



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regulación de la Expresión de *MI528a* en maíz”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Eduardo Luján Soto

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez
[Instituto de Ecología](#)

Dr. José Luis Reyes Taboada
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX., Marzo, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIACIONES.....	7
AGRADECIMIENTOS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1.- INTRODUCCIÓN	13
2.- ANTECEDENTES	36
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
4.- HIPÓTESIS	41
5.- OBJETIVOS	41
6.- METODOLOGÍA.....	42
7.- RESULTADOS.....	53
8.- DISCUSIÓN	78
9.- CONCLUSIONES	91
10.- PERSPECTIVAS	93
11.- REFERENCIAS	94
12.- ANEXOS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.- Morfología del maíz	14
Figura II.- Modelo de reproducción sexual del maíz	16
Figura III.- Esquema de las etapas de la embriogénesis cigótica en maíz	17
Figura IV.- Inicio de la transcripción en eucariontes	19
Figura V.- Biogénesis y mecanismos de acción de miRNAs en plantas	25
Figura VI.- Modelo de procesamiento bi-direccional de pri-miRNAs mediado por DCL1	32
Figura VII.- zma-miR528-5p maduro se acumula durante las primeras 24 h de imbibición en maíz.	36
Figura VIII.- La acumulación de zma-miR528-5p incrementa en medios con de exceso de nitratos.	37
Figura IX.- Distribución de miRNAs durante embriogénesis somática de maíz	38
Figura X.- Los niveles de zma-miR528-5p disminuyen conforme se depletan las hormonas del medio.	39
Figura 1.- Identificación de genes y precursores de miR528 de maíz.	54
Figura 2.- Conservación a nivel de secuencia y estructura entre precursores de miR528.	55
Figura 3.- Análisis filogenético de las secuencias de pre-miR528 encontradas en monocotiledóneas.	56
Figura 4.- Predicción y selección de transcritos diana de miR528-5p en maíz.	57
Figura 5.- Validación experimental del sitio de corte para transcritos diana de zma-miR528-5p.	59
Figura 6.- Niveles de acumulación de zma-miR528-5p y mRNAs diana durante la ES de maíz	61
Figura 7.- Distribución de zma-miR528-5p y sus mRNAs diana en fracciones polisomales	63

Figura 8.- identificación de elementos regulatorios presentes en el promotor de <i>zma-MIR528a</i> .	65
Figura 9.- Niveles de acumulación <i>zma-miR528-5p</i> y su precursor <i>pre-miR528a</i> durante la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz	64
Figura 10.- Tratamientos exógenos con nitratos y auxinas incrementan los niveles de <i>pre-miR528a</i> y <i>miR528</i> maduro.	69
Figura 11.- Los tratamientos con nitratos y auxinas desencadenan la transcripción de <i>zma-MIR528a</i>	71
Figura 12.- El promotor de <i>zma-MIR528a</i> dirige una expresión basal de los genes reporteros en protoplastos de maíz.	72
Figura 13.- El promotor de <i>zma-MIR528a</i> contiene regiones con elementos regulatorios involucrados en la respuesta a estímulos.	73
Figura 14.- Los TFBS presentes en el promotor de <i>zma-MIR528a</i> contribuyen de manera diferencial con la inducción por nitratos y auxinas	75
Figura 15.- La activación del promotor de <i>zma-MIR528a</i> por <i>Zm-ARF34</i> .	76
Figura 16.- Propuesta de modelo de los mecanismos de regulación ejercidos por <i>zma-miR528</i> sobre sus blancos.	83
Figura 17.- Regulación Transcripcional sobre <i>zma-MIR528a</i> en respuesta a nitratos y auxinas.	89
Figura S1.- Productos obtenidos del protocolo 5'-RLM-RACE después de amplificaciones consecutivas (RACE).	106
Figura S2.- Análisis de correlación de Pearson entre los niveles de <i>miR528-5p</i> y sus blancos en los tejidos de ES evaluados	106
Figura S3.- Análisis de bibliotecas públicas de CAGE-Seq y secuencia del promotor de <i>zma-MIR528a</i> .	107
Figura S4.- Elementos regulatorios en <i>cis</i> conservados entre promotores de genes <i>MIR528</i> en monocotiledóneas	110
Figura S5.- Efectos fisiológicos tratamientos prolongados de los estímulos con de nitratos o auxinas durante la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz.	109
Figura S6.- Regulación negativa de blancos de <i>miR528</i> desencadenados por la aplicación de tratamientos con nitratos y auxinas	110

Figura S8.- Determinación del DNA plasmídico transfectado en los ensayos de actividad transcripcional.	111
Figura S7.- Ensayos de transactivación en protoplastos de maíz.	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Función de algunos miRNAs conservados en plantas.	26
Tabla 2.- Listado de soluciones para el aislamiento de protoplastos de maíz	48
Tabla S1.- Composición del medio de cultivo N6 empleado para la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.	105
Tabla S1.- Localización genómica de los precursores de miR528 en monocotiledóneas depositadas en la base de datos PmiREN	106
Tabla S2.- Blancos de miR528 de maíz predichos con el software psRNATarget	107
Tabla S3.- Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo	109
Tabla S4.- TFBS identificados en el promotor de <i>zma-MIR528a</i> usando la base de datos NewPLACE.	110

ABREVIACIONES

AGO:	Proteína Argonauta
ARF:	Factor de Respuesta a Auxina
AuxRE:	Elemento de Respuesta a Auxina
bHLH:	Factor de transcripción hélice-giro-hélice
C1:	Callo embriogénico de 1 mes de proliferación
C4:	Callo embriogénico de 4 meses de proliferación
CAGE-Seq:	Análisis de Expresión y Secuenciación masiva por CAP
CREs:	Elementos Regulatorios en <i>cis</i>
CuRE:	Elemento de Respuesta a cobre
D-bodies:	Cuerpos de corte
ES:	Embriogénesis somática
FGTs:	Factores Generales de la Transcripción
FTs:	Factores de transcripción
GFP:	Proteína verde fluorescente
GUS:	Enzima β -glucuronidasa
IAA:	Ácido 1-indolacético
MIE:	Embriones inmaduros de maíz
MATE:	Transportador de eflujo para toxinas y multi-drogas
MIR:	Gen codificante para microRNA
miRNAs:	microRNAs
mRNA:	RNA mensajero
NAA:	Ácido 1-Naftalenacético
ncRNAs:	RNAs no codificantes
NPA:	Ácido N-1-napftilftalámico
PIC:	Complejo de pre-iniciación
PL:	Plántula de maíz regenerada
PLC:	Proteína similar a Plastocianina
Pre-miRNA:	precursor de miRNA
Pri-miRNA:	Transcrito primario de miRNA
RAM:	Meristemo Apical de la raíz
RISC:	Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RLM-RACE: Amplificación de extremos de cDNA mediada por ligación de RNA
SAM: Mersitemo Apical del Brote
SOD1a: Superóxido Dismutasa 1a
TFBS: Sitio de Unión para Factores de Transcripción
TGA 1/4: sitio de unión para la proteína TGACG FACTOR 1/4
TSS: Sitio de inicio de la Transcripción

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de Tesis de Doctorado fue realizado gracias al apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), con el proyecto **PAPIIT IN 218921**. De igual manera se agradece al financiamiento recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) en el proyecto **CONACYT 238439** y la beca **819042**. También se agradece al Programa de Apoyo a la Investigación para Estudiantes de Posgrado (**PAIP**) por el financiamiento recibido con el proyecto **PAIP 5000-9118**. Así mismo, se agradece al Programa de Apoyo a Estudiantes del Posgrado (**PAEP**) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos internacionales y Cursos en línea.

RESUMEN

La regulación de la expresión genética en organismos eucariontes ha sido una de las áreas de mayor importancia para comprender el funcionamiento de los seres vivos. Análisis de expresión global han determinado que cerca del 90% del genoma de distintas especies de plantas se transcribe; sin embargo, sólo una pequeña fracción de transcritos corresponde a RNAs que codifican a proteínas (mRNAs). Dentro del resto de los transcritos (conocidos como RNAs no codificantes; ncRNAs), se encuentran los microRNAs (miRNAs), moléculas de entre 20-24 nucleótidos (nt) que regulan la acumulación de mRNAs blanco a nivel post-transcripcional y que participan en múltiples procesos en plantas. Uno de estos es miR528, el cual es un miRNA específico de monocotiledóneas que posee múltiples funciones al regular múltiples transcritos de una especie a otra. En maíz, se han reportado cambios en la acumulación de miR528 en diversos procesos como el desarrollo embrionario, la maduración de la semilla, imbibición y germinación, durante la inducción de embriogénesis somática y como respuesta a estímulos externos como frío o elevada concentración de nitrógeno. Los estudios que involucran a miR528 se han enfocado principalmente en el miRNA maduro, sus niveles de acumulación y la correspondencia con los niveles de algunos mRNAs diana. No obstante, y a pesar de que miR528 funciona como componente central en distintos procesos, muy poco se ha investigado acerca de los elementos regulatorios que dirigen su expresión en condiciones particulares. Teniendo esto en cuenta, este trabajo se enfocó en dilucidar la función de miR528 al validar algunas de sus dianas moleculares, así como identificar algunos de los elementos regulatorios y estímulos que modifican su expresión en maíz. Mediante la identificación de productos de degradación de transcritos diana de miR528, la cuantificación de los niveles del miRNA y la distribución de éste en perfiles polirribosomales, se encontró que miR528 es capaz de llevar a cabo una regulación versátil sobre sus mRNAs objetivo. Por otro lado, al analizar la región promotora de los genes que originan a miR528, se identificaron sitios de unión para factores de transcripción como los elementos de respuesta a nitratos (TGA1/4) y auxinas (AuxRE). Interesantemente, tratamientos con nitratos y auxinas incrementaron los niveles del precursor y miRNA maduro a través de la actividad de la RNA Pol II. Al igual, el análisis funcional del promotor de *zma-MIR528a* demostró que los sitios AuxRE y TGA1/4 son necesarios para inducción transcripcional por estos estímulos. En conjunto, los resultados recopilados en este proyecto contribuyen al entendimiento de los elementos de regulación que controlan la expresión de *MIR528*, su acumulación y mecanismos de acción sobre sus

moléculas objetivo en maíz.

ABSTRACT

Gene expression regulation is one of the most studied fields that has increased the understanding of eukaryotic function. Several global expression analyses have determined that nearly 90% of the genomes of distinct plant species are actively transcribed, with just a minor fraction corresponding to protein-coding RNA (mRNAs). Among the rest of the transcripts (non-coding RNA; ncRNA), microRNAs (miRNAs) are small molecules of 20-24 nt in length that regulate their target mRNAs accumulation at the post-transcriptional level involved in multiple plant processes. One of them, miR528, is a monocot-specific miRNA with multiple functions by targeting different transcripts between species. In maize, miR528 accumulation changes during embryo maturation, seed imbibition, germination, and somatic embryogenesis. Also, recent reports showed that miR528 accumulation modifies by external stimuli such as cold and luxury nitrate concentration. In general, these reports focused mainly on the mature form of miR528 and explored its function by evaluating the correspondence between miRNA and some target mRNA levels. Although miR528 works as a central component in many models, there is a lack of knowledge about regulatory elements that guide its expression in maize. Thus, the present work aimed to elucidate, in addition to miR528 functionality and target regulation, the regulatory features within MIR528 genes that modify its expression during maize germination and seedling establishment.

miR528-mediated cleavage product identification, mature miRNA quantification, and miR528 distribution across polyribosome profiles suggested that miR528 can exert a versatile regulation over its targets. In addition, the analysis of the *MIR528* promoter region identified conserved *cis*-regulatory sites involved with the auxin (AuxRE) and nitrates (TGA1/4) response pathways. Interestingly, treatments with nitrate and exogenous auxins increased both precursor and mature miR528 levels in an RNA Pol-II-dependent manner. In deed, functional characterization of *MIR528a* promoter demonstrated that AuxRE and TGA1/4 sites are needed for transcripcional induction in response to the stimuli. Overall, our findings contribute to understand a regulatory network that controls zma-MIR528 expression in response to previously reported stimuli and settles specific miRNA accumulation profiles in maize. This work also adds to broaden the knowledge of factors regulating MIR gene expression in plants.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Morfología, fisiología y ciclo de vida del maíz

1.1.1 Morfología y fisiología del maíz

El maíz (*Zea mays*) es una planta domesticada con origen en América tropical cuyo cultivo y uso se ha extendido a lo largo del mundo. El maíz no solo es una fuente básica de nutrientes en la dieta del ser humano, sino que es un elemento básico en la alimentación animal y como materia prima para la manufactura de múltiples productos industriales (Erenstein *et al.*, 2022). El maíz es una monocotiledónea que pertenece a la familia de las gramíneas; son plantas anuales que presentan gran altura (de 1 a 4 m), con tallo grueso (> 20 mm) y hojas anchas (2-10 cm). Forma un sistema radicular complejo de sostén que profundiza en la tierra para atender los requerimientos hídricos del cultivo. Es una planta diclino-monoica, es decir, tiene flores masculinas y femeninas separadas, pero en la misma planta. La flor masculina tiene forma de panícula y está situada en la parte superior de la planta. La flor femenina (mazorca) se sitúa a media altura de la planta envuelta por falsas hojas o brácteas de donde sobresalen los estigmas o estilos (pelos). El número de granos y filas de la mazorca depende de la variedad y del vigor del maíz (Ortiz *et al.*, 2013)(Figura 1).

1.1.2 Ciclo de vida del maíz

El ciclo de desarrollo del maíz se divide en dos etapas principales: la etapa vegetativa y la reproductiva. Dependiendo de la variedad de maíz, la maduración y floración se alcanzan cerca de los 120 días después de emerger la plántula. La etapa vegetativa comprende desde la siembra de la semilla, la aparición de los primeros brotes con un continuo y rápido crecimiento y la promoción del crecimiento (Da Fonseca *et al.*, 2015). Una vez alcanzada la madurez vegetativa, se da paso a la fase reproductiva de la planta donde se presenta la antesis o floración masculina y se da la producción y arrojado de granos de polen. Posteriormente, ocurre la floración femenina con la aparición de mazorcas y la maduración de éstas donde cada grano potencial (ovario) desarrolla estigmas necesarios para la

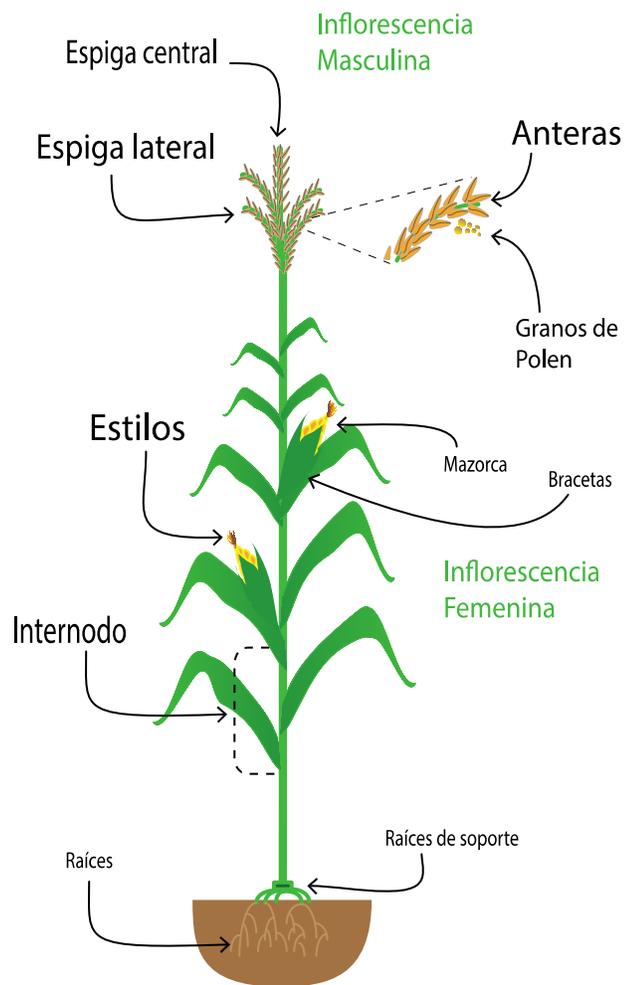


Figura I.- Morfología del maíz. El maíz es una planta monoica. Las inflorescencias femeninas se desarrollan a partir de dos yemas laterales en las axilas de las hojas en la mitad superior de la planta. La inflorescencia masculina está formada por una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas que producen abundantes granos de polen (modificado de Walbot & Evans, 2003).

fecundación y promover la formación de embriones, los cuales darán origen a nuevas plantas para comenzar de nuevo con el ciclo (Da Fonseca *et al.*, 2015).

1.1.3 Reproducción sexual del maíz

En el maíz, el polen (gametofito masculino o microgametofito) es una estructura que alberga tres núcleos; un núcleo vegetativo y dos núcleos generativos (núcleos espermáticos, formados a partir de la célula generativa precursora) y numerosos granos de almidón (Figura II). Por su parte, el eje de la mazorca u olote contiene numerosos megagametofitos

(gametofito femenino o saco embrionario) resguardados por la pared del ovario o pericarpio. El megagametofito se encuentra formado por 8 núcleos haploides contenidos en 7 células: el óvulo, dos células sinérgidas, una célula central binucleada (núcleos polares) y tres células antípodas (Figura II)(Zhou, Juranić and Dresselhaus, 2017). Los estigmas contienen una gran cantidad de tricomas (pelos vegetales) que segregan compuestos pegajosos donde se retiene al polen. Al estar en contacto los estigmas húmedos y el grano de polen ocurre la germinación de este último propiciando el crecimiento del tubo polínico. El proceso de polinización continúa al llevarse a cabo la fecundación en un paso denominado “doble fertilización”, característica de las angiospermas. Uno de los dos núcleos espermáticos del microgametofito se combina con el gametofito femenino para originar un cigoto diploide que dará pauta a la formación del embrión ($2n$). El segundo núcleo espermático se fusiona con los núcleos polares del gameto femenino para dar lugar a una estructura triploide que generará el endospermo ($3n$), que será la fuente de nutrientes para el embrión durante el desarrollo inicial hasta el establecimiento de la plántula luego de la germinación (Dresselhaus, Sprunck and Wessel, 2016).

1.1.4 Embriogénesis cigótica

La embriogénesis describe el periodo de desarrollo en el cual el cigoto se somete a una serie de eventos de diferenciación, dando como resultado la formación de un embrión maduro, con cotiledón, meristemo apical del brote (SAM, *shoot apical meristem*), meristemo apical radicular (RAM, *root apical meristem*) y tres sistemas de tejido embrionario (Yang and Zhang, 2011). En la fase inicial de maduración del embrión se establece la organización morfológica, hasta llegar a la etapa final de maduración donde se adquiere la capacidad de resistir a la desecación y se promueve la acumulación de moléculas de reserva para nutrir al embrión durante la etapa de imbibición y germinación (El-Esawi, 2016). En plantas monocotiledóneas como el maíz, en la embriogénesis cigótica se observan la fase globular, pro-embrionaria, escutelar, coleoptilar y de hoja (Figura III) (Nardmann and Werr, 2009).

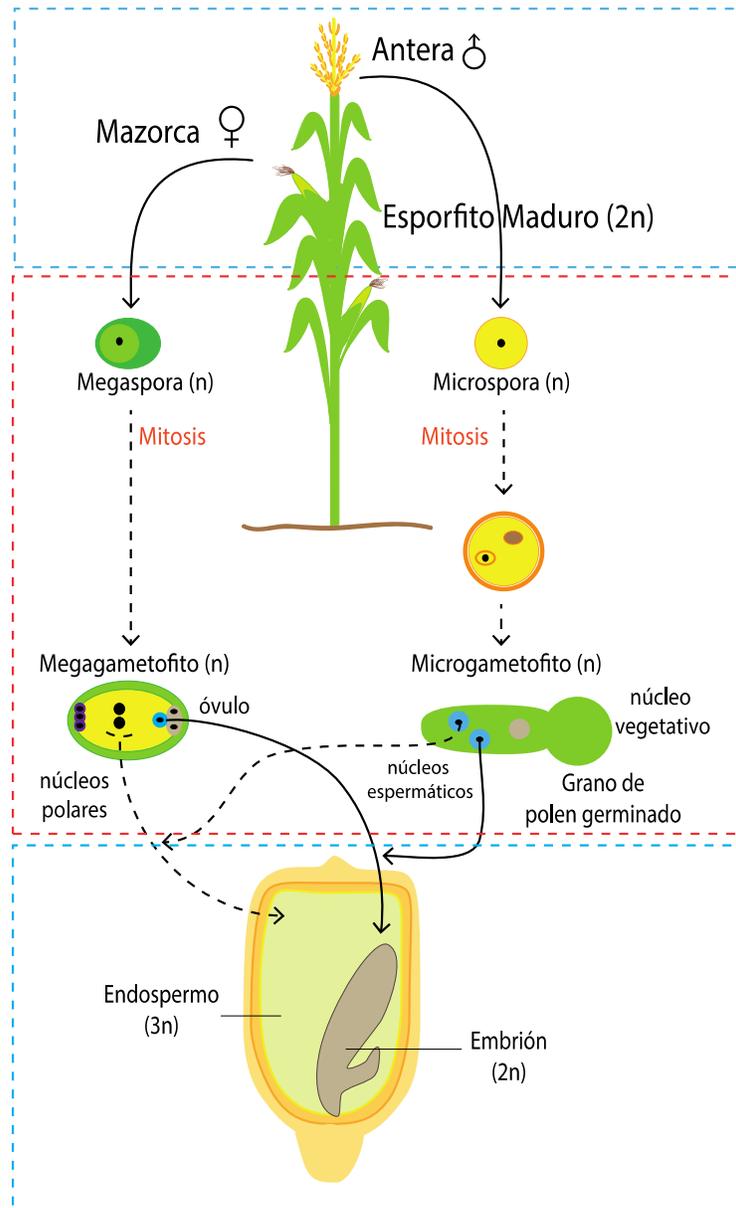


Figura II.- Modelo de reproducción sexual del maíz. Se muestran las inflorescencias masculinas y femeninas, la generación de los gametofitos y el proceso de doble fertilización a nivel de gametos para generar el endospermo (flechas punteadas) y el embrión (flechas continuas) (Modificado de Walbot & Evans, 2003).

1.1.5 Llenado del grano y germinación

Luego de ocurrida la fecundación y a la par del desarrollo del embrión, se lleva a cabo el proceso de llenado del grano. Esta etapa se caracteriza por una acumulación de almidón

en el endospermo y por la desecación progresiva del grano. La madurez fisiológica de la semilla ocurre cuando la humedad interna está por debajo del 30%; el almidón y otras sustancias de reserva presentes en el endospermo forman una capa dura y permiten la entrada a la dormancia de la semilla hasta que se encuentre en condiciones apropiadas para germinar (Shu *et al.*, 2015).

La germinación se define como la etapa de desarrollo que inicia con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y que culmina con la protrusión de la radícula a través de las capas que la recubren. Durante este proceso, se reanuda la actividad enzimática y fisiológica, promoviendo una aceleración en la división y elongación celular acompañada por cambios en la expresión de múltiples genes (Luján-Soto and Dinkova, 2021; Smolikova *et al.*, 2021). Las etapas posteriores o post-germinativas se caracterizan por la salida del coleoptilo, que se encarga de abrir paso a través del suelo para el establecimiento de la plántula de maíz, en virtud de la elongación del mesocotilo y el posterior desarrollo de raíces seminales laterales. La continua expansión de las hojas dentro del coleoptilo termina por romperlo en su punta, permitiendo que la primera hoja verdadera pueda emerger y comenzar con el metabolismo fotosintético. (Shu *et al.*, 2015; Yadukrishnan and Datta, 2021).

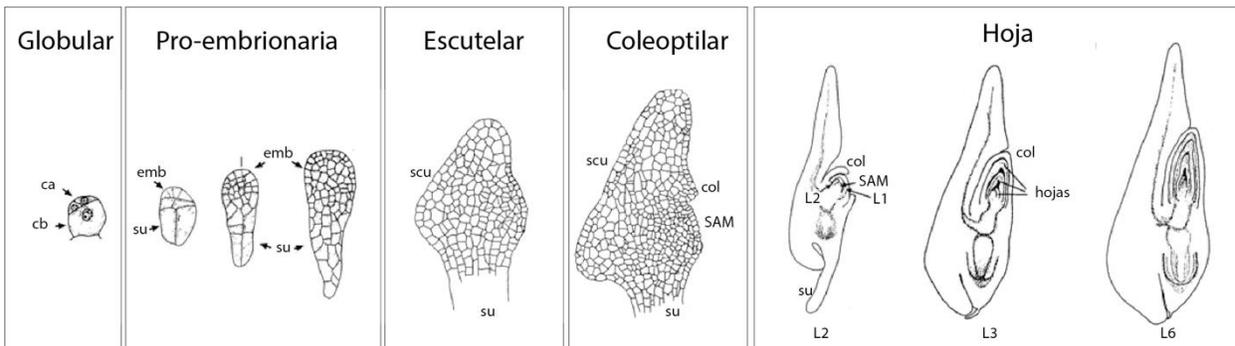


Figura III.- Esquema de las etapas de la embriogénesis cigótica en maíz. Durante la etapa globular, ocurre la primera división asimétrica del cigoto luego de la fecundación. Esta división genera una célula apical (ca), de la cual se desarrollará el embrión; y una célula basal (cb), a partir de la cual se genera el suspensor. Posteriormente, en la etapa pro-embriónica, el embrión (emb) y el suspensor (su), se expanden por medio de divisiones celulares al azar hasta la aparición del escutelo (scu), que funcionará como conexión entre el endospermo y el embrión. Posteriormente, en la etapa coleoptilar, se comienza la formación del meristemo apical del brote (SAM), así como una pequeña protuberancia por donde emergerá el coleoptilo (col). Las etapas tardías de la embriogénesis de maíz se nombran acorde al número de hojas (L1-L6). La última fase de la embriogénesis es la maduración del embrión y acumulación de productos de reserva (Modificado de Nardarmm and Werr, 2009)

1.2 La regulación de la expresión genética en plantas

1.2.1 El inicio de la transcripción como paso clave de regulación para la expresión genética.

La abundancia y la distribución del producto final de un gen se regula a diferentes niveles y por medio de diversos mecanismos moleculares que afectan las distintas etapas de la vida de un RNA mensajero (mRNA)(Picot *et al.*, 2010). Estos mecanismos modulan la expresión de múltiples genes para regular procesos fundamentales como la transición entre etapas de desarrollo o la determinación del destino celular en diversos tejidos de la planta. Igualmente, estos cambios en la expresión coordinan el inicio correcto de los programas de diferenciación o la supresión de programas cuya expresión es tardía o inapropiada (Picot *et al.*, 2010; Verma, Attuluri and Robert, 2022).

La expresión genética puede controlarse a nivel de inicio de la transcripción. La transcripción comienza en una posición definida dentro de la región promotora de los genes, el sitio de inicio de la transcripción (TSS, del inglés *Transcription Start Site*), localizado hacia el extremo 5' del cuerpo del gen. El TSS se encuentra embebido dentro del *core* del promotor, región que comprende alrededor de ~50 pares de bases (pb) río arriba y río abajo del TSS (Haberle and Stark, 2018). Esta región de aproximadamente 100 pb funciona como plataforma de anclaje para la maquinaria transcripcional eucarionte, constituida por la RNA polimerasa II (Pol II) asociada a los factores generales de la transcripción (FGT) (Mejía-Guerra *et al.*, 2015; Haberle and Stark, 2018). La presencia de Pol II es suficiente para catalizar la síntesis de RNA dirigida por DNA, sin embargo, esta proteína no es capaz de reconocer por sí sola la región promotora (Figura IV). Para tal acción, los FGT (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) promueven la formación del complejo de pre-iniciación (PIC) al reconocer motivos dentro de la secuencia del promotor que permiten su anclaje. La interacción de esta maquinaria con el promotor es suficiente para dirigir la transcripción basal de un gen, sin embargo, la tasa de expresión que se presenta comúnmente es baja (Haberle and Stark, 2018). La velocidad basal de transcripción puede modificarse mediante la acción del complejo multi-proteico *Mediator*, el cual funciona como “puente” molecular entre factores de transcripción particulares (FTs) y la maquinaria basal de transcripción (Soutourina, 2018). Estos FTs pueden reconocer secuencias distales de regulación presentes en el promotor como los *enhancers* (potenciadores) o *silencers* (silenciadores) que aumentan o disminuyen la expresión, respectivamente; independientemente de la distancia y la orientación que presenten respecto al promotor (Haberle and Stark, 2018).

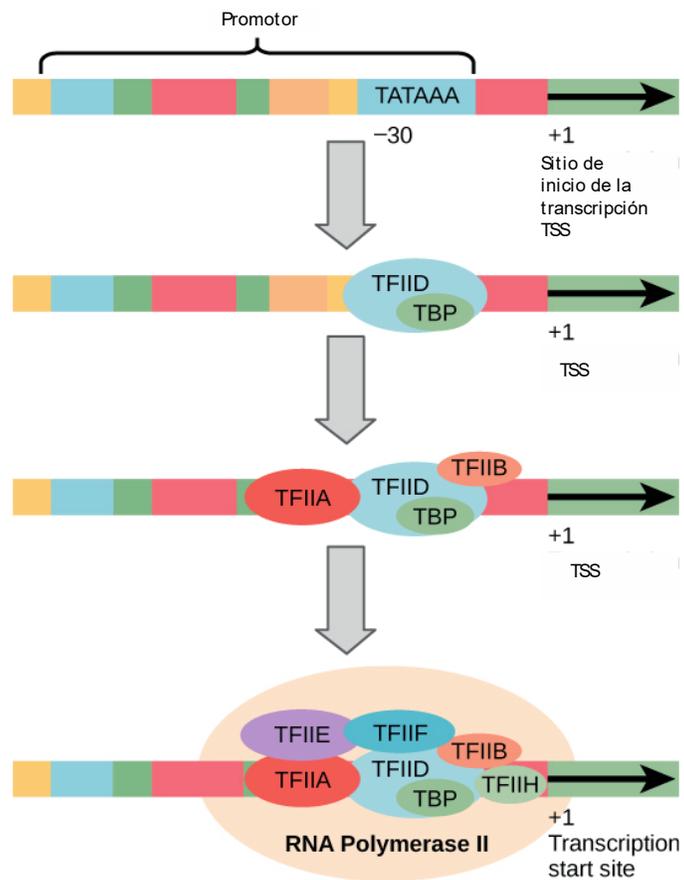


Figura IV.- Inicio de la transcripción en eucariontes. Representación simplificada del inicio de la transcripción y formación del complejo PIC. Los bloques de colores representan distintas secuencias de unión regulatorias presentes en los promotores (Modificado de Boubdless Biology, 2015).

Debido a que los FTs son un eje central en la regulación de la expresión, entender el mecanismo de acción de dichas proteínas es un área de investigación en constante crecimiento. Los FTs más estudiados son los pertenecientes al grupo de activadores transcripcionales. En general, los activadores presentan dos dominios importantes: una región proteica que se une al DNA y otro dominio de activación que incrementa la transcripción al interaccionar con la maquinaria transcripcional basal y mediadora (Hoang *et al.*, 2017)

La caracterización molecular de varias de estas proteínas ha revelado que el dominio de unión a DNA puede presentar diversos arreglos como dedos de zinc (ZINC FINGER DOMAIN), Hélice-giro-Hélice (BASIC HELIX-LOOP-HELIX, bHLH) o zipper de leucinas

(bZIP). Por otro lado, el dominio de activación presente en los FT no se encuentra tan bien caracterizado como el dominio de unión a DNA. Se ha reportado la existencia de Dominios de Activación Acídicos, los cuales son ricos en residuos de aminoácidos cargados negativamente (aspartato y glutamato), o ricos en residuos de prolina o glutamina. De cualquier manera, se ha propuesto que estos dominios de activación promueven la transcripción al interactuar con los FGT como TFIIB o TFIID para facilitar el ensamblaje del complejo transcripcional en el *core* (Sanborn *et al.*, 2021). Por otro lado, la expresión genética y la transcripción en eucariontes también se encuentra determinada por la acción de represores transcripcionales. Estas proteínas se unen al DNA e inhiben la transcripción, en algunos casos simplemente al interferir con los FGT y su reclutamiento (Rojo, 2001; Strader, Weijers and Wagner, 2022). También, existen represores que comparten una homología con FTs activadores, ya que presentan dominios de unión a DNA, pero no cuentan con dominios de activación por lo que sólo compiten por la unión a las secuencias regulatorias (Strader, Weijers and Wagner, 2022).

Todo esto en conjunto, permite la formación de redes de regulación complejas que determinan el nivel de expresión genética y la abundancia de los productos finales de la misma.

1.2.2 La regulación transcripcional en plantas y su relación con diversos procesos celulares.

Todos los organismos enfrentan retos únicos a lo largo de su desarrollo y han adquirido mecanismos novedosos para regular la expresión genética que les permiten contender contra dichos eventos. La manera en como las plantas responden ante estos eventos difiere a la de los animales en que las plantas son organismos sésiles, por lo que requieren adaptarse rápidamente a cambios en el ambiente. Por otro lado, desde el punto de vista del desarrollo, las plantas presentan nuevos órganos y estructuras en etapas post-embriónicas. Esta plasticidad durante su ciclo de vida se logra a través de mecanismos moleculares sofisticados que regulan la expresión de genes en función de distintas señales y estímulos presentes en el ambiente. Uno de estos mecanismos consiste en la formación de redes transcripcionales mediadoras de la respuesta celular a distintos estímulos (Laitinen and Nikoloski, 2019). Un claro ejemplo es la regulación transcripcional de genes en respuesta a la presencia de las fitohormonas auxinas. El tratamiento por 3 horas con la auxina ácido 3-indolacético (AIA) ocasiona que cerca de 600 genes se expresen

diferencialmente en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Weijers and Wagner, 2016). Esta expresión diferencial se logra a través de una red de señalización ampliamente estudiada. Una vez dentro de la célula, las auxinas se unen a las proteínas TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB), que a su vez están unidas débilmente con el represor transcripcional AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAAs). La incorporación de la auxina estabiliza la interacción TIR1-AUX/IAA desencadenando la ubiquitinación y degradación del represor AUX/IAA (Tiwari, Hagen and Guilfoyle, 2003; Yu *et al.*, 2015). En ausencia de auxinas, el represor AUX/IAA se dimeriza con una clase de factores de transcripción denominados AUXIN RESPONSE FACTOR (ARFs) inhibiendo su acción. Como resultado de la percepción hormonal, los ARFs libres pueden reconocer secuencias génicas denominadas Elementos de Respuesta a auxinas (AuxRE), presentes en los promotores de sus genes blancos y promueven o inhiben su transcripción (Tiwari, Hagen and Guilfoyle, 2003; Pierre-Jerome *et al.*, 2016). De entre los múltiples procesos en los que participa la regulación transcripcional desencadenada por auxinas se encuentran el mantenimiento de meristemos, la formación de planos simétricos durante la embriogénesis y la regulación de la expresión de reguladores maestros del desarrollo de la raíz, entre otros (Lanctot and Nemhauser, 2020).

Un segundo ejemplo que deja en evidencia la importancia de la regulación transcripcional es la formación de circuitos de retroalimentación para mantener niveles apropiados de FTs en el establecimiento de patrones morfológicos en plantas. La formación de la parte aérea, el patrón distintivo de formación de hojas y la formación de órganos florales están determinados por las células que forman parte del SAM. El mantenimiento de un número relativamente constante de células meristemáticas en el SAM a lo largo del desarrollo es regulado en parte por el factor transcripcional WUSCHEL (WUS), un FT de tipo homeodominio presente en el centro organizador (Ohmori *et al.*, 2013). A medida que la planta crece y el meristemo se vuelve activo, WUS juega un papel señalizador para especificar la identidad de las células meristemáticas y determinar el tamaño del SAM. WUS a su vez es regulado de manera negativa por CLAVATA 3 (CLV3), un glucopéptido móvil que reprime la formación de células meristemáticas (Fletcher, 2018). CLV3 se une a su receptor CLAVATA 1 (CLV1), una cinasa rica en leucinas que desencadena una cascada de fosforilación que ocasiona la represión de WUS. Adicionalmente, WUS regula de manera positiva la expresión del gen CLV3 por interacción directa en su promotor, lo que reafirma el circuito de regulación de la expresión del propio WUS (Yadav *et al.*, 2011; Fletcher, 2018). Estos y otros múltiples ejemplos, denotan el rol fundamental del control transcripcional para

coordinar la formación de redes de regulación necesarias para el correcto desarrollo, respuesta y adaptación de las plantas a distintos procesos y estímulos. Sin embargo, mecanismos adicionales a estas redes de factores transcripcionales colaboran en el correcto establecimiento de los programas de expresión.

1.2.3 La influencia de la compactación de cromatina y modificaciones epigenéticas en la regulación transcripcional.

La actividad transcripcional de los genes eucariontes está determinada por la acción combinada de los FTs y la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes, esta última dictada por el grado de compactación de la cromatina y la acción de distintos mecanismos epigenéticos de regulación. La regulación epigenética contempla aquellos mecanismos que ocasionan cambios en la función y expresión génica que no involucran cambios en la secuencia de DNA de estos genes (Baulcombe, D and Dean C., 2014). Estos mecanismos de regulación epigenética promueven cambios dinámicos en la actividad génica que determinan patrones de expresión que ayudan a las plantas con la respuesta a cambios impredecibles en el ambiente (Pikaard and Scheid, 2014). Existen múltiples reportes que ilustran la contribución de diversos mecanismos epigenéticos en la regulación de la expresión génica en plantas. Por ejemplo, la ausencia del factor central de formación de nucleosomas CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1 (CAF1), encargado de guiar la adición de las histonas H3 y H4 en nucleosomas nuevos; inhibe la expresión de los reguladores maestros *WUS* y *SCARECROW (SCR)* en los meristemas apicales y radiculares, respectivamente (Varas, Santos and Pradillo, 2017). De manera similar, el remodelado de nucleosomas integrando la variante de histona H2A.Z, favorece la expresión de genes de respuesta a cambios de temperatura e impacta en el tiempo de floración en *A. thaliana* (Aslam *et al.*, 2019). Otro de los mecanismos epigenéticos que controlan la expresión son las modificaciones post-traduccionales de los extremos N' terminal de las proteínas histonas. La acetilación de distintos residuos de lisinas de las histonas H3 y H4 activa la expresión al promover la relajación de la cromatina. La acetiltransferasa de histona (HAT) GENERAL CONTROL NON-REPPRESSED 5 (GCN5) funciona como coactivador transcripcional de *PLETHORA (PLT1)*, *WUS*, *LEAFY (LFY)*, entre otros (Kumar, Thakur and Prasad, 2021). Otra modificación de histonas esencial para el desarrollo celular en plantas es la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) que señala represión transcripcional. Las proteínas de complejo del grupo POLYCOMB (PcG) PRC2 llevan a

cabo la colocación de la marca H3K27me3, necesaria para la represión de factores meristemáticos en órganos en desarrollo para promover la diferenciación celular (Pikaard and Scheid, 2014; Bieluszewski *et al.*, 2021). Estos son sólo algunos ejemplos de los muchos procesos esenciales en el ciclo de vida de las plantas que requieren de cambios en la organización de la cromatina y del control transcripcional mediado por FTs para establecer los patrones de expresión específicos para cada condición. En conjunto, los mecanismos epigenéticos, el grado de compactación de la cromatina y las redes transcripcionales ejercen un control de la expresión a nivel transcripcional. Sin embargo, en plantas y otros organismos se ha evidenciado que existen mecanismos de regulación a nivel postranscripcional que también contribuyen con la expresión génica.

1.3 El papel de los RNAs pequeños no codificantes en el ciclo de vida de las plantas.

1.3.1 Clasificación de RNAs no codificantes.

Los avances tecnológicos desde hace tres décadas revelaron que las células eucariotas sintetizan diversas clases de RNAs no codificantes (*non-coding RNAs*, ncRNAs). Diversos reportes de secuenciación masiva han demostrado que la transcripción de ncRNAs se encuentra ampliamente distribuida en múltiples organismos. En un inicio, estos ncRNAs fueron considerados un tipo de transcritos “basura” no funcionales; sin embargo, hoy se sabe que estas moléculas juegan un papel fundamental en eventos celulares complejos como el desarrollo o la respuesta a estrés (Borges and Martienssen, 2015). Dentro de las principales categorías de los ncRNAs de plantas, se encuentran los RNAs pequeños (*small RNAs*, sRNAs) cuya regulación sobre distintas dianas afecta procesos como el desarrollo embrionario, reproducción, reprogramación genética y contribuyen a la plasticidad fenotípica de las plantas. Estos sRNAs fueron inicialmente caracterizados como mecanismo de defensa contra material genético externo de virus y elementos transponibles; pero después se comprobó su participación en la regulación de la expresión de genes endógenos (Borges and Martienssen, 2015; Ariel and Manavella, 2021). Los sRNAs endógenos de plantas pueden clasificarse en dos grupos principales: sRNAs interferentes (siRNAs, *small interferent RNAs*) y microRNAs (miRNAs). A su vez, una subclasificación separa a los siRNAs en siRNAs secundarios que actúan en *trans* (tasiRNAs), siRNAs naturales antisentido (nat-siRNAs) y siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs) (Waititu *et al.*, 2020; Ariel and Manavella, 2021). Desde el punto de vista estructural, los siRNAs se derivan

de precursores de doble cadena (dsRNA) formados por la hibridación de intermolecular de dos cadenas de RNA complementario. Por otro lado, los miRNAs se producen a partir de precursores de RNA de cadena sencilla (ssRNA) que poseen una complementariedad intramolecular tipo tallo-asa (Axtell, 2013). De igual manera, estas sub-poblaciones de sRNAs se diferencian por medio de la maquinaria molecular que participa en su biogénesis.

1.3.2 Biogénesis de microRNAs.

Los miRNAs son sRNAs de 20-24 nucleótidos de longitud que se encuentran codificados en el genoma de múltiples organismos. La biogénesis de los miRNAs requiere de varios pasos a fin de que se obtenga el miRNA maduro funcional (Figura V) (Li and Yu, 2021). Como primer paso, la RNA Pol-II transcribe el gen *MIR* dando lugar a un miRNA primario (pri-miRNA) capaz de formar estructuras secundarias tipo tallo-asa. Similar al mRNA naciente, el pri-miRNA se estabiliza por la adición al extremo 5' de un CAP de 7-metilguanosina y una cola de poliadeninas en el extremo 3' (Narjala *et al.*, 2020; Li and Yu, 2021). En plantas, estructuras dentro del pri-miRNA como una región apareada de 15 pb de longitud previo al dúplex miRNA-5p/miRNA-3p, la formación de un tallo largo en la región distal al dúplex y la existencia de una o varias asas terminales, determinan el reconocimiento de la secuencia exacta del futuro miRNA y guían el procesamiento (Moro *et al.*, 2018). El corte inicial en la base del tallo del dúplex del pri-miRNA, está mediado por una RNasa tipo III llamada DICER-LIKE (DCL), usualmente DCL1,. De este corte se obtiene el precursor del miRNA (pre-miRNA), el cual es sujeto de un corte adicional que es llevado a cabo por DCL1 junto con otras proteínas accesorias como DAWDLE (DDL) y CAP-BINDING PROTEIN 20/80 (CBP20/80). Estas proteínas se localizan dentro de un centro nuclear llamado *Dicing bodies*, que también contiene a SERRATE (SE) e HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), siendo su principal función la de promover la separación de fases para la formación y estabilización de estos cuerpos de procesamiento. Este centro de procesamiento ocasiona la liberación del dúplex miRNA-5p/miRNA-3p, cada una de las cadenas con un saliente de 2 nt en su extremo 3' (Li and Yu, 2021; Xie *et al.*, 2021). Para asegurar la estabilidad del dúplex, los extremos 3' salientes son metilados en la ribosa de los ribonucleótidos terminales por una RNA metil-transferasa llamada HUA ENHANCER 1 (HEN1). Posteriormente, el dúplex es exportado al citoplasma con ayuda de la proteína HASTY y complejos proteicos EXPORTIN-1/CRM (Bologna *et al.*, 2018). En el citoplasma, se realiza la selección de una de las cadenas con base en la estabilidad termodinámica del

extremo 5' de la cadena líder (miRNA-5p) en relación con el extremo 5' de la cadena pasajera (miRNA-3p) (Axtell and Meyers, 2018). La selección correcta de la cadena líder está mediada en gran parte por la proteína ARGONAUTA 1 (AGO1) y por la identidad del nucleótido del extremo 5' del miRNA. La mayoría de los miRNAs que se cargan en AGO1 poseen una uridina en el extremo 5'. Sin embargo, algunos miRNAs pueden unirse a otras proteínas AGO (Axtell and Meyers, 2018; Dalmadi *et al.*, 2019). Cuando el miRNA maduro es cargado en AGO se forma el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC), el cual ejercerá su función al identificar al mRNA blanco complementario al miRNA previamente cargado y ejercerá la represión post-transcripcional ya sea por corte endonucleolítico o por la represión traduccional del mRNA objetivo (Li and Yu, 2021).

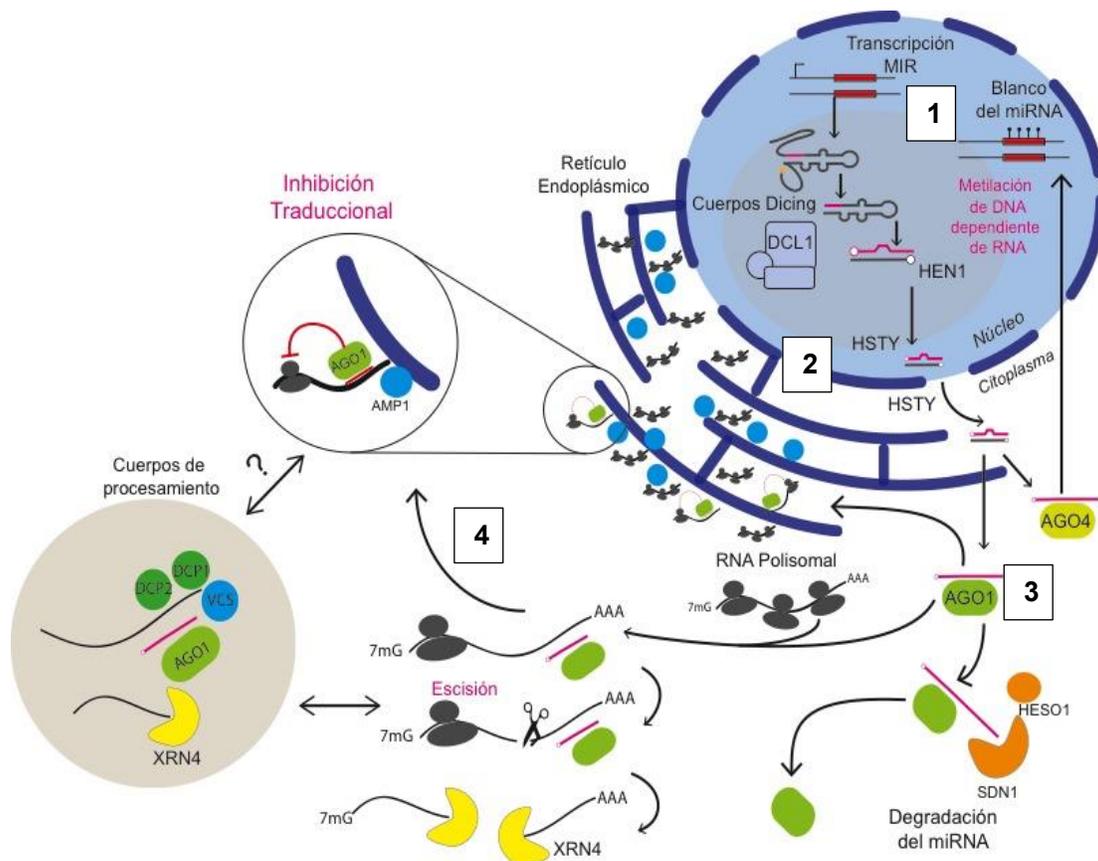


Figura V.- Biogénesis y mecanismos de acción de miRNAs en plantas. El pri-miRNA es procesado en el núcleo (1) y el miRNA maduro es exportado al citoplasma (2). El miRNA es incorporado a las proteínas AGO (3) y realiza el silenciamiento post-transcripcional de genes por medio de escisión del mRNA o por inhibición de la traducción(4). La localización citoplasmática del RISC es desconocida en plantas, pero recientemente se ha reportado que la represión traduccional ocurre en el retículo endoplásmico. De igual manera, los cuerpos Procesamiento (P-body) son requeridos para el reciclaje de la maquinaria de acción de miRNAs. (Modificado de Rogers & Chen, 2013).

