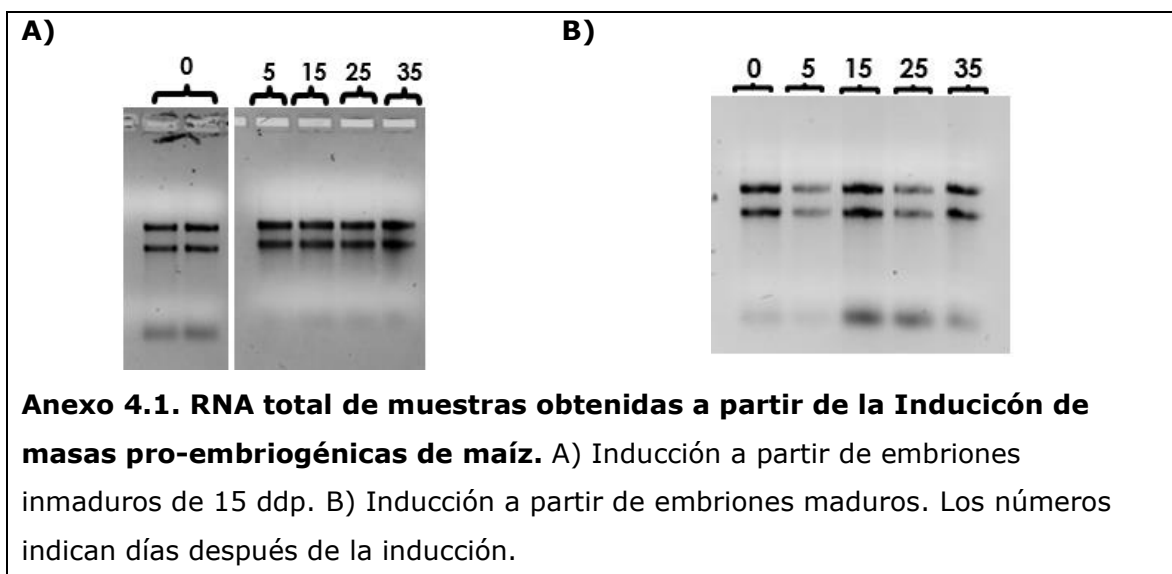


B)

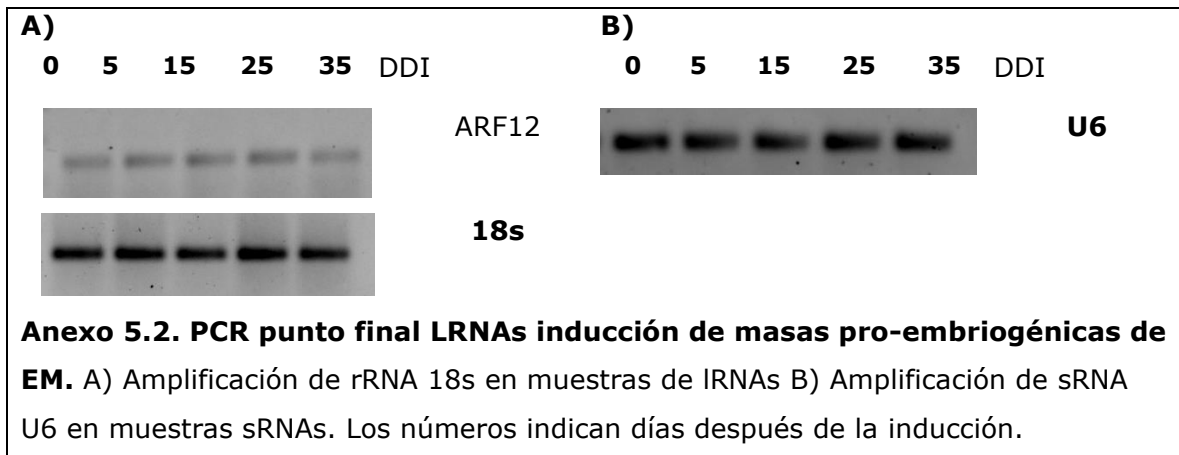
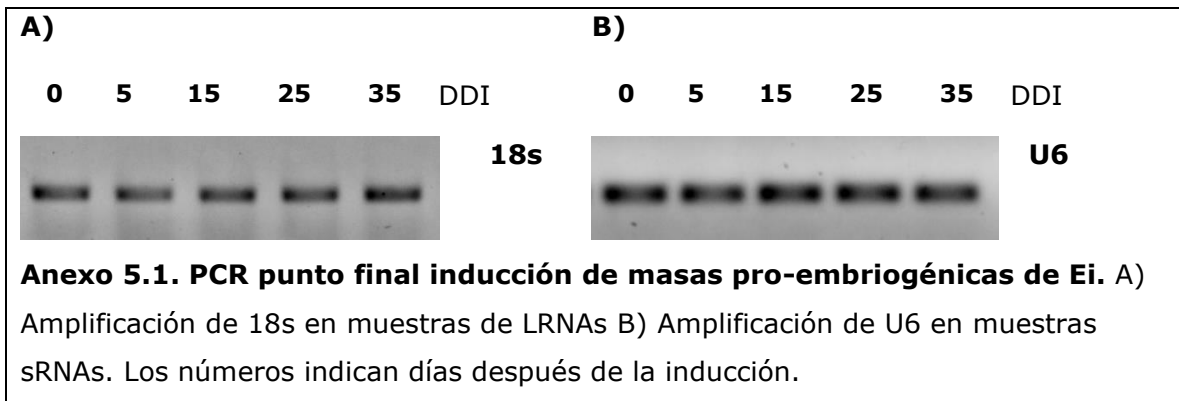