1.3.3 Funciones de microRNAs en plantas.

Las funciones de miRNAs conservados en diversas especies de plantas pueden clasificarse en tres grandes categorías: procesos de desarrollo, respuestas de adaptación a estrés y regulación de la biogénesis y función de sRNAs (Mallory and Vaucheret, 2006; Asefpour Vakilian, 2020). El rol de diversos miRNAs conservados se ha definido principalmente en virtud de los mRNAs blanco que regula. Diversos reportes experimentales han permitido identificar la regulación mediada por miRNAs de dianas involucradas en procesos biológicos como crecimiento y desarrollo, mantenimiento de la integridad genómica, transducción de señales, señalización y homeostasis hormonal y la respuesta a distintos tipos de estrés biótico y abiótico (ver Tabla 1). En el presente, más del 60% de los blancos de miRNAs de plantas han sido identificados como factores de transcripción. No obstante, a medida que el grado de conservación de un miRNA disminuye, los blancos entre especie tienden a ser diversos (Gramzow and Theißen, 2019). En maíz se han caracterizado cerca de 58 familias distintas de miRNAs, de las cuales 28 son conservadas con arroz (*Oryza sativa*) y 22 con *Arabidopsis thaliana* (Jiao et al., 2011).

Tabla 1.- Función de algunos miRNAs conservados en plantas.

miRNA	Diana	Función de la diana	Especies	Referencias
miR156	Familia SPL	Promoción de la floración. Desarrollo de hoja y raíz. Respuesta a estrés abiótico.	<i>Arabidopsis</i> y <i>Zea mays</i>	Aukerman and Sakai, 2003; Dai et al., 2018.
miR159	Genes tipo GAMYB	Desarrollo de semilla, inflorescencia masculina, desarrollo reproductivo y vegetativo.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Millar et al., 2019
miR160	ARFs	Desarrollo embrionario, de raíz y parte aérea. Enlongación de hipocotilo	<i>Arabidopsis</i> , <i>Medicago truncatula</i> y <i>Zea mays</i>	Lopez-Ruiz et al., 2019; Dai et a., 2021
miR164	Familia NACs	Determinación de meristemo. Formación de meristemo auxiliares. Floración	<i>Arabidopsis</i> , <i>Zea mays</i> y <i>Oryza sativa</i>	Wang et al., 2021b
miR165/166	HD-ZIP III	Mantenimiento de células del meristemo. Crecimiento de raíces laterales.	<i>Arabidopsis</i> , <i>Zea mays</i> y <i>Oryza sativa</i>	Yan et al., 2016 Merelo et al., 2016

Tabla 1.- (continuación)

miR167	ARFs	Desarrollo de organos masculinos, raíz, tallos y flores. Respuesta a estrés abiótico. Defensa contra patógenos	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Oryza sativa</i>	Yao et al., 2019; Caruana et al., 2020
miR172	Familia AP2	Represión de la floración, Identidad del meristemo floral. Transición de fase vegetativo-adulto. Tolerancia a estrés salino	<i>Arabidopsis</i> , <i>Zea mays</i> y <i>Oryza sativa</i>	Cheng et al., 2021a; Werner et al., 2021.
miR319	Familia TCP	Desarrollo de hoja y control de senescencia. Morfología organelar, síntesis de hormonas y señalización.	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	Ori et al., 2007; Koyama et al., 2017; Bresso et al., 2018
miR390	TAS3	Biogénesis de tasiRNAs para la represión de factores ARFs. Morfología de hoja	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dastidar et al., 2019.
miR393	TIR1 y AFB	Homeostasis de auxinas. Morfología de hoja	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Oryza sativa</i>	Lu et al., 2018; Wang et al., 2018

1.4 Expresión y procesamiento de miRNAs en plantas.

1.4.1 Regulación de la transcripción de los genes *MIR*.

Diversos estudios han descrito que la alteración del patrón de expresión y acumulación de distintos miRNAs causa defectos en el desarrollo, crecimiento y respuestas moleculares en distintas especies de plantas, lo que indica que la biogénesis de miRNAs es un proceso altamente regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. El nivel de acumulación de cada miRNA maduro depende en gran medida de la tasa transcripcional de los genes *MIR* que los originan. La gran mayoría de los genes *MIR* existen como unidades transcripcionales independientes, localizadas típicamente en regiones genómicas que no están ocupadas por genes codificantes de proteínas, conocidas como regiones intergénicas (IGR) (Fang *et al.*, 2015; Li and Yu, 2021). A la fecha, se ha determinado que existen alrededor de 200 a 400 genes *MIR* en distintos genomas de plantas terrestres (Jones-Rhoades, 2012; Gramzow and Theißen, 2019). La gran mayoría de estos genes presentan sus propios promotores que cuentan con elementos regulatorios como cajas TATA e iniciadores de la transcripción (INR), típicos en genes transcritos por la RNA Pol II (Megraw *et al.*, 2006; Civián and Švec, 2009). Generalmente, el pri-miRNA contiene la

secuencia correspondiente para un solo miRNA maduro funcional, sin embargo, en algunas especies de plantas se ha reportado la existencia de loci de genes *MIR* policistrónicos; los cuales originan transcritos que pueden formar dos o más estructuras tallo-asa, donde cada una contiene a un miRNA maduro (Baldrich, Hsing and San Segundo, 2016; Singh *et al.*, 2020). Asimismo, existen miRNAs que se encuentran embebidos en intrones de genes codificantes llamados miRtrones y su abundancia depende de la tasa transcripcional del gen hospedero y de la maquinaria de *splicing* que procesa el mRNA del mismo (Salim *et al.*, 2022).

1.4.2 Elementos regulatorios presentes en promotores de genes *MIR* en plantas.

Al igual que los genes codificantes para proteínas, la regulación transcripcional de los genes que dan lugar a los miRNAs involucra la participación de elementos de regulación en *cis* y *trans*. Desde el descubrimiento de un gran set de miRNAs en plantas que regulan la expresión de diversos factores de transcripción fundamentales para el desarrollo, surgió la interrogante de si estos FTs están involucrados en la regulación de la expresión de los genes *MIR* que los regulan. La caracterización experimental de TSS de algunos genes *MIR* de planta permitió el desarrollo de algoritmos bioinformáticos para predecir elementos de regulación en *cis* enriquecidos en promotores de genes *MIR* (Megraw *et al.*, 2006; Chow *et al.*, 2019). Adicional a la caja TATA en el *core* del promotor, motivos de unión para FTs como SORLEP3, ARF y MYC2 (un FT del tipo bHLH) se encontraron sobre-representados en genes *MIR* de Arabidopsis y arroz al compararlos con su porcentaje en promotores de genes codificantes para proteínas (Zhao and Li, 2013; Chow *et al.*, 2019). La presencia de motivos de unión para factores tipo ARF resulta interesante, puesto que en varias especies de plantas algunos miembros de esta familia de FTs son blancos de miRNAs conservados como miR160, miR167 y miR390 (Zhao and Li, 2013; Luo *et al.*, 2022).

Un claro ejemplo de la regulación transcripcional sobre genes *MIR* mediada por FTs es la comunicación de las vías de señalización de miR156 y miR172. En Arabidopsis, el factor SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) es regulado a nivel post-transcripcional por miR156 para establecer una adecuada transición de la etapa juvenil a adulto y del estado vegetativo a la fase reproductiva. Por su parte, miR172 regula a miembros de familia APETALA2 (AP2) para establecer el tiempo de floración y el desarrollo de órganos florales (Li *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019). miR156 y miR172 exhiben patrones de acumulación inversos: mientras miR156 disminuye su expresión durante la transición

juvenil-adulto, la expresión de miR172 aumenta. A medida que la planta madura, los niveles de miR156 disminuyen, sus blancos SPL9 y SPL10 se acumulan y se unen a sus motivos de reconocimiento presentes en el promotor de *MIR172*. Por consiguiente, el aumento de miR172 maduro ocasiona la regulación a la baja de su blanco AP2, un regulador positivo de *MIR156*, lo que disminuye aún más los niveles de miR156 durante la floración (Spanudakis and Jackson, 2014; Zheng *et al.*, 2019).

1.4.3 Cambios en la expresión de genes *MIR* como respuesta estímulos externos.

La función de muchos miRNAs se ha descrito al evaluar cambios en los niveles de estos sRNAs como respuesta a señales externas, como la limitación de nutrientes, el frío, la presencia de especies reactivas de oxígeno o presencia de luz (Olejniczak, Kotowska-Zimmer and Krzyzosiak, 2018). Por ejemplo, la expresión de miR398 en *A. thaliana* se induce en condiciones de crecimiento con limitación de cobre, ocasionando que los niveles de sus mRNAs diana *Cu-SUPEROXIDE DISMUTASE1* y *2* (*CSD1/2*) disminuyan de manera significativa. Este mecanismo coopera con la respuesta al déficit de este metal, pues moviliza cobre de proteínas no esenciales (como las *CSD1/2*) hacia proteínas esenciales como las plastocianinas que son indispensables para la fotosíntesis (Islam *et al.*, 2022). Además, la expresión de miR397, miR408 y miR857, tres miRNAs conservados en plantas que tienen como blancos mRNAs de proteínas que contienen cobre, tienden a incrementar su expresión en condiciones de déficit de este metal, por lo que la regulación de la expresión sobre estos genes contribuye también al mecanismo de homeostasis de cobre (Islam *et al.*, 2022).

Además de estar involucrado en procesos de desarrollo de plantas, miR167 participa como mediador de diversos tipos estrés, durante los cuales se expresa de manera diferencial. En tomate (*Solanum lycopersicum*), la región promotora del gen *MIR167a* presenta sitios de unión para FTs relacionados con diversos procesos. Mediante ensayos de expresión transitoria con el promotor de *MIR167a*, se comprobó que la actividad de esta región disminuía al someter a las plantas a estrés por frío. Un análisis más detallado indicó que la expresión diferencial estaba guiada por la interacción entre el promotor del miRNA y el factor de transcripción DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2A (*DREB2A*), inhibiendo la expresión del gen *MIR167a* (Jodder *et al.*, 2018).

Como ya se ha indicado, la expresión de los genes en plantas y otros eucariontes superiores

está determinada también por diversas modificaciones epigenéticas y el grado de compactación de la cromatina. Los genes *MIR* no son la excepción. Cambios en la actividad de remodeladores de cromatina afectan la expresión de algunos genes *MIR*. *Ath-MIR156* modifica su expresión en respuesta a pulsos de luz UV-B (Dotto *et al.*, 2018). La exposición de las plántulas de *Arabidopsis* a este estímulo afecta la actividad de componentes centrales del complejo represivo PRC2. Como consecuencia, ocurre una reducción en el depósito de la marca represiva H3K27me3 en diversos genes, dentro de los cuales se encuentra *MIR156*, por lo que se desencadena un aumento en la acumulación del miR156 maduro y se promueve un retraso en el tiempo de floración (Dotto *et al.*, 2018).

1.4.4 El procesamiento de los precursores y su impacto en la acumulación de miRNAs maduros.

Junto con la regulación de la expresión a la que son sometidos los genes *MIR*, el procesamiento de los transcritos precursores determina en gran medida los niveles de acumulación de los miRNAs maduros. El reconocimiento y subsecuente procesamiento del pri- y pre-miRNA son nodos centrales en la ruta de biogénesis de estos sRNAs para obtener un producto funcional. A pesar de presentar 5'-CAP y cola de poli (A) en el extremo 3', los pri-miRNAs son rápidamente procesados a medida que el transcrito nascente emerge del complejo transcripcional (Li and Yu, 2021; Gonzalo *et al.*, 2022). Recientemente, se ha reportado que en la cercanía al TSS de diversos genes *MIR* ocurre la formación de *R-loops* donde co-localizan complejos proteicos que contienen a DCL1 con la maquinaria transcripcional. Al igual, se ha visto que homólogos de DCL1, DCL4 y DCL3, pueden procesar de manera coordinada algunos pri-miRNAs; sin embargo, el procesamiento de los transcritos por estas otras proteínas resulta en la producción de miRNAs de longitud distinta a la canónica. Además, la tasa de procesamiento de los pri-miRNAs se ve afectada por otros factores como la estructura y plegamiento del transcrito primario, la presencia de ciertas proteínas accesorias y modificaciones postraduccionales en las proteínas que participan en la biogénesis de miRNAs (Narjala *et al.*, 2020; Li and Yu, 2021; Gonzalo *et al.*, 2022).

Diversos estudios han abordado las características presentes en el pri-miRNA involucradas con su procesamiento. Las estructuras tipo *hairpins* de pri-miRNAs en plantas presentan una longitud diversa, pues van desde los 50 nt hasta los 900 nt, y son determinantes del

patrón y la eficiencia de procesamiento del pri-miRNA (Moro *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2021). Los pri-miRNAs con *hairpins* cortos (<200 nt) son procesados inicialmente en posiciones cercanas al inicio del dúplex miRNA-5p/miRNA-3p en un procesamiento conocido como base-a-asa generando el pre-miRNA de manera instantánea (Figura VI-A). Para poder ser procesados, estos pri-miRNAs cortos deben de contener un tallo por debajo del dúplex de alrededor de 15 pb seguido de una burbuja de desapareamiento interna. Al igual, los pri-miRNAs más largos son procesados con este mismo patrón de corte (base-a-asa, Figura VI-B); sin embargo, en su estructura presentan dos tallos cercanos al dúplex, un tallo de 21 pb y un tallo de 15 pb separados por un loop interno. Debido a la necesidad de un mayor número de cortes para poder liberar el dúplex que contiene al miRNA, el procesamiento de este tipo de pri-miRNAs es más lento. Por otro lado, existe el patrón de procesamiento de pri-miRNAs del tipo asa-a-base, el cual se aplica a pri-miRNAs con dos asas consecutivas (la terminal y una interna de 42 nt); incluso se ha reportado la existencia de pri-miRNAs con asas terminales ramificadas que requieren de hasta cuatro cortes siguiendo este patrón, lo que ocasiona que el mecanismo de procesamiento no sea tan productivo (Figura VI-C) (Moro *et al.*, 2018).

A la par de estos elementos estructurales, múltiples proteínas accesorias definen la tasa de producción de miRNAs maduros. Estas proteínas regulan la actividad de DCL1 y/o facilitan el correcto acomodo del pri-miRNA dentro de ésta (Li and Yu, 2021). HYL1 y SE son dos componentes básicos de la biogénesis de miRNAs; pues mutantes de los genes que

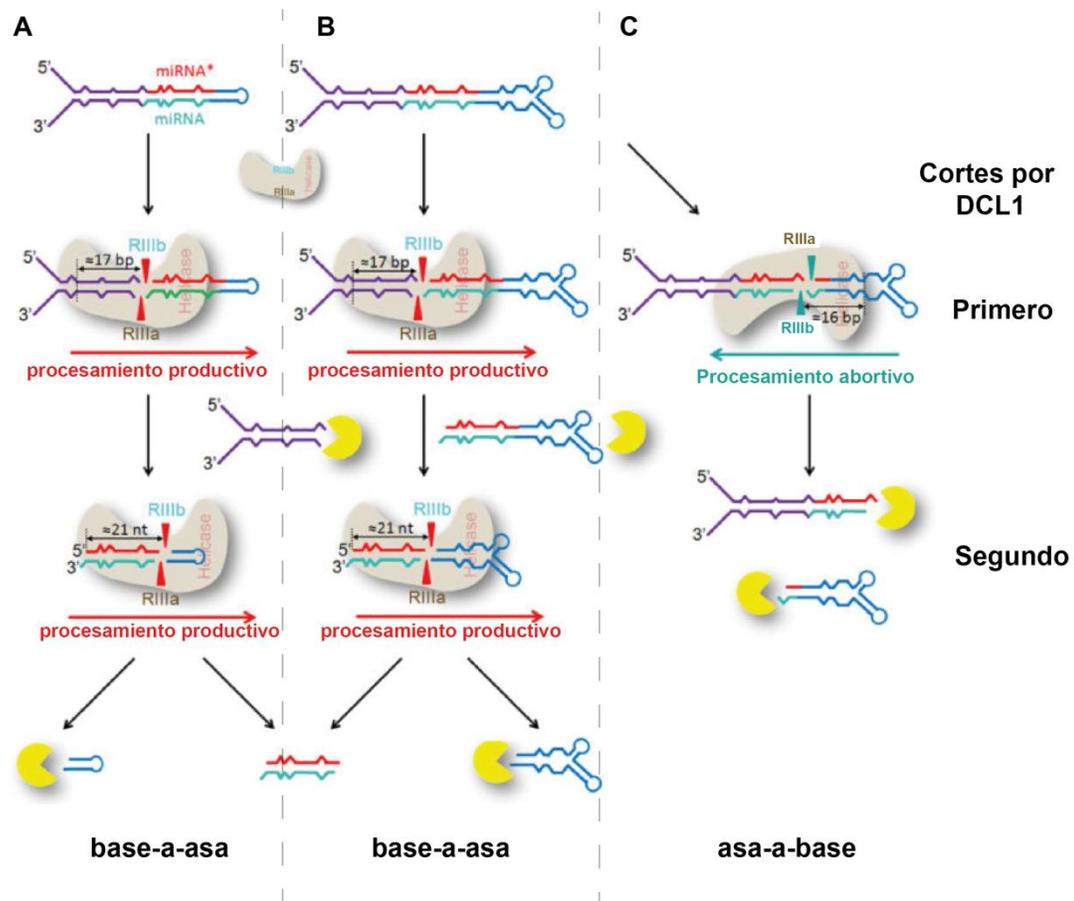


Figura VI.- Modelo de procesamiento bi-direccional de pri-miRNAs mediado por DCL1. La orientación de unión de DCL1 junto con el complejo de procesamiento sobre el pri-miRNA es un factor clave que determina si el procesamiento es productivo (flechas rojas) o abortivo (flecha verde). Pri-miRNAs con asas terminales cortas (A) y asas terminales ramificadas (B) pueden ser procesados por DCL1 en un mecanismo base-a-asa a través de la existencia de tallos largos en la región previa al dúplex miR-5p/miR-3p. Un mecanismo de atenuación identificado para pri-miRNAs con asas terminales ramificadas ocurre mediante el procesamiento asa-a-base (C) del transcrito primario para evitar la producción del miRNA maduro. Las exo- y endo-ribonucleasas se muestran en amarillo.(Modificado de Zhu et al., 2013)

codifican para estas proteínas presentan una reducción global de la población de miRNAs (Yu, Jia and Chen, 2017; Luo *et al.*, 2022). Notablemente, tres regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) presentes en SE, promueven la separación de fases en el núcleo que permite la formación de los cuerpos de *Dicing* donde se realiza la mayor parte de la biogénesis de miRNAs (Xie *et al.*, 2021). Al mismo tiempo, los transcritos *DCL1* y *AGO1* son blancos conservados de miRNAs. Los circuitos de regulación por retroalimentación negativa que involucran a miR162-*DCL1* y a miR168-*AGO1*, ilustran el papel esencial que juegan estas proteínas en la homeostasis de los miRNAs, ya que estos circuitos de regulación están conservados en diversas especies de plantas para mantener los niveles adecuados de proteínas de biogénesis (Dalmadi *et al.*, 2019; Li and Yu, 2021).

1.5 El maíz como modelo para el estudio de los genes de microRNAs.

1.5.1 La caracterización, función y regulación de los miRNAs en maíz.

Como sistema de modelo genético, el maíz ha contribuido significativamente al entendimiento del desarrollo y la evolución de las plantas, y más recientemente, ha permitido elucidar las funciones reguladoras de diversos miRNAs y su expresión. A la fecha, alrededor de 465 miRNAs de maíz han sido identificados y depositados en miRBase y otras bases de datos. Sin embargo, sólo una pequeña porción de estos miRNAs han sido funcionalmente caracterizada (Liu *et al.*, 2019). Uno de estos es zma-miR156, el cual regula la acumulación del transcrito *TEOSINTE GLUME ARCHITECTURE (TGA)*, un gen involucrado en la evolución molecular del maíz a partir del ancestro teosinte y que participa en la determinación de los órganos sexuales en maíz (Chuck, Meeley, *et al.*, 2007). También, se ha descrito que mutaciones en *CORNGRASS1 (CG1)*, que ocasionan un fenotipo neoténico (mantenimiento del estado juvenil en órganos adultos), modifican positivamente la acumulación de miR156 y reducen los niveles de miR172, ocasionando la alteración de la transición de fase juvenil a adulto en plantas de maíz (Chuck, Cigan, *et al.*, 2007).

Otras familias de miRNAs de maíz han sido funcionalmente caracterizadas en procesos de respuesta a distintos tipos de estrés. Por ejemplo, zma-miR166 incrementa su expresión en respuesta a estrés hídrico y disminuye los niveles del transcrito que codifica para la proteína HOMEODOMAIN ZIP III (HD-ZIP III), involucrada en procesos como la determinación de la polaridad de hoja, la formación de meristemas axilares y la emergencia de raíces laterales (Tang *et al.*, 2022). En contraste, zma-miR169 se regula a la baja como medida de respuesta a este tipo de estrés en plántulas de maíz sometidas a sequía por cortos periodos de tiempo (Das and Mondal, 2021). Otros estudios han demostrado que la regulación ejercida por zma-miR167, zma-miR160b y zma-miR529 sobre sus dianas son esenciales en procesos como la formación de mazorcas y el desarrollo morfológico. Sin embargo, estos miRNAs disminuyen su acumulación en respuesta a estrés biótico y abiótico (Gu *et al.*, 2013). Estos y otros múltiples reportes demuestran que la regulación mediada por miRNAs está involucrada en procesos fundamentales en el ciclo de vida del maíz y en la respuesta a diversos estímulos ambientales.

En los últimos años, se han caracterizado algunos genes de miRNAs esenciales para maíz. Zhang y colaboradores realizaron la anotación sistemática de genes *MIR* en diversos

tejidos, obtuvieron los perfiles de expresión por medio de sRNA-seq y realizaron la caracterización de los transcritos de pri-miRNAs para dar herramientas que permitan un mejor entendimiento de su transcripción y regulación (Zhang *et al.*, 2009). Esta caracterización arrojó que la longitud de la mayoría de los transcritos de pri-miRNAs oscila entre 250 nt y 2000 nt, con un tamaño promedio de 810 nt, tamaño mucho menor que el promedio para los transcritos de genes codificantes de proteínas en maíz (1433 nt). También, este grupo de trabajo reportó que la región 3' de varios pri-miRNAs (medida desde el sitio terminal del tallo-asa que contiene al dúplex del terminador transcripcional) es generalmente más larga que el extremo 5' de este, teniendo una longitud promedio de 953 nt y 523 nt, respectivamente. Otro hallazgo interesante es que cerca del 83% de los genes *MIR* de maíz presentan un motivo tipo TATA-box en las posiciones -23 y/o -28 relativas al TSS (Zhang *et al.*, 2009). Estos resultados han sido clave para desarrollar nuevos métodos de predicción de promotores proximales de genes *MIR* en maíz. No obstante, aún quedan interrogantes acerca de los mecanismos de regulación que determinan la expresión y acumulación de miRNAs en diversos procesos en el ciclo de vida del maíz.

1.5.2 *miR528: regulador central de múltiples procesos.*

En maíz, diversas familias de miRNAs altamente conservados funcionan como moduladores del desarrollo y crecimiento, señalización, homeostasis hormonal y respuesta a estrés (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017). Recientemente, la funcionalidad de familias menos conservadas ha sido estudiada. Una de estas familias es la de miR528, presente sólo en monocotiledóneas y catalogada inicialmente dentro de la respuesta a estrés oxidativo y metales pesados (Xu *et al.*, 2011). A la fecha, miR528 ha sido caracterizado en distintos modelos experimentales en múltiples especies de plantas. En arroz, se describió su participación en la respuesta a infecciones por virus y en la homeostasis de cobre (Wu *et al.*, 2017). Se observó que Os-SPL9 promueve la expresión de osa-*MIR528* como un mecanismo de respuesta antiviral donde miR528-5p promueve el procesamiento del transcrito *L-ASCORBATO OXIDASE (AOO)* en plantas de distintas variedades de arroz (Yang *et al.*, 2019). También en arroz, miR528-5p regula al factor de transcripción RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2 (OsRFI2) para promover la floración en condiciones de fotoperiodo de día largo (Wu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019). Otro estudio identificó que la sobreexpresión de *MIR528* compromete la tolerancia basal a arsénico III (As³⁺) de variedades resistentes de arroz y modifica el contenido de ácido abscísico (ABA) de la

planta (Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021). En plátano (*Musa acuminata*), Mac-miR528 es un regulador esencial de la respuesta a estrés por frío y la maduración del fruto al señalar la degradación de transcritos de diversas *POLYPHENOL OXIDASES* (PPO), lo que ocasiona el ennegrecimiento de la cáscara del fruto y se traduce en pérdidas económicas para productores (Zhu *et al.*, 2019). En general, estos y otros reportes indican que miR528 es un miRNA multifacético con una gran capacidad funcional debido a la diversidad de dianas que presenta entre especies.

2.- ANTECEDENTES

En maíz, la participación de miR528 en diversos procesos se ha estudiado con un enfoque principal en el miRNA maduro y sus mRNAs dianas. Experimentos de secuenciación masiva de sRNAs encontraron que los niveles de miR528-5p incrementan de manera significativa a medida que sucede la maduración del embrión de maíz luego de la polinización (D. Li *et al.*, 2013). De igual manera, se ha visto que este miRNA incrementa sus niveles durante la imbibición de la semilla (Figura VII), siendo su punto de acumulación máxima en el momento que la semilla germina. A través del análisis global de los productos de degradación mediados por miRNAs (degradoma) en semillas de maíz luego de la imbibición, se propuso que miR528 puede participar durante las primeras etapas de germinación al modular la homeostasis de mRNAs de proteínas reguladoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) para prevenir daño celular (Wang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

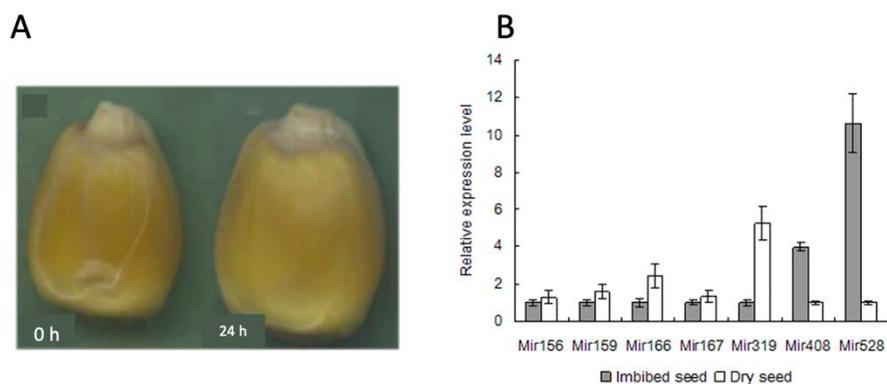


Figura VII.- zma-miR528 maduro se acumula durante las primeras 24 h de imbibición en maíz. (A) Semillas de la línea endogámica 87-1 previo a la imbibición en agua (izquierda, 0h) y luego de 24 h de imbibición (derecha, 24h) (B) Niveles de expresión relativa de distintos miRNAs de maíz en semilla seca (barras blancas) y después de 24 h de imbibición (barras grises). (Modificado de Li *et al.*, 2013)

Reportes más recientes señalan que la acumulación de este miRNA se ve modificada por los niveles de nitrógeno en el medio. Plantas de maíz de la variedad ZZC01 que crecieron en suelos adicionados con un exceso de nitrógeno presentaron niveles más elevados de miR528 en comparación con plántulas crecidas en medios pobres en nitrógeno (Sun *et al.*, 2018)(Figura VIII-A). Bajo estas condiciones, la sobre-acumulación de miR528 regula a la baja dianas específicas como *Zm-LACCASE3-5* (*Zm-LAC3-5*, Figura VIII-B y VIII-C), cuyos

productos están involucrados en la biosíntesis y deposición de lignina, generando plantas con tallos débiles que presentan un fenotipo de susceptibilidad al acostamiento (*lodging*) (Sun *et al.*, 2018).

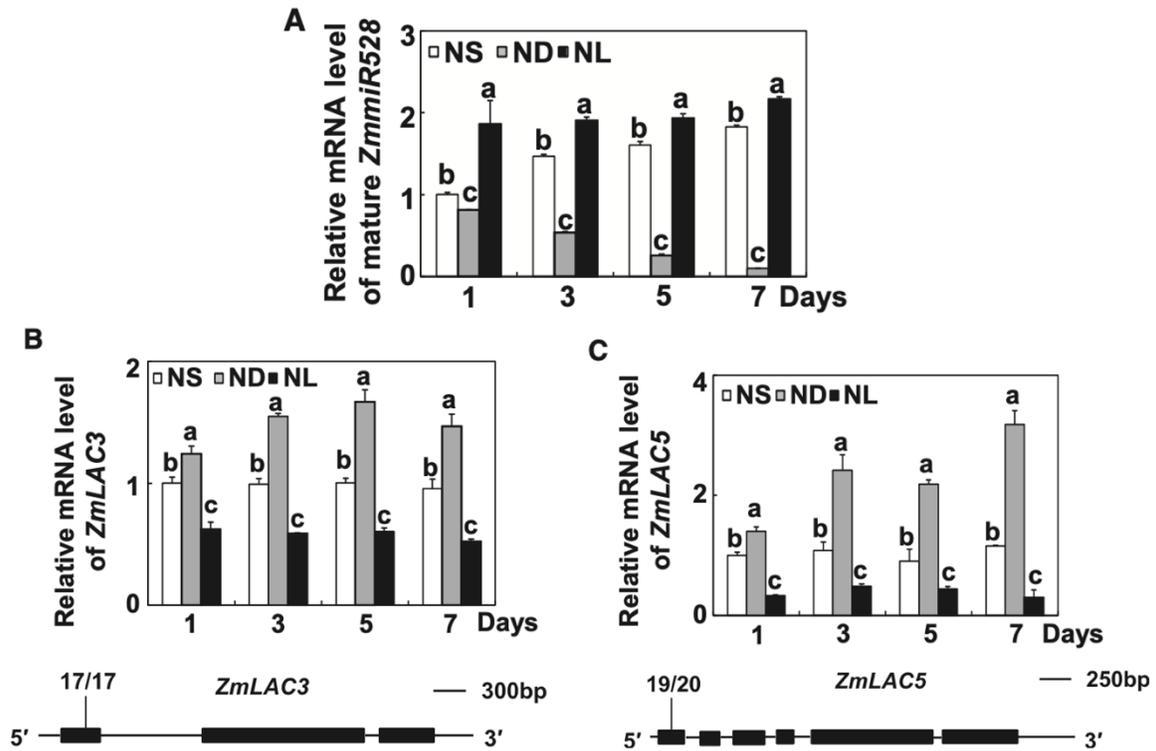


Figura VIII.- La acumulación de zma-miR528 incrementa en medios con exceso de nitratos.

(A) Niveles relativos de acumulación de zma-miR528 maduro en medios con concentraciones suficientes (NS, 18 mM NO₃⁻, barras blancas), deficientes (ND, 4 mM NO₃⁻, barras grises) y de exceso (NL, 30 mM NO₃⁻, barras negras) de nitratos en plántulas de maíz ZCC01 durante 7 días de tratamiento. Acumulación relativa de los transcritos LAC3 (B) y LAC5 (C) en plántulas de maíz bajo las condiciones probadas en (A). La representación gráfica de cada transcrito se encuentra debajo de cada perfil de acumulación. Los rectángulos negros denotan los exones en los transcritos y se señala el sitio de corte de miR528 validado por 5'-RLM-RACE (Modificado de Sun *et al.*, 2018)

Cambios significativos en los niveles de miR528 se han reportado también durante la inducción y proliferación de callos en la embriogénesis somática de maíz (ES). Esta vía alterna de desarrollo emplea células somáticas (2n) de un tejido explante que bajo estímulos con auxinas y otros fitorreguladores pueden generar embriones somáticos que regeneran a un individuo completo (planta) una vez retiradas estas hormonas (Yang and Zhang, 2011). Este modelo de desarrollo incluye una gran cantidad de eventos característicos como desdiferenciación celular, activación de la división celular, reprogramación de la fisiología y metabolismo y cambios en patrones de expresión de

genes (Méndez-Hernández *et al.*, 2019). El análisis global de la abundancia de miRNAs durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de la variedad mexicana VS-535 raza Tuxpeño, indicó que el incremento más significativo fue el observado para miR528 (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018)(Figura IX). Como parte del estudio funcional de miRNAs en este modelo, se analizó la presencia de algunos en perfiles polirribosomales de callos embriogénicos de maíz VS-535 para conocer si participan en la regulación traduccional de

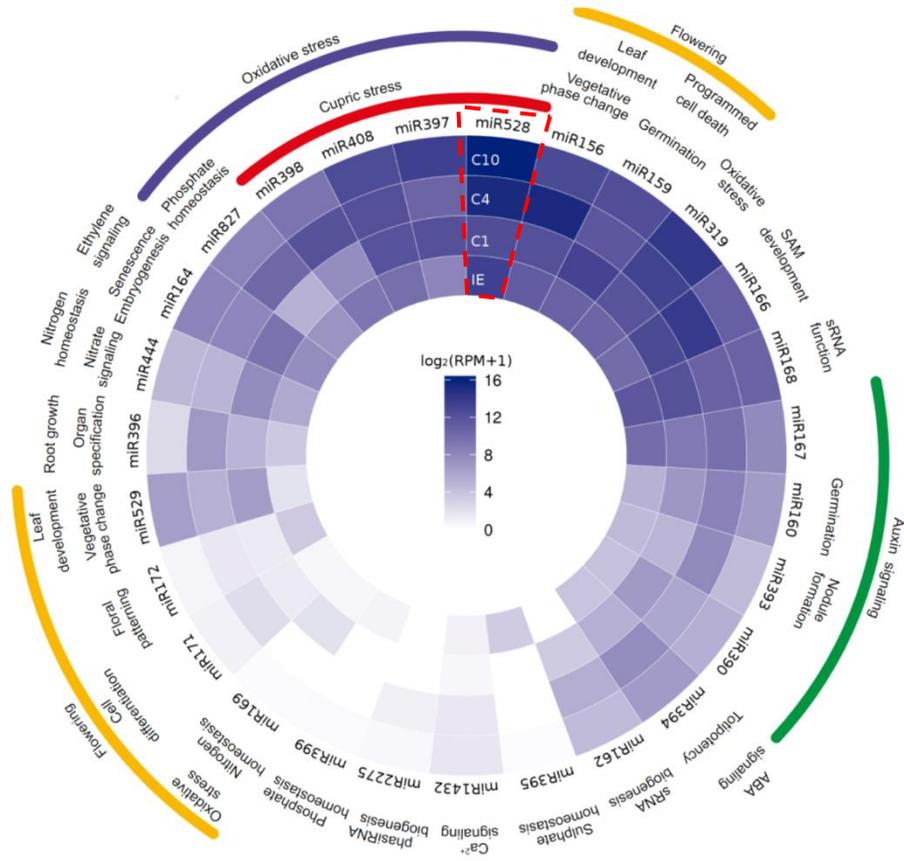


Figura IX.- Distribución de miRNAs durante la embriogénesis somática de maíz. Abundancia de miRNAs relacionados con diversos procesos celulares en callos embriogénicos de maíz VS-535. Se puede observar que miR528 es uno de los miRNAs que incrementó su expresión a lo largo del proceso (línea roja punteada). IE: embrión inmaduro. C1: callo de 1 mes. C4: callo de 4 meses. C10: callo de 10 meses. (tomado de Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018)

sus mRNA diana (Juárez-González, 2015). Estos ensayos revelaron que sólo miR528 se localizaba en fracciones de polisomas (con traducción activa y eficiente, FiguraX-A); sugiriendo que este miRNA puede ejercer regulación a nivel traduccional. Otro modelo experimental donde se han descrito cambios en la abundancia de miR528 es la regeneración *in vitro* de plantas de maíz en la etapa final de la ES. En la variedad VS-535 de maíz, la disminución hormonal y la exposición a la luz de callos embriogénicos ocasionaron que los niveles de miR528 disminuyeran significativamente a medida que se

establece la regeneración de plantas (Chávez-Hernández *et al.*, 2015)(Figura X-B). Para algunos de sus transcritos diana predichos se observó que, mientras *SOD1A* mostraba comportamiento inverso al perfil del miRNA, *PLC* no tenía este tipo de correlación. Esto plantea la posibilidad de que miR528 pueda ser capaz de ejercer su función a través de otros mecanismos (Figura X-B).

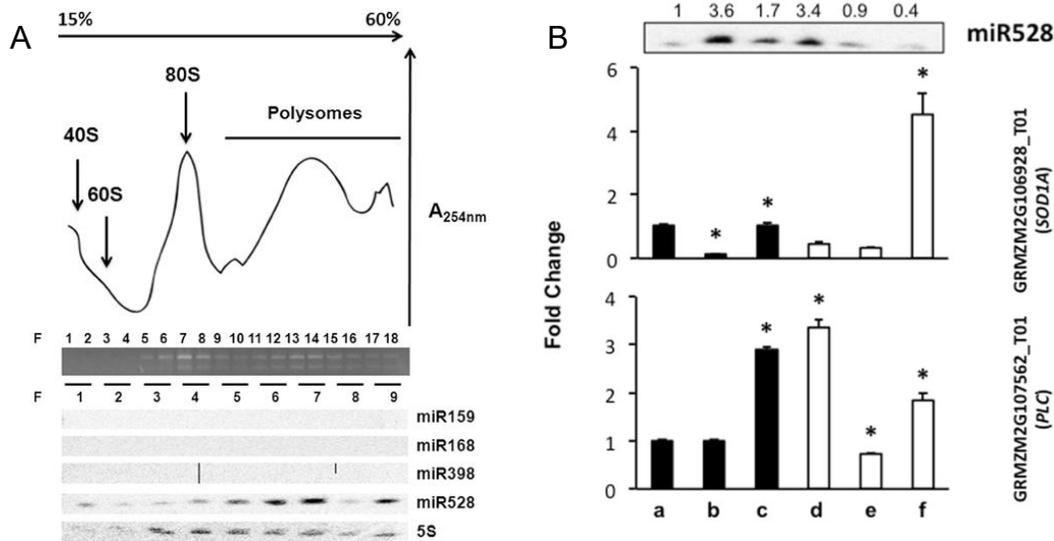


Figura X.- Los niveles de zma-miR528 disminuyen conforme se depletan las hormonas del medio. (A) Distribución de miRNAs a lo largo de distintas fracciones del perfil polirribosomal obtenido a partir de callo embriogénico subcultivado por 10 meses. Los paneles inferiores corresponden al RNA total purificado de cada fracción y la detección de distintos miRNAs por northern blot. (B) Acumulación de zma-miR528 y de dos transcritos diana: *SOD1a* (panel superior) y *PLC* (panel inferior) durante el proceso de regeneración. Las barras de color representan periodos de oscuridad y las barras blancas periodos de luz. a: medio 100% hormonas; b/d: medio con 50% hormonas; c/e: medio con 0% hormonas; f: plántula. En la parte superior se observan los niveles de miR528 durante estos procesos detectados por Northern-blot (modificado de Chávez-Hernández *et al.*, 2015)

En general, los estudios que demuestran la participación de miR528 en todos estos procesos de desarrollo, de respuesta a estímulos y estrés sólo se enfocan en determinar los cambios en la abundancia del transcrito maduro y cómo se ven afectados los niveles de algunos de sus mRNAs diana. Sin embargo, y a pesar de que este miRNA funciona como componente central en distintos procesos, poco se sabe acerca de sus mecanismos de regulación sobre los transcritos diana y los elementos regulatorios que dirigen la expresión a partir de los genes que lo codifican en maíz en respuesta a estos estímulos.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La participación de miR528 en diversos procesos en el desarrollo de maíz ha sido estudiada por medio de los perfiles de acumulación del miRNA maduro y de algunos de sus transcritos diana. Es evidente que en estos modelos existen cambios globales de expresión y eventos regulatorios característicos; sin embargo, poco se ha explorado acerca de cómo estos mecanismos regulatorios afectan la expresión de los genes *MIR* de los cuales se deriva miR528 y cuya acumulación se ve modificada durante estas etapas. Atendiendo a esto y a reportes previos de los niveles de acumulación de miR528 en algunas de estos modelos, el presente trabajo se propuso dilucidar, además del mecanismo de regulación de blancos de miR528, los elementos regulatorios y estímulos que modifican la expresión de este miRNA durante la germinación y primeras etapas de establecimiento de plántulas de maíz para contribuir a un mejor entendimiento de las redes de regulación que dirigen su expresión y el impacto sobre sus blancos.

4.- HIPÓTESIS

- » En maíz, miR528 es capaz de regular RNAs mensajeros blanco como *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, *SOD1a* y *PLC1* a través del corte endonucleolítico y por inhibición de la traducción de estos.
- » Elementos regulatorios presentes en el promotor de los genes *MIR528* de maíz funcionan en la activación transcripcional en respuesta a tratamientos con nitratos y auxinas durante la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz de la variedad VS-535.

5.- OBJETIVOS

Generales

- ❖ Analizar el mecanismo de regulación de miR528 sobre algunos de sus transcritos diana.
- ❖ Estudiar los elementos regulatorios presentes en el promotor de *MIR528* que determinan la transcripción de los genes que codifican para este miRNA en la variedad sintética de maíz Tuxpeño VS-535.

Particulares

- Analizar la relación estructural y conservación de secuencia entre precursores de miR528 de distintas especies de monocotiledóneas.
- Analizar de manera experimental la regulación de transcritos blancos como *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, *SOD1a* y *PLC1* de miR528 durante las etapas de inducción, proliferación y regeneración de la embriogénesis somática de maíz de la variedad sintética Tuxpeño VS-535
- Analizar la región promotora de genes *MIR528* de maíz en bases de datos actualizadas para encontrar secuencias de unión para distintos factores de transcripción.
- Evaluar de manera experimental la acumulación de miR528 y sus precursores durante la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz.
- Determinar el efecto de diversos estímulos sobre la abundancia de los precursores y miR528 en ejes germinados de maíz.
- Determinar las regiones del promotor de los genes *MIR528* que responden a diversos estímulos como nitratos y auxinas exógenas que desencadenan cambios en la acumulación de miR528.

6.- METODOLOGÍA

6.1 Material biológico y aplicación de estímulos.

Todos los experimentos fueron realizados con la variedad mexicana VS-535 proveniente de la raza *Tuxpeño* (*Zea mays* L.).

La evaluación funcional de miR528 sobre algunos mRNAs diana se evaluó en el modelo de embriogénesis somática (ES) en las etapas de inducción, proliferación y regeneración. Para contar con embriones inmaduros de edad adecuada para la inducción de la ES, se crecieron plantas de maíz en sacos de 20 kg con mezcla comercial de suelo (Sunshine) bajo condiciones de fotoperiodo natural y temperaturas de entre 25-30°C en el invernadero. Después de cuatro meses, se realizó la polinización manual de las mazorcas con polen colectado de distintas plantas. Entre 15 a 18 días después de la polinización, se colectaron embriones de tamaño similar de la sección media de la mazorca. A partir de este tejido, se realizó la inducción de ES siguiendo el protocolo mencionado más adelante.

Para los experimentos de germinación y establecimiento de plántulas, se desinfectaron semillas maduras de maíz con una solución comercial de NaClO al 6% mediante agitación constante (250 rpm) por 5 minutos seguido de 5 lavados con 100 mL de agua destilada estéril. La imbibición, germinación vertical y establecimiento de plántulas de maíz se realizó siguiendo el protocolo reportado (Crombez *et al.*, 2016). Las semillas se colocaron en rollos de papel humedecidos con agua y se incubaron con un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad a 28°C.

El efecto de la presencia de nitratos en la expresión de *MIR528* se evaluó conforme a lo reportado por (Sun *et al.*, 2018). Los rollos fueron empapados con 150 mL de agua destilada estéril (condición control) o con el mismo volumen de una solución 30 mM de KNO₃ hasta por 72 h, haciendo recambios de solución cada 24h. Se colectaron muestras de ambos grupos luego de 24, 48 y 72 h de tratamiento continuo.

Para la adición exógena de auxinas y su efecto sobre la expresión de *MIR528* se procedió conforme a lo reportado por (Crombez *et al.*, 2016). Durante las primeras 72 h de imbibición, se incubaron los rollos con semillas en agua destilada estéril (control) o en una solución 50 µM de ácido N-1-naftilalámico (NPA, inhibidor del transporte de auxinas, Sigma Aldrich).

Pasado este tiempo, una porción de las semillas tratadas con NPA se transfirió a rollos nuevos que se empaparon con solución 50 μM de ácido 1-naftalenacético (NAA, Sigma Aldrich). Se colectaron muestras luego de 0, 2, 4, y 6 h de aplicado el estímulo con auxinas. Se extrajeron los ejes embrionarios y coleoptilos de las muestras colectadas y se congelaron inmediatamente para su posterior procesamiento.

6.2 Inducción de callos embriogénicos, subcultivo y regeneración de plantas de maíz

La inducción de callos embriogénicos y su subcultivo se realizó conforme a los protocolos reportados por (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Juárez-González *et al.*, 2019; López-Ruiz *et al.*, 2019) a partir de embriones inmaduros colectados entre 15-18 días después de la polinización manual. Se desinfectaron las mazorcas y se extrajeron los embriones con ayuda de un bisturí estéril en una campana de flujo laminar. Los embriones se colocaron en medio de inducción N6I con 2 mg L^{-1} de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Ver Anexos Tabla S1) por dos semanas. Cada 2 semanas, los callos se subcultivaron en medio N6P fresco adicionado con 2 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.3 mg L^{-1} de benciladenina (BA, Ver Anexos Tabla S1). Se tomaron y almacenaron muestras correspondientes a callos embriogénicos tipo II luego de 1 y 4 meses después de la inducción. Pasados 8 meses de subcultivo, se realizó la regeneración de plantas de maíz siguiendo el protocolo reportado por (López-Ruiz *et al.*, 2019). Segmentos de la porción media de hojas de plantas regeneradas se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento.

6.3 Extracción, purificación y fraccionamiento de RNA de las muestras colectadas

Las muestras de tejido se pulverizaron en nitrógeno líquido en morteros previamente estériles hasta obtener un polvo fino. Rápidamente, se transfirió el polvo a microtubos de 1.5 mL estériles y se añadió 1 mL de TRIzol® (Invitrogen), se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Se centrifugaron los tubos a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C . Se recuperó el sobrenadante sin tocar la interfase y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se añadieron 200 μL de CHCl_3 y se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugaron a 12,000 g por 15 minutos a 4°C . Posteriormente, se transfirió cada sobrenadante a tubos nuevos, se añadieron 500 μL de isopropanol frío,

se mezcló por inversión lenta y se incubó por 15 minutos a -20°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron los tubos a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los botones de RNA con 1 mL de EtOH al 75%. Posterior a esto, se centrifugaron los tubos a 7,500 g por 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante por decantación, se secaron los botones a temperatura ambiente por 5 minutos y se resuspendió el RNA con 50 µL de H₂O DEPC. Cada muestra fue tratada con Dnasa I (Zymo Research) por 15 minutos a 37°C para retirar rastros de DNA genómico. Se purificaron y fraccionaron las muestras en RNAs largos (>200 nt) y pequeños (<200 nt) usando el kit comercial *RNA Clean and Concentrator* (Zymo Research) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.4 Análisis *in silico* de la relación filogenética y estructura de precursores de miR528 en monocotiledóneas

Las secuencias correspondientes a precursores de miR528 de 21 especies de plantas monocotiledóneas se recabaron usando las bases de datos *miRBase* (release 22.1; <https://www.mirbase.org>) y *Plant microRNA Encyclopedia* (PmiREN, versión 2.0; <https://pmiren.com>) (ver Anexos Tabla S2). Se analizó el grado de conservación de secuencia por medio de alineamientos usando el algoritmo optimizado para nucleótidos MUSCLE con 50 ciclos iterativos. La reconstrucción filogenética se construyó usando el software MEGA X con el método de máxima verosimilitud (ML) junto con el mejor modelo de ajuste (Modelo de Tamura de 3 parámetros, (Roy *et al.*, 2020)). La filogenia se evaluó por el método de *bootstrapping* con 1000 réplicas. El árbol filogenético se visualizó y dividió en clados usando el paquete *ggtree* en R studio. Además, se analizó el plegamiento de algunos precursores de miR528 usando el servidor web RNAFold de la Universidad de Viena (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

6.5 Predicción *in silico* de transcritos diana de miR528 de maíz

A partir de la secuencia de zma-miR528-5p maduro depositada en miRBase (5'-**UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG**-3'), se realizó un análisis global para identificar posibles mRNA diana en maíz usando el servidor psRNATarget (V2, release 2017; release, <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/home>). Se utilizaron los parámetros básicos para el algoritmo de búsqueda contra la biblioteca de cDNA del *Maize Genome Sequencing Project, Release 5a*. Los criterios de selección para las dianas fueron: una elevada complementariedad con miR528 en la región semilla (posiciones 10-13 del miRNA, permitiendo un máximo de 1 desapareamiento en esta región), tener un valor de expectativa

≤ 4 , una adecuada accesibilidad teórica al sitio de reconocimiento (UPE <0) y que el transcrito tuviera una adecuada anotación en la base de datos *Maize Genetics and Genomics Database* (maizeGBD RefGen_v4; <https://www.maizegdb.org>) (ver Anexos Tabla S3).

6.6 Amplificación Rápida de Extremos de cDNA mediada por Ligación de adaptador de RNA (5'-RLM-RACE) para validar corte en la secuencia del mRNA complementaria a miR528

Se emplearon alrededor de 3 μg de RNA total aislado como material de partida para la síntesis de cDNA usando el kit comercial *FirstChoice RLM-RACE kit* (Ambion) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se omitieron los tratamientos enzimáticos con fosfatasa alcalina y pirofosfatasa ácida (CIP/TAP) para mantener los 5'-monofosfatos de los productos degradados por miRNAs (Wang and Fang, 2015). Después, la reacción de ligación del adaptador de RNA se incubó a 37°C por 60 minutos y se tomaron 2 μg de RNA ligado para la síntesis de cDNA usando el kit Improm II RT (Promega). La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo por medio de reacciones de PCR anidadas usando oligonucleótidos específicos para cada transcrito candidato y el adaptador (Ver anexos Tabla S4). Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega) y 5 clonas independientes fueron secuenciadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) para identificar el sitio de corte para cada transcrito.

6.7 Cuantificación de precursores, miRNA maduro y transcritos diana de miR528 por RT-qPCR

Para la detección de los precursores de miR528, 2 μg de las fracciones de RNA pequeños (<200 nt) de las distintas muestras se sometieron a reacciones de poliadenilación usando el kit *Poly(A) tailing kit* (Invitrogen). Luego de esto, la síntesis de cDNA se realizó usando oligo (dT) y el sistema *Improm-II Reverse Transcription system* (Promega). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar ambos precursores de miR528 de maíz (zma-premiR528a/b) usando el servidor Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com>) con los ajustes de qPCR activados (Ver Anexos Tabla S4). El miRNA maduro se cuantificó a partir de 250 ng de RNA pequeños. Se sintetizó cDNA empleando el método de síntesis Multiplex de cDNA de miRNAs por RT-stem-loop con reacción pulsada (Kramer, 2011). La cuantificación de los niveles de transcritos diana se realizó a partir de RNA total purificado

y sometido a reacción de retro-transcripción (RT) usando oligo (dT) con el sistema *Improm-II Reverse Transcription system* (Promega). Todas las reacciones de qPCR se realizaron usando el kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher) en un termociclador 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). La acumulación de cada transcrito se reportó como expresión relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como normalizador el transcrito de 18S rRNA (para precursores y mRNAs diana) o el transcrito de U6 snRNA (para el miRNA maduro). Los datos de cada experimento (al menos 3 réplicas independientes con 3 réplicas técnicas cada una) se graficaron en *Rstudio* usando las paqueterías *ggplot2* y *ggpubr*. Se realizaron análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) con pruebas post hoc de comparación múltiple de Tukey para buscar diferencias significativas en *Rstudio*.

6.8 Obtención de perfiles polirribosomales

Para evaluar la regulación de dianas de miR528-5p por bloqueo de la traducción se obtuvieron perfiles polisomales a partir de embriones inmaduros, callos embriogénicos de 1 y 4 meses después de la inducción y de ejes embrionarios germinados por 24 h. Se procedió conforme al protocolo reportado por (Contreras-Paredes *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. Se pulverizó alrededor de 1 g de cada tejido con nitrógeno líquido en un mortero estéril. Sin dejar descongelar la muestra, se resuspendió el tejido molido en 10 mL de amortiguador de lisis (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 50 µg /mL cicloheximida, 0.5 mg /mL heparina, 50 µg /mL DTT, 1% IGEPAL, 1% Triton X-100, 2% PTE) mezclando vigorosamente por 1 minuto. Se clarificaron los extractos por centrifugación a 15,000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó sobre 3 mL de amortiguador de colchón (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 60% sacarosa y 0.05 mg/mL cicloheximida) en tubos de policarbonato estériles y se centrifugaron a 50,000 rpm por 3 horas a 4°C en un rotor de ángulo fijo 75Ti. Pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante y el pellet de polisomas se resuspendió en 500 µL de amortiguador de lisis para después ser depositados en la superficie de un gradiente continuo 15-60% de sacarosa. Los tubos se colocaron en un rotor SW40 y se centrifugaron a 36,000 rpm por 2 h a 4°C. Se graficaron y fraccionaron los perfiles en 16 porciones de 500 µL usando el sistema Auto Densi-Flow conectado con un detector de absorbancia (longitud de onda: 254 nm) y a un graficador de dos canales (LKB 2210).

6.9 Aislamiento de RNA de fracciones de perfiles

polirribosomales

Cada fracción de 500 μL fue tratada con 25 μL de SDS al 10% y 1 μL de Proteinasa K (10 mg/mL) por 30 minutos a 37°C. Después, se separó el RNA del resto de componentes mediante la adición de 250 μL de fenol ácido (pH= 4.3) y 250 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (25:1). Las fracciones se mezclaron con ayuda de un vórtex y se centrifugaron a 15,000 x g por 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el RNA con 80 μL de LiCl 10 M y 500 μL de isopropanol mezclando por inversión delicada. Se incubaron los tubos por 2 h a -20°C y se promovió la formación de pellet de RNA al centrifugar los tubos a 12,000 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los botones con etanol al 70%. Los botones se secaron con ayuda de una bomba de vacío y se resuspendieron en 30 μL de H₂O DEPC estéril. Se determinó la concentración e integridad del RNA en cada fracción y se fusionaron las fracciones que correspondían a una misma región del perfil como RNA libre y subunidades ribosomales (F1), monosomas (F2), polisomas ligeros (F3) y polisomas pesados (F4). Con esto, se procedió a la síntesis de cDNA usando el protocolo diana por medio de RT-qPCR.

6.10 Validación experimental del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de genes *MIR528* de maíz por medio de 5'-RACE

El mapeo del TSS para los genes de *MIR528* se realizó siguiendo el protocolo reportado por (Liu *et al.*, 2018) con algunas modificaciones. Alrededor de 10 μg de RNA total fueron tratados con la enzima QickCIP (NEB) por 1 h a 37°C. La reacción anterior se detuvo con 15 μL de acetato de amonio 5 M para después purificar el RNA usando el método de extracción fenol-cloroformo y precipitación por isopropanol. A partir del RNA precipitado, se agregaron 2 UI de enzima de *decapping* (NEB) para remover los 5'-CAP presente en los transcritos primarios de miRNAs y otros productos de la RNA Pol II. La ligación del adaptador del 5'-RACE se llevó a cabo usando 2 μL de RNA tratado y 2 μL de la T4 RNA ligasa (2.5 U/ μL) por 1 h a 37°C. Los productos de ligación se retro-transcribieron usando oligo (dT) y el sistema *Improm-II Reverse Transcription system* (Promega). Reacciones anidadas de PCR (*nested PCR*) se realizaron usando oligonucleótidos para el adaptador y para el pri-miR528a/b (Ver anexo Tabla 3). Los productos finales de amplificación se observaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se purificaron empleando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Los productos aislados fueron ligados en el vector pGEM-T-easy (Promega) para su secuenciación.

6.11 Búsqueda de elementos regulatorios en *cis* (CRE) en promotores de genes *MIR528* de monocotiledóneas.

El análisis *in silico* de los sitios de unión para FTs (TFBS) dentro de las regiones promotoras de *MIR528* se realizó usando el software de análisis NEW PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) y las bases de datos PlantPAN3.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw>) y PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (ver Anexos Tabla S5) . Se recolectaron las secuencias correspondientes a las regiones río arriba (≈ 2000 pb) al sitio de mapeo del precursor de miR528 en diversas especies de monocotiledóneas usando la base de datos de *Ensembl Plant database* release 52 (<https://plants.ensembl.org/index.html>) para el buscar de motivos de unión conservados y realizar un análisis de homología de estos TFBS entre especies. Se alinearon estas secuencias usando el algoritmo MUSCLE optimizado para nucleótidos y se obtuvo la filogenia usando el software MEGA X y el método de máxima verosimilitud (ML) y 1000 iteraciones de bootstrapping.

6.12 Generación de construcciones para el análisis funcional del promotor de *zma-MIR528a*

6.12.1 Aislamiento del promotor de *zma-MIR528a*

Se extrajo DNA genómico (gDNA) a partir de ejes germinados de maíz usando el método de aislamiento por CTAB (J. Li *et al.*, 2013). Una vez aislado el gDNA, se realizó la amplificación de la región comprendida entre la posición -1510 río arriba y 209 río abajo del TSS del gen *zma-MIR528a* usando *Phusion High Fidelity DNA* polimerasa (NEB) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se purificó el producto de amplificación y se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega) para secuenciación.

6.12.2 Deleciones 5'-consecutivas del promotor de *zma-MIR528a*

A partir del promotor aislado de maíz, se generaron deleciones consecutivas del promotor de *MIR528a* (pMIR_1-pMIR_4) usando oligonucleótidos específicos (Ver Anexos Tabla 3). Los amplicones se clonaron en el vector pENTR-D-TOPO (Thermo Fisher). Se corroboró la inserción y orientación de cada fragmento por PCR y se realizó la recombinación de cada construcción con el vector final pBGWFS7.0 por medio de la enzima *Gateway LR-Clonase II* (Invitrogen). Se comprobó la inserción correcta de cada fragmento del promotor y la

integridad de los genes reporteros (eGFP y GUS) en los constructos finales por secuenciación tipo Sanger realizadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos).

6.12.3 Delección de los motivos TGA1/4 y AuxRE del promotor de zma-MIR528a

Las deleciones de sitios de unión particulares (TGA1/4 proximal/distal y AuxRE) se llevaron a cabo por medio de mutación sitio-dirigida usando el método de PCR de traslape (*Overlapping PCR*) (Hussain and Chong, 2016) sobre la construcción con el promotor completo (pMIR_1). Los casetes de expresión WT y mutantes se clonaron en el vector pGEM-T easy para su secuenciación y posterior uso en ensayos de actividad transcripcional.

6.12.4 Plásmidos de expresión constitutiva de factores ARFs activadores de maíz

Los plásmidos efectores para ensayos de cotransfección se generaron a partir de las clonas de entrada pUT6075 y pUT3104 depositadas en el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) que contienen los marcos de lectura de los FTs zm-ARF34 (*Zm00001eb031700*) y zm-ARF4 (*Zm00001eb067270*), respectivamente. Estos plásmidos se recombinaron con el vector destino pEarleyGate 102 usando el sistema de recombinación *Gateway LR-clonase II* (Invitrogen). La inserción e integridad de la región codificante de los factores ARFs se comprobó por secuenciación tipo Sanger.

6.13 Aislamiento de plásmidos para ensayos de expresión transitoria

A partir de gliceroles de cada construcción se inocularon 100 µL de suspensión bacteriana en 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron a 37°C y 250 rpm por toda la noche. Los tubos con crecimiento se centrifugaron a 4000 g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en 500µL de solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH=8.5, 10 mM EDTA pH=8.5 y 50 µg/mL de RNasa I agregada el día de la extracción). Luego de esto, se añadieron 500 µL de amortiguador de lisis (200 mM NaOH y SDS al 1%), se mezclaron por inversión y se incubaron los tubos por 3 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 500 µL de solución de neutralización (Acetato de potasio 3 M y 12% ácido acético glacial) y se mezclaron por inversión. El lisado bacteriano se distribuyó en microtubos de 1.5 mL por decantación. A

continuación, se centrifugaron los tubos a 13,200 x g a 4°C por 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y se añadió un volumen (1x) de etanol absoluto frío, mezclando fuertemente por 5 segundos. Las muestras con etanol se cargaron en las columnas del kit *GenElute Plasmid miniprep* (Thermo Fisher) de manera secuencial centrifugando por 30 segundos a 13,200 x g luego de la adición de cada alícuota. Luego de la centrifugación, se lavaron las columnas dos veces con 500 µL de amortiguador de lavado del kit. Las columnas se centrifugaron de manera adicional por 1.5 minutos a 13,200 x g para remover el etanol residual. Luego de esto, se colocaron las columnas en microtubos de 1.5 mL estériles y se agregó a las columnas 36 µL de H₂O DEPC y se centrifugaron por 2 minutos a 13,200 x g a temperatura ambiente. La concentración de cada plásmido aislado se determinó por Nanodrop.

6.14 Aislamiento y transfección de protoplastos de maíz

La obtención de protoplastos se realizó siguiendo el protocolo reportado por (Yoo, Cho and Sheen, 2007) con algunas modificaciones. Se desinfectaron y sembraron alrededor de 15 semillas de maíz en macetas de 15 cm de diámetro. Luego de la emergencia del hipocótilo, se colocaron las plántulas en oscuridad hasta que la primera hoja (segunda en emerger después del cotiledón) se encontraba completamente expandida y etiolada (~10-12 cm). La porción media de cada hoja se cortó en tiras de 0.5 cm y se infiltraron a vacío por 45 minutos en 20 mL de solución de enzimas (Ver Tabla 2). Pasado este tiempo, se incubaron las tiras en la oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación constante (50 rpm) por 3 horas. Los protoplastos se colectaron por filtración y centrifugación (200 rpm por 4 minutos), se lavaron dos veces con 2 mL de solución W5 y se resuspendieron en solución MMg fría a una concentración final de 10⁶ protoplastos mL⁻¹. Para la transfección, se tomaron 2X10⁵ protoplastos y se combinaron con 50 µg de DNA de la construcción correspondiente y se mezclaron por inversión con un volumen (1x) de solución PEG4000. Esta mezcla fue incubada a 25°C por 30 minutos en la oscuridad y los protoplastos transfectados se lavaron dos veces con 1 mL de solución W5. Finalmente, se resuspendieron los protoplastos en 1

SOLUCIÓN	COMPONENTES	
Solución de enzimas	Celulasa R10	1.5% m/v
	Macerozima R10	0.75% m/v
	Manitol	0.6 M
	MES pH 5.7	10 mM
	CaCl ₂	10 mM
	BSA	0.1 %
	β-mercaptoEtOH	3μL
Solución W5	NaCl	154 mM
	CaCl ₂	125 mM
	KCl	5 mM
	MES pH 5.7	2 mM
Solución MMg	MES pH 5.7	4 mM
	MgCl ₂	15 mM
	Manitol	0.4 M
Solución PEG 4000	PEG 4000	40% m/v
	Manitol	0.4 M
	CaCl ₂	0.1 M
Solución de incubación	MES pH 5.7	4 mM
	Manitol	0.6 M
	KCl	4 mM

Tabla 2.- Listado de soluciones para el aislamiento de protoplastos de maíz

mL de solución de incubación y se almacenaron en la oscuridad por 16 h para propiciar la expresión basal de cada construcción. Para evaluar el efecto de la presencia de nitratos y auxinas en la actividad transcripcional de cada construcción, se adicionó al medio de incubación de protoplastos, KNO₃ y/o NAA a concentraciones finales de 10 mM y 1 μM, respectivamente, durante 6 horas adicionales al tiempo de incubación basal. Estas concentraciones fueron menores a las empleadas en los experimentos con semillas y plántulas para evitar la lisis de los protoplastos. Luego de los estímulos, los protoplastos fueron cosechados por centrifugación a 200 x g por 5 minutos para su posterior análisis. La eficiencia de transfección y normalización de la actividad se obtuvo por medio de la cuantificación absoluta de DNA plasmídico transfectado con éxito, siguiendo el protocolo reportado por (Hanifah *et al.*, 2018).

6.15 Análisis de la actividad del promotor de *zma-MIR528a*

La actividad transcripcional de cada construcción se determinó por medio de la expresión transitoria de las proteínas reporteras eGFP y GUS. Pasado el tiempo de incubación basal, los protoplastos transfectados se colectaron y resuspendieron en 300 μL de solución W5 y se detectó la señal de eGFP usando el microscopio confocal Olympus FluoView 1000, equipado con el software FV10-ASW 3.0. Los protoplastos fueron colocados en portaobjetos cóncavos con su correspondiente cubreobjetos. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo de inmersión 60X empleando el láser de excitación para GFP (470 nm) y filtro de barrera (emisión 535-600 nm) y se consideró la autofluorescencia de la clorofila (color de emisión en rojo) como fondo para determinar de manera cualitativa la fluorescencia de la proteína eGFP. Así mismo, la actividad del promotor se determinó por medio de la actividad enzimática de GUS sobre el sustrato ácido 4-metilumbeliferil- β -glucopiranosaidurónico (4-MUG). A partir de los protoplastos transfectados y tratados con los estímulos, se colectaron los extractos proteicos de cada transfección al lisar las células en amortiguador de extracción (amortiguador de fosfatos 50 mM, Na_2EDTA 10 mM, Tritón X-100 1% v/v, IGEPAL 1%, β -mercaptoetanol 10 mM). Cada extracto se recolectó por centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomaron 300 μL de cada extracto, se mezclaron con 150 μL de una solución 2 mM de 4-MUG en amortiguador de lisis y se incubaron a 37°C por 16 horas en la oscuridad. Pasado este tiempo, a cada tubo se le adicionaron 900 μL de amortiguador de paro (0.2 M Na_2CO_3 pH=9.5). La lectura de fluorescencia se realizó por triplicado en placas de 96 pozos para fluorescencia usando el equipo Varioskan LUX Multimode (Thermo Fisher) con un filtro de excitación de 365 nm y un filtro de emisión de 455 nm. Así mismo, se determinó la cantidad de proteína total de cada extracto proteico por medio del ensayo de Bradford. La actividad de GUS se calculó con base en una curva estándar de β -metilumbeliferona (4-MU) y se expresó como $\text{nmol de 4-MU min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína total.

7.- RESULTADOS

7.1 miR528 y sus precursores presentan un alto grado de conservación entre monocotiledóneas

Existen miRNAs que se han conservado en secuencia y función en una gran cantidad de especies de plantas. En particular, miR528 sólo ha sido descrito de manera funcional en arroz (*Oryza sativa*), banana (*Musa acuminata*) y maíz (*Zea mays*); a pesar de ser un miRNA presente en otras monocotiledóneas. Teniendo esto en cuenta, la primera aproximación al estudio de la regulación y función de miR528 fue identificar los genes que dan origen a este miRNA en maíz. En la base de datos miRBase, se identificaron 2 accesos (MI0013239 y MI0013240) anotados como “*RNA_precursor*” de miR528 en dos cromosomas distintos (Figura 1) los cuales generan el mismo miRNA maduro. El gen *zma-MIR528a* (MI0013239) se localizó en el cromosoma 1; su precursor, pre-miR528a, mapea entre las coordenadas 6,412,284 -6,412,406 en la cadena directa, posee una longitud de 123 nt y se encuentra entre dos genes codificantes aproximadamente a una distancia de 3.0 kb y 7.0 kb de cada uno (Figura 1a). Por su parte, el gen *zma-MIR528b* (MI0013240) corresponde al precursor pre-miR528b, se localiza en el cromosoma 9 con coordenadas 15,375,2340-15,375,2417 en la cadena *reversa* y presenta una longitud de 77 nt (Figura 1b). Ambos precursores contienen la misma secuencia para el dúplex miR528-5p/miR528-3p. Asimismo, las dos secuencias precursoras adoptan el plegamiento típico de pre-miRNAs (tallo-asa); sin embargo, sólo *zma-premiR528a* presenta una “asa” terminal ramificada. Una vez identificados estos precursores de maíz, se procedió a analizar la conservación de los precursores de miR528 en diversas especies. Haciendo uso de la enciclopedia de miRNAs de plantas (PmiREN), se colectaron las secuencias depositadas

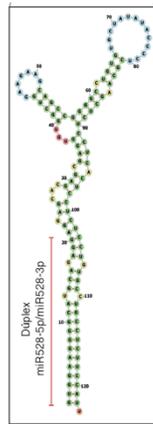
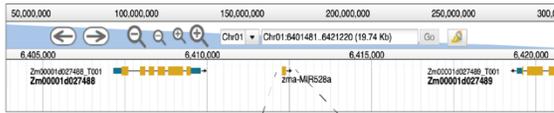
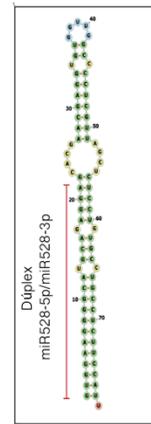
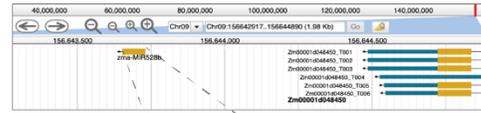
A)*zma-MIR528a*Cromosoma: 1 (+) (123 nt)
miRBase ID: MI0013239*zma-premiR528a***B)***zma-MIR528b*Cromosoma: 9 (-) (77 nt)
miRBase ID: MI0013239*zma-premiR528b*

Figura 1.- Identificación de genes y precursores de miR528 de maíz. Localización genómica, longitud e identificadores de los genes *zma-MIR528a* (A) y *zma-MIR528b* (B) presentes en maíz. En las predicciones de plegamiento se señalan los nucleótidos correspondientes al dúplex miR528-5p/miR528-3p.

como pre-miR528 de 21 especies distintas, incluido maíz (ver Anexos Tabla 1). A partir de esto, se realizó un alineamiento múltiple de precursores (Figura 2). Como se puede observar, los precursores poseen un alto grado de conservación de secuencia, especialmente en la región correspondiente al miR528-5p (miRNA maduro efector), donde todos los precursores presentaron una misma secuencia. En contraste, la región del miR528-3p presentó mayor número de diferencias (Figura 2A). De igual manera, se identificaron algunas bases conservadas en la región correspondiente al tallo del precursor. Este grado de conservación también pudo observarse al explorar el plegamiento de los precursores, donde algunas de las secuencias analizadas presentaron burbujas de

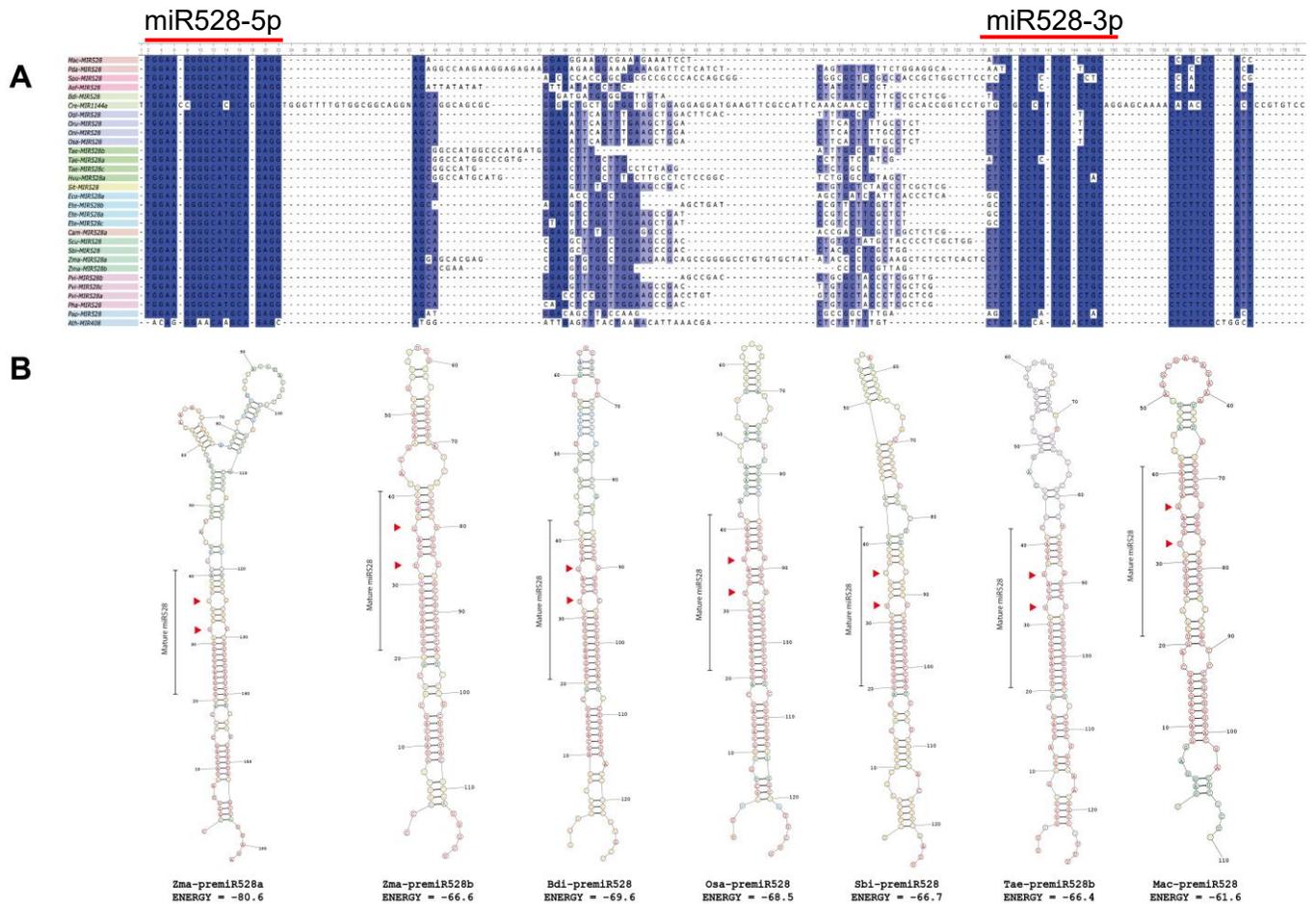


Figura 2.- Conservación a nivel de secuencia y estructura entre precursores de miR528. (A) Alineamiento de secuencias de precursores miR528 en distintas monocotiledóneas. Los nucleótidos resaltados en azul indican regiones conservadas. Un color azul más tenue indica menor porcentaje de identidad. **(B)** Estructuras secundarias predichas para precursores de miR528 en algunas especies obtenidas por medio del programa RNAFold. En la parte inferior se muestra la energía libre mínima de cada estructura. Cada base está coloreada conforme a la probabilidad de apareamiento derivado de la función de partición. A mayor coloración roja, mayor probabilidad de apareamiento. Las posiciones del dúplex con desapareamientos conservados (posición 12 y 16 de la secuencia del miRNA maduro) entre precursores se indican con triángulos rojos. La porción correspondiente al miRNA maduro se indica con una línea negra.

desapareamiento conservadas entre especies, como las posiciones 12 y 16 de la región del dúplex o las burbujas de desapareamiento inmediatamente después del dúplex (Figura 2B). Al analizar la relación evolutiva entre estas secuencias de precursores, se pudo apreciar que las secuencias de pre-miR528a y pre-miR528b de maíz se agruparon en un clado definido cercano a secuencias de precursores presentes en plantas de la familia *Panicoideae* como *Sorghum bicolor* (Sbi), *Panicum virgatum* (Pvi), *Setaria italic* (Sit) y *Saccharum* (Figura 3). Contrario a esto, precursores como el de banana (Mac-premiR528),

mostraron una relación evolutiva más distante con los precursores de maíz, en coincidencia con reportes previos (Zhu *et al.*, 2020).

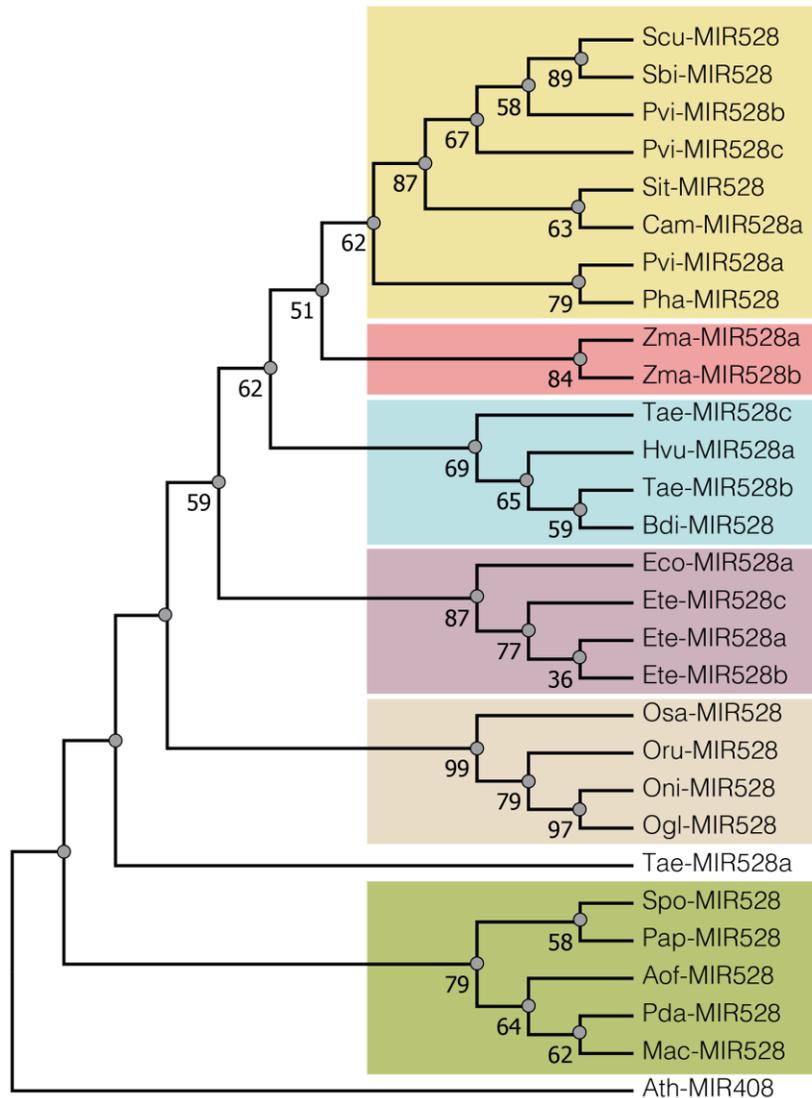


Figura 3.- Análisis filogenético de las secuencias de pre-miR528 encontradas en monocotiledóneas. Reconstrucción filogenética realizada con MEGA X y el método de Máxima verosimilitud (ML) y mejor modelo ajustado (Tamura 3 parámetros) con 1000 iteraciones de bootstrapping. 28 secuencias de precursores de miR528 fueron agrupadas en distintos clados usando el paquete *ggtree* en R studio. El precursor de miR408 de *A. thaliana* (Ath-MIR408) se usó como *outlier* con función equivalente a miR528. El valor de bootstrapping se indican como números en los nodos. Aof: *Asparagus officinalis*, Bdi: *Brachypodium distachyon*, Cam: *Cenchrus americanus*, Eco: *Eleusine coracana*, Ete: *Eragrostis tef*, Hvu: *Hordeum vulgare*, Mac: *Musa acuminata*, Ogl: *Oryza glaberrima*, Oni: *Oryza nivara*, Oru: *Oryza rufipogon*, Osa: *Oryza sativa*, Pha: *Panicum hallii*, Pvi: *Panicum virgatum*, Pap: *Phalaenopsis Aphrodite*, Pda: *Phoenix dactylifera*, Scu: *Saccharum hybrid cultivar*, Sit: *Setaria italica*, Sbi: *Sorghum bicolor*, Spo: *Spirodela polyrhiza*, Tae: *Triticum aestivum*, zma: *Zea mays*.

En conjunto, estos resultados indican que miR528 maduro y sus precursores se encuentran conservados entre monocotiledóneas a nivel de secuencia y estructura, a pesar de la gran diversidad de transcritos diana reportados para miR528 en distintas especies.

7.2 miR528 regula mRNAs diana involucrados en múltiples procesos de maíz

Una de las maneras de estudiar la función de un miRNA es a través de la identificación de sus transcritos diana. Existen diversos métodos y algoritmos de predicción que permiten conocer posibles dianas de un miRNA. Para miR528-5p de maíz, se identificaron dianas potenciales por medio del software psRNATarget (ver Anexos Tabla S2). La selección de algunos candidatos para ser validados se realizó considerando parámetros como el grado de complementariedad entre el miRNA y la región semilla del transcrito, que el mRNA presentara un plegamiento secundario favorable para permitir el acceso al sitio reconocido por miR528 y que tuviera una anotación funcional conocida. Se seleccionaron los transcritos *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND*

Acceso	Descripción del blanco	Alineamiento	Expectativa	Inhibición	Referencias
<i>MATE/BIGE1</i> Zm00001d012883_T001	Transportador que regula la iniciación de órganos laterales y el tamaño del embrión. Modula la acumulación de auxinas.	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGGAAGGU 1 :::~::~:~::~:~::~:~::~:~::~: Target 102 CUCCUCUGCCUGCCUUUCA 122	2.0	Corte	Suzuki et al., 2015 Upadhyay et al., 2019
<i>bHLH152</i> Zm00001d016873_T001	Factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario y aurículas de hojas.	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGGAAGGU 1 :::~::~:~::~:~::~:~::~:~::~: Target 1660 CUGUUUUGCAUGCCUUCCA 1680	2.0	Corte	Vendramin et al., 2020 Zhang et al., 2018
<i>SOD1a</i> Zm00001d031908_T001	Cu-Zn Superóxido dismutasa, regula la tolerancia a estrés y se estimula durante el crecimiento hidropónico de plantas.	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGGAAGGU 1 :::~::~:~::~:~::~:~::~:~::~: Target 570 CUCCUCUGC-UGCCCCUCCG 589	3.0	Corte	Mauro et al., 2005
<i>PLC1</i> Zm00001d021850_T001	Proteína de la superfamilia de las cupredoxinas con función de acarreo de electrones. Involucrada en la respuesta a frío	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGGAAGGU 1 :::~::~:~::~:~::~:~::~:~::~: Target 173 UUCUCCGCACGCCUUUCA 193	3.5	Traducción	Rienzo et al., 2000
<i>GID2</i> Zm00001d048185_T001	Mediador de la ubiquitinación para la degradación de la proteína DELLA durante el crecimiento de plántulas	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGGAAGGU 1 :::~::~:~::~:~::~:~::~:~::~: Target 664 CUCCUCUGCUGCCUUUCA 684	3.5	Traducción	Alexandrov et al., 2009 Zhang et al., 2019
<i>F-BOX</i> Zm00001d028159_T001	Proteína con dominio F-Box. Participa en la ubiquitinación de proteínas señalizadas para degradación por proteasoma 26S	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGGAAGGU 1 :::~::~:~::~:~::~:~::~:~::~: Target 748 CUCCUCUGCUGCCUUUCA 768	4.0	Traducción	Jia et al., 2013

Figura 4.- Predicción y selección de transcritos diana de miR528-5p en maíz. Lista de dianas potenciales de miR528 seleccionados para validación experimental. Se muestra el sitio de reconocimiento y apareamiento entre las secuencias del miRNA y el mRNA diana junto posible mecanismo de inhibición. El valor de expectativa se calcula a partir de los parámetros del algoritmo de psRNATarget, un mayor valor de expectativa indica una menor probabilidad de que el blanco sea regulado por el miRNA en análisis.

EXTRUSION/BIG EMBRYO 1 (MATE/BIGE1; Zm00001d012883_T001), *BASIC HELIX-LOOP-HELIX 152 (bHLH152; Zm00001d016873_T001)*, *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2 F-BOX (GID2; Zm00001d048185_T001)*, y *F-BOX CONTAINING PROTEIN (F-BOX; Zm00001d028159_T001)*; los cuales no habían sido analizados en otros estudios (Figura 4). Así mismo, se incluyeron *SUPEROXIDE DISMUTASE 1a (SOD1a; Zm00001d031908_T001)* y *PLASTOCYANIN-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN (PLC1; Zm00001d021850_T001)*, cuya acumulación y correspondencia con los niveles de miR528 ya había sido explorada durante la regeneración a partir de embriones somáticos de maíz (Chávez-Hernández *et al.*, 2015). La mayor parte de los transcritos seleccionados están involucrados en procesos como el desarrollo y maduración embrionaria, el transporte y acumulación de auxinas y en la respuesta a estrés oxidativo. De manera interesante, estos procesos se relacionan entre sí, ya que el mantenimiento de un estado redox adecuado influye en el desarrollo y proliferación durante la embriogénesis y juntos determinan el estado metabólico y la eficiencia energética de la célula durante estas etapas (Clmini *et al.*, 2019). La amplia variabilidad de dianas predichas para miR528 podría sugerir que este miRNA forma nodos de regulación para proceso celulares ligados entre sí. Cabe mencionar que con el algoritmo de predicción *in silico* empleado, también se identificaron los transcritos *LACASSE 3 (Zm-LAC3; Zm00001d052243_T001)* y *LACASSE 5 (Zm-LAC5; Zm00001d042901_T001)*; dianas de miR528 previamente validadas y cuya regulación mediada por este miRNA afecta la deposición de lignina en plantas de maíz creciendo en medio ricos en nitratos (Sun *et al.*, 2018) (Ver Anexos Tabla S2).

Para confirmar si zma-miR528 ejercía regulación a nivel de degradación sobre algunos de los transcritos seleccionados, se realizó la identificación de productos de degradación mediante el protocolo de 5'-RLM-RACE y con ello definir el sitio de corte en cada mRNA. *MATE/BIGE1*, *bHLH152* y *SOD1a* presentaron el sitio de corte en los nucleótidos que corresponden al apareamiento en las posiciones 10 y 11 de zma-miR528-5p (Figura 5A-5C). Asimismo, se detectó una menor amplificación del producto de degradación del transcrito *PLC1*, lo que podría sugerir que este transcrito se regula por miR528 usando algún otro mecanismo adicional al corte endonucleolítico (Figura 5D y Anexos Figura S1). A pesar de que los productos de degradación para los transcritos *GID2* y *F-BOX* no fueron detectados, se decidió continuar con su caracterización experimental como posibles dianas de miR528 para profundizar en su regulación.

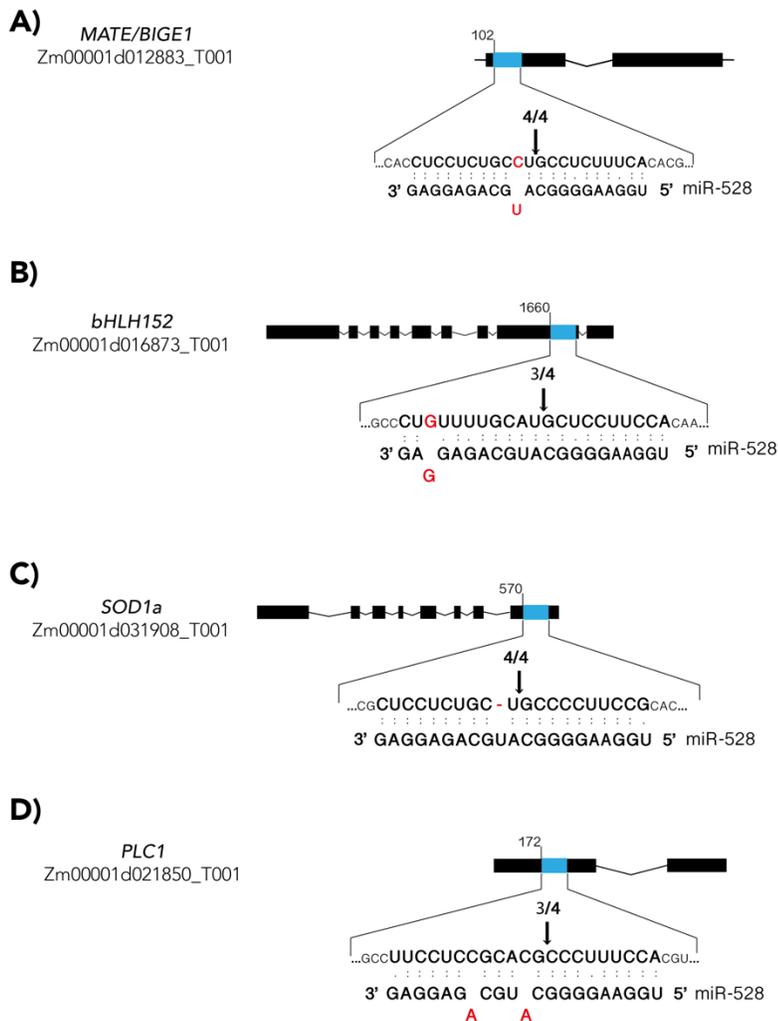


Figura 5.- Validación experimental del sitio de corte para transcritos diana de zma-miR528. Productos de degradación mediada por miR528, identificados a través de 5'-RLM-RACE para **(A)** *MATE/BIGE1*, **(B)** *bHLH152*, **(C)** *SOD1a* y **(D)** *PLC1*. Las flechas señalan el sitio de corte en el transcrito diana, los números arriba de ésta indican la proporción de clones independientes que mostraron el mismo sitio de corte. La secuencia superior representa la secuencia del sitio blanco en el transcrito (fragmento azul), la secuencia inferior corresponde al apareamiento con zma-miR528. Los despareamientos se indican en rojo. (:) apareamiento

7.3 miR528 ejerce una regulación versátil sobre sus mRNAs diana durante la embriogénesis somática de maíz

Al igual que muchos otros procesos regulados por miRNAs en plantas, la embriogénesis somática (ES) depende en gran medida de estos sRNAs. La ES se logra de manera artificial empleando elevadas concentraciones de fitoreguladores en el explante de trabajo, provocando cambios en las células, sus niveles de proliferación y que permite

regenerar una planta al retirar la exposición hormonal (Juárez-González *et al.*, 2019). El papel de los miRNAs reside en la regulación que estos ejercen sobre distintos transcritos diana como FTs involucrados en desarrollo, componentes de la respuesta a hormonas, la maquinaria de respuesta a estrés, entre otros (López-Ruiz *et al.*, 2019). De manera particular, miR528 ha sido identificado como uno de los miRNAs con mayor acumulación en callos embriogénicos durante la ES en algunas especies, incluyendo maíz (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). Sin embargo, la contribución de miR528 en la ES a través de la regulación de sus transcritos diana aún no ha sido completamente explorada. Por consiguiente, se evaluaron los patrones de acumulación de zma-miR528 maduro y transcritos diana anteriormente validados en tejidos de diversas etapas de la ES: tejido de explante (embriones inmaduros, IE), callos embriogénicos a 1 mes de inducción (C1), callos en proliferación subcultivados por 4 meses (C4) y hojas de plantas regeneradas (PL) (Figura 6A). Como se puede observar, los niveles de zma-miR528 presentaron una ligera disminución a 1 mes de inducción con respecto al tejido explante (IE); sin embargo, esta diferencia no fue significativa y podría estar dada por la heterogeneidad de tejido presente al mes de la inducción (Figura 6B). Por otro lado, en callos embriogénicos en proliferación (C4), zma-miR528 presentó un incremento significativo de casi 5 veces de cambio en comparación a las etapas previas, resultado congruente con los datos obtenidos por secuenciación masiva donde los niveles elevados se mantienen incluso a tiempos posteriores de subcultivo (hasta 10 meses después de la inducción) (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). En cambio, plantas regeneradas (PL) presentaron una reducción sustancial en los niveles de este miRNA (Figura 6B), sugiriendo que miR528 podría estar participando activamente en la ES de maíz durante el mantenimiento y la proliferación de callos embriogénicos.