Tinción mediante verde rápido. A) Embrión inmaduro en etapa L1, 10x. B) Embrión maduro en etapa L6, 4x. Microscopio óptico motic. Es: escutelo. Co: coleóptilo. L1-L6: número de primordio de hoja embrionaria. SAM: shoot apical meristem.

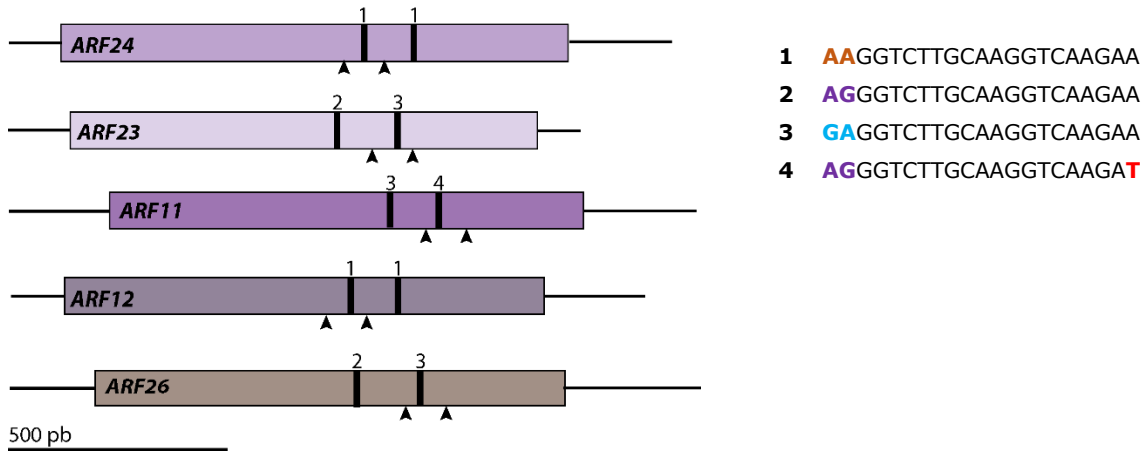
ANEXO 4. Análisis de integridad de RNA Ei y EM



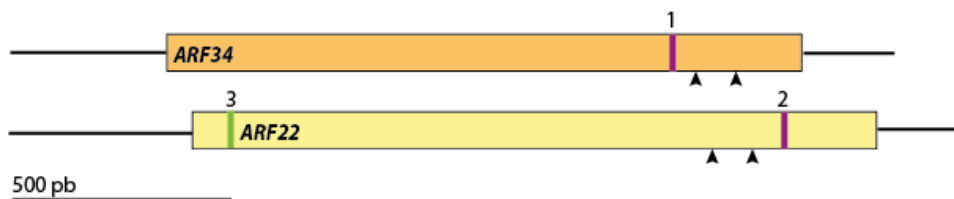
ANEXO 5. PCR punto final Ei y EM, genes control.



ANEXO 6. Regulación de los genes *ZmARF* sRNAs.



Regulación de los genes *ZmARF* clase I (*ARF3*) por tasiRNAs. Los transcritos de los cinco *ARF3* de maíz contienen cada uno, dos sitios de reconocimiento de tasiRNA (barras negras) espaciadas por aproximadamente 200 pb. Los números indican la secuencia de cada sitio. Las puntas de flecha indican la localización de los oligonucleótidos empleados. Tomada y modificada de Dotto et al., 2014.



- 1 AAGATCAGGCTGGCAGCTTGT
- 2 GAGATCAGGCTGGCAGCTTGT
- 3 AGAGAGAGAGGGAGAAGTGAGC

Regulación de los genes *ZmARF* clase V (*ARF6/8*) por miRNAs. Los transcritos de *ARF34* y *ARF22* de maíz contienen cada uno, un sitio de reconocimiento de miR167 (barras moradas), y únicamente *ARF22* contiene un sitio potencial de reconocimiento de miR156 (barra verde) (Juárez-González et al., 2019). Las puntas de flecha indican la localización de los oligonucleótidos empleados.