A la par, se cuantificaron los niveles de mRNAs diana en estas muestras y se evaluó la correspondencia que presentaban con los niveles de zma-miR528. Los transcritos *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, *SOD1a*, *GID2* y *F-BOX* presentaron patrones de acumulación similares en los tejidos evaluados (Figura 6B). Sus niveles disminuyeron de manera significativa en callos en proliferación (C4), tejido que a su vez presentó una elevada acumulación del zma-miR528. Por el contrario, en tejidos de regeneración (PL) estos

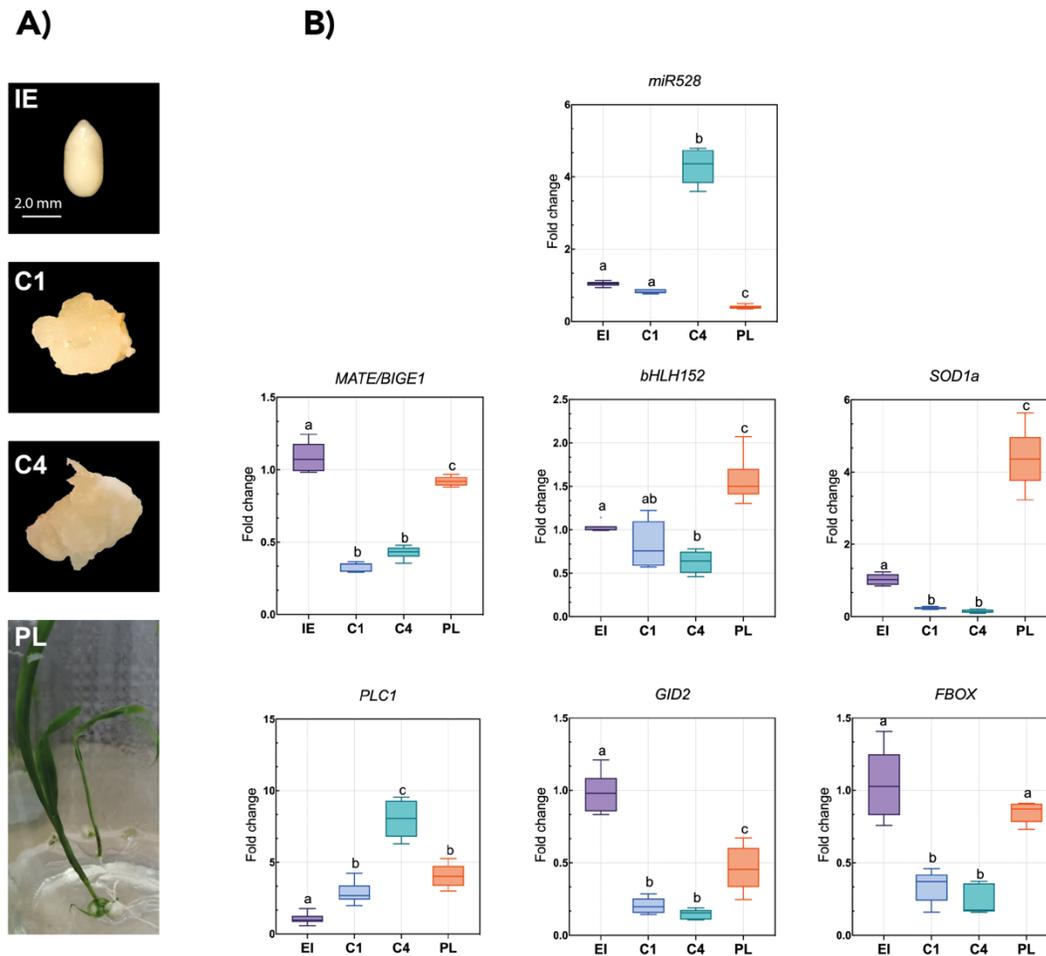


Figura 6.- Niveles de acumulación de zma-miR528 y mRNAs diana durante la ES de maíz. (A) Muestras de tejido obtenidas en diversas etapas de ES usadas para la cuantificación del miRNA y transcritos diana. Embriones inmaduros (EI) luego de 15-18 días de polinización se usaron como explante de inicio para la ES. Luego de un mes de inducción, los callos embriogénicos friables (C1) se recolectaron y procesaron. Los callos embriogénicos fueron subcultivados cada 2-3 semanas para establecer proliferación hasta los 4 meses (C4). La reducción gradual de hormonas y la exposición a luz promovió la regeneración de plantas (PL). **(B)** Niveles de acumulación de zma-miR528 y mRNAs diana obtenidos por medio de RT-qPCR en muestras de RNA total de los tejidos mencionadas en (A). El Fold-change representa la abundancia relativa al explante (IE) y normalizada por U6 (para el miRNA) o el rRNA 18S (blancos). Los resultados fueron obtenidos de tres réplicas biológicas independientes con tres réplicas técnicas cada una (n= 9). Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía con una prueba post-hoc Tukey de comparación múltiple. Las cajas que no comparten al menos una letra difieren de manera significativa ($p < 0.05$) entre sí.

transcritos presentaron incrementos significativos respecto a las etapas anteriores. Por su parte, *PLC1* exhibió un patrón divergente a los demás transcritos, pues se acumuló de manera constante desde el explante (IE) hasta C4 y disminuyó ligera pero significativamente en hojas de plantas regeneradas (PL, Figura 6B). El análisis de

correlación de Pearson entre los niveles de cada transcrito con el miRNA indicó que los perfiles de acumulación de *MATE/BIGE1*, *bHLH152* y *SOD1a* presentan una correspondencia inversa y significativa con los niveles de zma-miR528 (ver Anexos Figura S2); lo que sugiere que la regulación de estos transcritos por parte de miR528 sucede principalmente a través del corte endonucleolítico. En conjunto, estos resultados sugieren que zma-miR528 ejerce una regulación diferencial sobre sus blancos, siendo algunos transcritos regulados preferencialmente por degradación evidenciado por una correspondencia inversa clara, mientras que otros mRNAs diana sólo presentan tendencias de esta correlación. De manera particular, *PLC1* no presentó esta correspondencia inversa en RNA total en los tejidos analizados. Esta falta de correspondencia apunta a la posibilidad de que el mecanismo de inhibición ejercido por el miRNA para este y otras dianas sea el bloqueo traduccional en lugar del procesamiento por corte.

La inhibición traduccional mediada por miRNAs es un mecanismo de regulación que ha sido recientemente explorado en plantas. Evidencias como niveles desproporcionados entre el mRNA y la cantidad de proteína para dianas de miRNAs y la asociación de complejos miRNA-AGO1 con polisomas (donde sucede la traducción activa de mensajeros), apuntan a que los miRNAs de plantas ejercen la inhibición traduccional de sus transcritos diana (Yu, Jia and Chen, 2017). Considerando los patrones de acumulación en RNA total para los dianas de miR528 y tomando en cuenta reportes previos que localizaron a este miRNA en fracciones enriquecidas en polirribosomas (Chávez-Hernández *et al.*, 2015), se procedió a explorar una aproximación a la posible regulación traduccional de miR528 a través de su distribución en perfiles polirribosomales de distintos tejidos (Figura 7). Cada perfil obtenido se dividió en 4 regiones principales en función de su migración a lo largo del gradiente de sacarosa: RNA libre y subunidades pequeñas de ribosomas (F1), monosomas (F2), polisomas ligeros y medios (F3) y polisomas pesados (F4). En todos los perfiles, zma-miR528 se localizó principalmente en la región de polisomas pesados, con más del 80% del miRNA presente en la región F4 para las muestras de callo de 1 y 4 meses (Figura 7B y 7C). En cambio, los transcritos *MATE/BIGE1*, *bHLH152* y *SOD1a* exhibieron una distribución homogénea entre las 4 regiones de los perfiles en todos los tejidos; con excepción de *SOD1a*, el cual presentó un pico de acumulación en la región F4 del perfil de C1 (Figura 7B). Estos patrones de distribución indican que estos transcritos no exhiben una

correspondencia negativa entre su estado traduccional y la distribución de zma-miR528-5p. Sin embargo, los perfiles de *PLC1* mostraron una distribución única al acumularse preferencialmente en RNA libre o monosomas (regiones F1 y F2, respectivamente) y presentar muy bajos niveles en la región F4 (10% o menos en todos los tejidos analizados). Este patrón de distribución es inverso a zma-miR528-5p. Los bajos niveles detectados de *PLC1* en fracciones de polisomas podrían deberse a que este transcrito es regulado en un inicio por inhibición traduccional mediada por miR528 en complejos polirribosomales, para después ocasionar el corte y procesamiento de *PLC1*; mecanismo que explicaría los bajos niveles de producto de degradación detectados por 5'-RLM-RACE y la ausencia de una correspondencia negativa clara en RNA total para este mRNA diana. Estos resultados apoyan una función regulatoria de zma-miR528 sobre *PLC1* que es ejercida tanto por corte endonucleolítico, como por inhibición de la traducción. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para corroborar esto.

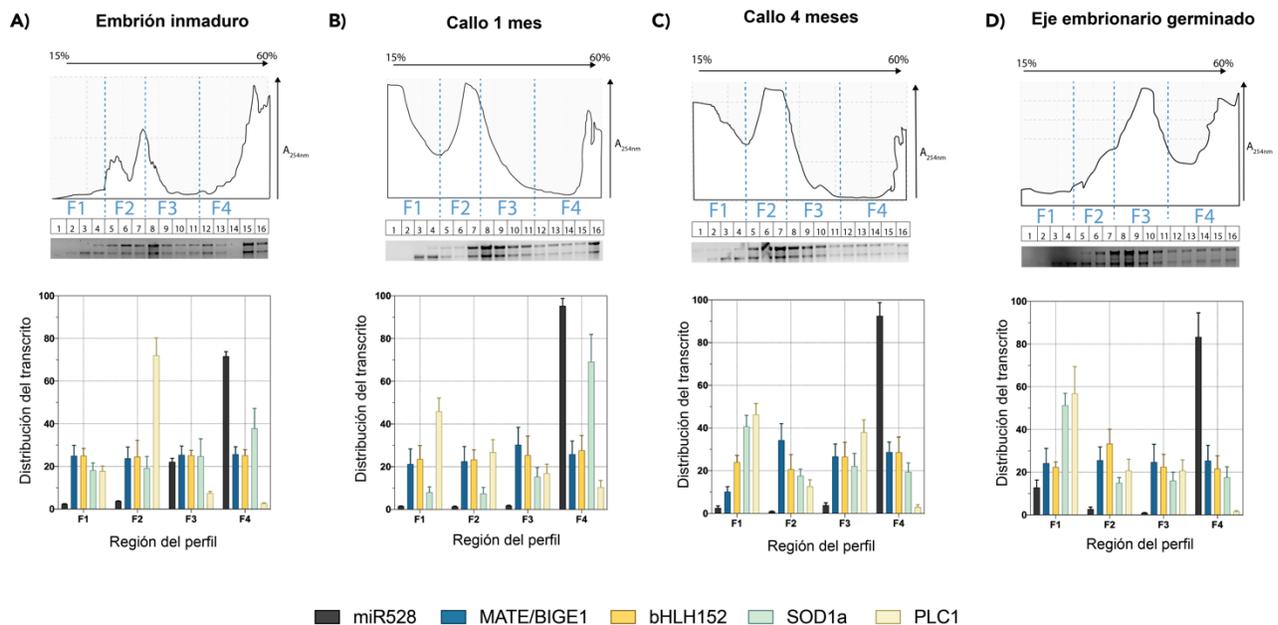


Figura 7.- Distribución de zma-miR528 y sus mRNAs diana en fracciones polisomales. Los paneles superiores muestran los perfiles obtenidos para (A) embrión inmaduro, (B) Callo 1 mes, (C) Callo de 4 meses y (D) eje germinado de maíz. Cada perfil está compuesto por 16 fracciones que fueron fusionadas en 4 regiones de acuerdo con la absorbancia del perfil y la presencia del rRNA en geles de agarosa. Los paneles inferiores muestran la distribución de miR528 y sus dianas en cada región del perfil. El porcentaje de distribución se calculó para cada transcrito usando el valor más bajo de Ct como normalizador. Las barras de error indican \pm DS de dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada uno ($n=6$). A254nm: valor de absorbancia relativa a una longitud de onda de 254 nm.

Aun así, estos resultados representan un avance en el estudio de la función de miR528 en maíz y establecen la pauta para estudiar con mayor profundidad los diferentes niveles de regulación sobre otros mRNAs diana.

7.4 Los promotores de los genes *MIR528* de maíz albergan elementos regulatorios conservados involucrados en diversos procesos

En plantas, la contribución funcional de los miRNAs en el desarrollo y respuesta a condiciones de estrés se ha determinado principalmente por medio de los cambios en la acumulación de cada miRNA maduro. Sin embargo, el entendimiento de los mecanismos regulatorios sobre los genes *MIR* que promueven estos cambios es aún un campo pobremente explorado. Los genes *MIR528* no son la excepción, pues a la fecha sólo existe un reporte que aborda la regulación transcripcional de Osa-*MIR528* mediada por el FT SPL9 durante floración en arroz (Yang *et al.*, 2019).

Luego de haber evaluado los cambios en los niveles de miR528, algunos de sus transcritos diana y la implicación de esta regulación en ES de maíz, se procedió a identificar elementos regulatorios presentes en los promotores de los genes zma-*MIR528a/b* que podrían estar involucrados en dirigir la expresión de este miRNA bajo ciertas condiciones de desarrollo. La primera aproximación fue la descripción de los promotores de los genes *MIR528* de maíz a través de la identificación del sitio de inicio de la transcripción (TSS). Lo anterior se logró aprovechando la modificación 5'-CAP presente en los pri-miRNAs. A partir de RNA total tratado con enzima de *decapping* y ligando un adaptador a la posición +1 de los transcritos de la RNA Pol II, se identificó un producto de amplificación de alrededor de 300 nt, el cual no fue detectado en muestras de RNA sin tratamiento enzimático para remover el 5'-CAP (-TAP control, Figura 8A). La clonación y secuenciación de este producto permitió localizar el sitio +1 presente en el transcrito primario de *MIR528a*. La secuencia correspondiente a

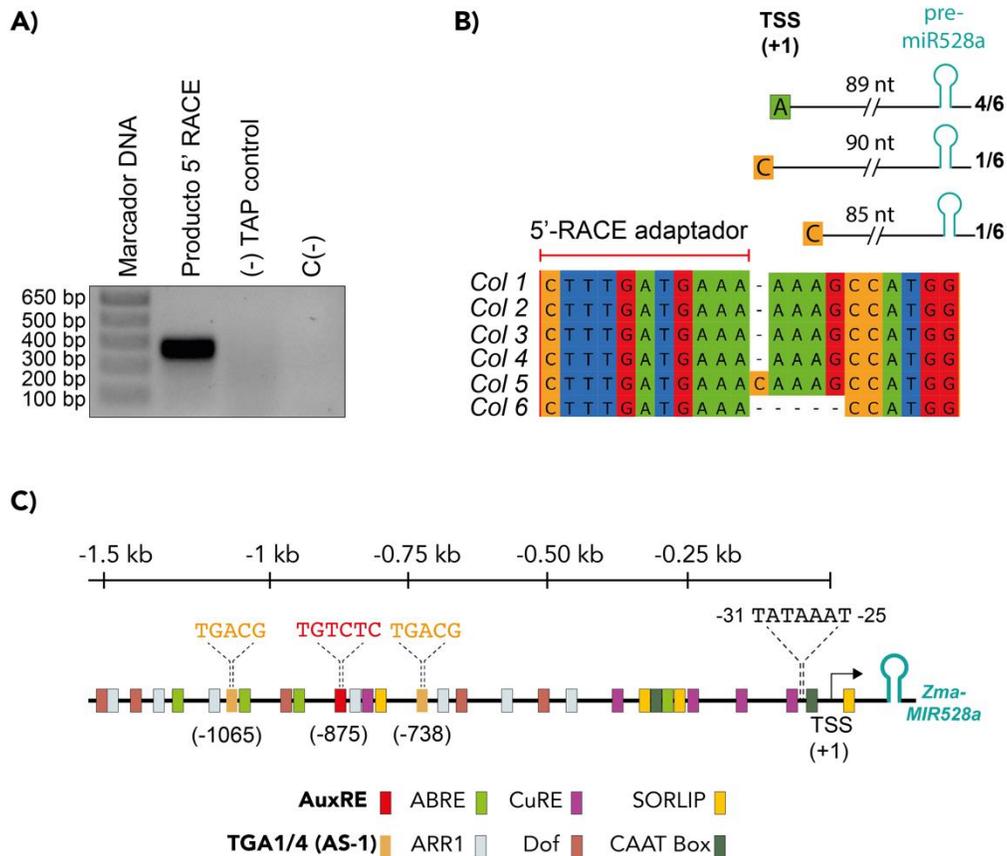


Figura 8.- identificación de elementos regulatorios presentes en el promotor de zma-MIR528a. (A) Producto de amplificación de PCR anidadas separado por electroforesis en gel. C(-): control negativo; -TAP control: muestra de RNA sin *decapping*. (B) Identidad de los distintos TSS (+1) identificados luego de la secuenciación de las clonas obtenidas de los experimentos de 5'-RACE. Se indica la distancia entre el TSS y el sitio de mapeo del precursor pre-miR528a; el número de la derecha indica la porción del total de clonas identificadas con el mismo extremo 5'. (C) La región de DNA genómico correspondiente a 1500 pb río arriba al TSS dominante de zma-MIR528a se analizó usando las bases de datos PlantCare y New PLACE. Las cajas de colores representan distintos motivos de unión para FTs predichos. La secuencia y posición de los elementos TGA1/4, AuxRE y TATA-box se resaltan.

pri-miR528b no fue detectada, a pesar de que el protocolo experimental se realizó usando oligonucleótidos capaces de reconocer secuencias en ambos transcritos. Las clonas secuenciadas mostraron la presencia de tres TSS alternativos; sin embargo, el TSS con mayor proporción de clonas correspondió a una adenina localizada a 89 nt río arriba del sitio de mapeo de pre-miR528a en el genoma de maíz (Figura 8B). Para corroborar esto, se analizaron bibliotecas públicas de CAGE-seq (*Cap Analysis Gene Expression and Deep Sequencing*) (Mejía-Guerra *et al.*, 2015) donde se identificaron lecturas que alineaban en la cercanía genómica de pre-miR528a, con la base y posición del TSS dominante idéntico al detectado por los experimentos de 5'-RACE (ver Anexos Figura S3).

Una vez definido el TSS, se analizaron las secuencias del promotor de *zma-MIR528a* y genes homólogos presentes en otras especies de plantas para identificar sitios de unión para FTs (TFBS) conservados entre ellas (ver Anexos Figura S4). Sólo 5 de las secuencias estudiadas (incluyendo a *zma-MIR528a*) presentaron cajas TATA a 25 pb del TSS. Contrario a esto, un mayor número de genes *MIR528* mostraron motivos regulatorios basales del tipo CATT. Además, varios genes *MIR528* presentaron motivos conservados para FTs involucrados con la respuesta a citocininas (ARR1; ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS), señalización por ABA (ABRE, *ABA Response Elements*), homeostasis de cobre (CuRE, *Copper Response Elements*) y con la formación y función de tejido vascular (Dof, *DNA-binding with one finger TF*) (Figura 8C, Anexos Figura S4).

De manera particular, el promotor *zma-MIR528a* presentó dos motivos de unión para los factores TGACG-BINDING FACTORS1/4 (TGA1/4, en las posiciones -1065 y -738 respecto al TSS), componentes regulatorios esenciales de la señalización por nitratos en *A. thaliana* y otras especies (Alvarez *et al.*, 2010; Canales *et al.*, 2017)(Figura 8C). Además, *zma-MIR528a* posee un motivo TGTCTC, definido como un elemento de respuesta a auxinas (AuxRE) que es reconocido por las proteínas AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) para activar o reprimir la transcripción de genes (Freire-Rios *et al.*, 2020)(Figura 8C). Ambas vías de señalización, nitratos y auxinas, se encuentran activas en los modelos experimentales que presentan incrementos importantes de *zma-mir528* maduro, como la inducción y proliferación de callos embriogénicos tras la exposición a auxinas del tejido de explante o en la susceptibilidad al acostamiento de plantas de maíz crecidas en medios ricos en nitratos (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Por tal motivo, se decidió explorar con mayor profundidad la contribución de los elementos TGA1/4 y AuxRE en la regulación de la expresión de *zma-MIR528a*.

7.5 La acumulación del precursor pre-miR528a disminuye a medida que ocurre la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz

La regulación transcripcional ejercida sobre los miRNAs puede estudiarse por medio de la cuantificación de sus precursores, ya que su acumulación estará determinada, en gran medida, por la tasa de transcripción del gen *MIR*. Estudios previos reportaron que *zma-miR528* maduro incrementa su expresión hacia el final del desarrollo embrionario, alcanzando el máximo nivel de acumulación durante la imbibición y germinación de semillas de maíz (D. Li *et al.*, 2013). Por lo tanto, se exploró si se podía detectar alguno de los precursores de *zma-miR528* a lo largo de las primeras 72h de imbibición de semillas de

maíz (Figura 9A). En este modelo, sólo se pudo detectar el transcrito correspondiente a pre-miR528a, a pesar de que se usaron oligonucleótidos que reconocen secuencias en ambos precursores (amplificación positiva con gDNA, 123 nt para *MIR528a* y 77 nt para *MIR528b*, Figura 9B). La cuantificación relativa por RT-qPCR arrojó que los niveles de pre-miR528a disminuyen de manera continua desde semilla seca hasta las primeras etapas de plántula (72 h, Figura 9C). Por su parte, miR528 maduro presentó la mayor acumulación hacia las primeras 24 h de imbibición para después reducir sus niveles (Figura 9D), similar a patrones de acumulación anteriormente reportados en este modelo de maíz (D. Li *et al.*, 2013). Considerando todo lo anterior, se seleccionaron las etapas de germinación y el

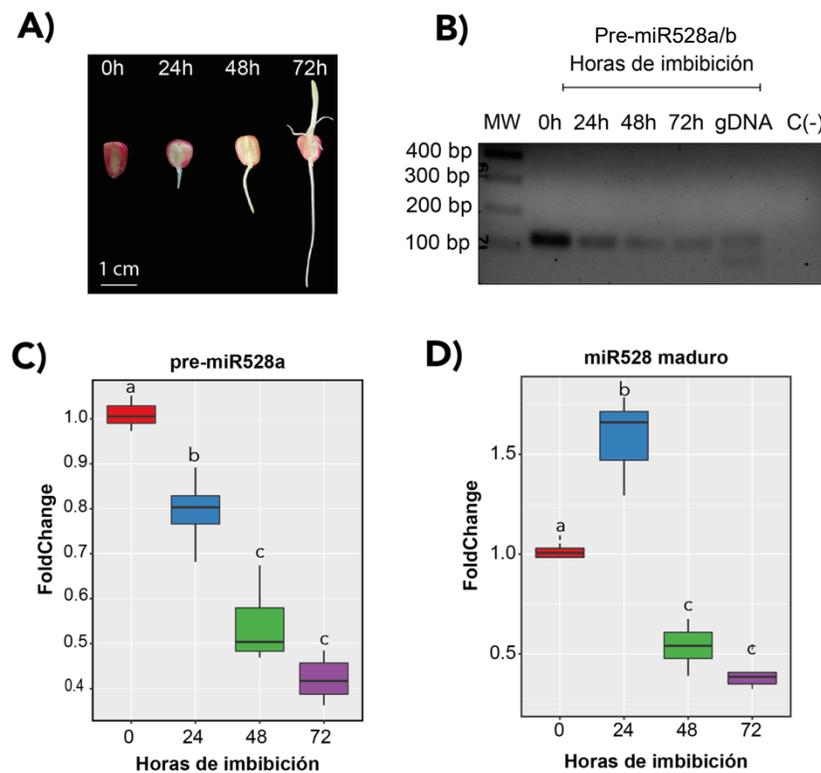


Figura 9.- Niveles de acumulación zma-miR528 y su precursor pre-miR528a durante la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz. (A) Semillas de maíz VS-535 se germinaron en una cámara vertical conforme a lo descrito por Crombez et al (2016) durante 24, 48 y 72 h en condiciones control. (B) Detección de pre-miR528a por RT-PCR punto final luego de 20 ciclos de amplificación. (C-D) Cuantificación de pre-miR528a y miR528 maduro en ejes embrionarios de maíz en las etapas indicadas durante la imbibición de semillas. El Fold change representa la abundancia relativa respecto al tejido de semilla seca (0h) normalizado por los controles internos 18S rRNA (precursor) o U6 snRNA (maduro). Las barras de error representan el error estándar del promedio de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una (n=9). Los datos se analizaron por medio de una ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey como prueba *post hoc*. Cajas que no comparten al menos una letra en común difieren de manera significativa ($p < 0.05$) entre sí.

establecimiento de plántulas de maíz como modelos de trabajo experimental para evaluar el efecto que presentaban distintos estímulos externos sobre la expresión de *zma-MIR528a* por medio de la cuantificación de su precursor.

7.6 Tratamientos con nitratos y auxinas exógenas desencadenan la expresión de *zma-MIR528a*

Una vez determinado el modelo experimental, se probaron protocolos para aplicar distintos tratamientos durante la germinación y primeras etapas de crecimiento de plántulas de maíz (Figura 10A). Atendiendo a reportes previos (Sun *et al.*, 2018), se probó el efecto de la aplicación de nitratos en el medio de imbibición. A nivel fisiológico, la incubación en medios adicionados con KNO_3 30 mM incrementó la tasa de germinación (panel superior Figura 10B y Anexos Figura S5A). Para comprobar que el estímulo con nitratos se percibió correctamente, se prolongó la incubación bajo estas mismas condiciones lo que ocasionó un crecimiento acelerado de las plántulas tratadas en comparación con el grupo control (ver Anexos Figura S5B); similar con lo reportado por (Osuna, Prieto and Aguilar, 2015) bajo este mismo estímulo.

Otro tratamiento analizado fue la presencia exógena de auxinas, componente principal de modelos donde *miR528* experimenta cambios significativos de acumulación (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). La adición de auxinas se realizó en muestras que fueron previamente incubadas con NPA (inhibidor del transporte de auxinas, tratamiento por 72 h) y que posteriormente recibieron un pulso por hasta 6 h con la auxina NAA (Figura 10A). Las plántulas tratadas con auxinas no mostraron diferencias claras en el desarrollo al compararlas con el grupo tratado con NPA; no obstante, ambos grupos presentaron una disminución en la longitud de la raíz principal en comparación con el grupo incubado en H_2O (panel inferior Figura 10B y Anexos Figura S5C). Un mayor tiempo de incubación con NAA (48 h) ocasionó la aparición de múltiples raíces laterales a partir de la raíz principal (ver Anexos Figura S5D), resultado análogo a lo reportado por (Crombez *et al.*, 2016), lo que permitió corroborar que se estaban percibiendo las auxinas añadidas en la solución de crecimiento.

En concordancia con resultados previos (Sun *et al.*, 2018), los niveles del precursor y la molécula madura de *miR528* incrementaron significativamente en muestras tratadas con

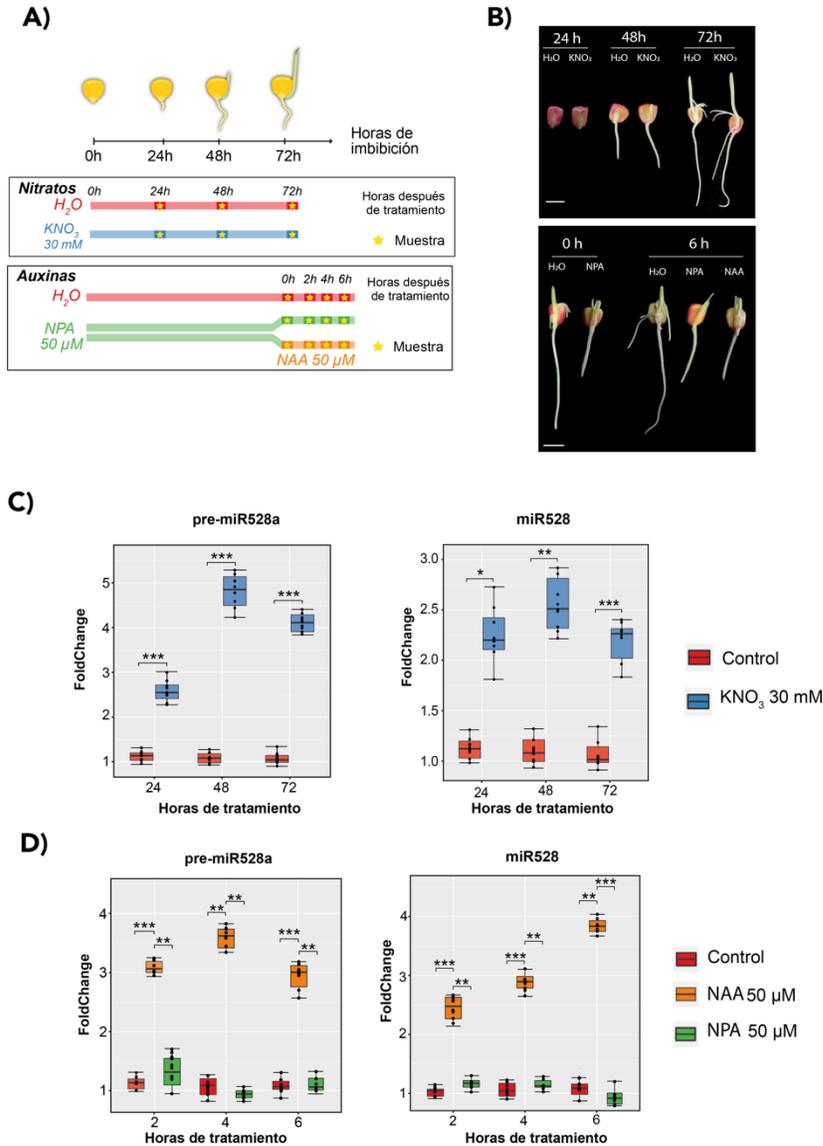


Figura 10.- Tratamientos exógenos con nitratos y auxinas incrementan los niveles de pre-miR528a y miR528 maduro. (A) Diseño experimental para la aplicación de tratamientos con nitratos y auxinas durante la germinación vertical de semillas de maíz. (B) Imágenes representativas de semillas y plántulas de maíz a las 24, 48 y 72 h de tratamiento con nitratos (panel superior) y 6 h después del pulso con auxinas (panel inferior) (C) Cuantificación del precursor y miRNA maduro en semillas tratadas con nitratos. (D) Cuantificación del precursor y miRNA maduro en semillas tratadas con auxinas. Los niveles de expresión fueron normalizados usando la acumulación de los transcritos 18sRNA (precursor) o U6 snRNA (miRNA maduro). Las barras de error representan el error estándar de al menos tres réplicas experimentales independientes con 3 réplicas técnicas cada una. Los datos se analizaron usando una ANOVA de dos vías y un análisis comparativo tipo T-Student a cada tiempo contra la muestra control * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

exceso de nitratos en comparación con la condición control después de 24, 48 y 72 h de

tratamiento (Figura 10C). Similar, el tratamiento con auxinas incrementó los niveles del precursor y miRNA maduro, con el máximo de acumulación luego de 4 y 6 h de tratamiento, respectivamente. Por su parte, las muestras que permanecieron en medios con el inhibidor NPA o en condición control (H₂O), no presentaron aumentos significativos para ninguno de los dos transcritos (Figura 10D).

Considerando lo anterior, se evaluó si estos incrementos se debían a eventos transcripcionales sobre el gen *zma-MIR528a* derivados de la aplicación de los estímulos. Para esto, se realizaron ensayos de bloqueo transcripcional al aplicar los estímulos antes mencionados en presencia de α -amanitina (un inhibidor de la RNA Pol-II). Como se puede observar, los tratamientos con nitratos y auxinas requieren de la actividad de la RNA Pol-II para ocasionar la acumulación de pre-miR528a y de miR528 maduro, ya que las muestras que recibieron los tratamientos en conjunto con el inhibidor, no exhibieron cambios significativos en la abundancia de estas moléculas (Figura 11). Por último, se analizó el efecto que tenían estos tratamientos en la abundancia de algunos mRNAs blancos de miR528 anteriormente validados (ver Anexo Figura S6). En general, la abundancia de *MATE/BIGE1*, *bHLH152* y *SOD1a* disminuyó significativamente en las muestras que recibieron alguno de los dos tratamientos en comparación de las muestras control caracterizadas por una baja acumulación de miR528 (Figura 10C-D). En conjunto, estos resultados indican que la presencia exógena de nitratos o auxinas promueve la transcripción de *zma-MIR528a*, lo que deriva en el aumento de los niveles del precursor y miR528 maduro y ocasiona una disminución en la acumulación de los transcritos blancos del miRNA durante la germinación y primeras etapas post-germinativas de maíz bajo estas condiciones.

7.7 El promotor de *zma-MIR528a* alberga elementos regulatorios responsables de la inducción transcripcional en respuesta a nitratos y auxinas

Dado que los tratamientos con nitratos y auxinas promueven la expresión de *zma-MIR528a*, se procedió a identificar las regiones dentro del promotor responsables de esta inducción. A partir del análisis de sitios de unión para FTs en el promotor de *zma-MIR528a* y la función reportada para estos factores, se contempló la presencia de los motivos TGA1/4, AuxRE y

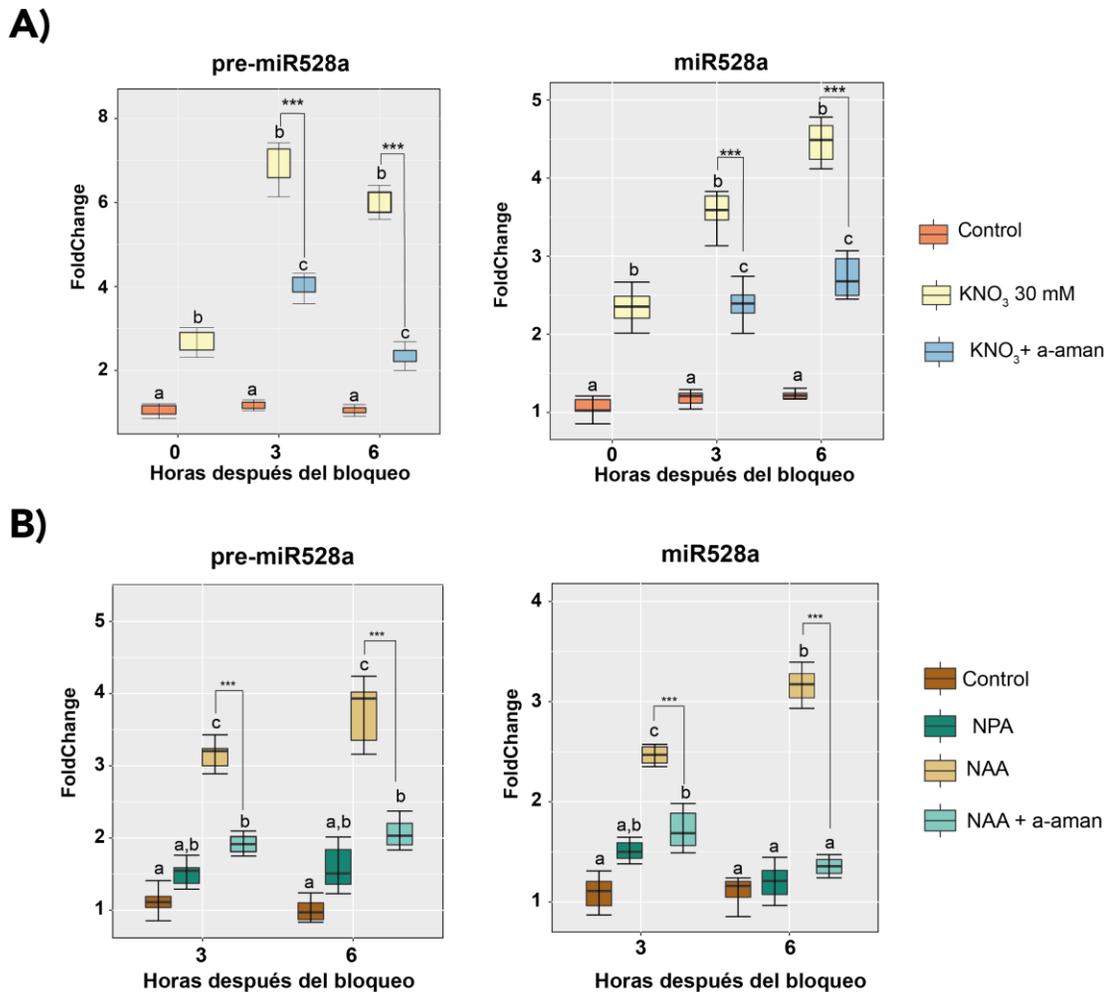


Figura 11.- Los tratamientos con nitratos y auxinas desencadenan la transcripción de *zma-MIR528a*. Niveles relativos de expresión del precursor (panel izquierdo) y miR528 maduro (panel derecho) en muestras tratadas con KNO₃ 30 mM (A) o NAA 50 μM (B) en presencia de α-amanitina (25 μM). Los niveles de expresión fueron normalizados usando la acumulación de los transcritos 18sRNA (precursor) o U6 snRNA (miRNA maduro). Las barras de error representan el error estándar de al menos tres réplicas experimentales independientes con 3 réplicas técnicas cada una. La diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos se representa por letras distintas (p ≤ 0.05) luego de un análisis ANOVA de 1 vía y prueba Tukey post hoc comparando las muestras a cada tiempo.

la caja TATA para diseñar construcciones con deleciones consecutivas del extremo 5' del promotor de *MIR528a* fusionado a los genes reporteros *eGFP* y *GUS* en el vector pBGWFS7.0 (Figura 12A). Estas construcciones se usaron en ensayos de expresión transitoria en protoplastos de maíz. En estos ensayos, el plásmido con la secuencia completa (pMIR_1, -1180 pb del TSS) exhibió actividad para ambos genes reporteros (Figura 12B y 12C), lo que demuestra que el promotor de *zma-MIR528a* es una secuencia integral y funcional. Sin embargo, a medida que esta secuencia se acortaba, la actividad transcripcional de las construcciones disminuyó. La deleción de 814 nt (pMIR_3) y 1157 nt

(pMIR_4) previos al TSS, redujo significativamente la actividad del promotor en protoplastos transfectados incubados en condiciones control (Figura 12B, 12C y Anexos Figura S7). Después de esto, se examinó la actividad de cada versión del promotor cuando los protoplastos transfectados eran incubados con nitratos (10 mM KNO₃) y auxinas (1 μM NAA). La actividad del reportero GUS incrementó en muestras de protoplastos transfectados con las versiones pMIR_1 y pMIR_2 bajo el estímulo con nitratos (Figura 13A). Por el contrario, sólo el promotor completo (pMIR_1) mostró una inducción significativa en respuesta al tratamiento con NAA (Figura 13B). Cuando los tratamientos se usaron en combinación, la actividad transcripcional de los constructos pMIR_1 y pMIR_2

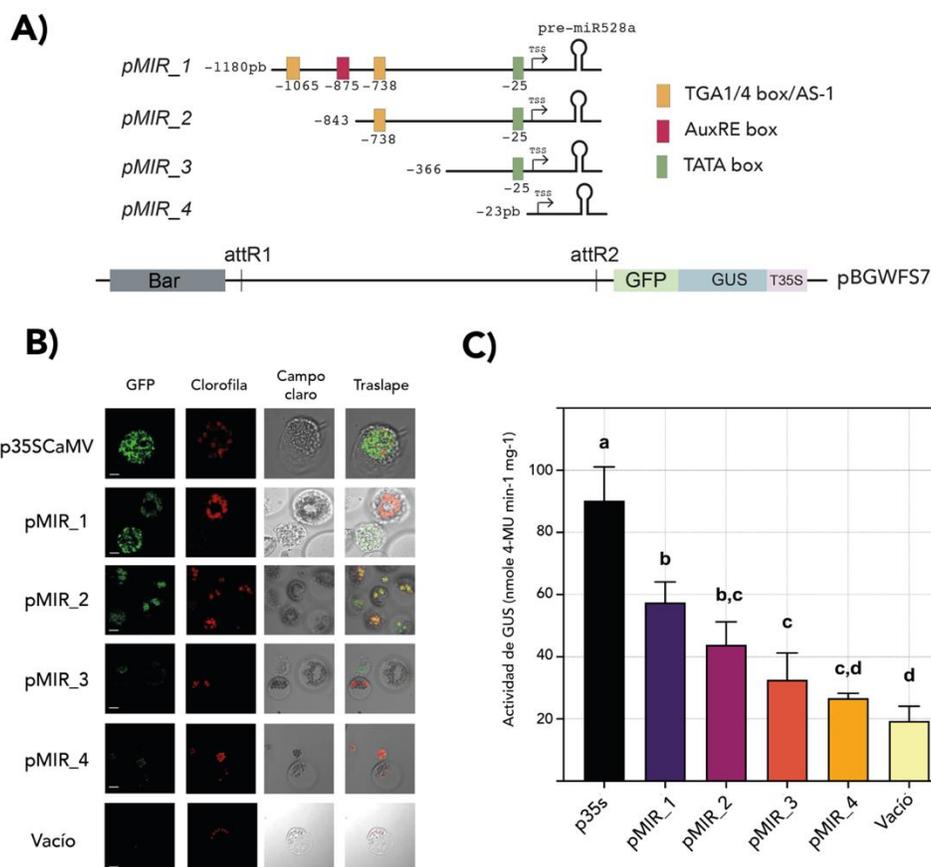


Figura 12.- El promotor de zma-MIR528a dirige una expresión basal de los genes reporteros en protoplastos de maíz. (A) La secuencia completa (pMIR_1) y fragmentos de promotor de zma-MIR528a (pMIR_2-4) se introdujeron en el vector pBGWFS7.0 río arriba de los reporteros eGFP/GUS **(B)** Expresión transitoria de eGFP bajo el control de las distintas versiones del promotor de zma-MIR528a (pMIR_1-4) bajo condiciones control de incubación. Barra escala: 20 μm. **(C)** Determinación fluorométrica de la actividad GUS en extractos proteicos de protoplastos transfectados con los constructos generados. El vector vacío y el promotor 35S CaMV se emplearon como controles negativo y positivo, respectivamente. La actividad GUS para cada construcción se normalizó por la cantidad de plásmido transfectado (ver anexos Figura S7). Las barras representan el promedio de tres réplicas biológicas independientes con tres réplicas técnicas cada una. Los datos se analizaron con una ANOVA de 1 vía y una prueba post hoc Tukey de comparación

aumentó de manera significativa, llegando a ser mayor a la presentada con los estímulos por separado (Figura 13C). Considerando que en la construcción pMIR_2 están ausentes la caja TGA1/4 distal (posición -1065 al TSS) y el elemento AuxRE (posición -875 al TSS), pero se mantiene el motivo TGA1/4 proximal (posición -738), este motivo podría resultar suficiente para inducir la expresión de *zma-MIR528a* en respuesta a altas concentraciones de nitratos.

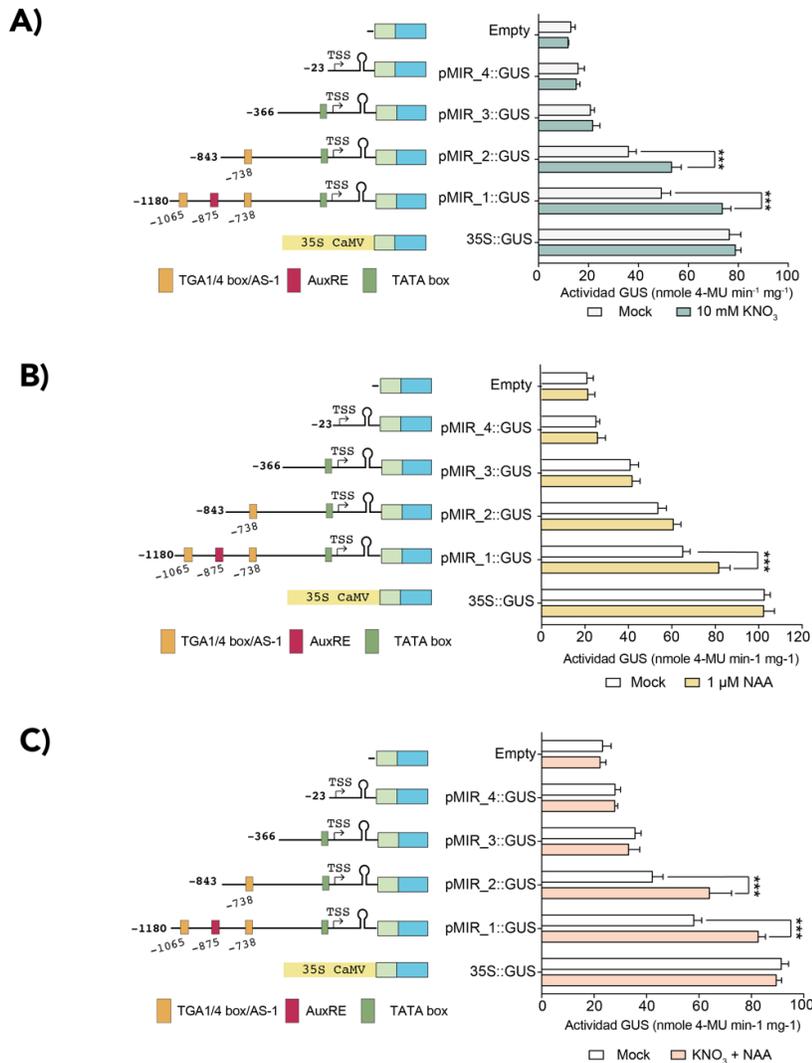


Figura 13.- El promotor de *zma-MIR528a* contiene regiones con elementos regulatorios involucrados en la respuesta a estímulos. Cuantificación fluorométrica de la actividad de GUS de extractos proteicos de protoplastos transfectedados con las versiones del promotor de *zma-MIR528a* incubados con nitratos (A), auxinas (B) o ambos estímulos (C). La construcción con el promotor 35SCaMV fue empleada como control positivo y el vector vacío como control negativo. Los datos representan el promedio ± SD de tres réplicas biológicas independientes con tres réplicas técnicas cada una. Los datos se analizaron usando una ANOVA de dos vías y una prueba post hoc Tukey para determinar las diferencias significativas al comparar el *mock* vs tratamiento para cada construcción (***P<0.001). las cajas verde y azul representan los genes reporteros *eGFP* y *GUS*, respectivamente.

7.8 Los TFBS presentes en el promotor de zma-*MIR528a* contribuyen de manera diferencial a la inducción por nitratos y auxinas

A pesar de que los ensayos de expresión transitoria revelaron que el promotor de zma-*MIR528a* contiene elementos regulatorios involucrados con la activación transcripcional en respuesta a nitratos y auxinas, la contribución de cada una de las cajas TGA1/4 y del elemento AuxRE no estaba completamente elucidada debido a que las deleciones podrían estar eliminando la contribución de otros elementos de respuesta dentro del promotor de *MIR528a*. Por tal motivo, se evaluó el efecto de eliminar cada sitio de unión en el contexto del promotor completo. A diferencia de las deleciones consecutivas, la eliminación de los TFBS no afectó la transcripción basal de los genes reporteros (condición *mock*, Figura 14), evidenciando la contribución de otros elementos regulatorios en la expresión basal del promotor que se perdían en la construcción pMIR_2, lo que explicaría la menor actividad basal de esta construcción en comparación a la presentada por pMIR_1.

Notablemente, la inducción transcripcional con el promotor sin alterar (construcción WT, pMIR_1) fue mayor con los estímulos combinados que con los tratamientos individuales (Figura 14). Por su parte, el promotor sin el sitio TGA1/4 distal (posición -1065, construcción Δ TGA1) mantuvo una inducción significativa bajo los tratamientos con nitratos, auxinas y su combinación. En cambio, la remoción del sitio TGA1/4 proximal (posición -738, construcción Δ TGA2) suprimió la inducción transcripcional del promotor por cualquiera de los tratamientos individuales; únicamente se observó una ligera pero significativa inducción con la acción combinada de nitratos y auxinas (Figura 14). Estos resultados sugieren que el sitio TGA1/4 proximal al TSS desempeña un papel esencial en la activación transcripcional de zma-*MIR528a* por nitratos y auxinas.

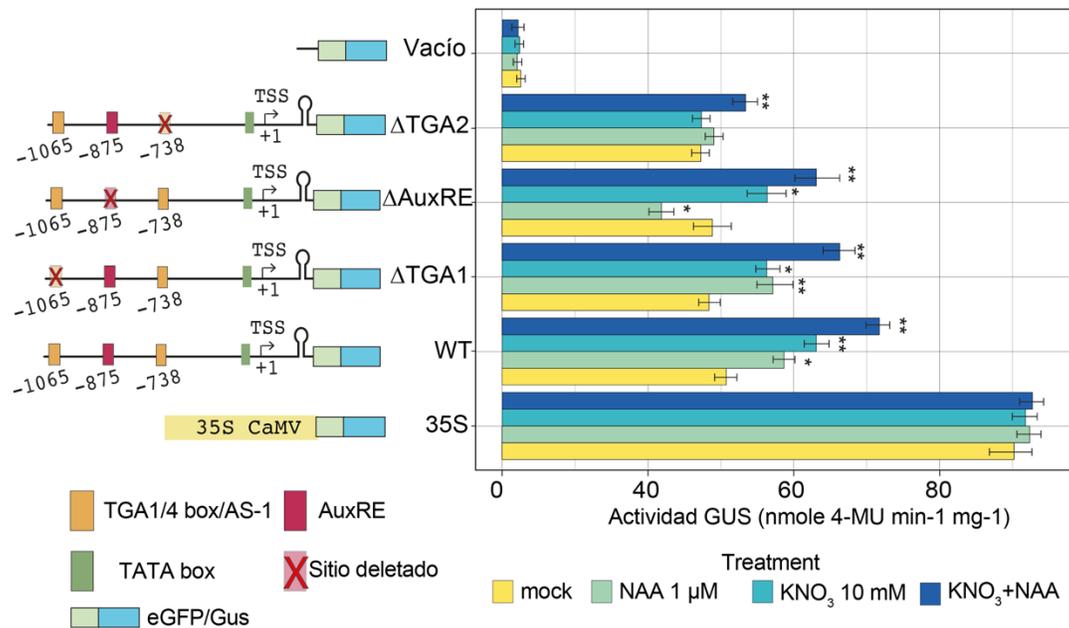


Figura 14.- Los TFBS presentes en el promotor de *zma-MIR528a* contribuyen de manera diferencial con la inducción por nitratos y auxinas. Las construcciones del promotor WT y mutantes con deleciones para cada uno de los sitios TGA1/4 (Δ TGA1 y Δ TGA2) o del sitio AuxRE (Δ AuxRE) se transflectaron en protoplastos de maíz y se incubaron en condiciones control (*mock*) o con tratamientos con nitratos, auxinas y la combinación de ambos estímulos. La caja removida en cada construcción se representa con el sitio tachado. Los valores representan la actividad de GUS determinada por fluorimetría. La construcción con el promotor 35SCaMV fue empleada como control positivo y el vector vacío como control negativo. Los datos representan el promedio \pm SD de tres réplicas biológicas independientes con tres réplicas técnicas cada una. Los datos se analizaron usando una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey para determinar las diferencias significativas para cada construcción al comparar la condición control vs cada tratamiento. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Finalmente, la mutación de la secuencia TGTCTC (AuxRE en la posición -875, construcción Δ AuxRE) suprimió únicamente la inducción por NAA, demostrando que este motivo es esencial para la correcta activación del promotor *zma-MIR528a* por medio de la vía de señalización por auxinas (Figura 14).

7.9 El factor Zm-ARF34 de maíz activa el promotor de *zma-MIR528a* por medio de los sitios AuxRE y TGA1/4 proximal

Para corroborar que el elemento AuxRE funciona como sitio de reconocimiento de la maquinaria de respuesta a auxinas, se realizaron experimentos donde se transflectaron protoplastos de maíz con el promotor pMIR_1 o alguna de las construcciones mutantes (Plásmidos reporteros, Figura 15A) junto con el plásmido efector que contenía el marco de

lectura para ARF34 (Zm00001eb031700, Figura 15A); un ARF activador de la transcripción ampliamente estudiado en maíz (Galli *et al.*, 2018). La inducción de actividad de los genes reporteros se detectó en protoplastos co-transfectados con el plásmido efector y el reportero pMIR_1 (Figura 15B y Anexos Figura S8). Esta respuesta del promotor de zma-MIR528a parece ser particular para ARF34, puesto que experimentos análogos realizados con

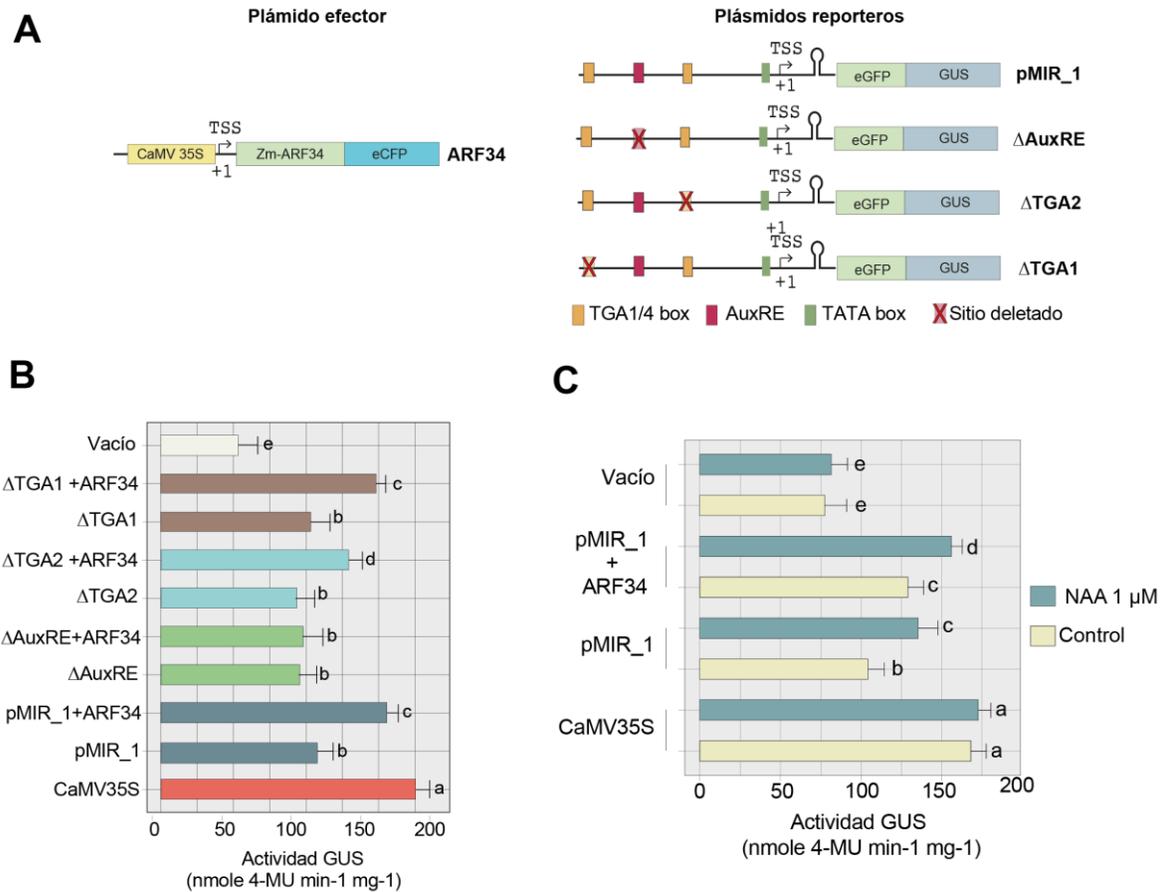


Figura 15.- La activación del promotor de zma-MIR528a por Zm-ARF34. (A) Representación esquemática de las construcciones usadas como reporteras y efectoras para ensayos de transactivación en protoplastos de maíz. El plásmido efector contiene el ORF de ARF34 bajo el promotor 35S CaMV para una expresión constitutiva. (B) Efecto de la sobreexpresión de Zm-ARF34 en la actividad del promotor de zma-MIR528a. Los plásmidos reporteros fueron co-transfectados junto con el efector en protoplastos de maíz que se incubaron en condiciones control. (C) Efecto de la presencia de auxinas y ARF34 en la actividad del promotor de zma-MIR528a. La combinación de plásmidos pMIR_1 + Zm-ARF34 se introdujo en protoplastos que fueron incubados en ausencia (control) o presencia de NAA 1 μ M. Los valores representan la actividad de GUS determinada por fluorometría. La construcción con el promotor 35SCaMV fue empleada como control positivo y el vector vacío como control negativo. Los datos representan el promedio \pm SD de tres réplicas biológicas independientes con tres réplicas técnicas cada una. Los datos se analizaron usando ANOVA de una y dos vías y una prueba post hoc Tukey para determinar las diferencias significativas entre cada co-transfección y tratamiento. Las barras que no comparten al menos una misma letra difieren significativamente ($p < 0.05$) entre sí.

pMIR_1 y otro ARF de maíz del tipo activador como ARF4 (Zm00001eb067270, (Galli *et al.*, 2018) no mostraron cambios significativos de la actividad del reportero eGFP (ver Anexos Figura S8). Por otro lado, no se observó una inducción de la actividad transcripcional de GUS cuando se evaluó la cotransfección de ARF34 junto con la construcción Δ AuxRE (combinación Δ AuxRE+ARF34), en comparación con la transfección sin el plásmido efector (Δ AuxRE, Figura 15B). En contraste, la actividad del reportero sí incrementó cuando el efector ARF34 se transfectó junto con los plásmidos Δ TGA1 y Δ TGA2. Sin embargo, la inducción observada fue menor para la combinación Δ TGA2+ARF34 en comparación con la actividad detectada para las combinaciones Δ TGA1+ARF34 y pMIR_1+ARF34 (Figura 15B). Esto indica que tanto el elemento AuxRE como el sitio TGA1/4 proximal cooperan para lograr una inducción total del promotor de *zma-MIR528a* a través de la señalización por auxinas. Por último, la inducción detectada con pMIR_1+ARF34 incrementó cuando los protoplastos co-transfectados fueron incubados en presencia de NAA 1 μ M (Figura 15C), lo que podría implicar a otros componentes de la vía de respuesta a auxinas, adicionales a ARF34, en la regulación de la expresión de *zma-MIR528a* bajo el estímulo. En conjunto, estos resultados indican que el sitio AuxRE y el elemento TGA1/4 proximal participan en la regulación por ARF34, y posiblemente otros componentes de la vía de auxinas, para promover la expresión de *MIR528a* en respuesta a incrementos en los niveles de auxinas.

8.- DISCUSIÓN

Diversos avances en la biología molecular han permitido demostrar el papel de los miRNAs en la regulación post-transcripcional de múltiples procesos metabólicos esenciales para las plantas. La manipulación de la expresión y función de estos riboreguladores es una estrategia potencial que permitirá el mejoramiento de distintas especies de plantas de gran interés agronómico (Tang and Chu, 2017). La identificación de un miRNA representa un paso crítico para poder elucidar su función. En contraste con la abundante cantidad de familias de miRNAs en genomas de animales, las plantas poseen un menor número de familias de miRNAs, pero estas familias están integradas por una mayor cantidad de miembros. Los miembros de una misma familia de miRNAs en plantas suelen ser muy similares, lo que sugiere una reciente expansión por duplicación genética en tándem y por segmentos. Sin embargo, estos miembros pueden diferir significativamente en longitud y localización genómica (Zhao *et al.*, 2021). En la versión más reciente de miRBase (v 22.1), se han identificado alrededor de 470 loci de miRNAs agrupados en 194 familias en maíz, los cuales desempeñan una función crítica durante el crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés biótico y abiótico (Yu, Jia and Chen, 2017). De este total, 95 miRNAs pertenecen a 20 familias conservadas entre varias especies, de entre las cuales destacan miR156a, miR160a, miR164e, miR164a, miR167d, miR168, miR169a, miR393a, miR397b, miR408b, entre otros (Djami-Tchatchou *et al.*, 2017). Algo similar ocurre con miR528, el cual es un miRNA conservado en monocotiledóneas y que presenta dos genes *MIR* en maíz: *zma-MIR528a* y *zma-MIR528b*. Al comparar ambos precursores originados de estos genes de maíz, resulta interesante notar que pre-miR528a tiene una mayor longitud y adopta un plegamiento que permite la formación de asas terminales ramificadas, flexibles y de tamaños que varían entre 15 y 30 nt. Estas propiedades estructurales han sido reportadas como uno de los factores que facilitan el procesamiento preferencial para liberar al miRNA maduro (Zhang *et al.*, 2015). Por su parte, pre-miR528b presenta un plegamiento más rígido, con un asa terminal de tan solo 5 nt. Estas diferencias estructurales resultan interesantes, pues se ha reportado que asas terminales flexibles y largas (>10 nt) son importantes para un adecuado procesamiento por la maquinaria de biogénesis, pues al disminuir la longitud del asa terminal de los precursores, se disminuye la eficiencia del procesamiento del precursor y la acumulación del miRNA maduro (Zhang *et al.*, 2015). A pesar de estas diferencias, el grado de conservación a nivel de secuencia para ambos

precursores es elevado, ya que ambos generan el mismo miRNA maduro 5p y 3p. Similar a esto, precursores de miR528 presentes en otras especies de plantas producen el mismo miRNA-5p y presentan plegamiento similar con los precursores de maíz. Interesantemente, se ha reportado que las características estructurales y de secuencia presentes en el precursor de miR528 en arroz (*osa-premiR528*), como el porcentaje de CG y desapareamientos en la región del dúplex miR528-5p/miR528-3p, son indispensables para un correcto procesamiento y acumulación del miRNA efector (Narjala *et al.*, 2020). Estas características también están presentes en los precursores de miR528 de maíz y otras monocotiledóneas, sugiriendo que podrían estar involucradas en establecer un patrón de procesamiento y biogénesis para este miRNA semejante entre especies. A pesar de su elevada conservación, este miRNA ha sido descrito para diversos procesos entre especies, lo que denota que su función está determinada por otros factores adicionales a la biogénesis propia del miRNA (Sun *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2019). Así mismo, resultaría interesante buscar equivalentes funcionales para miR528 en sistemas donde este miRNA no está presente, como *Arabidopsis* o *Nicotiana*.

El papel de distintos miRNAs en casi todos los procesos en plantas se ha abordado al comparar los patrones de expresión del miRNA maduro y sus transcritos diana. De manera particular, *zma-miR528* posee un amplio rango de dianas potenciales, pero solo unos cuantos han sido explorados a detalle. Una parte de este trabajo se enfocó en validar y evaluar experimentalmente la correspondencia entre *zma-miR528-5p* y sus transcritos diana en un modelo que presentara cambios en la acumulación de este miRNA y con ello poder explicar sus posibles funciones en este y otros procesos. Atendiendo a estudios previos que demuestran que miR528 se acumula de manera diferencial en distintas etapas del proceso de embriogénesis somática de maíz (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018), se exploró el patrón de acumulación para miR528 durante las etapas de inducción y proliferación de callos. miR528 mostró una acumulación similar con los de otros miRNAs en este mismo modelo. Al igual que *zma-miR528*, miRNAs como *zma-miR167*, *zma-miR398*, *zma-miR827* y *ath-miR164a-c* y *ath-miR398a-c* se acumulan a medida que progresa la inducción de la ES de maíz y *A. thaliana*, respectivamente (Szyrajew *et al.*, 2017; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). Además, el análisis de los niveles de *zma-miR528* permitió determinar que este miRNA se encuentra altamente acumulado en muestras de callos embriogénico bien establecidos y en proliferación, semejante con reportes donde se determinó que miR528 es uno de los miRNAs que más

se acumula en callos embriogénicos de maíz subcultivados por tiempos prolongados (10 meses), lo que refleja su probable contribución al mantenimiento del estado proliferativo de callos embriogénicos de maíz (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018; Juárez-González *et al.*, 2019). La acumulación de zma-miR528 podría fungir como mecanismo modulador de la respuesta a estrés oxidativo (su clasificación funcional inicial en plantas), ya que el tejido de explante debe experimentar una oxidación controlada previo al establecimiento de callos (Garrocho-Villegas, Jesús-Olivera and Quintanar, 2012; Juárez-González *et al.*, 2019). La inducción de la embriogénesis somática es un proceso complejo determinado por diversos factores. La homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) es fundamental para una correcta progresión de la ES en múltiples especies (Prudente, de Souza and Paiva, 2020). Altas concentraciones de ROS resultan tóxicas y dañinas para los tejidos de explante durante la inducción. Sin embargo, en apropiadas concentraciones, las especies ROS actúan como moléculas señalizadoras que regulan las respuestas fisiológicas y de desarrollo necesarias para la ES (Elhiti and Stasolla, 2015; Wu *et al.*, 2017). El aumento de miR528 durante la progresión de la ES podría estar participando en la modulación de los niveles de ROS, para ocasionar un ambiente propicio para la proliferación de callos embriogénicos de maíz.

Igualmente, se determinaron los perfiles de acumulación de mRNAs diana validados para miR528 y se analizó su correspondencia con los niveles del miRNA. *MATE/BIGE1*, *bHLH152* y *SOD1a* exhibieron una correlación inversa junto con niveles detectables de producto de degradación mediado por miR528, lo que sugiere que zma-miR528 regula a estos blancos usando como mecanismo principal el corte endonucleolítico. De manera particular, *MATE/BIGE1* codifica para un transportador conservado en plantas involucrado en el desarrollo de órganos laterales y la determinación del tamaño del embrión. Mutantes por pérdida de función de este gen ocasionan incrementos en el tamaño del embrión, adelanto en el tiempo de floración y mayor producción de órganos laterales (Suzuki *et al.*, 2015). Además, se ha descrito que *MATE/BIGE1* promueve la transición a la fase de expansión de células escutelares durante la maduración del embrión, región de donde se originan los callos embriogénicos durante la inducción en la ES de maíz (López-Ruiz *et al.*, 2019); por lo que la regulación de *MATE/BIGE1* por miR528 podría contribuir en la ES al delimitar el desarrollo de esta región. Además, su regulación por zma-miR528 podría estimular la acumulación de auxinas en callos embriogénicos en proliferación, ya que se ha visto que la sobreexpresión de homólogos de *BIGE1* origina una menor acumulación y

percepción de esta fitohormona en *A. thaliana*, puesto que funciona como un sistema de secreción y modulación de los niveles de auxinas (Li *et al.*, 2014).

Por su parte, la regulación negativa de zma-miR528 sobre el transcrito que codifica para la proteína bHLH152 podría implicar una interrupción del programa de maduración embrionario necesario para que ocurra la desdiferenciación celular del explante y su compromiso con la vía de ES, ya que plantas de Arabidopsis que presentan una expresión sostenida del homólogo de bHLH152 (*ROOTHAIRLESS LIKE-3(LRL3)/bHLH82*) carecen por completo de respuesta embriogénica y desarrollo de callo (Wang *et al.*, 2020).

Como ya se mencionó, el estrés oxidativo en el tejido de explante funciona como segundo mensajero para poner en marcha el programa de expresión genética necesario para la ES. A la par, la acumulación de compuestos que inducen estrés oxidativo incrementa los niveles de auxinas endógenas durante la ES en muchas especies de plantas. Por lo tanto, un gradiente particular de estrés oxidativo se debe de establecer al modular la actividad de enzimas antioxidantes (Prudente, de Souza and Paiva, 2020). En este contexto, la regulación negativa de *SOD1a* por zma-miR528 podría contribuir con la ES al formar sitios de acumulación de H₂O₂ para encender programas expresión particulares acompañados de un aumento local en los niveles de auxinas requeridos para la adquisición de la competencia embriogénica durante la proliferación de callos de maíz.

PLC1 fue un transcrito que presentó patrones de acumulación distintos a los demás blancos estudiados. En RNA total no mostró tendencia de algún tipo de correlación negativa con los niveles del miRNA maduro, pero fue el único blanco que presentó una distribución inversa con miR528 en perfiles polirribosomales, por lo que se hipotetiza que este transcrito podría ser regulado preferencialmente por inhibición de la traducción. Aún más, se pudo detectar producto de degradación por corte endonucleolítico para *PLC1*, lo que sugiere que la escisión del blanco ocurre aun cuando zma-miR528 es reclutado a polisomas. Independiente del mecanismo, la regulación de *PLC1* por miR528 también podría verse implicada con el establecimiento del gradiente oxidativo durante la ES, pues las proteínas plastocianinas funcionan como capacitores rédox que aceptan, almacenan y donan electrones en las reacciones catalizadas por las enzimas antioxidantes (Gideon, Nirusimhan and Manoj, 2022).

Al igual que zma-miR528, otros miRNAs funcionales han sido localizados en fracciones de polisomas evidenciando su capacidad de ejercer la inhibición traduccional en plantas (S. Li

et al., 2013; Iwakawa and Tomari, 2015); sin embargo, el comportamiento de sus transcritos diana en esas fracciones no ha sido estudiado. Varios estudios han propuesto que la degradación de mRNAs guiada por miRNAs y su arresto traduccional pueden ser procesos acoplados en la célula y que la selección del mecanismo a ejercer podría depender de factores como la localización subcelular del complejo miRNA-mRNA diana, el reclutamiento del miRNA a polisomas o el correcto ensamblaje de los complejos de corte en agregados polisomales para promover el corte de los transcritos (Yu, Jia and Chen, 2017). Esta capacidad de regulación dual se ha demostrado para miR398, el cual media el corte endonucleolítico y la inhibición traduccional de *COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (CCS1)*, transcrito que codifica una proteína esencial para la maduración de enzimas que usan Cu/Zn como cofactores en Arabidopsis (Beauclair, Yu and Bouché, 2010). Además, estudios recientes han demostrado que el corte de mRNA dirigido por miRNAs sucede en polisomas unidos a membrana del retículo endoplásmico (MBPs) con ayuda de las proteínas ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) y KATANINA1 (KTN1), lo que sugiere que tanto la inhibición traduccional como el procesamiento por corte suceden en el mismo dominio subcelular (Yang *et al.*, 2021). En general, esta primera aproximación a la funcionalidad de miR528 en el modelo de embriogénesis somática permite establecer nuevas interrogantes para profundizar en el estudio de miRNAs de plantas, como el determinar cuáles son los factores que influyen en la selección del mecanismo de regulación sobre los transcritos diana o cuál sería la implicación de la ausencia de este miRNA en el progreso de la ES y otros procesos de desarrollo (Figura 16).

Por otro lado, y a pesar de que una gran cantidad de miRNAs han sido descritos en diversas especies de plantas, la caracterización de sus regiones promotoras y elementos de regulación involucrados en la expresión genética sigue siendo una incógnita para muchos genes *MIR*. La mayor parte de los datos disponibles actualmente son predicciones computacionales y ensayos genómicos que han tratado de acotar estas regiones (Megraw *et al.*, 2009; Zhao and Li, 2013; Zhao *et al.*, 2021). El primer paso para identificar el promotor basal de cualquier gen es la determinación de las coordenadas genómicas para el sitio de inicio de la transcripción (TSS)(Mejia-Guerra *et al.*, 2018). Teniendo esto en cuenta, se realizó la validación experimental del TSS para el gen *zma-MIR528a* localizado a 89 nt del sitio anotado como el precursor pre-miR528a. Distancias comparables se han reportado

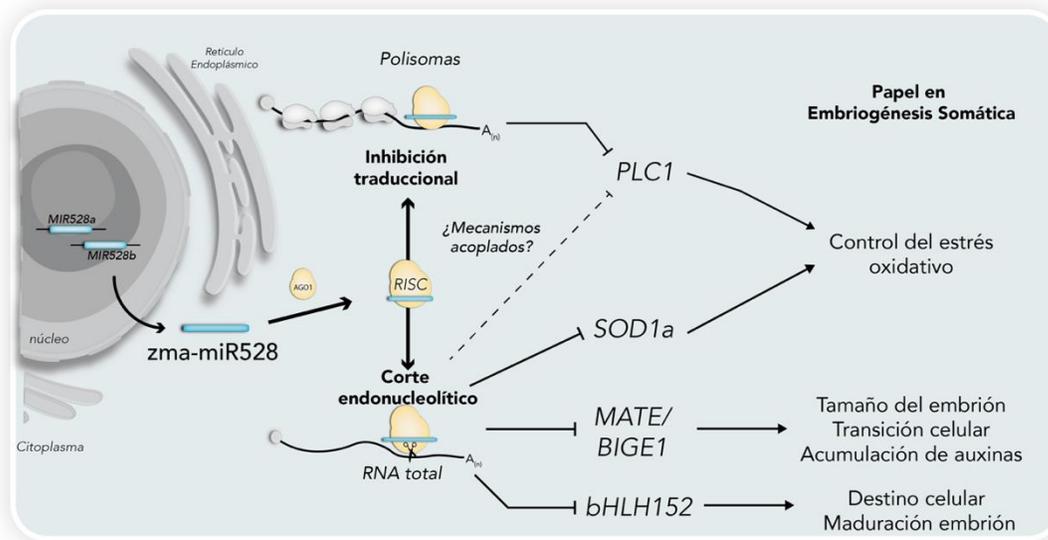


Figura 16.- Propuesta de modelo de los mecanismos de regulación ejercidos por zma-miR528 sobre sus blancos. (A) El miRNA maduro se origina de cualquiera de los dos genes presentes en maíz (*MIR528a* o *MIR528b*). El complejo RISC se puede localizar en el citoplasma o en polisomas unidos a membrana, donde zma-miR528 reconoce a sus blancos y promueve el corte endonucleolítico o la represión traduccional. La selección del mecanismo de inhibición podría estar determinado por parámetros cinéticos del reconocimiento miRNA-blanco o por la presencia/ausencia de ciertas proteínas accesorias en los complejos RISC. Sin embargo, ambos mecanismos generarían productos de degradación mediados por miRNAs, como lo sugerido en por (Yang et al. 2021).

para genes *MIR* en *A. thaliana* y arroz, ya que la mayoría de los miRNAs presenta menos de 200 nt entre el TSS y la región correspondiente al precursor (Zhao and Li, 2013). Se identificaron sitios TSS adicionales cercanos al TSS predominante, semejante con resultados obtenidos por análisis masivos (Mejía-Guerra *et al.*, 2015). La presencia de múltiples TSS es una característica común para muchos genes en diversas especies (Jores *et al.*, 2021). Además, múltiples TSS contiguos en una región estrecha se relacionan con una expresión tejido-específica, lo que explicaría los patrones de expresión particulares reportados para miR528 delimitada al tejido vascular de hojas y tallos y en embriones inmaduros de maíz (Li *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018). En contra parte, genes con expresión constitutiva presentan múltiples TSS dispersos los cuales emplean una batería diversa de elementos regulatorios para con ello poder presentar una expresión ubicua (Mejia-Guerra *et al.*, 2018).

La determinación del TSS permitió delimitar la región promotora de zma-*MIR528a* y analizar la presencia de elementos regulatorios en *cis* (CREs). La identificación de motivos de unión para factores de transcripción (TFBS) dentro de la región reguladora de un gen, provee una aproximación a los procesos metabólicos y fisiológicos en los que se encuentra implicado

el producto de este gen. Este mismo criterio es aplicable para los miRNAs. A pesar de la menor identidad entre promotores de genes *MIR*, el escrutinio de estas regiones ha permitido identificar elementos regulatorios conservados que contribuyen a establecer patrones de expresión similares entre especies (Porto *et al.*, 2014). Por ejemplo, algunos miembros de la familia de genes *MIR166* en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Physcomitrella patens* comparten elementos regulatorios como las cajas G-Box (de respuesta a luz), GARE box (involucradas con la señalización de giberilinas) y motivos ARE (de respuesta a sales) (Barik *et al.*, 2014). En estas especies, la mayoría de los miRNAs que se producen de los loci *MIR166*, presentan acumulación diferencial en respuesta a estrés por salinidad o a luz (Yadav *et al.*, 2021).

Con el análisis de los promotores de *MIR528a/b* de maíz, se observó que ambos poseen elementos regulatorios de expresión similares a los presentes en otros genes *MIR* de arroz (Meng *et al.*, 2009) y *A. thaliana* (Megraw *et al.*, 2006). Particularmente, sólo *zma-MIR528a* presentó una caja TATA en la cercanía del TSS. De manera individual, la caja TATA presente en *MIR528a* contribuye con una expresión basal mínima, pues la construcción que sólo contenía este elemento presentó una baja actividad transcripcional. Sin embargo, este elemento trabaja en conjunto con otras secuencias reguladoras para guiar el correcto ensamblaje de la maquinaria transcripcional. Se ha reportado que la presencia de este elemento afecta la fuerza del promotor e incrementa la expresión de genes endógenos y sintéticos en plantas (Jores *et al.*, 2021). Esta diferencia entre genes *MIR528* podría contribuir a establecer tasas de expresión distintas entre ambos genes en maíz y explicar la ausencia del precursor pre-miR528b. Además, esta diferencia podría restringir la expresión de *MIR528b* a otros tejidos o etapas de desarrollo particulares distintas a las evaluadas en este trabajo; no obstante, múltiples datos de expresión masiva solo han podido detectar lecturas de la región correspondiente a *MIR528a* (Stelpflug *et al.*, 2016; Woodhouse *et al.*, 2022). Por otro lado, se identificaron varios motivos CAAT en regiones cercanas al TSS y a lo largo de ambos genes *MIR528* de maíz. Los motivos CAAT son elementos conservados en muchas especies que están implicados en determinar la eficiencia transcripcional de los genes que regulan pues son sitios de unión para las proteínas NUCLEAR FACTOR-Y (NFY) (Porto *et al.*, 2014). Efectivamente, se ha propuesto que la inserción de múltiples cajas CAAT es el mecanismo por el cual las regiones promotoras adquirieron su función reguladora sobre algunos genes *MIR*, como *MIR1444*, *MIR058* y *MIR12112* en *Vitis vinífera* (Lu, 2019); por lo que no es extraño que estos

elementos de regulación basal también se hayan identificado en genes homólogos de *MIR528*, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel conservado en la expresión de *MIR528* en monocotiledóneas.

De los CREs conservados entre homólogos de *MIR528*, la sobre-representación de motivos como los elementos de respuesta a cobre (CuRE, GTAC) resulta llamativo, pues estas secuencias se encuentran presentes en genes que se regulan en respuesta a cambios en los niveles de cobre. Bajos niveles de este metal desencadenan la expresión de diversos miRNAs (conocidos como Cu-miRNAs) como miR937, miR398, miR408 y miR857 en *A. thaliana*, los cuales promueven la degradación de sus dianas (mRNAs codificantes de enzimas que usan Cu como cofactor) para redireccionar el uso de las reservas de cobre para procesos esenciales (Perea-García *et al.*, 2021). Como ya se mencionó, entre las dianas de miR528 conservadas en maíz y otras monocotiledóneas están las cupredoxinas, por lo que la gran cantidad de motivos CuRE identificados en la mayoría de los promotores *MIR528*, sugiere que la expresión de estos miRNAs podría estar determinada por la homeóstasis de cobre en diversas especies. Además, la presencia de estos sitios CuRE en *zma-MIR528a* resulta interesante, ya que estos motivos han sido caracterizados también como sitios de unión de factores del tipo SQUAMOSA BINDING PROTEIN LIKE (SPL). De manera particular, el factor Os-SPL9 regula positivamente la transcripción de *osa-MIR528* por medio de estos elementos en plantas de arroz (Yang *et al.*, 2019); mecanismo que podría estar conservado también en maíz.

Otro de los motivos conservados entre genes *MIR528* fueron los sitios TGA1/4 (AS-1, TGACG) implicados en múltiples vías como la percepción de nitratos, la señalización por jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), estrés biótico y la respuesta a ROS (Alvarez *et al.*, 2014; Canales *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2018). Estas rutas de señalización están involucradas en modelos experimentales en los que se han observado cambios en la acumulación de miR528 en arroz, maíz, caña de azúcar y orquídea (Zanca *et al.*, 2010; An, Hsiao and Chan, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). En contraste, una menor proporción de los promotores analizados exhibieron elementos AuxRE, lo que sugiere que la respuesta de *MIR528* a auxinas ocurre en un menor número de especies. A excepción de *MIR528* en plátano (*M. acuminata*), los promotores que presentaron sitios AuxRE carecen del módulo bipartito canónico presente en genes de respuesta temprana a auxinas, incluido *zma-MIR528a* (Boer *et al.*, 2020). No obstante, la presencia de un solo elemento de respuesta en la región reguladora de algunos genes *MIR* puede ser suficiente para promover cambios

en su expresión, pues se demostró que el promotor del gen *MIR390* en *Arabidopsis thaliana* presenta una región con una sola copia del elemento AuxRE y ésta es suficiente para ser reconocida por el factor ARF5 y modificar la expresión del gen *MIR* (Dastidar *et al.*, 2019).

Apoyando la funcionalidad de estos elementos de respuesta, se encontró que la incubación de semillas de maíz VS-535 en medios con alta concentración de nitratos y suplementados con auxinas exógenas incrementaba significativamente los niveles del precursor originado del gen *zma-MIR528a* y el miRNA maduro en etapas germinativas y post-germinativas. Similar a estos resultados, reportes previos han indicado que la acumulación de miR528 maduro se ve modificada a la baja cuando las plantas de maíz se desarrollan en condiciones deficientes en nitrógeno (Trevisan *et al.*, 2012), mientras que plantas en medios ricos en nitrógeno acumulan una mayor cantidad de este miRNA (Sun *et al.*, 2018). Además, el exceso de nitratos y una alta concentración de auxinas son dos condiciones comúnmente utilizadas durante las etapas de inducción y proliferación en la ES de maíz, lo que podría explicar los altos niveles de miR528 detectados en tejidos desdiferenciados en este y otros trabajos (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). Una respuesta similar a ambos estímulos ha sido descrita para otros genes *MIR* en distintas especies de plantas y modelos de estudio. Por ejemplo, tratamientos con la auxina IAA promueven la transcripción del gen *MIR393b* en la parte aérea de plántulas de *Arabidopsis thaliana* y brotes de manzana (Chen *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2021). Además, miR393 incrementa su acumulación en plantas de *Arabidopsis* tratadas por dos horas con una solución 5 mM de nitrato de potasio ocasionando la reducción de sus transcritos blancos (Vidal, Álvarez and Gutiérrez, 2014; Luo *et al.*, 2022). De manera interesante, durante las primeras etapas de la ES en *A. thaliana* ocurre un aumento en la expresión de los genes *MIR393a* y *MIR393b*, necesario para una correcta percepción de auxinas y control de la transición embriogénica de las células somáticas presentes en el explante de inicio (Wójcik and Gaj, 2016), similar a la respuesta de miR528 en la ES de maíz.

Los experimentos de expresión transitoria en protoplastos con el promotor de *zma-MIR528a* confirmaron la funcionalidad de los elementos de respuesta a nitratos y auxinas dentro de esta región. Por un lado, los sitios TGA1/4 identificados en *MIR528a* presentaron una distribución similar a la arquitectura que poseen otros genes cuya transcripción se activa en respuesta a nitratos en *Arabidopsis* (Alvarez *et al.*, 2014). Sin embargo, la contribución hacia la expresión de *MIR528a* por parte de cada uno fue distinta, pues sólo la remoción del sitio TGA1/4 más cercano al TSS (Δ TGA2) afectó de manera significativa la inducción

por los estímulos externos. Esto es congruente con estudios de dinámica transcripcional que reportan que la mayoría de los genes de plantas que incrementan su expresión en respuesta a nitratos están enriquecidos en sitios TGA1/4 preferencialmente en la región de los 500 pb próximos al TSS (Brooks *et al.*, 2019). De igual forma, los resultados obtenidos sugieren que el sitio TGA1/4 proximal de *zma-MIR528a* también participa en la inducción del promotor por auxinas, ya que no se observó inducción de la actividad de la construcción Δ TGA2 en presencia de NAA, a pesar de que el elemento AuxRE se encontraba presente. Esto resulta interesante pues múltiples FTs, adicionales a los factores TGA, son capaces de unirse a motivos que contienen la secuencia TGACG y dirigir la expresión de genes en respuesta a auxinas sintéticas, metil-jasmonatos y H₂O₂; por lo que se ha propuesto a estos elementos regulatorios como puentes moleculares entre distintas rutas de señalización (Gatz, 2012; Weiste and Dröge-Laser, 2014; Noshi *et al.*, 2016). También, los factores TGA son capaces de establecer interacciones con otros FTs para modificar la expresión genética. Por ejemplo, se ha reportado que TGA1 interactúa con el factor WRKY50 para potenciar la transcripción del gen *NON-EXPRESSER OF PATHOGEN-RELATED (NPR1)* en respuesta a salicilatos *Arabidopsis thaliana* (Hussain *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha descrito que los motivos TGACG se encuentran frecuentemente en promotores de genes inducidos por auxinas y desarrollan una función de moduladores cuantitativos de la transcripción en respuestas a la hormona. Este mecanismo ha sido ampliamente descrito para el gen *GRETCHEN HAGEN 3 (GH3)*, el cual responde a auxinas a través de la interacción de factores ARFs con los elementos AuxRE distribuidos a lo largo de su promotor. Esta respuesta se potencializa cuando los factores TGA (bZIP) reconocen los motivos TGACG cercanos y promueven el reclutamiento de complejos epigenéticos que acetilan la histona H3K27 y facilitan el acceso de la maquinaria transcripcional (Weiste and Dröge-Laser, 2014). En este contexto, proponemos que la presencia del sitio TGA proximal al TSS de *zma-MIR528a* podría estar involucrada en establecer una adecuada arquitectura del promotor y funcionar como andamio para que factores tipo TGA1/4 interactúen con otros FTs para promover la expresión de miR528 en respuesta a auxinas y nitratos.

Por lo general, los genes de respuesta temprana a auxinas descritos en *A. thaliana* poseen dos o más motivos canónicos TGTCTC adyacentes que permiten la dimerización de los factores ARFs y una adecuada activación de la transcripción (Pierre-Jerome *et al.*, 2016; Freire-Rios *et al.*, 2020). Sin embargo, cerca del 86% de los sitios de unión de ARFs presentes en maíz se componen por al menos dos motivos *core* TGTC separados por

espaciadores de longitud variable (Galli *et al.*, 2018). En este sentido, el promotor de *zma-MIR528a* posee un motivo *core* TGTC adicional localizado a 36 pb río abajo del elemento AuxRE estudiado en este trabajo, característica compartida con otros promotores de genes de maíz que también responden a estas hormonas (Galli *et al.*, 2018; Freire-Rios *et al.*, 2020). La longitud de la región espaciadora entre ambos motivos ha sido reportada como una de las determinantes de unión preferencial para algunos ARFs activadores (Galli *et al.*, 2018), lo que explicaría la inducción por ARF34 observada en los ensayos de transactivación en protoplastos. La alteración de esta arquitectura al remover el motivo AuxRE del promotor suprimió la señalización por auxinas sobre el promotor de *MIR528a*. Resultados similares han sido reportados para el gen *ath-MIR390a*, pues la delección de una porción del promotor de 36 pb donde se encontraba un motivo AuxRE invertido, eliminó la regulación directa por ARF5/MONOPTEROS y abolió la respuesta de este gen a auxinas (Dastidar *et al.*, 2019). En conjunto, estos resultados ratifican que el sitio AuxRE se requiere para la respuesta del promotor a auxinas al promover la unión de factores ARFs del tipo activador (clado A) preferentemente. Sin embargo, este elemento por sí solo no es suficiente para dirigir la inducción total a auxinas, ya que esta respuesta depende (en menor medida) de la presencia del elemento tipo TGA1/4 proximal al TSS del gen *zma-MIR528a*.

En general, el análisis del promotor de *zma-MIR528a* sugiere que las vías de señalización por nitratos y auxinas participan de manera interconectada para inducir la expresión de *MIR528a* (Figura 17). Esto puede deberse al traslape de la respuesta molecular de ambas rutas ampliamente estudiada en plantas. El exceso de nitratos desencadena una respuesta primaria a través de reguladores maestros como TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR y NIN-LIKE PROTEIN (TCP-NLP), que regulan de manera directa a FTs como TGA1/4 permitiendo que estos reconozcan sus sitios de unión en genes diana (Guan, 2017). Por otra parte, la percepción de auxinas exógenas enciende la señalización para activar a los ARFs para que estén disponibles para reconocer sus secuencias consenso (Figura 17). Ambas rutas convergen a través de los reguladores maestros TCP-NLP, también implicados en el control de la homeostasis y señalización de auxinas al regular la expresión del gen *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1)* involucrado con la biosíntesis de AIA (Guan *et al.*, 2017) y promover la acumulación de AFB3/TIR1, necesario para la degradación de represores Aux/IAA y liberación de los ARFs para que ejerzan su función (Figura 17). Por lo tanto, proponemos que la presencia simultánea de auxinas y nitratos promueve la expresión de

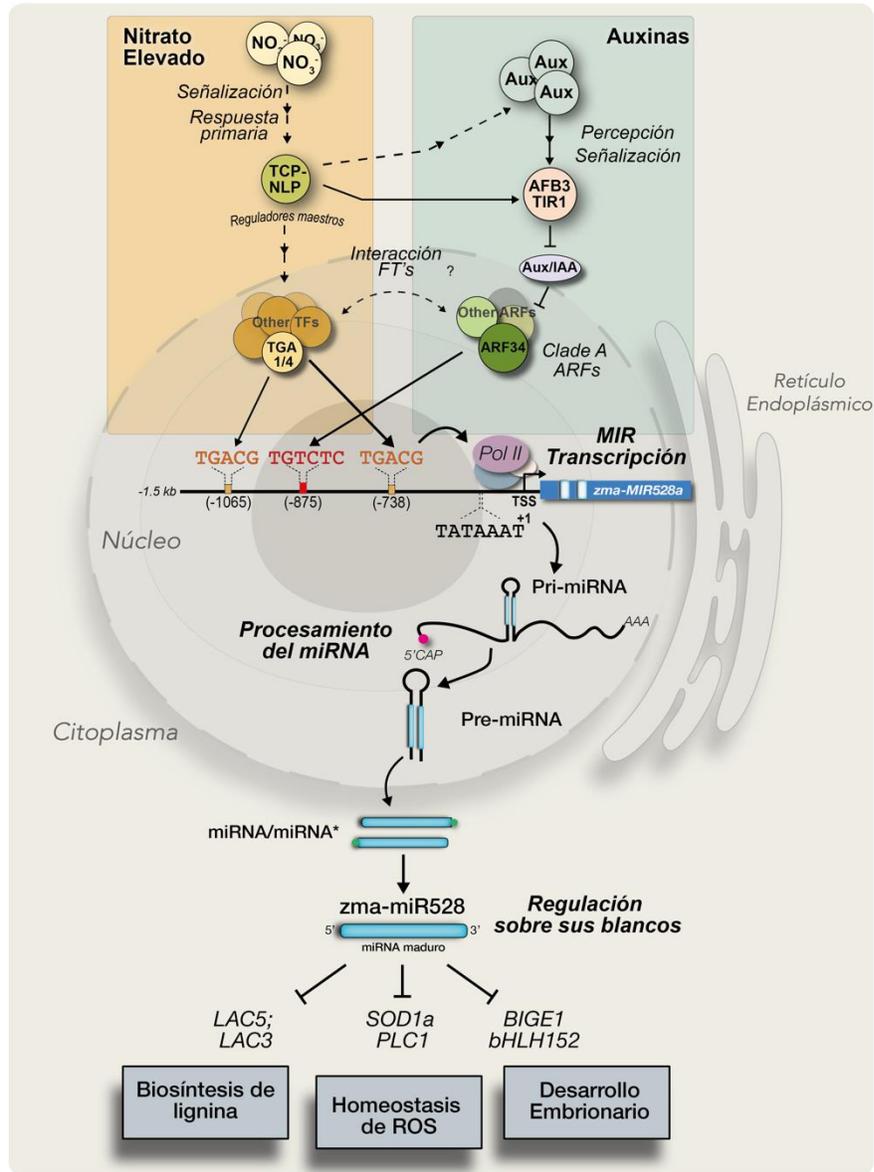


Figura 17.- Regulación Transcripcional sobre zma-MIR528a en respuesta a nitratos y auxinas. La presencia de una elevada concentración de nitratos desencadena una señalización primaria guiada por reguladores maestros (TCP/NLP) que activan distintos FTs. TGA1, TGA4 y otros FTs reconocen sus motivos de unión en el promotor de zma-MIR528a para promover su expresión en respuesta a este estímulo. Además, un incremento en la concentración de auxinas promueve la activación de AFB3/TIR1 para poliubiquitinar al represor Aux/IAA, liberando a los factores ARFs del tipo activador (como ARF34) para interactuar con el sitio AuxRE del promotor de MIR528a y estimular su transcripción. Ambas rutas de señalización coinciden por medio del nodo regulatorio TCP/NLP. La señalización por nitratos induce la biosíntesis de auxinas (línea punteada) a través de la expresión de genes involucrados con el metabolismo del triptófano para obtener IAA. De igual manera, estos reguladores maestros controlan la percepción de auxinas por medio de la activación del componente AFB3/TIR1 (línea sólida). Ambos estímulos promueven la expresión de zma-MIR528a de manera coordinada que deriva en un aumento de los niveles de miR528 maduro y la regulación a la baja de sus mRNAs blanco.

zma-MIR528a al localizar factores homólogos a TGA1/4 y ARFs activadores en la región promotora y con esto, propicia mayor acumulación de miR528 bajo estas condiciones.

Incrementos en los niveles de miR528 han sido reportados en otros modelos experimentales que emplean estos mismos estímulos, como el debilitamiento del tallo ocasionado por la sobreacumulación de miR528 en plantas de maíz ZCC01 creciendo en medios ricos en nitratos (Sun *et al.*, 2018) o durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos en la ES de maíz VS-535 (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). Sin embargo, no se descarta que rutas de regulación adicionales, como la respuesta a estrés oxidativo o estrés por frío, puedan controlar la expresión de *zma-MIR528a* al activar otros elementos regulatorios presentes en el promotor. De igual manera, los mecanismos de regulación sobre este gen podrían diferir entre especie, etapa de desarrollo o condición estudiada (Wu *et al.*, 2017).

9.- CONCLUSIONES

- miR528 es un miRNA altamente conservado entre monocotiledóneas a nivel de secuencia y plegamiento del precursor, factores que podrían determinar el procesamiento y acumulación de este miRNA entre especies.
- miR528 se encuentra altamente acumulado en callos embriogénicos de maíz en proliferación y durante las primeras horas de imbibición y germinación de semillas secas de maíz. En contraste, la acumulación de este miRNA disminuye durante la regeneración de plantas obtenidas por ES y en etapas post-germinativas durante el establecimiento de plántulas de maíz.
- miR528 se distribuye preferencialmente en fracciones polisomales en diversos tejidos de maíz, lo que sugiere que este miRNA es capaz de realizar inhibición de la traducción de alguno de sus blancos al co-localizarse en polisomas.
- Los blancos *MATE*, *bHLH152* y *SOD1a* son regulados preferencialmente por degradación del transcrito, presentan una correspondencia inversa con los niveles de miR528, mientras que *PLC* (cuya correspondencia inversa no fue aparente en RNA total) presenta una distribución inversa a la observada para miR528 en polirribosomas.
- El promotor de *zma-MIR528a* alberga diversos motivos de unión para FTs involucrados con diversas rutas de señalización como la respuesta a hormonas, nitratos, control de los niveles de cobre, respuesta estrés y desarrollo de tejido vascular, algunos de los cuales se conservan en los promotores de genes MIR528 de varias especies.
- La presencia de exceso de nitratos y aplicación exógena de auxinas desencadena eventos transcripcionales sobre el gen *zma-MIR528a* los cuales modifican los niveles del pre-miRNA y miRNA maduro durante las primeras etapas post-germinativas de maíz.
- La percepción del estímulo transcripcional sobre *MIR528a* ocasionado por la presencia de nitratos está guiada en gran medida por elementos regulatorios del tipo TGA1/4, principalmente por el sitio localizado a 738 pb del sitio de inicio de la transcripción.
- El elemento AuxRE canónico (TGTCTC) presente en la posición -875 pb en el promotor de *zma-MIR528a* es fundamental para la percepción de las señales

moleculares de la vía de respuestas a auxinas para promover la expresión de este gen bajo estímulos con estas hormonas.

10.- PERSPECTIVAS

El presente trabajo representa un abordaje a la función y regulación de miR528. Se requieren de estrategias experimentales adicionales para profundizar en estos aspectos como:

- ❖ Analizar la abundancia a nivel proteico de algunos de los transcritos diana de miR528 para corroborar el efecto en la regulación de la traducción por este miRNA
- ❖ Identificar a nivel de secuencia las regiones de complementariedad miR528-diana necesarias para desencadenar la regulación postranscripcional de sus blancos.
- ❖ Estudiar otros niveles de regulación sobre *MIR528a* como distintos mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional (como la deposición de las marcas H3K4me3 o H3K27me3) en etapas contrastantes de acumulación o bajo los estímulos evaluados.
- ❖ Analizar la interacción directa de factores transcripcionales a los elementos TGA1/4 y AuxRE del promotor de MIR528a de maíz.
- ❖ Evaluar el efecto del abatimiento o disminución de la expresión de miR528 durante la germinación de semillas y durante la inducción y proliferación de la ES de maíz.
- ❖ Evaluar la función de miR528 por medio de la expresión heteróloga en planta(s) dicotiledónea(s) (*Arabidopsis* o *Nicotiana*) para identificar equivalentes funcionales de este miRNA en estas especies.

11.- REFERENCIAS

Alejandri-Ramírez, N. D. *et al.* (2018) 'Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment', *Plant Physiology and Biochemistry*. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.11.013.

Alvarez, J. *et al.* (2010) 'TGA1 and TGA4 transcription factors control nitrate responses in Arabidopsis thaliana root organs.', in *21st International Conference on Arabidopsis research*.

Alvarez, J. M. *et al.* (2014) 'Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of Arabidopsis thaliana roots', *Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.12618.

An, F.-M., Hsiao, S.-R. and Chan, M.-T. (2011) 'Sequencing-based approaches reveal low ambient temperature-responsive and tissue-specific microRNAs in phalaenopsis orchid', *PLoS One*, 6(5), p. e18937.

Ariel, F. D. and Manavella, P. A. (2021) 'When junk DNA turns functional: transposon-derived non-coding RNAs in plants', *Journal of Experimental Botany*, 72(11), pp. 4132–4143. doi: 10.1093/jxb/erab073.

Asefpour Vakilian, K. (2020) 'Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses', *Scientific reports*, 10(1), pp. 1–10.

Aslam, M. *et al.* (2019) 'SWR1 Chromatin Remodeling Complex: A Key Transcriptional Regulator in Plants', *Cells*, 8(12), p. 1621. doi: 10.3390/cells8121621.

Axtell, M. J. and Meyers, B. C. (2018) 'Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data', *The Plant cell*. 2018/01/17, 30(2), pp. 272–284. doi: 10.1105/tpc.17.00851.

Baldrich, P., Hsing, Y.-I. C. and San Segundo, B. (2016) 'Genome-Wide Analysis of Polycistronic MicroRNAs in Cultivated and Wild Rice', *Genome biology and evolution*, 8(4), pp. 1104–1114. doi: 10.1093/gbe/evw062.

Barik, S. *et al.* (2014) 'Phylogenetic analysis reveals conservation and diversification of micro RNA166 genes among diverse plant species', *Genomics*. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.11.004.

Beauclair, L., Yu, A. and Bouché, N. (2010) 'microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 62(3), pp. 454–462.

Bieluszewski, T. *et al.* (2021) 'PRC2 activity, recruitment, and silencing: a comparative perspective', *Trends in Plant Science*, 26(11), pp. 1186–1198.

Bologna, N. G. *et al.* (2018) 'Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway', *Molecular Cell*, 69(4), pp. 709-719.e5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.007>.

Borges, F. and Martienssen, R. A. (2015) 'The expanding world of small RNAs in plants', *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(12), pp. 727–741.

Brooks, M. D. *et al.* (2019) 'Network Walking charts transcriptional dynamics of nitrogen signaling by integrating validated and predicted genome-wide interactions', *Nature Communications*, 10(1), p. 1569. doi: 10.1038/s41467-019-09522-1.

Canales, J. *et al.* (2017) 'Nitrate induction of root hair density is mediated by TGA1/TGA4 and CPC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.13656.

Chávez-Hernández, E. C. *et al.* (2015) 'Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis', *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2015.00555.

Chen, Z.-H. *et al.* (2011) 'Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein1 is involved in normal development in *Arabidopsis*', *Plant Molecular Biology*, 77(6), pp. 619–629. doi: 10.1007/s11103-011-9838-1.

Chow, C. N. *et al.* (2019) 'Plantpan3.0: A new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from chip-seq experiments in plants', *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gky1081.

Chuck, G., Cigan, A. M., *et al.* (2007) 'The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA', *Nature Genetics*, 39(4), pp. 544–549. doi: 10.1038/ng2001.

Chuck, G., Meeley, R., *et al.* (2007) 'The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*', *Nature Genetics*, 39(12), pp. 1517–1521. doi: 10.1038/ng.2007.20.

Civáň, P. and Švec, M. (2009) 'Genome-wide analysis of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) TATA box and Y Patch promoter elements', *Genome*. doi: 10.1139/G09-001.

Contreras-Paredes, C. A. *et al.* (2012) 'The Absence of Eukaryotic Initiation Factor eIF(iso)4E Affects the Systemic Spread of a Tobacco etch virus Isolate in *Arabidopsis thaliana*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(4), pp. 461–470. doi: 10.1094/MPMI-09-12-0225-R.

Crombez, H. *et al.* (2016) 'Lateral root inducible system in *Arabidopsis* and maize', *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (107), p. e53481.

Dalmadi, Á. *et al.* (2019) 'AGO-unbound cytosolic pool of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading', *Nucleic acids research*, 47(18), pp. 9803–9817. doi: 10.1093/nar/gkz690.

Das, R. and Mondal, S. K. (2021) 'Plant miRNAs: Biogenesis and its functional validation to combat drought stress with special focus on maize', *Plant Gene*, 27, p. 100294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100294>.

Dastidar, M. G. *et al.* (2019) 'ARF5/MONOPTEROS directly regulates miR390 expression in the *Arabidopsis thaliana* primary root meristem', *Plant Direct*, 3(2), p. e00116.

Djami-Tchatchou, A. T. *et al.* (2017) 'Functional Roles of microRNAs in Agronomically Important Plants-Potential as Targets for Crop Improvement and Protection', *Frontiers in plant science*, 8, p. 378. doi: 10.3389/fpls.2017.00378.

Dotto, M. *et al.* (2018) 'UV-B radiation delays flowering time through changes in the PRC2 complex activity and miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*', *Plant, Cell & Environment*, 41(6), pp. 1394–1406. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.13166>.

- Dresselhaus, T., Sprunck, S. and Wessel, G. M. (2016) 'Fertilization mechanisms in flowering plants', *Current Biology*, 26(3), pp. R125–R139.
- El-Esawi, M. A. (2016) 'Nonzygotic embryogenesis for plant development', *Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement*, pp. 583–598.
- Elhiti, M. and Stasolla, C. (2015) 'ROS signalling in plant embryogenesis', in *Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*. Springer, pp. 197–214.
- Erenstein, O. *et al.* (2022) 'Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications', *Food Security*, pp. 1–25.
- Fang, X. *et al.* (2015) 'Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. Nat Plants 1: 15075'.
- Ferreira, T. H. *et al.* (2012) 'microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum spp.*)'.
- Fletcher, J. C. (2018) 'The CLV-WUS Stem Cell Signaling Pathway: A Roadmap to Crop Yield Optimization', *Plants (Basel, Switzerland)*, 7(4), p. 87. doi: 10.3390/plants7040087.
- Da Fonseca, R. R. *et al.* (2015) 'The origin and evolution of maize in the Southwestern United States', *Nature plants*, 1(1), pp. 1–5.
- Freire-Rios, A. *et al.* (2020) 'Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), pp. 24557–24566.
- Galli, M. *et al.* (2018) 'The DNA binding landscape of the maize AUXIN RESPONSE FACTOR family', *Nature Communications*. doi: 10.1038/s41467-018-06977-6.
- Garrocho-Villegas, V., Jesús-Olivera, M. T. de and Quintanar, E. S. (2012) 'Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration', *Plant cell culture protocols*, pp. 173–182.
- Gatz, C. (2012) 'From Pioneers to Team Players: TGA Transcription Factors Provide a Molecular Link Between Different Stress Pathways', *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 26(2), pp. 151–159. doi: 10.1094/MPMI-04-12-0078-IA.
- Gideon, D. A., Nirusimhan, V. and Manoj, K. M. (2022) 'Are plastocyanin and ferredoxin specific electron carriers or generic redox capacitors? Classical and murburn perspectives on two photosynthetic proteins', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(5), pp. 1995–2009.
- Gonzalo, L. *et al.* (2022) 'R-loops at microRNA encoding loci promote co-transcriptional processing of pri-miRNAs in plants', *Nature plants*. 2022/04/21, 8(4), pp. 402–418. doi: 10.1038/s41477-022-01125-x.
- Gramzow, L. and Theißen, G. (2019) 'Plant miRNA conservation and evolution', *Plant MicroRNAs*, pp. 41–50.
- Guan, P. (2017) 'Dancing with hormones: a current perspective of nitrate signaling and regulation in Arabidopsis', *Frontiers in plant science*, 8, p. 1697.
- Guan, P. *et al.* (2017) 'Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America. 2017/02/15, 114(9), pp. 2419–2424. doi: 10.1073/pnas.1615676114.
- Haberle, V. and Stark, A. (2018) 'Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation', *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(10), pp. 621–637.
- Hanifah, F. H. A. *et al.* (2018) 'GCTTCA as a novel motif for regulating mesocarp-specific expression of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) stearyl-ACP desaturase gene', *Plant cell reports*, 37(8), pp. 1127–1143.
- Hoang, X. L. T. *et al.* (2017) 'Transcription Factors and Their Roles in Signal Transduction in Plants under Abiotic Stresses', *Current genomics*, 18(6), pp. 483–497. doi: 10.2174/1389202918666170227150057.
- Hu, Q.-Q. *et al.* (2021) 'Role of Auxin and Nitrate Signaling in the Development of Root System Architecture', *Frontiers in plant science*, 12, p. 690363. doi: 10.3389/fpls.2021.690363.
- Hussain, H. and Chong, N. F.-M. (2016) 'Combined overlap extension PCR method for improved site directed mutagenesis', *BioMed research international*, 2016.
- Hussain, R. M. F. *et al.* (2018) 'Arabidopsis WRKY50 and TGA transcription factors synergistically activate expression of PR1', *Frontiers in plant science*, 9, p. 930.
- Islam, W. *et al.* (2022) 'Plant responses to metals stress: microRNAs in focus', *Environmental Science and Pollution Research*, pp. 1–16.
- Iwakawa, H. and Tomari, Y. (2015) 'The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression', *Trends in cell biology*, 25(11), pp. 651–665.
- Jiao, Y. *et al.* (2011) 'Identification of novel maize miRNAs by measuring the precision of precursor processing', *BMC Plant Biology*, 11(1), p. 141. doi: 10.1186/1471-2229-11-141.
- Jodder, J. *et al.* (2018) 'Distinct transcriptional and processing regulations control miR167a level in tomato during stress', *RNA biology*. 2017/11/13, 15(1), pp. 130–143. doi: 10.1080/15476286.2017.1391438.
- Jones-Rhoades, M. W. (2012) 'Conservation and divergence in plant microRNAs', *Plant Molecular Biology*, 80(1), pp. 3–16. doi: 10.1007/s11103-011-9829-2.
- Jores, T. *et al.* (2021) 'Synthetic promoter designs enabled by a comprehensive analysis of plant core promoters', *Nature Plants*, 7(6), pp. 842–855.
- Juárez-González, V. T. *et al.* (2019) 'The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis', *Scientific reports*, 9(1), pp. 1–14.
- Kramer, M. F. (2011) 'Stem-loop RT-qPCR for miRNAs', *Current protocols in molecular biology*, 95(1), pp. 10–15.
- Kumar, V., Thakur, J. K. and Prasad, M. (2021) 'Histone acetylation dynamics regulating plant development and stress responses', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(10), pp. 4467–4486.
- Laitinen, R. A. E. and Nikoloski, Z. (2019) 'Genetic basis of plasticity in plants', *Journal of Experimental Botany*, 70(3), pp. 739–745.
- Lanctot, A. and Nemhauser, J. L. (2020) 'It's Morphine' time: how multiple signals converge on ARF

- transcription factors to direct development', *Current Opinion in Plant Biology*. doi: 10.1016/j.pbi.2020.04.008.
- Li, D. *et al.* (2013) 'Deep sequencing of maize small RNAs reveals a diverse set of microRNA in dry and imbibed seeds', *PLoS one*, 8(1), p. e55107.
- Li, D. *et al.* (2016) 'Genome-wide identification and characterization of microRNAs in developing grains of *Zea mays* L.', *PLoS one*, 11(4), p. e0153168.
- Li, J. *et al.* (2013) 'A modified CTAB protocol for plant DNA extraction', *Chinese Bulletin of Botany*, 48(1), p. 72.
- Li, M. and Yu, B. (2021) 'Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis', *RNA Biology*, 18(12), pp. 2087–2096. doi: 10.1080/15476286.2021.1899491.
- Li, R. *et al.* (2014) 'ADP1 affects plant architecture by regulating local auxin biosynthesis', *PLoS genetics*, 10(1), p. e1003954.
- Li, S. *et al.* (2013) 'MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*', *Cell*, 153(3), pp. 562–574.
- Li, X.-Y. *et al.* (2019) 'Regulation of flowering time via miR172-mediated APETALA2-like expression in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*)', *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 20(4), pp. 322–331. doi: 10.1631/jzus.B1800003.
- Liu, F. *et al.* (2018) 'Capping-RACE: a simple, accurate, and sensitive 5' RACE method for use in prokaryotes', *Nucleic acids research*, 46(21), pp. e129–e129.
- Liu, H. *et al.* (2017) 'Integrative analysis of DNA methylation, mRNAs, and small RNAs during maize embryo dedifferentiation', *BMC Plant Biology*. doi: 10.1186/s12870-017-1055-x.
- Liu, Q. *et al.* (2015) 'Involvement of miR528 in the Regulation of Arsenite Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04191.
- Liu, X. *et al.* (2019) 'Analyses of MiRNA Functions in Maize Using a Newly Developed ZMBJ-CMV-2bN81-STTM Vector', *Frontiers in Plant Science*. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01277>.
- López-Ruiz, B. A. *et al.* (2019) 'Development-related miRNA expression and target regulation during staggered in vitro plant regeneration of tuxpeño VS-535 maize cultivar', *International journal of molecular sciences*, 20(9), p. 2079.
- Lu, S. (2019) 'De novo origination of MIRNAs through generation of short inverted repeats in target genes', *RNA biology*, 16(6), pp. 846–859.
- Luján-Soto, E. and Dinkova, T. D. (2021) 'Time to wake up: Epigenetic and small-RNA-mediated regulation during seed germination', *Plants*, 10(2), p. 236.
- Luo, P. *et al.* (2022) 'MicroRNAs Are Involved in Regulating Plant Development and Stress Response through Fine-Tuning of TIR1/AFB-Dependent Auxin Signaling', *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms23010510.
- Mallory, A. C. and Vaucheret, H. (2006) 'Functions of microRNAs and related small RNAs in plants', *Nature genetics*, 38(6), pp. S31–S36.

- Megraw, M. *et al.* (2006) 'MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis', *RNA*. doi: 10.1261/rna.130506.
- Megraw, M. *et al.* (2009) 'A transcription factor affinity-based code for mammalian transcription initiation', *Genome Research*. doi: 10.1101/gr.085449.108.
- Mejía-Guerra, M. K. *et al.* (2018) 'Genome-Wide TSS Identification in Maize', in *Plant Transcription Factors*. Springer, pp. 239–256.
- Mejía-Guerra, M. K. *et al.* (2015) 'Core promoter plasticity between maize tissues and genotypes contrasts with predominance of sharp transcription initiation sites', *The Plant Cell*, 27(12), pp. 3309–3320.
- Méndez-Hernández, H. A. *et al.* (2019) 'Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis', *Frontiers in Plant Science*. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00077>.
- Meng, Y. *et al.* (2009) 'Genome-wide survey of rice microRNAs and microRNA–target pairs in the root of a novel auxin-resistant mutant', *Planta*, 230(5), pp. 883–898.
- Moro, B. *et al.* (2018) 'Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants', *Nucleic acids research*, 46(20), pp. 10709–10723.
- Nardmann, J. and Werr, W. (2009) 'Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology', in *Handbook of maize: Its biology*. Springer, pp. 105–119.
- Narjala, A. *et al.* (2020) 'A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis', *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkaa077.
- Noshi, M. *et al.* (2016) 'Arabidopsis clade IV TGA transcription factors, TGA10 and TGA9, are involved in ROS-mediated responses to bacterial PAMP flg22', *Plant Science*, 252, pp. 12–21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.019>.
- Ohmori, Y. *et al.* (2013) 'WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene FCP1 in rice', *The Plant cell*. 2013/01/31, 25(1), pp. 229–241. doi: 10.1105/tpc.112.103432.
- Olejniczak, M., Kotowska-Zimmer, A. and Krzyzosiak, W. (2018) 'Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017/07/17, 75(2), pp. 177–191. doi: 10.1007/s00018-017-2591-0.
- Ortiz, J. P. A. *et al.* (2013) 'Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from Paspalum', *Annals of Botany*, 112(5), pp. 767–787.
- Osuna, D., Prieto, P. and Aguilar, M. (2015) 'Control of seed germination and plant development by carbon and nitrogen availability', *Frontiers in Plant Science*, 6, p. 1023.
- Perea-García, A. *et al.* (2021) 'The copper-microRNA pathway is integrated with developmental and environmental stress responses in arabidopsis thaliana', *International journal of molecular sciences*, 22(17), p. 9547.
- Picot, E. *et al.* (2010) 'Evolutionary analysis of regulatory sequences (EARS) in plants', *Plant Journal*. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04314.x.
- Pierre-Jerome, E. *et al.* (2016) 'Functional analysis of molecular interactions in synthetic auxin

- response circuits', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1604379113.
- Pikaard, C. S. and Scheid, O. M. (2014) 'Epigenetic regulation in plants', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(12), p. a019315.
- Porto, M. S. *et al.* (2014) 'Plant promoters: an approach of structure and function', *Molecular biotechnology*, 56(1), pp. 38–49.
- Prudente, D. de O., de Souza, L. B. and Paiva, R. (2020) 'Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress', *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(3), pp. 483–487.
- Rojo, F. (2001) 'Mechanisms of transcriptional repression', *Current Opinion in Microbiology*, 4(2), pp. 145–151. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00180-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00180-6).
- Roy, S. *et al.* (2020) 'Computational identification of conserved microRNAs and functional annotation of their target genes in Citrus limon: Identification of microRNA in Citrus limon', *South African journal of botany*, 130, pp. 109–116.
- Salim, U. *et al.* (2022) 'Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons', *WIREs RNA*, 13(1), p. e1680. doi: <https://doi.org/10.1002/wrna.1680>.
- Sanborn, A. L. *et al.* (2021) 'Simple biochemical features underlie transcriptional activation domain diversity and dynamic, fuzzy binding to Mediator', *eLife*. Edited by A. G. Hinnebusch and K. Struhl, 10, p. e68068. doi: 10.7554/eLife.68068.
- Shu, K. *et al.* (2015) 'Dormancy and germination: How does the crop seed decide?', *Plant biology*, 17(6), pp. 1104–1112.
- Singh, A. K. *et al.* (2020) 'Identification and evolutionary analysis of polycistronic miRNA clusters in domesticated and wild wheat', *Genomics*, 112(3), pp. 2334–2348. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.005>.
- Smolikova, G. *et al.* (2021) 'Transition from seeds to seedlings: Hormonal and epigenetic aspects', *Plants*, 10(9), p. 1884.
- Soutourina, J. (2018) 'Transcription regulation by the Mediator complex', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), pp. 262–274. doi: 10.1038/nrm.2017.115.
- Spanudakis, E. and Jackson, S. (2014) 'The role of microRNAs in the control of flowering time', *Journal of experimental botany*, 65, pp. 365–380. doi: 10.1093/jxb/ert453.
- Stelpflug, S. C. *et al.* (2016) 'An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development', *The plant genome*, 9(1), pp. plantgenome2015-04.
- Strader, L., Weijers, D. and Wagner, D. (2022) 'Plant transcription factors — being in the right place with the right company', *Current Opinion in Plant Biology*, 65, p. 102136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102136>.
- Sun, Q. *et al.* (2018) 'MicroRNA528 Affects Lodging Resistance of Maize by Regulating Lignin Biosynthesis under Nitrogen-Luxury Conditions', *Molecular Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2018.03.013.
- Suzuki, M. *et al.* (2015) 'Conserved functions of the MATE transporter BIG EMBRYO1 in regulation of lateral organ size and initiation rate', *The Plant Cell*, 27(8), pp. 2288–2300.

- Szyrajew, K. *et al.* (2017) 'MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in Arabidopsis', *Frontiers in plant science*, 8, p. 18.
- Tang, J. and Chu, C. (2017) 'MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits', *Nature plants*, 3(7), pp. 1–11.
- Tang, Q. *et al.* (2022) 'Characteristics of microRNAs and Target Genes in Maize Root under Drought Stress', *International journal of molecular sciences*, 23(9), p. 4968.
- Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. (2003) 'The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription', *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.008417.
- Trevisan, S. *et al.* (2012) 'The miRNA-mediated post-transcriptional regulation of maize response to nitrate', *Plant Signaling & Behavior*, 7(7), pp. 822–826. doi: 10.4161/psb.20462.
- Varas, J., Santos, J. L. and Pradillo, M. (2017) 'The Absence of the Arabidopsis Chaperone Complex CAF-1 Produces Mitotic Chromosome Abnormalities and Changes in the Expression Profiles of Genes Involved in DNA Repair', *Frontiers in plant science*, 8, p. 525. doi: 10.3389/fpls.2017.00525.
- Verma, S., Attuluri, V. P. S. and Robert, H. S. (2022) 'Transcriptional control of Arabidopsis seed development', *Planta*, 255(4), pp. 1–19.
- Vidal, E. A., Álvarez, J. M. and Gutiérrez, R. A. (2014) 'Nitrate regulation of AFB3 and NAC4 gene expression in Arabidopsis roots depends on NRT1.1 nitrate transport function', *Plant Signaling and Behavior*. doi: 10.4161/psb.28501.
- Waititu, J. K. *et al.* (2020) 'Plant Non-Coding RNAs: Origin, Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stress', *International journal of molecular sciences*, 21(21), p. 8401. doi: 10.3390/ijms21218401.
- Wang, C. and Fang, J. (2015) 'RLM-RACE, PPM-RACE, and qRT-PCR: an integrated strategy to accurately validate miRNA target genes', in *Small Non-Coding RNAs*. Springer, pp. 175–186.
- Wang, F.-X. *et al.* (2020) 'Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory network structure for plant somatic embryogenesis', *Developmental Cell*, 54(6), pp. 742–757.
- Wang, M. *et al.* (2021) 'The miR528-AO Module Confers Enhanced Salt Tolerance in Rice by Modulating the Ascorbic Acid and Abscisic Acid Metabolism and ROS Scavenging', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(31), pp. 8634–8648. doi: 10.1021/acs.jafc.1c01096.
- Wei, X. *et al.* (2021) 'Structural basis of microRNA processing by Dicer-like 1', *Nature Plants*, 7(10), pp. 1389–1396. doi: 10.1038/s41477-021-01000-1.
- Weijers, D. and Wagner, D. (2016) 'Transcriptional responses to the auxin hormone', *Annual review of plant biology*, 67, pp. 539–574.
- Weiste, C. and Dröge-Laser, W. (2014) 'The Arabidopsis transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery', *Nature Communications*, 5(1), p. 3883. doi: 10.1038/ncomms4883.
- Wójcik, A. M. and Gaj, M. D. (2016) 'miR393 contributes to the embryogenic transition induced in vitro in Arabidopsis via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment', *Planta*, 244(1), pp. 231–243. doi: 10.1007/s00425-016-2505-7.

- Woodhouse, M. R. *et al.* (2022) 'qTeller: A tool for comparative multi-genomic gene expression analysis', *Bioinformatics*, 38(1), pp. 236–242.
- Wu, J. *et al.* (2017) 'ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice', *Nature Plants*. doi: 10.1038/nplants.2016.203.
- Xie, D. *et al.* (2021) 'Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in Arabidopsis', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/s41556-020-00606-5.
- Yadav, A. *et al.* (2021) 'microRNA 166: an evolutionarily conserved stress biomarker in land plants targeting HD-ZIP family', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(11), pp. 2471–2485.
- Yadav, R. K. *et al.* (2011) 'WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex', *Genes & development*, 25(19), pp. 2025–2030. doi: 10.1101/gad.17258511.
- Yadukrishnan, P. and Datta, S. (2021) 'Light and abscisic acid interplay in early seedling development', *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.16963.
- Yang, R. *et al.* (2019) 'Fine-Tuning of MiR528 Accumulation Modulates Flowering Time in Rice', *Molecular Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2019.04.009.
- Yang, X. *et al.* (2021) 'Widespread occurrence of microRNA-mediated target cleavage on membrane-bound polysomes', *Genome biology*, 22(1), pp. 1–31.
- Yang, X. and Zhang, X. (2011) 'Developmental and molecular aspects of nonzygotic (somatic) embryogenesis', in *Plant tissue culture, development and biotechnology*. CRC Press Boca raton, pp. 307–326.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. and Sheen, J. (2007) 'Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis', *Nature protocols*, 2(7), pp. 1565–1572.
- Yu, H. *et al.* (2015) 'Untethering the TIR1 auxin receptor from the SCF complex increases its stability and inhibits auxin response', *Nature Plants*, 1(3), p. 14030. doi: 10.1038/nplants.2014.30.
- Yu, Y., Jia, T. and Chen, X. (2017) 'The "how" and "where" of plant microRNAs', *New Phytologist*, 216(4), pp. 1002–1017. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.14834>.
- Zanca, A. S. *et al.* (2010) 'Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane', *BMC plant biology*, 10(1), pp. 1–13.
- Zhang, L. *et al.* (2009) 'A genome-wide characterization of microRNA genes in maize', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1000716.
- Zhao, X. and Li, L. (2013) 'Comparative Analysis of MicroRNA Promoters in Arabidopsis and Rice', *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(1), pp. 56–60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.12.004>.
- Zhao, Y. *et al.* (2021) 'MicroRNA annotation in plants: current status and challenges', *Briefings in Bioinformatics*, 22(5), p. bbab075.
- Zheng, C. *et al.* (2019) 'A Regulatory Network for miR156-SPL Module in Arabidopsis thaliana', *International journal of molecular sciences*, 20(24), p. 6166. doi: 10.3390/ijms20246166.
- Zhou, L.-Z., Juranić, M. and Dresselhaus, T. (2017) 'Germline development and fertilization

mechanisms in maize', *Molecular Plant*, 10(3), pp. 389–401.

Zhu, H. *et al.* (2019) 'Banana sRNAome and degradome identify microRNAs functioning in differential responses to temperature stress', *BMC Genomics*, 20(1), p. 33. doi: 10.1186/s12864-018-5395-1.

Zhu, H. *et al.* (2020) 'Micro RNA 528, a hub regulator modulating ROS homeostasis via targeting of a diverse set of genes encoding copper-containing proteins in monocots', *New Phytologist*, 225(1), pp. 385–399.

12.- ANEXOS

Tablas suplementarias

Tabla S1.- Composición del medio de cultivo N6 empleado para la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.

Componente	g/L
KNO₃	2.38
(NH₄)₂SO₄	0.463
KH₂PO₄	0.4
MgSO₄-7H₂O	0.185
CaCl₂-2H₂O	0.166
Na₂EDTA-H₂O	0.0375
FeSO₄-7H₂O	0.0278
MnSO₄-H₂O	0.0032
H₃BO₃	0.0016
ZnSO₄-7H₂O	0.0015
KI	0.00083
Adenina	0.1
Prolina	2.5
Caseína	0.2
Sacarosa	30
Cocktel 20 de vitaminas*	*
Agargel	7
*Bajo patente (En el laboratorio de cultivo de tejidos se utiliza 10 mL/L del stock)	

Tabla S2.- Localización genómica de los precursores de miR528 en monocotiledóneas depositadas en la base de datos PmiREN

precursor ID	ID PmiREN	Cromosoma	Inicio	Fin	Cadena	Especie
Aof-MIR528	PmiREN000996	Aof-NC_033797.1	10579184	10579302	+	<i>Asparagus officinalis</i>
Bdi-MIR528	PmiREN001255	Bdi-Bd1	73295140	73295266	-	<i>Brachypodium distachyon</i>
Mac-MIR528	PmiREN012215	Mac-chr8	10341398	10341507	-	<i>Musa acuminata</i>
Ogl-MIR528	PmiREN013581	Ogl-GL455988.1	1549995	1550120	+	<i>Oryza glaberrima</i>
Oni-MIR528	PmiREN013810	Oni-3	1341691	1341816	+	<i>Oryza nivara</i>
Oru-MIR528	PmiREN013986	Oru-HG417167.1	1412714	1412839	+	<i>Oryza rufipogon</i>
Osa-MIR528	PmiREN014362	Osa-Chr3	1667310	1667435	+	<i>Oryza sativa</i>
Pha-MIR528	PmiREN016262	Pha-Chr09	69425755	69425882	-	<i>Panicum hallii</i>
Pvi-MIR528a	PmiREN016436	Pvi-Chr01N	69192314	69192445	+	<i>Panicum virgatum</i>
Pvi-MIR528b	PmiREN016437	Pvi-Chr09K	87418444	87418571	-	<i>Panicum virgatum</i>
Pvi-MIR528c	PmiREN016438	Pvi-Chr09N	120070864	120070991	-	<i>Panicum virgatum</i>
Pap-MIR528	PmiREN016701	Pap-NEWO01000071.1	538724	538838	+	<i>Phalaenopsis aphrodite</i>
Pda-MIR528	PmiREN016944	Pda-NW_008247750.1	18899	19050	-	<i>Phoenix dactylifera</i>
Scu-MIR528	PmiREN018444	Scu-JXQF01030556.1	160	293	+	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>
Sit-MIR528	PmiREN018709	Sit-scaffold_9	57157041	57157170	-	<i>Setaria italica</i>
Sbi-MIR528	PmiREN020074	Sbi-chromosome_1	79165414	79165537	-	<i>Sorghum bicolor</i>
Spo-MIR528	PmiREN020175	Spo-pseudo17	196564	196705	-	<i>Spirodela polyrhiza</i>
Tae-MIR528a	PmiREN026132	Tae-chr4B	162371969	162372094	+	<i>Triticum aestivum</i>
Tae-MIR528b	PmiREN026133	Tae-chr4D	32161888	32162013	+	<i>Triticum aestivum</i>
Tae-MIR528c	PmiREN026134	Tae-chr5A	210090100	210090222	+	<i>Triticum aestivum</i>
Zma-MIR528a	PmiREN023456	Zma-1	6409229	6409390	+	<i>Zea mays</i>
Zma-MIR528b	PmiREN023457	Zma-9	153752320	153752436	-	<i>Zea mays</i>
Cam-MIR528a	PmiREN028422	Cam-CM007986.2	154895594	154895721	+	<i>Cenchrus americanus</i>
Eco-MIR528a	PmiREN029346	Eco-LXGH01442297.1	9766	9888	+	<i>Eleusine coracana</i>
Ete-MIR528a	PmiREN029473	Ete-scaffold2964	104305	104428	+	<i>Eragrostis tef</i>
Ete-MIR528b	PmiREN029474	Ete-scaffold3813	32300	32422	+	<i>Eragrostis tef</i>
Ete-MIR528c	PmiREN029475	Ete-scaffold3813	32700	32823	+	<i>Eragrostis tef</i>
Hvu-MIR528a	PmiREN029969	Hvu-SDOW01000255.1	540484	540623	-	<i>Hordeum vulgare</i>

Tabla S3.- Blancos de miR528 de maíz predichos con el software psRNATarget. Las filas resaltadas en amarillo corresponden a blancos analizados y validados en este trabajo. En azul (*) se indican blancos previamente validados por Sun et al., (2018)

Secuencia del miR528	Acceso del Blanco	Exp	UPE	Fragmento alineado del miRNA	Alineamiento	nto alineado del	Mecanismo de inhibición	Anotación del blanco	Multiplicidad	Nombre asignado
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012883_T001	2	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCCUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:1584315:158	1	MATE/BIGE1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016873_T001	2	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUUUGCAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:178968180:1	1	bHLH152
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012205_T001	2.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCGCGAGCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:170071902:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d053327_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUUCUGCGAGC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:4:226351856:2	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d034627_T003	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCAUUC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:1:298407979:2	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d042901_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUUCUCGCAUGU	Corte	cdna chromosome:AGPv4:3:183398638:1	1	LAC5*
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d052243_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUGCUGCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:4:184464169:1	1	LAC3*
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d050081_T005	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUUUUGCAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:4:64819818:64	2	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d031908_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCGCGAGCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:1:206405716:2	1	SOD1a
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T017	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257422:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T010	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257320:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T005	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257312:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T004	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257300:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T011	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257329:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T015	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257344:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T003	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257296:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T016	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257369:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T014	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257342:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T009	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257317:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d016326_T012	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUGUUCUCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:157257330:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d021227_T004	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	GUUUCGCGGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:146557650:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d021227_T002	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	GUUUCGCGGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:146557648:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d021227_T003	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	GUUUCGCGGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:146557648:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d021227_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	GUUUCGCGGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:146557648:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d042966_T003	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UGUCUCUGCUUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:3:185204239:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d042966_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UGUCUCUGCUUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:3:185204150:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d042966_T002	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UGUCUCUGCUUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:3:185204218:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d019875_T002	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	GACCUUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:71972262:71	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d019875_T001	3	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	GACCUUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:71972262:71	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d024868_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:10:91402127:5	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d025564_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:10:122405475	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d033710_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:1:271948830:2	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d024703_T007	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUUCUGUGUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:10:84135279:8	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d021850_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGC-UGCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:7:164513895:1	1	PLC1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T008	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168279310:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T007	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168278927:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T005	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168277896:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T006	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168277932:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T003	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168277783:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168277736:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012101_T002	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUCUGCCUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:8:168277736:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d031002_T004	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCUUUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:1:172832352:1	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T013	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213152086:2	1	
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018047_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:212828616:2	1	

Tabla S3. continuación

UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151971:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T007	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151971:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T004	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151971:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T002	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151971:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T003	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151971:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T011	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213152048:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T006	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151971:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d048185_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCUGU	Traducción	seq=cdna; coord=9:148878970..14887991	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018047_T002	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:212828616:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T008	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151973:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T010	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151987:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018049_T009	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	AUCCUCUGUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:213151973:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d027548_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCCUCUCCAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:1:8046302:804	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T011	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220891088:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T005	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220890875:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T012	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220891089:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T009	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220891038:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T007	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220891034:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T010	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220891039:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T008	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220891037:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T002	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220890838:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T001	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220890838:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T004	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220890838:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T003	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220890838:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d018439_T006	3.5	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUAUACUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:5:220890985:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d028159_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGCUGU	Traducción	seq=cdna; coord=1:24207341..24208364	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d023881_T002	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGUGUCU	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:10:26194546:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d037290_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUUCUCUGCAUGU	Corte	cdna chromosome:AGPv4:6:119545820:1	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d041063_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGUGUC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:3:94045566:94	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d023881_T005	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGUGUCU	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:10:26194557:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d023881_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGUGUCU	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:10:26194543:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d023881_T004	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGUGUCU	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:10:26194550:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d023881_T003	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUGUGUCU	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:10:26194550:2	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d029562_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUUCUGUAUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:1:76238126:76	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d012725_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUUUUGCUUG	Corte	cdna chromosome:AGPv4:8:179214402:1	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d039165_T012	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUG-AUGCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:6:171556065:1	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d039165_T013	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCUG-AUGCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:6:171556079:1	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d002097_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUUCUCUUAUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:2:5954841:595	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d043352_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUUGUCUGCAUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:3:197452490:1	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d008726_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUCCGCGUCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:8:17930694:17	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d008726_T002	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUCCGCGUCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:8:17930694:17	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d008726_T003	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCUCCGCGUCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:8:17930694:17	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d043352_T002	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUUGUCUGCAUCC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:3:197452490:1	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d041055_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	UUCCUCUGCCUGC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:3:93411371:93	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d013544_T001	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCAGCAUAC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:5:13969116:13	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d008726_T004	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCGCGUCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:8:17930755:17	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d008726_T005	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCGCGUCC	Corte	cdna chromosome:AGPv4:8:17930785:17	1
UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	Zm00001d013544_T002	4	-1	UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG	CUCCUCAGCAUAC	Traducción	cdna chromosome:AGPv4:5:13969116:13	1

Tabla S4.- Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo

ID	Sequence (5'-3')		
Cuantificación de miR528 maduro y transcritos blancos			
MATE/BIGE1	Zm00001d012883_T001	Forward	CCCACGACGAGATGCCATAT
		Reverse	AACGGCCTCTCTTTCTCTGC
bHLH152	Zm00001d016873_T001	Forward	CCCGGCATCAAATCAAAGCC
		Reverse	TGCGATGGAGCACATGTAGT
SOD1a	Zm00001d031908_T001	Forward	CAATGGGTGCATATCGACAG
		Reverse	GCAACAATGTTTCCCAGGTC
PLC1	Zm00001d021850_T001	Forward	TGGCCGTATGAGCATTTAGC
		Reverse	GATGTTCCCGAAGCAAAGTC
GID2	Zm00001d048185_T001	Forward	CCGGTGCCATCGATCTCTAC
		Reverse	AGTCCCTGAGGTCAGCTC
FBOX	Zm00001d028159_T001	Forward	AATGGCATTGAGCTTCAGCC
		Reverse	CGACGACATGGAAGGACGA
zma-miR528	MI0013239	Stem loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTC CGAGGTATTGCACTGGATAC GACCTCTC
		Forward	GCGCGTGAAGGGGCATGCA
18s rRNA		Forward	TCCTATTGTTGGCCTTCGG
		Reverse	TCCTTG GCAAATGCTTTCGC
U6 snRNA		Stem loop	GTGCAGGGTCCGAGGTTTTGG ACCATTCTCGAT
		Forward	GGAACGATACAGAGAAGATTAGCA
MATE/BIGE1		Outer	TGATGTTGGTCAGCCCGATG
RLM-RACE		Inner	TTGAGAGCAGTGACAGGCG
bHLH152		Outer	GAGGAATGGTGAAGGAGGA
RLM-RACE		Inner	TCTCACCAGGCAGAGCAGG
SOD1a		Outer	ACTCGTGGAGGTGAAGCC
RLM-RACE		Inner	TCACAGTTGTAGGTCATCGTC
PLC1		Outer	TTCAAAAGGCGCGTCC
RLM-RACE		Inner	TCAAGTGATCATGCCAGCAC
Amplificación y cuantificación de transcritos primarios y precursores			
premiR_FW			GTGGAAGGGGCATGCAGAG
premiR528a_Rv1			AAGAGGCAGGCACAGGAGA
premiR528a_Rv2			AGGCACAGGAGAGGAGTGAG
premiR528_Rv 3			GGAAGAGGCAGGCACAGG
premiR528a_Loop			GAGGAGTGAGGAGAGCTTGC
PrimiR528a_Fw1			AGTGATGAGTGGCCTGCAAA
PrimiR528a_Fw2			ATGGCAGGTTGAGCATCTCC
PrimiR528b_Fw1			TGCTACAAATAGGGGCACGA
PrimiR528b_Fw2			ACAAATAGGGGCACGAGTGG
Stem_Loop_premiR528a			GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTGCACTGGATACGACAATGGA
Stem_Loop_miR528			GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTGCACTGGATACGACCTCCTC
miR528_Fw			GCGCGTGAAGGGGCATGCA
Universal_Reverse			GTGCAGGGTCCGAGGTA
5' RACE Adapter			5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACUCGCG UUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3'
5' RACE Outer Primer			5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'
5' RACE Inner Primer			5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTCTGGCTTTGATG-3'
Delecciones 5' consecutivas del promotor			
pMIR1_F			CACCGAAACGTGCGTTAAATGGACAG
pMIR1.2_F			CACCAACCAACATCCACCTCGAAT
pMIR2_F			CACCACTGGTTAATGTCTTAGGTTGTGC
pMIR3_F			CACCGCGTGCAGTAGAAAGATTCCCT
pMIR4_F			CACCACTGCTTTTACTGTTTTGAACA
pMIR_R			AGTTTCTGCTGCTGGCTAGT
Delecciones puntuales de TFBS			
pMIR_Pro_F			AACCAACATCCACCTCGAAT
35sTer_Rv			CATGCCTGCAGGTCAGTGG
ΔTGACG_1_F			TGACGTTAGACGCGGTGTGTATCTTATTGT
ΔTGACG_1_R			ACGTCATGACTGACTAGATCGTCACCCA
ΔTGACG_2_F			GGTCACGATTCTAGTCAGTCATATGTTAAATACA
ΔTGACG_2_R			CTGACTAGAATCGTGACCACCTACTTCAA
ΔTCTGTG_F			TAGGAACGATGGTGGAGGCTTACAATAT
ΔTCTGTG_R			CCTCCACCATCGTTCCTACTAAGCCAACAGA

Tabla S5.- TFBS identificados en el promotor de zma-MIR528a usando la base de datos NewPLACE. Las filas resaltadas corresponden a los sitios analizados en este trabajo

ID del motivo de unión	Posición relativa al TSS	Cadena	Secuencia consenso	ID NewPLACE
NODCON2GM	-1503	(+)	CTCTT	S000462
OSE2ROOTNODULE	-1503	(+)	CTCTT	S000468
DOFCOREZM	-1501	(-)	AAAG	S000265
TAAAGSTKST1	-1501	(-)	TAAAG	S000387
CARGCW8GAT	-1501	(-)	CWWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	-1501	(+)	CWWWWWWWWWG	S000431
TATAPVTRNALEU	-1500	(+)	TTTATATA	S000340
TATABOX4	-1499	(-)	TATATAA	S000111
CACFTPPCA1	-1493	(-)	YACT	S000449
CAATBOX1	-1490	(-)	CAAT	S000028
GT1CONSENSUS	-1480	(+)	GRWAAW	S000198
INRNTPSADB	-1478	(-)	YTCANTYY	S000395
CAATBOX1	-1476	(-)	CAAT	S000028
GATABOX	-1470	(+)	GATA	S000039
CACFTPPCA1	-1461	(-)	YACT	S000449
GATABOX	-1444	(+)	GATA	S000039
GATABOX	-1437	(-)	GATA	S000039
GATABOX	-1433	(-)	GATA	S000039
MYBCORE	-1415	(-)	CNGTTR	S000176
MYB2AT	-1415	(+)	TAACGTG	S000177
MYB2CONSENSUSAT	-1415	(+)	YAACKG	S000409
ARR1AT	-1410	(+)	NGATT	S000454
RAV1AAT	-1399	(-)	CAACA	S000314
SEF3MOTIFGM	-1386	(-)	AACCCA	S000115
CACFTPPCA1	-1367	(-)	YACT	S000449
ARR1AT	-1359	(+)	NGATT	S000454
DPBFCOREDCDC3	-1352	(+)	ACACNNG	S000292
GATABOX	-1346	(+)	GATA	S000039
GT1CONSENSUS	-1336	(-)	GRWAAW	S000198
GT1GMSCAM4	-1336	(-)	GAAAAA	S000453
T/GBOXATPIN2	-1324	(+)	AACGTG	S000458
ABRERATCAL	-1324	(+)	MACGYGB	S000507
ACGTATERD1	-1323	(-)	ACGT	S000415
RHERPATEXPA7	-1323	(-)	KCACGW	S000512
ABRELATERD1	-1323	(+)	ACGTG	S000414
ACGTATERD1	-1323	(+)	ACGT	S000415
DRE1COREZMRAB17	-1303	(-)	ACCGAGA	S000401
GTGANTG10	-1298	(+)	GTGA	S000378
ARR1AT	-1294	(-)	NGATT	S000454
WBOXNCHN48	-1291	(+)	CTGACY	S000508
WBOXHVIS01	-1290	(+)	TGACT	S000442
WRKY71OS	-1290	(+)	TGAC	S000447
WBOXNTERF3	-1290	(+)	TGACY	S000457
ARR1AT	-1275	(-)	NGATT	S000454
TATABOX5	-1250	(-)	TTATTT	S000203
NODCON2GM	-1246	(-)	CTCTT	S000462
OSE2ROOTNODULE	-1246	(-)	CTCTT	S000468
ARR1AT	-1243	(+)	NGATT	S000454
TAAAGSTKST1	-1229	(+)	TAAAG	S000387
DOFCOREZM	-1228	(+)	AAAG	S000265
ARR1AT	-1214	(-)	NGATT	S000454
GT1CONSENSUS	-1205	(-)	GRWAAW	S000198
POLLEN1LELAT52	-1203	(-)	AGAAA	S000245
BOXINTPATPB	-1202	(-)	ATAGAA	S000296
S1FBOXSORPS1L21	-1198	(+)	TTGGTA	S000223
GATABOX	-1194	(-)	GATA	S000039
NODCON1GM	-1193	(-)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	-1193	(-)	AAAGAT	S000467
DOFCOREZM	-1191	(-)	AAAG	S000265
CACFTPPCA1	-1182	(-)	YACT	S000449
GTGANTG10	-1181	(+)	GTGA	S000378
GTGANTG10	-1174	(-)	GTGA	S000378
DOFCOREZM	-1169	(+)	AAAG	S000265
NODCON1GM	-1169	(+)	AAAGAT	S000461
OSE1ROOTNODULE	-1169	(+)	AAAGAT	S000467
GATABOX	-1166	(+)	GATA	S000039
IBOXCORE	-1166	(+)	GATAA	S000199
AMMORESIVDCRN1A1	-1151	(+)	CGAACTT	S000375
CACFTPPCA1	-1135	(-)	YACT	S000449
TAAAGSTKST1	-1133	(+)	TAAAG	S000387
DOFCOREZM	-1132	(+)	AAAG	S000265
GT1CONSENSUS	-1123	(-)	GRWAAW	S000198
POLLEN1LELAT52	-1121	(-)	AGAAA	S000245
BIHD1OS	-1117	(+)	TGTCA	S000498
WBOXATNPR1	-1116	(-)	TTGAC	S000390
WRKY71OS	-1116	(-)	TGAC	S000447
REALPHALGLHCB21	-1100	(+)	AACCAA	S000362
CCAATBOX1	-1098	(+)	CCAAT	S000030
CAATBOX1	-1097	(+)	CAAT	S000028
ARR1AT	-1096	(-)	NGATT	S000454
GTGANTG10	-1094	(-)	GTGA	S000378
ARR1AT	-1089	(+)	NGATT	S000454
RAV1AAT	-1077	(-)	CAACA	S000314
ASF1MOTIFCAMV	-1065	(-)	TGACG	S000024
WRKY71OS	-1064	(-)	TGAC	S000447
T/GBOXATPIN2	-1053	(+)	AACGTG	S000458
ABRERATCAL	-1053	(+)	MACGYGB	S000507
ACGTATERD1	-1052	(-)	ACGT	S000415

RAV1AAT	-1037	(-)	CAACA	S000314
ARR1AT	-1030	(-)	NGATT	S000454
REALPHALGLHCB21	-1021	(+)	AACCAA	S000362
RAV1AAT	-1018	(+)	CAACA	S000314
ROOTMOTIFTAPOX1	-1004	(-)	ATATT	S000098
GT1CONSENSUS	-995	(+)	GRWAAW	S000198
CAATBOX1	-991	(-)	CAAT	S000028
CCAATBOX1	-991	(-)	CCAAT	S000030
DOFCOREZM	-986	(-)	AAAG	S000265
GTGANTG10	-983	(-)	GTGA	S000378
QARBNEXTA	-981	(-)	AACGTGT	S000244
ABRERATCAL	-981	(-)	MACGYGB	S000507
ABRELATERD1	-980	(-)	ACGTG	S000414
BP5OSWX	-980	(-)	CAACGTG	S000436
T/GBOXATPIN2	-980	(-)	AACGTG	S000458
ACGTATERD1	-979	(-)	ACGT	S000415
ACGTATERD1	-979	(+)	ACGT	S000415
POLLEN1LELAT52	-973	(+)	AGAAA	S000245
GT1CONSENSUS	-972	(+)	GRWAAW	S000198
GT1GMSCAM4	-972	(+)	GAAAAA	S000453
ROOTMOTIFTAPOX1	-966	(-)	ATATT	S000098
GATABOX	-951	(-)	GATA	S000039
EBOXBNNAPA	-948	(-)	CANNTG	S000144
RAV1BAT	-948	(-)	CACCTG	S000315
MYCCONSUSAT	-948	(-)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	-948	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	-948	(+)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	-935	(-)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	-935	(-)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	-935	(+)	CANNTG	S000144
MYCCONSUSAT	-935	(+)	CANNTG	S000407
RAV1AAT	-931	(-)	CAACA	S000314
CIACADIANLELHC	-927	(-)	CAANNNNATC	S000252
CACFTPPCA1	-913	(-)	YACT	S000449
ARR1AT	-905	(+)	NGATT	S000454
ARR1AT	-899	(+)	NGATT	S000454
-300ELEMENT	-897	(-)	TGHAARK	S000122
GT1CONSENSUS	-896	(-)	GRWAAW	S000198
GT1GMSCAM4	-896	(-)	GAAAAA	S000453
DOFCOREZM	-889	(+)	AAAG	S000265
POLLEN1LELAT52	-887	(+)	AGAAA	S000245
ROOTMOTIFTAPOX1	-881	(+)	ATATT	S000098
ARFAT	-875	(+)	TGCTC	S000270
SURECOREATSULTR11	-874	(-)	GAGAC	S000499
GTGANTG10	-867	(-)	GTGA	S000378
ROOTMOTIFTAPOX1	-863	(+)	ATATT	S000098
CACFTPPCA1	-859	(+)	YACT	S000449
DOFCOREZM	-857	(-)	AAAG	S000265
CACFTPPCA1	-853	(+)	YACT	S000449
CACFTPPCA1	-849	(-)	YACT	S000449
CURECORECR	-848	(-)	GTAC	S000493
CURECORECR	-848	(+)	GTAC	S000493
CACFTPPCA1	-843	(+)	YACT	S000449
GT1CORE	-838	(+)	GGTTAA	S000125
SORLIPIAT	-811	(+)	GCCAC	S000482
GATABOX	-802	(+)	GATA	S000039
ROOTMOTIFTAPOX1	-801	(+)	ATATT	S000098
-10PEHVPSBD	-800	(+)	TATTCT	S000392
BOXINTPATPB	-798	(-)	ATAGAA	S000296
POLLEN2LELAT52	-795	(-)	TCCACCATA	S000246
GTGANTG10	-782	(-)	GTGA	S000378
CARGCW8GAT	-779	(-)	CWWWWWWWWWG	S000431
ROOTMOTIFTAPOX1	-777	(-)	ATATT	S000098
ROOTMOTIFTAPOX1	-776	(+)	ATATT	S000098
CACFTPPCA1	-768	(-)	YACT	S000449
WBOXNTERF3	-761	(-)	TGACY	S000457
WRKY71OS	-760	(-)	TGAC	S000447
GTGANTG10	-759	(-)	GTGA	S000378
RHERPATEXPA7	-759	(+)	KCACGW	S000512
CARGCW8GAT	-749	(-)	CWWWWWWWWWG	S000431
CARGCW8GAT	-749	(+)	CWWWWWWWWWG	S000431
GTGANTG10	-731	(+)	GTGA	S000378
ASF1MOTIFCAMV	-730	(+)	TGACG	S000024
WRKY71OS	-730	(+)	TGAC	S000447
WBOXHVIS01	-716	(-)	TGACT	S000442
WBOXNTERF3	-716	(-)	TGACY	S000457
WRKY71OS	-715	(-)	TGAC	S000447
EBOXBNNAPA	-713	(-)	CANNTG	S000144
CATATGGMSAUR	-713	(-)	CATATG	S000370
MYCCONSUSAT	-713	(-)	CANNTG	S000407
EBOXBNNAPA	-713	(+)	CANNTG	S000144
CATATGGMSAUR	-713	(+)	CATATG	S000370
MYCCONSUSAT	-713	(+)	CANNTG	S000407
TATABOXOSPAL	-706	(-)	TATTTAA	S000400
CAATBOX1	-699	(+)	CAAT	S000028
GT1CONSENSUS	-695	(+)	GRWAAW	S000198
ROOTMOTIFTAPOX1	-692	(-)	ATATT	S000098
ARR1AT	-687	(-)	NGATT	S000454

Figuras Suplementarias

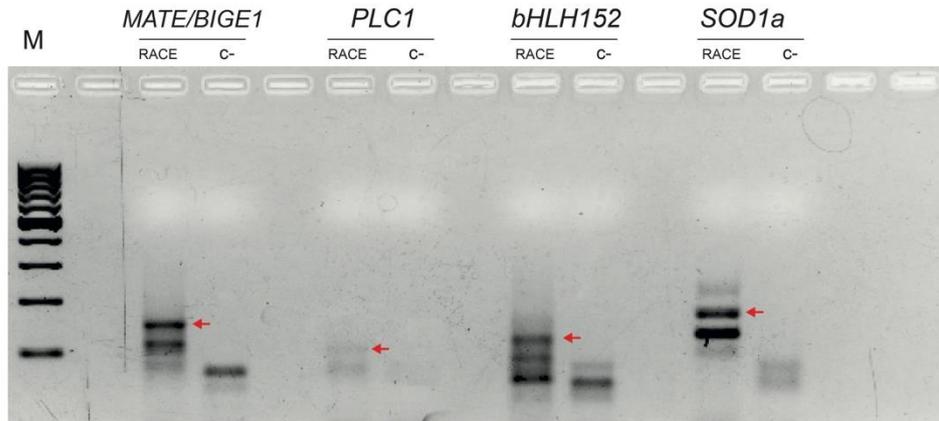
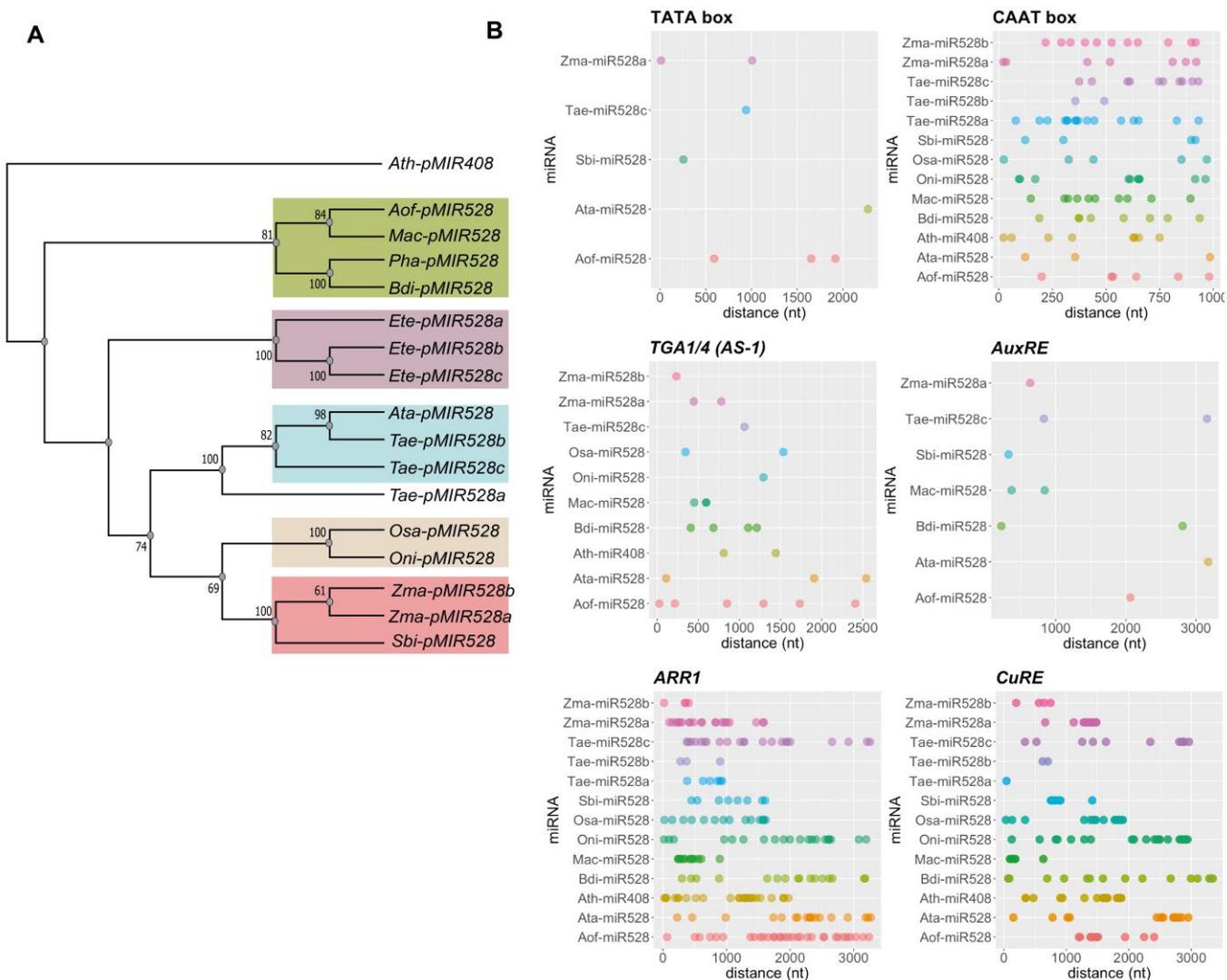


Figura S1.- Productos obtenidos del protocolo 5'-RLM-RACE después de amplificaciones consecutivas (RACE). Las flechas rojas indican los productos purificados, clonados y secuenciados. C-: control negativo. M: marcador de peso molecular



Figura S3.- Análisis de bibliotecas públicas de CAGE-Seq y secuencia del promotor de *zma-MIR528a*. **(A)** Representación de lecturas mapeadas en las coordenadas genómicas del TSS de *MIR528a* obtenidas a partir de los datos públicos [GSE70251] correspondiente a tejidos de raíz y parte aérea de plántulas de maíz B73 de 14 días. Las lecturas se agruparon en CAGE-cluster TSS (líneas horizontales grises) con el sitio TSS dominante designado con el bloque rojo. TPM: tags por millón. SI: shape index. **(B)** Secuencia del promotor *zma-MIR528a* analizada. La porción subrayada corresponde al sitio de mapeo del precursor pre-miR528a. Las porciones coloreadas corresponden a distintos elementos de respuesta. La base correspondiente al TSS dominante se resalta en amarillo y negritas.



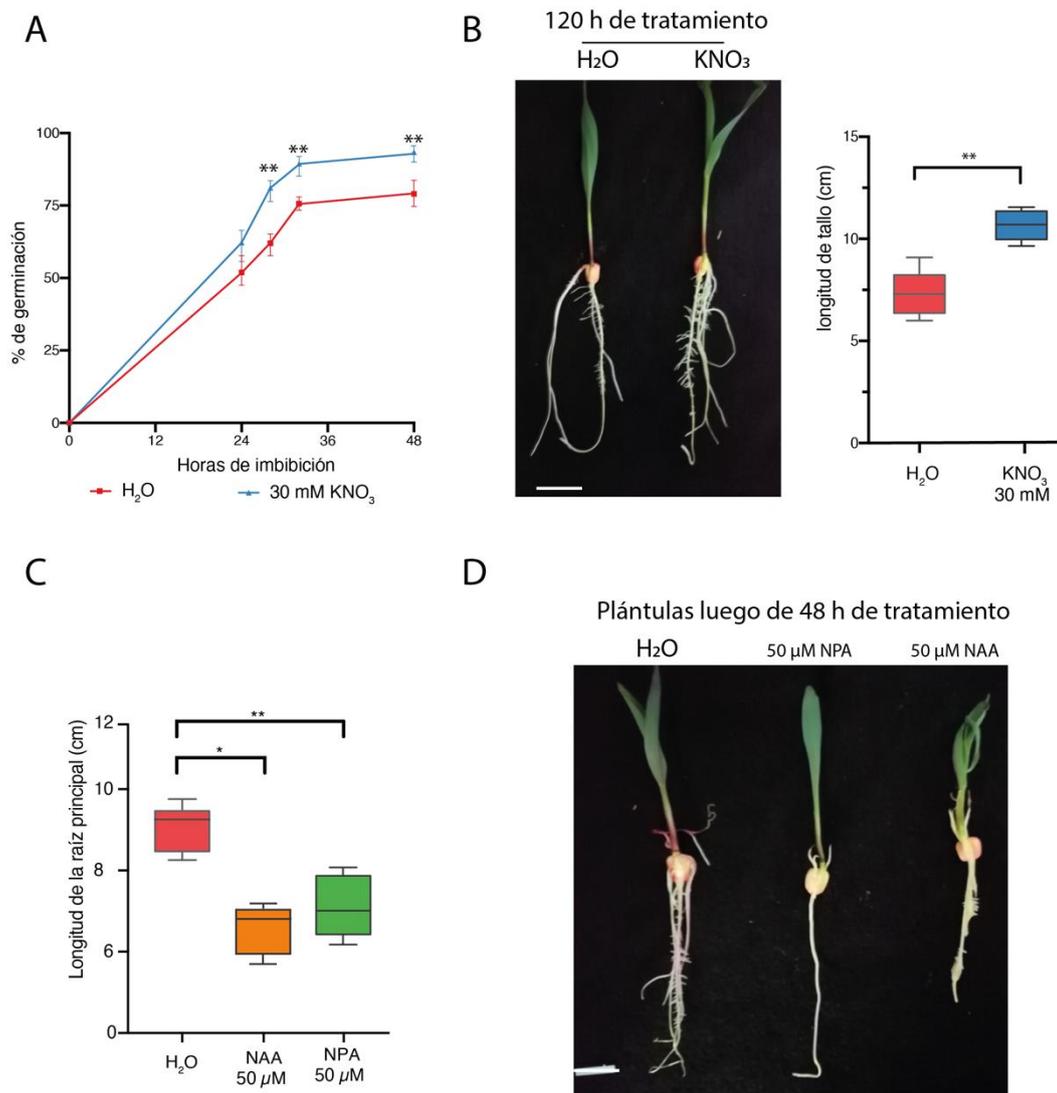


Figura S5.- Efectos fisiológicos tratamientos prolongados de los estímulos con de nitratos o auxinas durante la germinación y el establecimiento de plántulas de maíz. (A) Porcentaje de germinación de semillas de maíz incubadas en condiciones control (H₂O, línea roja) o con KNO₃ 30 mM, luego de 48h de tratamiento. **(B)** Plántulas obtenidas por incubación prolongada (120 h de tratamiento) en condiciones control o bajo el estímulo con exceso de nitratos (panel izquierdo). Se cuantifico la longitud de la parte aérea de cada muestra (panel derecho). Las barras de error indican la desviación estándar **(C)** Cuantificación de la longitud de la raíz primaria de semillas de maíz luego de 6 h de aplicado el estímulo con NAA 50 μM. **(D)** Efecto de tratamientos prolongados con auxinas (48 h de tratamiento continuo). Las barras indican la desviación estándar (n=3 réplicas biológicas independientes, **P*<0.05; ** *P*<0.01, t-Student comparando las muestras tratadas vs control a cada tiempo; ANOVA de una vía con prueba Tukey Posthoc para comparación múltiple.

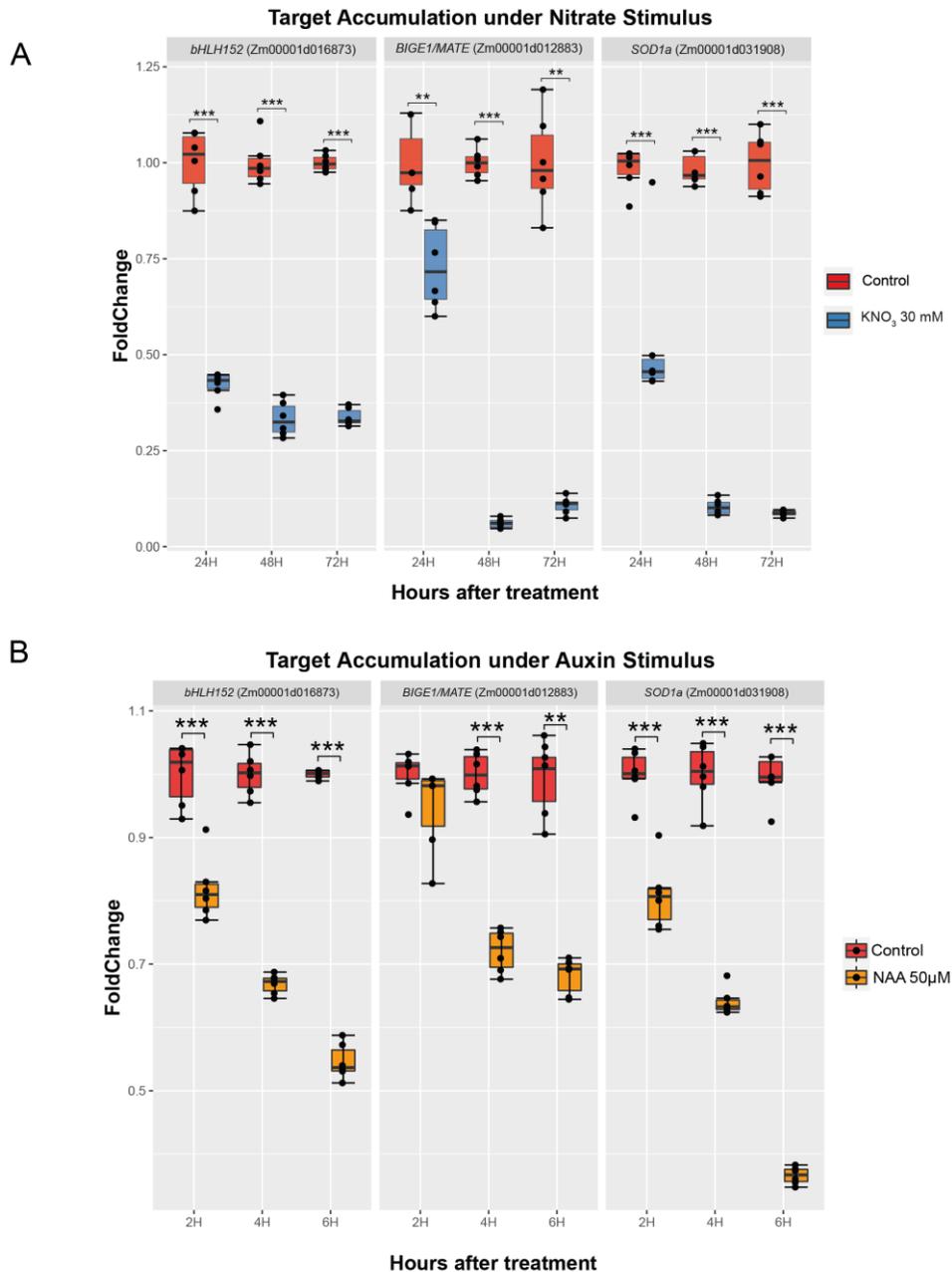


Figura S6.- Regulación negativa de blancos de miR528 desencadenados por la aplicación de tratamientos con nitratos y auxinas. (A) Niveles relativos de acumulación para bHLH152, MATE/BIGE1 y SOD1a en muestras tratadas con nitratos (30 mM KNO₃) (A) o auxinas (50 µM NAA) (B). Los datos se normalizaron usando la expresión del gen 18 sRNA. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) de al menos 3 réplicas biológicas independientes. Los datos se analizaron por medio de una ANOVA de una vía con prueba post hoc Tukey para comparación múltiple entre las muestras tratadas y el control a cada tiempo (** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$).

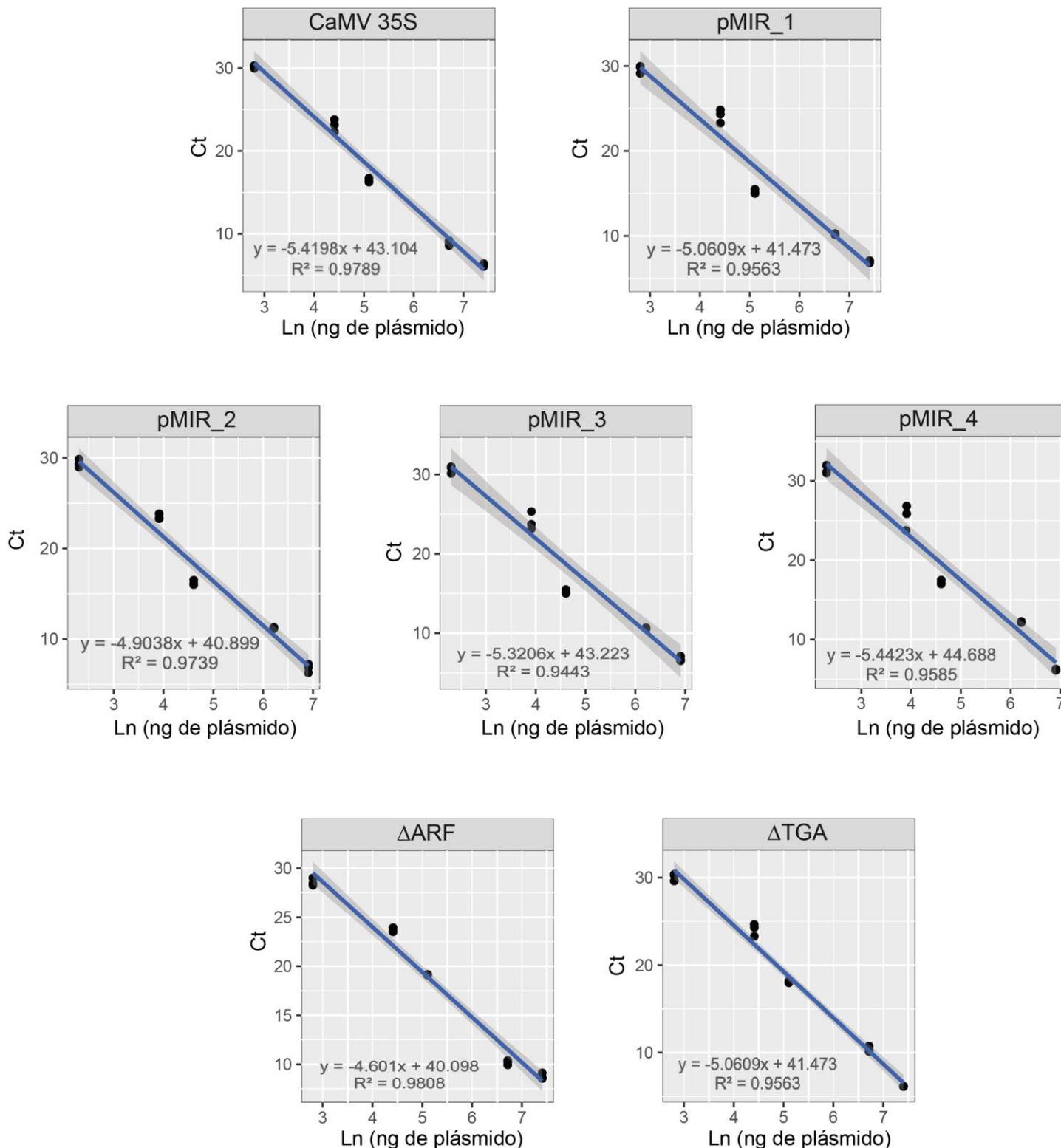


Figura S7.- Determinación del DNA plasmídico transfectado en los ensayos de actividad transcripcional. Curvas de cuantificación obtenidas para cada construcción empleada en los ensayos transitorios en protoplastos de maíz por medio de qRT-PCR. Se prepararon diluciones seriadas para cada construcción (1000 ng, 500 ng, 100 ng, 50ng y 10 ng) y se evaluó la correspondencia con el ciclo de amplificación (Ct). Los datos se analizaron usando un modelo ajustado de regresión lineal entre la cantidad de plásmido (expresado en Ln) y el Ct usando el software Rstudio. A partir de cada curva, se determinó la ecuación ajustada a los puntos y con esto se calculó la cantidad de plásmido transfectado en los ensayos de actividad transcripcional para normalizar la actividad de GUS obtenida para cada construcción.

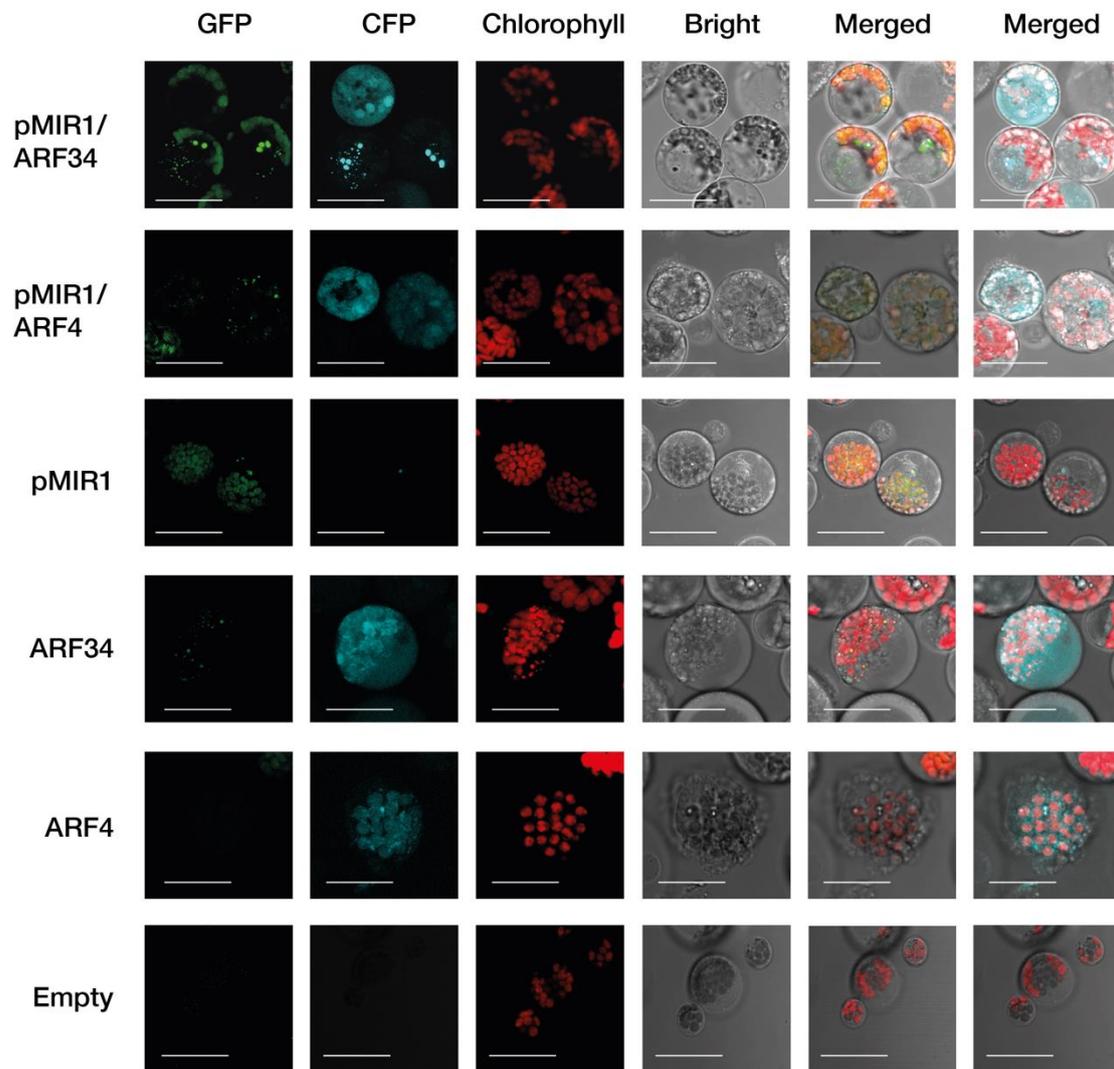


Figura S8.- Ensayos de transactivación en protoplastos de maíz. Protoplastos de maíz fueron co-transfectados con la construcción reportera (pMIR1::GFP/GUS) y el plásmido efector (35SCaMV:zm:ARF34-CFP o 35sCaMV::zm-ARF4-CFP). La señal de GFP y CFP se detectaron por microscopía confocal y cada señal se combinó (*merged*) con el campo claro. La expresión transitoria de pMIR_1 transfectado en solitario se empleó para tener la expresión basal de la construcción reportera. Barra blanca de escala= 40 μ m.



Article

MicroRNA Zma-miR528 Versatile Regulation on Target mRNAs during Maize Somatic Embryogenesis

Eduardo Luján-Soto ¹, Vasti T. Juárez-González ¹, José L. Reyes ² and Tzvetanka D. Dinkova ^{1,*}



- ¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CdMx 04510, México; eduardolujan@quimica.unam.mx (E.L.-S.); vasti.juarez.gonzalez@gmail.com (V.T.J.-G.)
- ² Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor 62210, México; jose.reyes@ibt.unam.mx
- * Correspondence: cesy@unam.mx; Tel.: +52-55-5622-5277

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate the accumulation and translation of their target mRNAs through sequence complementarity. miRNAs have emerged as crucial regulators during maize somatic embryogenesis (SE) and plant regeneration. A monocot-specific miRNA, mainly accumulated during maize SE, is zma-miR528. While several targets have been described for this miRNA, the regulation has not been experimentally confirmed for the SE process. Here, we explored the accumulation of zma-miR528 and several predicted targets during embryogenic callus induction, proliferation, and plantlet regeneration using the maize cultivar VS-535. We confirmed the cleavage site for all tested zma-miR528 targets; however, *PLC1* showed very low levels of processing. The abundance of zma-miR528 slightly decreased in one month-induced callus compared to the immature embryo (IE) explant tissue. However, it displayed a significant increase in four-month sub-cultured callus, coincident with proliferation establishment. In callus-regenerated plantlets, zma-miR528 greatly decreased to levels below those observed in the initial explant. Three of the target transcripts (*MATE*, *bHLH*, and *SOD1a*) showed an inverse correlation with the miRNA abundance in total RNA samples at all stages. Using polysome fractionation, zma-miR528 was detected in the polysome fraction and exhibited an inverse distribution with the *PLC1* target, which was not observed at total RNA. Accordingly, we conclude that zma-miR528 regulates multiple target mRNAs during the SE process by promoting their degradation, translation inhibition or both.

Keywords: maize; miRNA-target regulation; somatic embryogenesis; zma-miR528



Citation: Luján-Soto, E.; Juárez-González, V.T.; Reyes, J.L.; Dinkova, T.D. MicroRNA Zma-miR528 Versatile Regulation on Target mRNAs during Maize Somatic Embryogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5310. <https://doi.org/10.3390/ijms22105310>

Academic Editor: Ivan Minkov

Received: 28 April 2021
Accepted: 15 May 2021
Published: 18 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Among the distinctive features of plants, the capacity to generate an embryo by several routes is one of their most remarkable abilities. As evidence, in the late 1950s, carrot somatic cells exposed to a synthetic medium containing auxins and other phytohormones produced large numbers of embryos; this *in vitro* reprogramming, known as somatic embryogenesis (SE), was later found to be common in many plant species and could vary depending on many factors such as the plant genotype, the identity of the initial cells, and the usage of different combinations of growth regulators. Regardless of these singularities, SE can be used for the mass production of economically important plants, clonal propagation, germplasm conservation, protoplast culture, and genetic improvement of agronomic traits [1]. Additionally, SE has also emerged as a model system to study morphological, genetic, and molecular mechanisms shared with zygotic embryo development [2].

In some plants such as maize (*Zea mays*), somatic embryogenesis requires intermediary steps of induction and proliferation of the embryogenic callus before plant regeneration. The precise molecular mechanisms controlling these stages remain elusive. Over the last decade, small RNAs (sRNAs) have been identified as central regulators of the SE process in several plant species. Among plant sRNAs, microRNAs (miRNAs) remain the most studied and reported during SE. Plant miRNAs are 20–22-nt sRNAs transcribed from *MIR* genes by

RNA polymerase II. Biogenesis enzymes successively process the primary transcripts into functional mature miRNAs that promote their complementary target silencing by cleavage or translational inhibition [3].

MiRNAs participate in SE by regulating the levels of many development-related transcription factors (TFs), components of hormone response pathways, and stress-response machinery found as essential for somatic to embryogenic transition in explant tissues. For example, in *Arabidopsis thaliana* SE induction, miR165 and miR166 target *PHABULOSA* (*PHB*) and *PHAVOLUTA* (*PHV*) mRNAs, encoding TFs that control the expression of a well-known SE marker and enhancer of the embryogenic potential *LEAFY COTYLE- DON 1* (*LEC1*) [4,5]. Another miRNA involved in *Arabidopsis* SE is miR393, which targets *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*TIR1*), encoding a receptor that participates in the auxin-regulated transcription of genes needed for proper SE induction [6]. In *Larix leptolepis*, overexpression of miR166a in somatic embryos resulted in the reduction of Class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP III) TFs that negatively impact the embryonic elongation and cotyledonary formation, leading to abnormal embryogenic development [7]; while miR156a overexpression in *Citrus sinensis* calli increased their embryogenic potential [8].

A substantial number of reports that have investigated the role of miRNAs (and other sRNAs) in SE are genome-wide approaches that describe significant changes in miRNA and mRNAs populations, but with no detailed experimental confirmation of their predicted targets and regulatory mechanisms during SE [9–12]. Previously, we globally examined the sRNA populations in immature embryos (IE) and derived embryogenic callus at different subculture times from the Mexican maize cultivar VS-535 [13]. We detected increases in abundance for several stress-related miRNAs (miR397, miR398, miR408, and miR528) toward the established proliferative stages of the callus. In particular, zma-miR528 was the most abundant miRNA in the explant (IE), with an initial decrement following induction and a further increase upon several subcultures. miR528 is restricted to monocots and was first described in rice [14,15]. Moreover, miR528 is one of the most abundant miRNAs in embryogenic calli for several plant species, including maize [15–17]. Multiple miR528 targets identified from different plant species have brought into focus the functional diversity of this miRNA [18]. A recent report showed that zma-miR528 affects lignin biosynthesis by targeting two copper-containing laccase transcripts, *ZmLACCASE3* (*ZmLAC3*) and *ZmLACCASE5* (*ZmLAC5*) under nitrogen luxury growth conditions (8 mM NO_3^-) in maize [19]. While an important number of targets have been predicted for this miRNA, only a few of them have been experimentally validated [16].

Here, we analyzed the accumulation patterns of zma-miR528 and some targets at total RNA level, and their polyribosomal distribution during SE of the maize cultivar VS-535. The abundance patterns of miR528 supported its relevance for target regulation at the proliferative stage of de-differentiated callus. The validated target transcripts encoding for *MATE*, *bHLH*, and *SOD1a* showed an inverse correspondence with the miRNA profile in total RNA samples. The inverse correlation for these targets was also evident in the independent process of maize seed imbibition and early germination. Importantly, miR528 was found at a higher proportion in the heavy polysome fractions in embryogenic callus and germinated embryo extracts, presenting an inverse correlation with the distribution of one putative target (*PLC1*), which did not present a negative correlation at total RNA level. All targets were validated for miR528-specific cleavage, suggesting that degradation is promoted for total or polysomal-bound transcripts. This study experimentally confirms several miR528 targets for maize SE and proposes versatile regulatory mechanisms for this miRNA at the RNA degradation and translation levels.

Results

1.1. Selection of Potential Targets Regulated by Zma-miR528

An initial approach to unveiling miRNA function is the identification of potential regulatory targets [10,20]. In maize, mature miR528 originates from two independent *MIR* genes, zma-*MIR528a* (MI0013240) and zma-*MIR528b* (MI0013239), located on chromo-

somes 1 and 9, respectively. *Zma*-miR528 mRNA targets were predicted using the psRNA Target program (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>, accessed on 23 February 2021) (Supplementary Materials, Additional File 1, Table S1) with the expectation threshold set at 4 to obtain a stringent search with high coverage [21]. The selection of targets for experimental validation was based on the appropriate miRNA-target pairing at the seed region (with penalization for G-U and other non-canonical pairings); a favorable secondary structure allowed access to the target site, and annotation of the target as a coding transcript [22] (see Supplementary Materials and Methods). Different transcripts with diverse functions and genomic locations were within the highly ranked targets (Figure 1a and Supplementary Material, Additional File 1, Table S1).

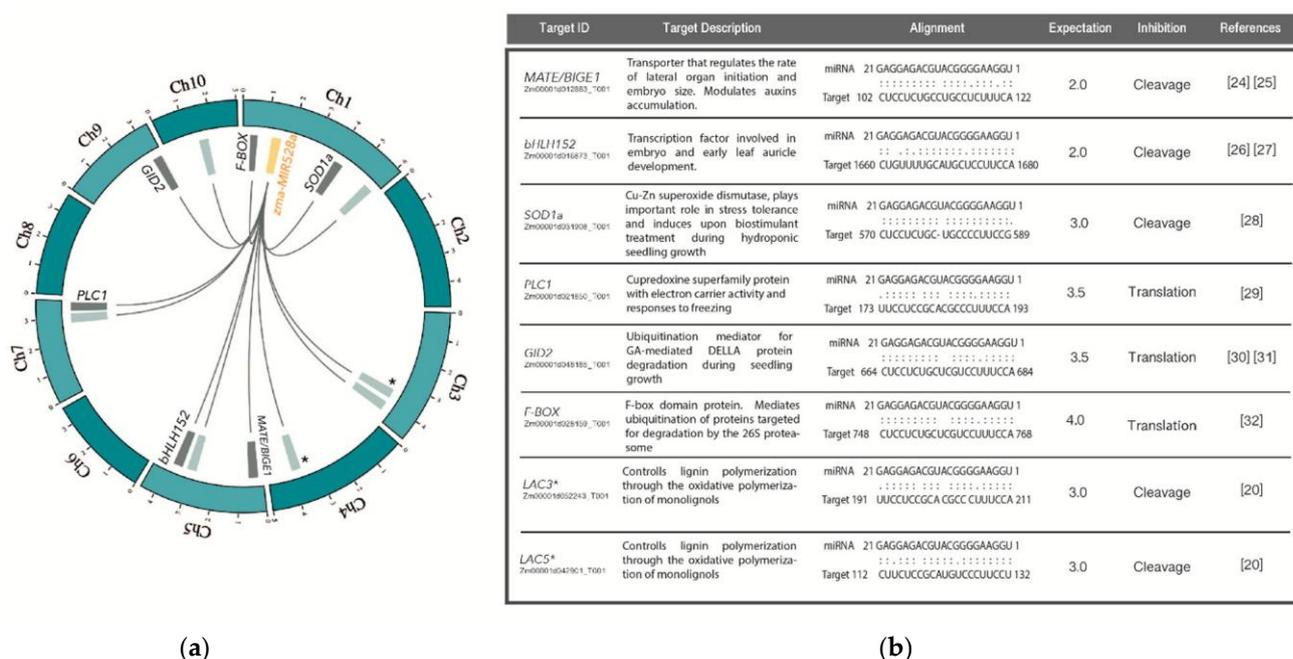


Figure 1. Target prediction for *zma*-miR528. (a) Circos plot between *zma*-miR528a and predicted targets showing their chromosomal location. The yellow-filled box represents the *MIR528a* gene location. Gray dark boxes refer to targets selected and analyzed in this study. For Circos plot construction, we used *zma*-*MIR528a* location only to illustrate the miRNA-target pairing, as both genes produce the same mature miRNA targeting the same transcripts. Pale gray boxes denote other putative targets not approached in our investigation. (*) Experimentally validated targets for *zma*-miR528 in a previous report: *ZmLAC3* (Zm00001d052243_T001); *ZmLAC5* (Zm00001d042901_T001). (b) List of the selected potential targets showing the recognition site pairing for *zma*-miR528 and their reported function in plant pathways according to several reports [19,23–31].

Novel putative targets selected for further experimental validation were *MULTIDRUGAND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/BIG EMBRYO 1* (*MATE/BIGE1*; Zm00001d012883_T001), *BASIC HELIX-LOOP-HELIX 152* (*bHLH152*; Zm00001d016873_T001), *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2 F-BOX* (*GID2*; Zm00001d048185_T001), and a *F-BOX CONTAINING PROTEIN* (*F-BOX*; Zm00001d028159_T001). As well, we included the previously described targets *SUPEROXIDE DISMUTASE 1a* (*SOD1a*; Zm00001d031908_T001) and *PLASTOCYANIN-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN* (*PLC1*; Zm00001d021850_T001), the accumulation of which was previously reported during hormone depletion and regeneration of maize somatic embryos [17]. All selected targets seem to participate in pathways closely associated with the SE process, such as auxin accumulation and transport, oxidative-stress response, embryo development, gibberellic acid perception, and protein degradation process (Figure 1b). Notably, *LACASSE 3* (*ZmLAC3* (Zm00001d052243_T001)) and *LACASSE 5* (*ZmLAC5* (Zm00001d042901_T001)), are experimentally validated and shown to

impact on maize plant lodging under luxury nitrogen growth conditions [19], were also found in our search (Figure 1b; Supplementary Material, Additional File 1, Table S1).

1.2. Experimental Verification of miRNA-Guided Cleavage of miR528 Targets Using 5'-RLM-RACE

To confirm whether zma-miR528 promotes cleavage of the selected targets, we performed 5'-RLM-RACE amplification and mapped the cleavage sites in the corresponding transcripts. The analysis demonstrated that the cleavage sites of *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, and *SOD1a* were at the nucleotide that pairs with the 10th and/or 11th nucleotide from the 5'-end of zma-miR528 (Figure 2). Moreover, smaller amounts of the miRNA-mediated cleavage product of *PLC1* were detected, which led us to think that this target might experience another mode of regulation additional to transcript cleavage (Supplementary Material, Figure S1). Although *GID2* and *F-BOX* cleavage products were not detected, we pursued further analysis to gain insight into their feasible regulation as guided by zma-miR528.

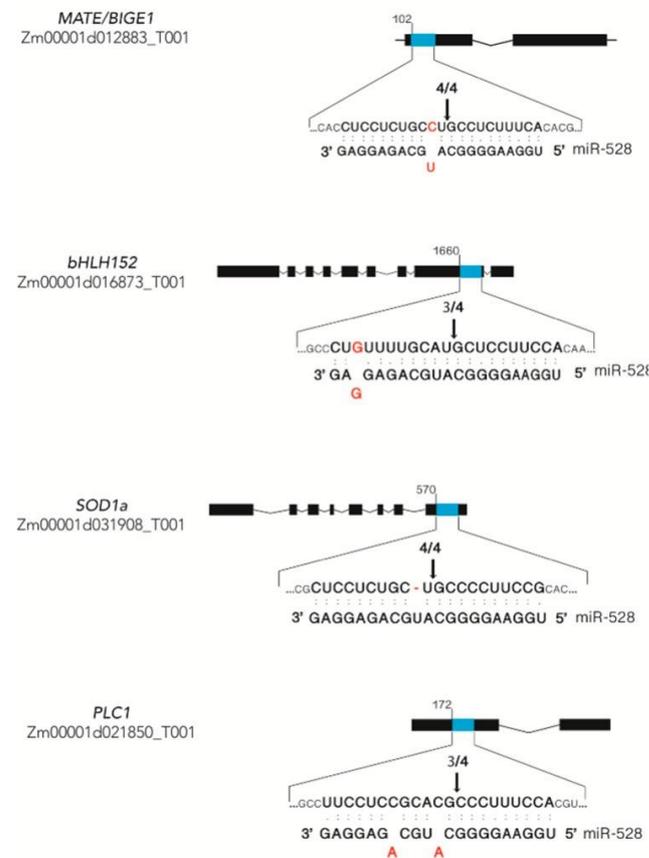


Figure 2. Experimentally validated cleavage sites for zma-miR528 targets. Validation for cleavage was obtained after 5'-RLM-RACE mapping, as described in the methods. The presence of cleavage products is shown in Supplementary Material, Figure S1. Arrows designate the cleavage sites, and the above numbers indicate the proportion of clones showing the same site. The upper strand represents targets with the complementary site (blue-filled fragment), and the bottom strand shows the pairing with the miRNA sequence. Mismatches are shown in red. (:) pairing, (.) non-canonical pairing.

1.3. Expression Patterns of Zma-miR528 and Targets during Maize Somatic Embryogenesis

To better understand the zma-miR528 abundance fluctuation during SE stages, and if any of the selected transcripts exhibited a typical miRNA-target correspondence, we examined their accumulation patterns by RT-qPCR in immature embryos used as explants (IE), induced embryogenic callus of one month (C1), proliferating callus subcultured for four months (C4), and leaves of regenerated plantlets (PL) (Figure 3a). A slight, non-significant decrease in miR528 levels was observed for induced embryogenic callus (C1)

compared to the original explant (IE) (Figure 3b); this could reflect the heterogenic nature of cells during calli induction and the remaining explant tissue that surrounds them. Indeed, a similar adjustment was reported for miR156, miR159, miR164, miR166, and miR319 families at early SE stages in *Arabidopsis thaliana* [9] and *Dimocarpus longan* [32]. However, in proliferating embryogenic calli (C4), miR528 importantly increased (~ almost 5-fold compared to previous stages, Figure 3b), consistent with our previous observation on a global analysis [13]. While miR528 remains highly accumulated at further subculture times (ten months after induction), a substantial reduction in abundance takes place in regenerated plantlets (PL), supporting its role in well-established embryogenic callus proliferation, but not in differentiated tissues, where a burst of development-related miRNA accumulation (miR156, miR160, miR164) has been described [17,33].

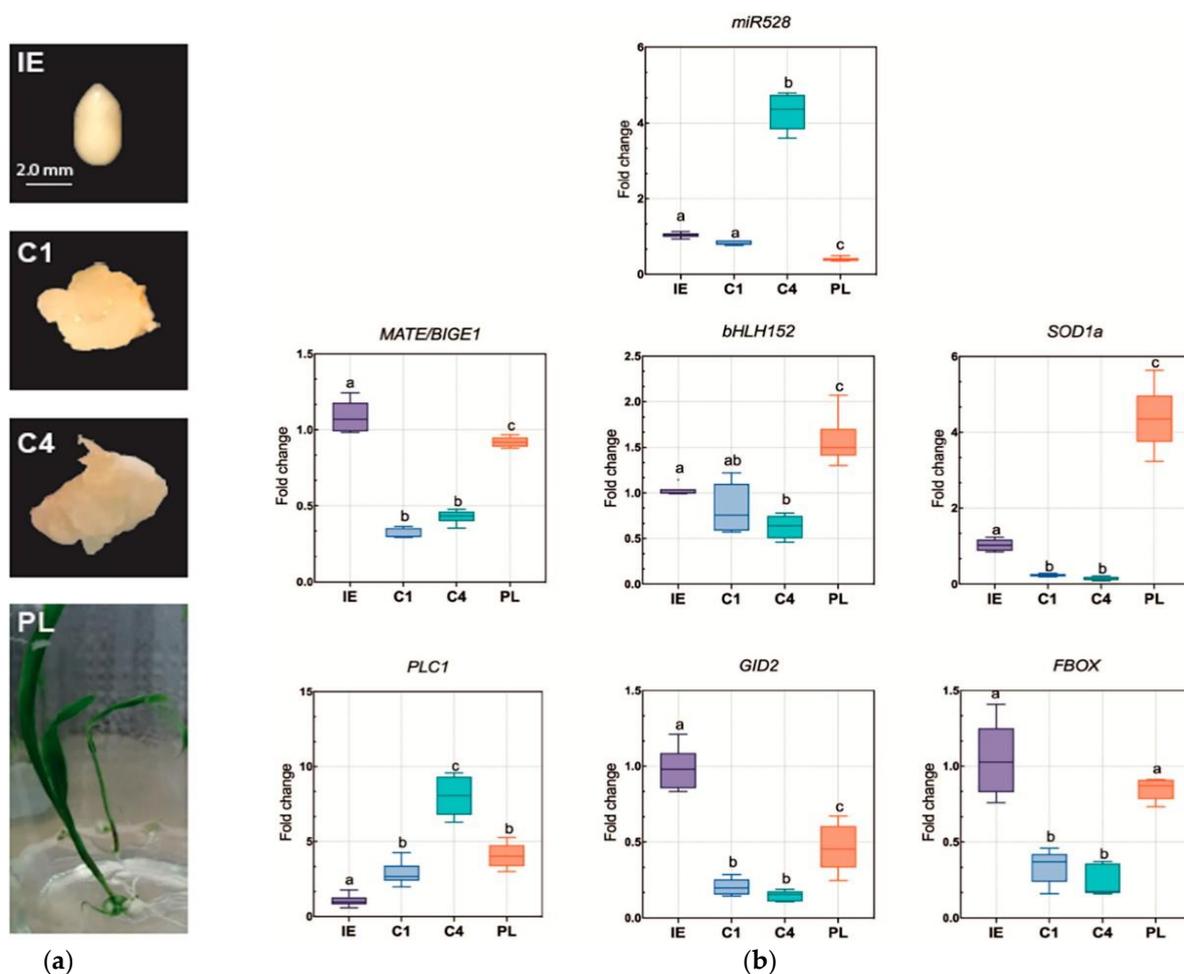


Figure 3. Zma-miR528 and mRNA target accumulation levels in VS-535 SE. (a) Different tissue samples obtained from maize SE stages used for miRNA and target profiling. Immature embryos (IE) at 15–18 days after pollination (DAP) used as initial explant for SE initiation. One month after induction, friable embryogenic callus (C1) was selected for sampling. Embryogenic calli were subcultured monthly, and proliferation was established after four months (C4). By gradual hormone reduction and photoperiod exposure, plantlet (PL) regeneration was achieved. (b) zma-miR528 and selected target levels were analyzed by RT-qPCR in total RNA from the samples mentioned above. Fold change represents abundance relative to IE and normalized either by U6 snRNA internal control (microRNA) or 18S rRNA (transcripts). The results were obtained from three independent biological replicates ($n = 3$) with three technical replicates for each one ($n = 9$). Data were analyzed by performing a one-way ANOVA with multiple comparisons by the Tukey post hoc test. Boxes that do not share at least an identical letter differ significantly ($p < 0.005$) from each other.

The quantification of selected zma-miR528 targets was performed in the same samples of RNA extraction. The abundance patterns of *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, *GID2*, and

FBOX presented some similarities at the assayed stages. All of them displayed significant downregulation during callus induction and in proliferating callus (C1 and C4), where miR528 was highly accumulated, but displayed upregulation in leaves of regenerated plantlets as miR528 decreased (Figure 3b). On the other hand, *PLC1* showed a divergent pattern compared to other targets, with constant increments from IE to C4 and a small but significant decrease in plantlets. The negative correlation between target transcript and *zma-miR528* profiles, considering all analyzed tissues, showed significant values only for *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, and *SOD1a* (Figure 4, Supplementary Material, Figure S2); which supports that degradation-mediated regulation of these targets by miR528 occurs during SE. *GID2* and *FBOX* transcripts tended to inverse correspondence only in C4 and PL, with poor statistical significance for a global inverse correlation (Supplementary Material, Figure S2). As expected, no correlation was obtained when comparing the miR528 pattern with *PLC1* accumulation during SE.

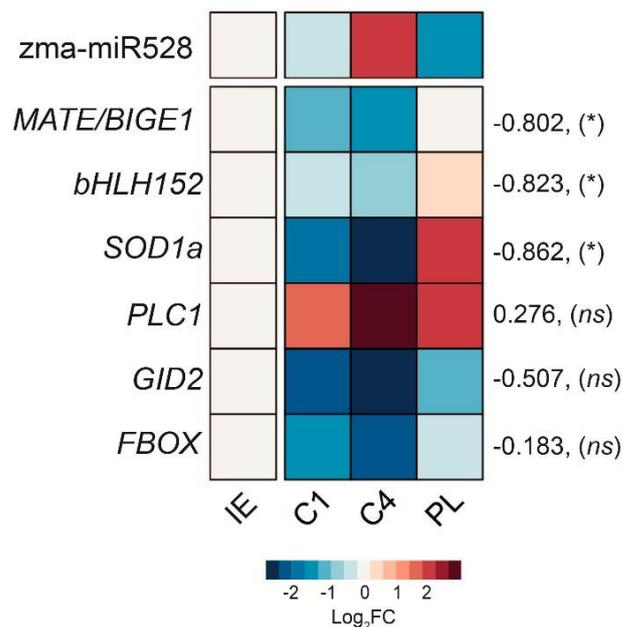


Figure 4. Inverse correlation between *zma-miR528* and some of the selected targets during VS-535 SE stages. The heatmap shows the log₂-fold-change (Log₂FC) of each transcript in samples. Numbers on the right side represent Pearson's coefficient (R) and the significance value (p) for the correlation analysis between the miRNA and each relative target abundance. * $p < 0.05$, ns: no significance. IE: immature embryo. C1: one-month embryogenic callus. C4: four-month embryogenic callus. PL: regenerated plantlet.

To test whether the observed correlations were also present in a different developmental model, we obtained expression profiles for *zma-miR528* and the selected targets during dry seed imbibition and first stages of germination, a natural developmental program exhibiting variations in miRNA populations [34]. As in SE stages, *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, and *SOD1a* presented similar accumulation patterns, indicating upregulation towards seedlings establishment concomitant with *zma-miR528* level reduction (Supplementary material, Figure S3). Interestingly, the same profile was exhibited by *PLC1*, with increasing transcript accumulation after the first 24 h of imbibition. Most importantly, the previously determined strong inverse correlations for *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, and *SOD1a* vs. miR528 were also present in the germination model, while *PLC1*, despite showing an inverse correlation, was not significant (Supplementary Material, Figures S3 and S4).

Overall, these findings suggest that miR528 exerts a versatile regulation over its targets, with some of them being preferentially regulated by degradation with clear inverse correlations, while others present only tendencies of inverse correspondence. Moreover,

the absence of inverse correspondence between miR528 and some targets could imply that translation inhibition may be selected over cleavage as the prime regulatory mechanism, as prior evidence has pointed out [17]. Still, we cannot discard the possibility that the absence of correlation could stem from a lack of co-occurrence of the miRNA and targets in the same cell types of the analyzed tissues.

1.4. Distribution of *Zma-miR528* and Its Targets in Polysome Profiles

Inhibition of translation is a fundamental miRNA regulatory mechanism that recently gained importance in plants. Several key reports have provided evidence that translational inhibition is a plausible mode of regulation executed by plant miRNAs. For instance, some miRNAs exhibited disproportionate effects on their targets, when comparing the transcript levels with the corresponding protein abundance [35]. Furthermore, the association of miRNAs and miRNA-AGO1 complexes with polysomes (where active translation takes place) has been described [36–38]. Previously, we reported the high accumulation of miR528 in maize embryogenic calli polysomal fractions [17]. Based on the absence of inverse correlation for some targets in total RNA, and considering the *zma-miR528* reported distribution in polysomal fractions, we evaluated the possible translational regulation by miR528 on some targets. (Figure 5).

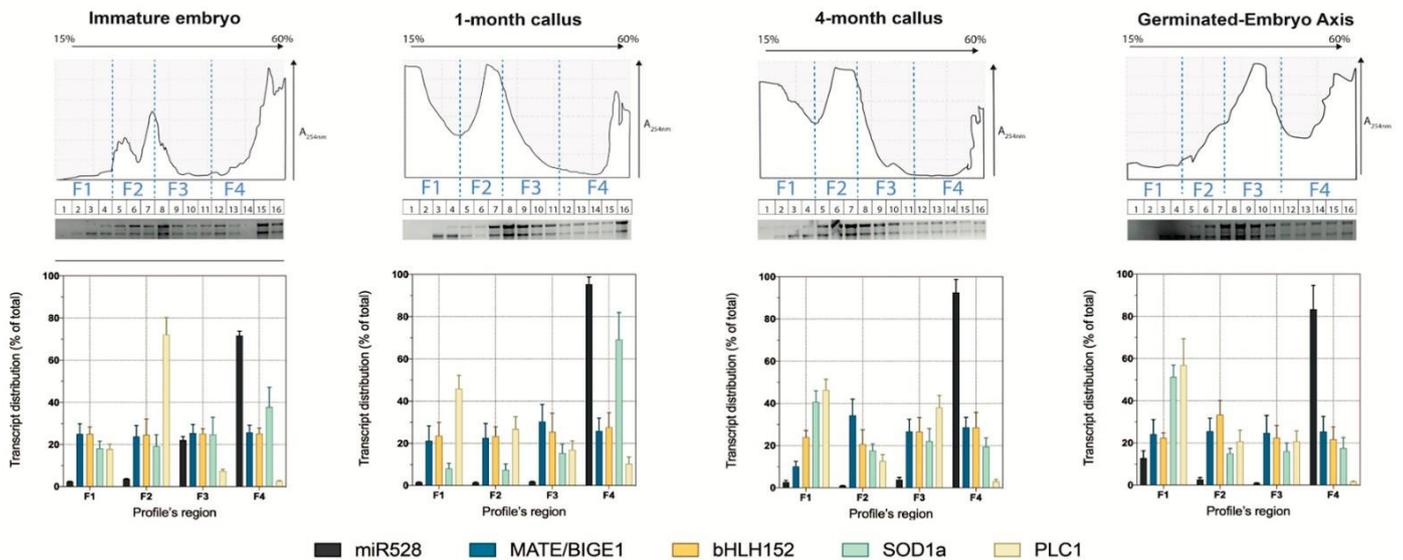


Figure 5. Distribution of *zma-miR528* and targets in polysomal fractions. Upper panels show profiles for the immature embryo, one-month callus, four-month callus, and germinated embryo axis. Each profile is composed of 16 minor fractions further pooled into broader fractions according to the absorbance profile and rRNA observation on depicted agarose gels: F1 (free RNA and ribonucleoproteins complexes), F2 (monosomes), F3 (light polysomes), and F4 (heavy polysomes). Lower panels display the distribution of miR528 and some targets in each fraction. The percentage level was calculated for each transcript using the lower Ct value as a normalizer. Error bars indicate \pm SD of two biological replicates with three technical replicates for each one ($n = 6$). A_{254 nm}: absorbance value at 254 nm wavelength.

The polysome profiles obtained on continuous sucrose gradients were divided into four main regions, representing distinct RNA pools. The F1 region was mainly composed of free RNA and small ribosomal subunit complexes; the F2 region was characterized by a well-defined monosome peak; the F3 comprised light and medium polysomes; the F4 region represented heavy polysomes. Polysomal profile fragmentation was made to evaluate miRNA and target transcripts distribution over complexes with different translation activities (Figure 5, upper panels). In all profiles, *zma-miR528* accumulated mainly in the heavy polysomes region, more than 80% located in F4 for callus samples (Figure 5). Instead, *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, and *SOD1a* targets were homogeneously distributed in all four regions of the profile, except for *SOD1a*, which for C1 had a higher abundance in

F4. This suggests no inverse correspondence of the translational status of these targets with respect to the zma-miR528 location. In contrast, *PLC1* showed a unique distribution, as it preferably accumulated in free RNA or monosome regions (F1 and F2, respectively) and much less in F4 (10% or less), which inversely mirrored zma-miR528 distribution. The lower amount of *PLC1* detected in polysomes could be due to an initial translation inhibition triggered by zma-miR528 in polysomal complexes, which subsequently derivates in target cleavage and processing, as suggested by the lower amplification of *PLC1* cleavage product in 5'-RLM-RACE, and the absence of negative correspondence between this target and zma-miR528 levels in total RNA. In consequence, we hypothesize that zma-miR528 could promote transcript cleavage and translation inhibition over its targets.

Discussion

Plant cell totipotency is a field with a long history of research. In vitro culture of somatic embryos became a powerful biotechnological tool for the propagation and genetic improvement of several plants, crops included. So far, distinct molecular, biochemical, and morphological mechanisms are required to establish and maintain proper SE. Among those pathways, the regulation exerted by miRNAs is essential for controlling key processes in SE [9,39,40]. Thus, different SE stages are characterized by the expression of specific miRNAs.

Previous reports highlighted some miRNA families changing their accumulation during SE of different maize cultivars [12,13,16]. Accordingly, we found that zma-miR528 considerably accumulated in 15-day-old immature embryos used as explants and decreased as SE induction occurred. However, a posterior ~5-fold induction occurred upon proliferation and establishment of an embryogenic callus during later subcultures. Similar accumulation profiles have been reported for other miRNAs, such as zma-miR167, zma-miR398, and zma-miR827, and ath-miR164a-c and ath-miR398a-c, during advanced induction of maize and *A. thaliana* SE, respectively [9,13]. Moreover, zma-miR528 has been reported as one of the highly accumulated miRNAs in long-term subcultures (up until ten months) of maize embryogenic callus, which might reflect the role of this and other miRNAs in maintaining the elevated proliferative state of healthy well-established embryogenic callus [12,13]. The upregulation of zma-miR528 could act as an oxidative stress response modulator (its original classification in plants such as *Oryza sativa*), as portions of the explant tissue experience mild oxidation before calli establishment [12,41].

The role of diverse miRNAs in almost any developmental plant process, including SE, has been approached by comparing the expression patterns of the mature miRNAs and their targets [1]. Particularly for zma-miR528, a wide range of potential targets exist, but few of them have been explored in detail. Here, we selected some of the predicted zma-miR528 targets, validated cleavage on a few of them and measured their transcript accumulation level during SE stages and seed imbibition. The zma-miR528-target inverse correlation or lack of it at particular stages, as well as the versatility of its regulatory mechanisms, expose the potential relevance of this maize miRNA, particularly enriched within the ES process (Figure 6). *MATE/BIGE1*, *bHLH152*, and *SOD1a* presented evident inverse correspondences with zma-miR528 levels in samples obtained from SE and early germination, which might imply that these targets are preferentially regulated by endonucleolytic cleavage. Indeed, miRNA-mediated cleavage products of these transcripts were easily detected when 5'-RLM-RACE was performed, consistent with the preferred plant miRNA mode of action and the significant repressive effect on target mRNA expression during developmental transitions and dedifferentiation processes [42].

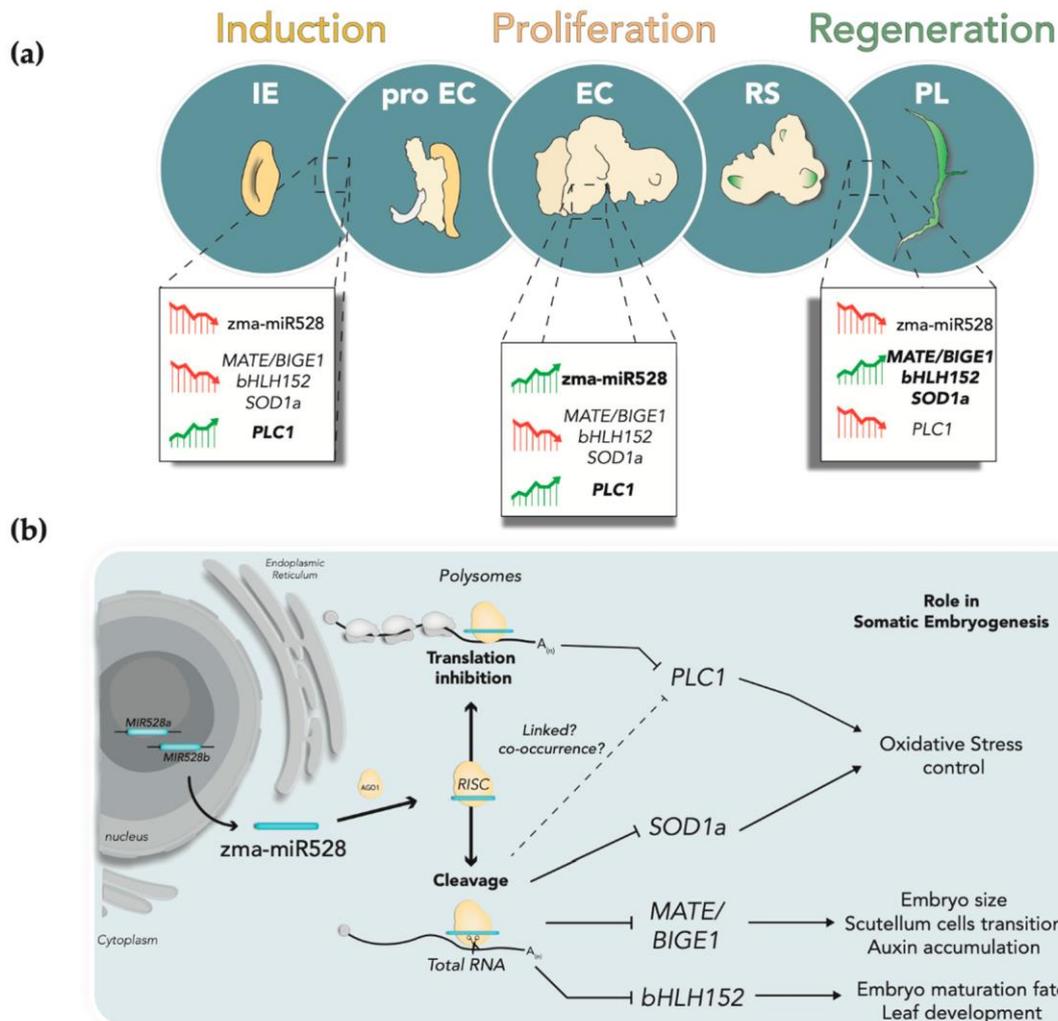


Figure 6. Mechanisms and impact of zma-miR528 target regulation during maize SE. (a) Zma-miR528 and its targets experience accumulation patterning during the induction, proliferation, and plantlet regeneration in maize SE. Upregulation: green upward arrow; downregulation: red downward arrow. IE: immature embryo (explant); proEC: pro embryogenic callus mass; EC: embryogenic callus; RS: regenerative spots; PL: regenerated plantlet. (b) Proposed model for zma-miR528 regulatory mechanisms exerted on targets. Mature miRNA arises from either of two *MIR528* genes present in maize. miRNA-RISC assembles either in the cytoplasm or on membrane-bound polysomes, where zma-miR528 directs target recognition to promote target cleavage or translational repression. Mechanism selection could depend on miRNA-target kinetic parameters or the presence/absence of certain accessory proteins in the RISC complex. However, either mechanism could be linked to the production of miRNA-mediated cleavage products, as suggested in the literature [38]. According to the target function, zma-miR528 could be involved in embryogenic calli proliferation by maintaining metabolic and physiologic processes required for SE.

Interestingly, *MATE/BIGE1* encodes a conserved transporter implicated in organ initiation and embryo size [23]. This loss-of-function mutation causes increased embryo size, early flowering, and accelerated lateral organ production. Moreover, *MATE/BIGE1* promotes an adequate transition to the expansion phase of scutellar cells during embryo development, a region from which maize embryogenic callus originated during the SE dedifferentiation step [33]. Thus, we propose that zma-miR528 might contribute to the delimitation of this region by controlling the abundance of *MATE/BIGE1* transcript to reach the callus establishment phase (Figure 6a). Additionally, *MATE/BIGE1* degradation promoted by zma-miR528 might stimulate auxin accumulation in proliferative embryogenic callus, as recent reports have confirmed that the overexpression of *ALTERED DEVELOPMENT*

PROGRAM 1 (ADP1), a *BIGE1* homologous gene in *A. thaliana*, causes a reduction in auxin level and diminishes its perception [43].

The functional characterization of several bHLH proteins in plants has been carried out mainly in *Arabidopsis* and rice (*Oryza sativa*), describing their roles in multiple cellular processes, such as embryo maturation, seed germination, flowering regulation, and stress response [44]. Furthermore, many *bHLH* factors are among the differentially expressed genes governing callus formation in maize SE [45]. According to our results, *bHLH152* was negatively regulated by zma-miR528 in well-established embryogenic calli until the regeneration of plantlets occurred. Similar downregulation of this target was observed during the early stages of SE using the inbred maize line CAL [45]. This TF has been associated with embryo maturation and early leaf development in maize [26]. The *Arabidopsis bHLH152* orthologue, *ROOTHAIRLESS LIKE-3 (LRL3)/bHLH82*, is principally involved in root-hair development [46]. During *Arabidopsis* SE induction, using the ecotype Col-0, the progressive reduction of *LRL3/bHLH82* level occurred as somatic embryos developed. In contrast, the steady expression of *LRL3/bHLH82* was observed when inducing SE from *tanmei/emb2757*, a mutant entirely lacking in vitro embryogenic response [47]. Therefore, the depletion of *bHLH152* levels by zma-miR528 might be involved in arresting the explant preestablished developmental pathway to allow dedifferentiation for SE (Figure 6b).

To date, several reports have supported the link between oxidative stress and SE [48]. Various authors consider H₂O₂ a cellular “second messenger” capable of inducing gene expression that leads to SE. It has also been shown that oxidative stress-inducing compounds promote endogenous auxin accumulation during the early dedifferentiation stage of SE in many plant species. Hence, a particular stress gradient is established in the explants during the cell dedifferentiation stage, guided by antioxidant enzymes scavenging reactive oxygen species that arise throughout the process [49,50]. In such a context, the downregulation of *SOD1a* caused by the zma-miR528 might cause the localized accumulation of H₂O₂ to promote specific expression programs and auxin accumulation that are crucial for embryogenic competence acquisition and maintenance during callus formation.

In agreement with our previous report [17], we corroborated a high accumulation of zma-miR528 in polysome fractions in all analyzed tissues. Several other functional miRNAs have been located in polysome fractions, providing evidence of translational control exerted by plant miRNAs [36,37]; the behavior of their targets has not been studied in such fractions. We hypothesized that some of the analyzed zma-miR528 targets might show opposite polysomal distribution between the SE stages, supporting translational control by the miRNA. Interestingly, *PLC1* was the only target that exhibited inverse distribution with zma-miR528 in polysomes, while the other targets roughly showed equal distribution across fractions. More notably, we could detect *PLC1* miRNA-mediated cleavage product, which may indicate that target excision occurs even when zma-miR528 is recruited to polysomes (Figure 6b). Interestingly, some reports have proposed that miRNA-guided degradation and translational arrest could be coupled in the cell, and the selection of the regulatory mechanism might depend on factors such as miRNA-target duplex subcellular location, recruitment of the mRNA transcript to polysomes, or assembly of suitable miRNA slicing machinery/complexes in aggregates that command the cleavage of transcripts [3]. This dual regulation has been proven for miR398, which mediates the cleavage and translational inhibition of mRNAs encoding COPPER CHAPERONE FOR SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (CCS1), the chaperone protein that is essential for generating the mature copper/zinc SODs in *Arabidopsis* [51]. Several reports have demonstrated that translation inhibition by plant miRNAs preferentially takes place on membrane-bound polysomes (MBPs) assisted by ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) and KATANIN 1 (KTN1) proteins [52]. Moreover, a recent report has revealed that target cleavage also occurs on MBPs, suggesting that both translational repression and endonucleolytic processing of miRNA targets co-occur at these subcellular domains [38]. Altogether, these findings might explain why we detected an inverse correspondence between zma-miR528 and *PLC1* only in polysome profiles. Correspondence between *PLC1* and miR528 levels was also reported. Li et al.

found that this target, formerly known as *ANTI-FREEZE PROTEIN (AFP)*, did not display inverse correlation with zma-miR528, as the accumulation of the miRNA and *AFP* transcript both increased in the later stages of seed development [53]. Such unusual regulation exerted over *PLC1* during maize SE might be implicated in oxidative state control, since plastocyanins work as redox capacitors that can accept, store, and donate electrons during reactions catalyzed by the antioxidant enzymes [54], suggesting an interplay between *PLC1* and the machinery controlling the oxidative gradient generation during SE.

Overall, this study addressed the differential regulation of one particular miRNA (zma-miR528) on diverse targets, and the plasticity of such control during the induction and proliferation of embryogenic calli within the maize SE process. Further research on the relevance of zma-miR528-mediated regulation on these and other targets in calli with distinct embryogenic potential, proliferative features and maize genotypes with contrasting embryogenic competence will contribute to a better comprehension of the role of miRNAs in SE, aiming at the improvement of in vitro plant propagation.

Materials and Methods

1.5. Plant Material and Tissue

All tissue samples were from the Mexican cultivar VS-535 *Tuxpeño (Zea mays L.)*. Plants were grown in a greenhouse using potting sacks with a commercial soil mixture (Sunshine) from March to early July (considered to be spring in Mexico) under a natural photoperiod (approximately 12 h light/12 h dark) and temperatures between 25 °C and 30 °C, with watering three times per week. After four months, ears were manually pollinated, and similar-sized embryos were collected 15 days after pollination (IE) from the middle part of the ears. Embryos were used for somatic embryogenesis induction, morphological characterization, and RNA isolation. For imbibition, dry seeds were placed on wet cotton for 24, 48 and 72 h in the dark at 28 °C. The embryo axes were manually obtained from the imbibed seeds. After excision, embryonic axes were frozen immediately in liquid nitrogen until use.

1.6. Callus Induction, Subculture and Plant Regeneration

Callus induction and subculture were performed as previously reported [12,17,33]. Samples were collected one month (C1) and four months (C4) after induction. Every 2–3 weeks, the embryogenic calli were subcultured on fresh proliferation medium N6P, containing 2 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg mL⁻¹ kinetin [55]. Regeneration took place using 8-month-old subcultures and followed the protocol reported by [55]. Segments of regenerated leaves were collected from the plantlets (PL) and immediately stored at 80 °C for subsequent analysis.

1.7. In-Silico Target Prediction for Zma-miR528

Zma-miR528 sequences were collected from the miRBase database (<http://www.mirbase.org>, release 22.1, accessed on 23 February 2021). The mature miRNA sequence UG-GAAGGGGCAUGCAGAGGAG corresponds to either zma-miR528a-5p or zma-miR528b-5p and was used to identify target transcripts with the psRNATarget Server (V2, 2017 release, <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/home>; accessed on 23 February 2021). Default parameters were chosen and the *Z. mays* transcript, the NSF-funded Maize Genome Sequencing Project, Release 5a, filtered set was selected as cDNA library [56]. Target description was retrieved from the Maize Genetics and Genomics Database (maizeGDB RefGen_v4; <https://www.maizegdb.org>, accessed on 25 February 2021). Selection criteria of putative targets for experimental validation and expression analysis were: (1) strong miRNA-target pairing in the seed region; (2) expectation value ≤ 4 and appropriate target accessibility value (UPE < 0); and (3) annotation of the targets as known protein-coding transcripts [21,22].

1.8. Total and Polysomal RNA Isolation

Total RNA was isolated from IE, C1, C4, PL, or imbibed axes in at least triplicate biological samples following the protocol reported by [57]. Column-sized-fractionation, clean-up and concentration were performed using the RNA Clean and Concentrator TM-5 kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. For polysome isolation and fractionation, nearly 1 g of each tissue was pulverized in liquid nitrogen with a sterile mortar and pestle. While still frozen, the powder was suspended in 10 mL of lysisbuffer (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 50 µg/mL cycloheximide, 0.5 mg/mL heparin, 0.5 µL/mL RNAsin, 50 µg/mL DTT, 1% µL Triton X-100), mixed by vortexing for 1 min and clarified by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was slowly layered onto 2 mL of sucrose cushion buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 60% sucrose and 0.05 mg/mL cycloheximide) in Ultra-Clear[®] polycarbonate tubes (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and centrifuged at 50,000 rpm in a pre-chilled fixed angle 80Ti rotor for about 3 h, at 4 °C. The ribosomal pellet was resuspended in 500 µL of DEPC-treated sterile water, layered onto 15–60% continuous sucrose gradient, and centrifuged in a pre-chilled SW40 rotor at 36,000 rpm for 2 h, at 4 °C. Fractionation and profile plotting were performed with an Auto Densi-Flow system connected to an absorbance detector (wavelength 254 nm: ISCO-UV) and a 2-channel recorder (LKB 2210 Bromma). RNA was isolated from each fraction as previously reported [58]. RNA concentration was determined by Nanodrop and quality was tested by agarose gel electrophoresis.

1.9. Experimental Target Validation by RLM-RACE

Total RNA was obtained from germinated embryo axes and 3 to 5 µg of column-cleaned RNA were used as starting material for cDNA production, using FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion, Austin, TX, USA) following the manufacturer's directions, omitting the alkaline phosphatase and acid pyrophosphatase steps. After adapter ligation, PCR amplification of cDNA fragments was achieved by nested reactions using gene-specific primers designed for each target, based on their coding sequence reported in maizeGDB. Individual PCR fragments were cloned, and independent clones were sequenced to identify the amplified product and determine the cleavage site.

1.10. RT-qPCR

For large (>200 nt) RNAs, reverse transcription (RT) was performed using an oligo (dT) primer and the Improm-II[®] reverse transcription system (Promega, Madison, WI, USA). Specific primers for each selected target were designed using Primer3Plus [59] with qPCR settings to amplify products containing the predicted miRNA-directed cleavage site (Supplementary material, Additional file 2, Table S2). For zma-miR528 amplification, stem-loop and forward primer were designed following previously reported recommendations [60]. Small RNAs (<200 nt) sample fractions were used in a pulsed stem-loop RT for zma-miR528 and U6 snRNA amplification. qPCR was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix in a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA). Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using IE (for SE samples) or dry (0 h) embryo axes (for imbibition stages) as references, and 18S rRNA (for targets) or U6 snRNA (for miRNA) as internal housekeeping controls [61]. Polysomal distribution was calculated as transcript abundance (% of total) along pooled fractions using the fraction with a lower Ct value as a reference. Results obtained for each condition were compared using a one-way analysis of variance (one-way ANOVA) with a Tukey Multiple Comparison post hoc test for significance.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22105310/s1>. Figure S1: gel image of 5' RLM-RACE showing the amplified products (ranging from 100–200 bp) after consecutive PCR reactions, Figure S2: Pearson correlation analysis between zma-miR528 and the selected targets during SE, Figure S3: differential accumulation of

zma-miR528 and target transcripts in dry (0 h) and imbibed (24–72h) embryonic axes, Figure S4: negative correlation between zma-miR528 and the selected targets abundances during maize seed imbibition. Table S1: putative targets for zma-miR528 identified using psRNATarget. Table S2: oligonucleotides used in this study.

Author Contributions: Conceptualization, E.L.-S. and T.D.D.; methodology, E.L.-S., V.T.J.-G. and J.L.R.; formal analysis, E.L.-S. and T.D.D.; investigation, E.L.-S.; writing—original draft preparation, E.L.-S.; writing—review and editing, E.L.-S., V.T.J.-G., J.L.R. and T.D.D.; supervision, T.D.D.; funding acquisition, T.D.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN214118, IN218921 and Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP 5000-9118. The APC was funded by PAPIIT IN218921.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We deeply thank Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores for excellent technical support in embryogenic callus induction and subcultures. We are particularly grateful for the assistance given by Carlos de la Rosa in 5'RACE experiments. We also acknowledge the use of core facilities at Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM, as well as valuable support provided by Jorge Herrera-Díaz.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Siddiqui, Z.H.; Abbas, Z.K.; Ansari, M.W.; Khan, M.N. The role of miRNA in somatic embryogenesis. *Genomics* **2019**, *111*, 1026–1033. [[CrossRef](#)]
2. Leĳjak-Levanić, D.; Mihaljević, S.; Bauer, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37*, 1–14. [[CrossRef](#)]
3. Yu, Y.; Jia, T.; Chen, X. The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytol.* **2017**, *216*, 1002–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Elhiti, M.; Stasolla, C.; Wang, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol.—Plant.* **2013**, *49*, 631–642. [[CrossRef](#)]
5. Ge, F.; Luo, X.; Huang, X.; Zhang, Y.; He, X.; Liu, M.; Lin, H.; Peng, H.; Li, L.; Zhang, Z.; et al. Genome-wide analysis of transcription factors involved in maize embryonic callus formation. *Physiol. Plant.* **2016**, *158*, 452–462. [[CrossRef](#)]
6. Wojcik, 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Li, Z.X.; Li, S.G.; Zhang, L.; Han, S.; Li, W.F.; Xu, H.; Yang, W.; Liu, Y.; Fan, Y.; Qi, L.W. Over-expression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2016**, *127*, 461–473. [[CrossRef](#)]
8. Long, J.M.; Liu, C.Y.; Feng, M.Q.; Liu, Y.; Wu, X.M.; Guo, W.W. miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 2979–2993. [[CrossRef](#)]
9. Szyrajew, K.; Bielewicz, D.; Dolata, J.; Wojcik, A.M.; Nowak, K.; Szczygiel-Sommer, A.; Szweykowska-Kulinska, Z.; Jarmolowski, A.; Gaj, M.D. MicroRNAs Are Intensively Regulated during Induction of Somatic Embryogenesis in Arabidopsis. *Front. Plant. Sci.* **2017**, *8*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Chen, C.J.; Liu, Q.; Zhang, Y.C.; Qu, L.H.; Chen, Y.Q.; Gautheret, D. Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 538–547. [[CrossRef](#)]
11. Chu, Z.; Chen, J.; Xu, H.; Dong, Z.; Chen, F.; Cui, D. Identification and Comparative Analysis of microRNA in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Callus Derived from Mature and Immature Embryos during In vitro Culture. *Front. Plant. Sci.* **2016**, *7*, 1302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Juarez-Gonzalez, V.T.; Lopez-Ruiz, B.A.; Baldrich, P.; Lujan-Soto, E.; Meyers, B.C.; Dinkova, T.D. The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14511. [[CrossRef](#)]
13. Alejandri-Ramirez, N.D.; Chavez-Hernandez, E.C.; Contreras-Guerra, J.L.; Reyes, J.L.; Dinkova, T.D. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeno maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant. Physiol. Biochem.* **2018**, *122*, 78–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liu, B.; Li, P.; Li, X.; Liu, C.; Cao, S.; Chu, C.; Cao, X. Loss of function of OsDCL1 affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice. *Plant. Physiol.* **2005**, *139*, 296–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
15. Wu, J.; Yang, Z.; Wang, Y.; Zheng, L.; Ye, R.; Ji, Y.; Zhao, S.; Ji, S.; Liu, R.; Xu, L.; et al. Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *Elife* **2015**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 16. Shen, Y.; Jiang, Z.; Lu, S.; Lin, H.; Gao, S.; Peng, H.; Yuan, G.; Liu, L.; Zhang, Z.; Zhao, M.; et al. Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 425–430. [[CrossRef](#)]
 17. Chavez-Hernandez, E.C.; Alejandri-Ramirez, N.D.; Juarez-Gonzalez, V.T.; Dinkova, T.D. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 18. Chen, C.; Liu, Y.; Xia, R. Jack of Many Trades: The Multifaceted Role of miR528 in Monocots. *Mol. Plant.* **2019**, *12*, 1044–1046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 19. Sun, Q.; Liu, X.; Yang, J.; Liu, W.; Du, Q.; Wang, H.; Fu, C.; Li, W.X. MicroRNA528 Affects Lodging Resistance of Maize by Regulating Lignin Biosynthesis under Nitrogen-Luxury Conditions. *Mol. Plant.* **2018**, *11*, 806–814. [[CrossRef](#)]
 20. Yang, X.; Wang, L.; Yuan, D.; Lindsey, K.; Zhang, X. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 1521–1536. [[CrossRef](#)]
 21. Axtell, M.J.; Meyers, B.C. Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data. *Plant Cell* **2018**, *30*, 272–284. [[CrossRef](#)]
 22. Srivastava, P.K.; Moturu, T.R.; Pandey, P.; Baldwin, I.T.; Pandey, S.P. A comparison of performance of plant miRNA target prediction tools and the characterization of features for genome-wide target prediction. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 23. Suzuki, M.; Sato, Y.; Wu, S.; Kang, B.H.; McCarty, D.R. Conserved Functions of the MATE Transporter BIG EMBRYO1 in Regulation of Lateral Organ Size and Initiation Rate. *Plant Cell* **2015**, *27*, 2288–2300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Upadhyay, N.; Kar, D.; Datta, S. A multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter modulates auxin levels in root to regulate root development and promotes aluminium tolerance. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 745–759. [[CrossRef](#)]
 25. Vendramin, S.; Huang, J.; Crisp, P.A.; Madzima, T.F.; McGinnis, K.M. Epigenetic Regulation of ABA-Induced Transcriptional Responses in Maize. *G3 (Bethesda)* **2020**, *10*, 1727–1743. [[CrossRef](#)]
 26. Zhang, T.; Lv, W.; Zhang, H.; Ma, L.; Li, P.; Ge, L.; Li, G. Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Mauro, S.; Van Eycken, F.; Challou, N.; Lucas, P.; L’Oiseau, M. Characterization of new maize chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoforms by high resolution native two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Identification of chilling responsive chloroplastic superoxide dismutase isoforms. *Physiol. Plant.* **2005**, *124*, 323–335. [[CrossRef](#)]
 28. De Rienzo, F.; Gabdoulline, R.R.; Menziani, M.C.; Wade, R.C. Blue copper proteins: A comparative analysis of their molecular interaction properties. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1439–1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 29. Alexandrov, N.N.; Brover, V.V.; Freidin, S.; Troukhan, M.E.; Tatarinova, T.V.; Zhang, H.; Swaller, T.J.; Lu, Y.P.; Bouck, J.; Flavell, R.B.; et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol. Biol.* **2009**, *69*, 179–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 30. Zhang, X.; Gonzalez-Carranza, Z.H.; Zhang, S.; Miao, Y.; Liu, C.J.; Roberts, J.A. F-Box Proteins in Plants. *Annu. Plant Rev.* **2019**, *2*, 307–328. [[CrossRef](#)]
 31. Jia, F.; Wu, B.; Li, H.; Huang, J.; Zheng, C. Genome-wide identification and characterisation of F-box family in maize. *Mol. Genet. Genom.* **2013**, *288*, 559–577. [[CrossRef](#)]
 32. Xu, X.; Chen, X.; Chen, Y.; Zhang, Q.; Su, L.; Chen, X.; Chen, Y.; Zhang, Z.; Lin, Y.; Lai, Z. Genome-wide identification of miRNAs and their targets during early somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4626. [[CrossRef](#)]
 33. Lopez-Ruiz, B.A.; Juarez-Gonzalez, V.T.; Sandoval-Zapotitla, E.; Dinkova, T.D. Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during Staggered In Vitro Plant Regeneration of Tuxpeno VS-535 Maize Cultivar. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Wang, L.; Liu, H.; Li, D.; Chen, H. Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 35. Brodersen, P.; Sakvarelidze-Achard, L.; Bruun-Rasmussen, M.; Dunoyer, P.; Yamamoto, Y.Y.; Sieburth, L.; Voinnet, O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **2008**, *320*, 1185–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 36. Lanet, E.; Delannoy, E.; Sormani, R.; Floris, M.; Brodersen, P.; Crete, P.; Voinnet, O.; Robaglia, C. Biochemical Evidence for Translational Repression by *Arabidopsis* MicroRNAs. *Plant Cell* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 37. Li, S.; Liu, L.; Zhuang, X.; Yu, Y.; Liu, X.; Cui, X.; Ji, L.; Pan, Z.; Cao, X.; Mo, B.; et al. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* **2013**, *153*, 562–574. [[CrossRef](#)]
 38. Yang, X.; You, C.; Wang, X.; Gao, L.; Mo, B.; Liu, L.; Chen, X. Widespread occurrence of microRNA-mediated target cleavage on membrane-bound polysomes. *Genome Biol.* **2021**, *22*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 39. Wu, X.M.; Kou, S.J.; Liu, Y.L.; Fang, Y.N.; Xu, Q.; Guo, W.W. Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA- and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 383–394. [[CrossRef](#)]

-
40. Yang, J.; Liu, X.; Xu, B.; Zhao, N.; Yang, X.; Zhang, M. Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea*. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 41. Garrocho-Villegas, V.; de Jesus-Olivera, M.T.; Quintanar, E.S. Maize somatic embryogenesis: Recent features to improve plant regeneration. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *877*, 173–182. [[CrossRef](#)]
 42. Park, J.H.; Shin, C. MicroRNA-directed cleavage of targets: Mechanism and experimental approaches. *BMB Rep.* **2014**, *47*, 417–423. [[CrossRef](#)]
 43. Li, R.; Li, J.; Li, S.; Qin, G.; Novak, O.; Pencik, A.; Ljung, K.; Aoyama, T.; Liu, J.; Murphy, A.; et al. ADP1 affects plant architecture by regulating local auxin biosynthesis. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1003954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 44. Heim, M.A.; Jakoby, M.; Werber, M.; Martin, C.; Weisshaar, B.; Bailey, P.C. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **2003**, *20*, 735–747. [[CrossRef](#)]
 45. Du, X.; Fang, T.; Liu, Y.; Huang, L.; Zang, M.; Wang, G.; Liu, Y.; Fu, J. Transcriptome Profiling Predicts New Genes to Promote Maize Callus Formation and Transformation. *Front. Plant. Sci.* **2019**, *10*, 1633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Karas, B.; Amyot, L.; Johansen, C.; Sato, S.; Tabata, S.; Kawaguchi, M.; Szczyglowski, K. Conservation of lotus and Arabidopsis basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant. Physiol.* **2009**, *151*, 1175–1185. [[CrossRef](#)]
 47. 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*, e69261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 48. Zavattieri, M.A.; Federico, A.M.; Lima, M.; Sabino, R.; Arnholdt-Schmitt, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron. J. Biotechnol.* **2010**, *13*, 1–9. [[CrossRef](#)]
 49. Kairong, C.; Ji, L.; Gengmei, X.; Jianlong, L.; Lihong, W.; Yafu, W. Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2002**, *68*, 187–193. [[CrossRef](#)]
 50. Prudente, D.d.O.; Batista de Souza, L.; Paiva, R. Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* **2019**, *90*, 483–487. [[CrossRef](#)]
 51. Beauclair, L.; Yu, A.; Bouche, N. microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2010**, *62*, 454–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 52. Iwakawa, H.O.; Tomari, Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 651–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 53. Li, D.; Liu, Z.; Gao, L.; Wang, L.; Gao, M.; Jiao, Z.; Qiao, H.; Yang, J.; Chen, M.; Yao, L.; et al. Genome-Wide Identification and Characterization of microRNAs in Developing Grains of *Zea mays* L. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 54. Gideon, D.A.; Nirusimhan, V.; Manoj, K.M. Are plastocyanin and ferredoxin specific electron carriers or generic redox capacitors? Classical and murburn perspectives on two photosynthetic proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 55. Lopez-Ruiz, B.A.; Juarez-Gonzalez, V.T.; Chavez-Hernandez, E.C.; Dinkova, T.D. MicroRNA Expression and Regulation During Maize Somatic Embryogenesis. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1815*, 397–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 56. Dai, X.; Zhuang, Z.; Zhao, P.X. psRNA Target: A plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W49–W54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 57. Wang, G.; Wang, G.; Zhang, X.; Wang, F.; Song, R. Isolation of high quality RNA from cereal seeds containing high levels of starch. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 159–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 58. Martinez-Silva, A.V.; Aguirre-Martinez, C.; Flores-Tinoco, C.E.; Alejandri-Ramirez, N.D.; Dinkova, T.D. Translation initiation factor AteIF(iso)4E is involved in selective mRNA translation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31606. [[CrossRef](#)]

-
59. Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W71–W74. [[CrossRef](#)]
 60. Chen, C.; Ridzon, D.A.; Broomer, A.J.; Zhou, Z.; Lee, D.H.; Nguyen, J.T.; Barbisin, M.; Xu, N.L.; Mahuvakar, V.R.; Andersen, M.R.; et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e179. [[CrossRef](#)]
 61. Rao, X.; Huang, X.; Zhou, Z.; Lin, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinform. Biomath.* **2013**, *3*, 71–85.



Article

Transcriptional regulation of *zma-MIR528a* by action of nitrate and auxin in maize

Eduardo Luján-Soto¹, Paola I. Aguirre de la Cruz¹, Vasti T. Juárez-González^{1,2}, José L. Reyes³, María de la Paz Sanchez⁴ and Tzvetanka D. Dinkova^{1*}

Citation: Luján-Soto, E.; de la Cruz, A.; Juárez-González, V.T.; Reyes, J.L.; de la Paz Sanchez, M.; Dinkova, T.D. Transcriptional regulation of *zma-MIR528a* by action of nitrate and auxin in maize. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CdMx, México; eduardolujan@quimica.unam.mx (E.L.S.); paola.aguirre9915@gmail.com (P.I.A.C.)

² Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 75007, Sweden; vasti.juarez.gonzalez@gmail.com (V.T.J.-G.)

³ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor 62210, Mexico; jose.reyes@ibt.unam.mx (J.L.R.)

⁴ Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, México; mpsanchez@ieecologia.unam.mx (M.P.S.)

* Correspondence: cesy@unam.mx (T.D.D.); Tel.: +52 55 5622 5277

Abstract: In recent years, miR528, a monocot-specific miRNA, has been assigned multifaceted roles during development and stress response in several plant species. Yet, the signals regulating its expression have not been described. Here we analyzed the *zma-MIR528a* promoter region and found conserved transcription factor binding sites related to diverse signaling pathways, including the nitrate (TGA1/4) and auxin (AuxRE) response networks. Accumulation of both, pre-miR528a and mature miR528, was up-regulated by exogenous nitrate and auxin treatments during imbibition, germination, and maize seedling establishment. Functional promoter analyses demonstrated that TGA1/4 and AuxRE sites are required for transcriptional induction by both stimuli. Overall, our findings of the nitrogen and auxin-induced *zma-MIR528a* expression through *cis*-regulatory elements in its promoter contribute to the knowledge of miR528 regulome.

Keywords: auxin; auxin response element (AuxRE); nitrate stimulus; TGA1; transcription regulation; *zma-MIR528*

1. Introduction

Global analyses performed on several plant species have revealed that up to 90% of their genome is transcribed, although only a small fraction of the transcripts correspond to protein coding RNAs (mRNAs). The remaining transcripts (non-coding RNAs, ncRNAs) have emerged as central regulators of different molecular programs implicated in plant development, growth, and stress response. Several types of ncRNAs with different functions have been described, among which, microRNAs (miRNAs) of 20 to 24 nt length are known to control gene expression at post-

transcriptional level by inhibiting the accumulation or translation of specific mRNA targets. Like protein-coding genes, transcription of *MIR* genes is controlled by the action of the DNA-dependent RNA polymerase II (Pol II) along with general and specific transcription factors (TFs; extensively reviewed by [4]). A capped and polyadenylated primary miRNA transcript (pri-miRNA) is processed inside Dicing bodies (D-bodies) formed by proteins such as DICER LIKE-1 (DCL1), double-stranded RNA-binding protein HYPONASTIC LEAVES (HYL1) and the structural protein SERRATE (SE), among others. Sequential processing originates the stem-loop precursor (pre-miRNA) that eventually produces a mature miRNA associated with ARGONAUTE 1 (AGO1) protein to assemble the RNA-induced silencing complex (RISC; broadly reviewed in [4,5]).

Most plant miRNAs have been studied in their mature form with a primary focus on their target prediction and validation [6-8]. Their contribution to plant development and growth has been denoted through regulating particular targets, that act as key players in controlling phase transition, biotic and abiotic stress response, nutrient homeostasis, and many other processes [9-13]. In contrast, just a few studies have focused on the regulation of *MIR* gene expression [14-16].

So far in maize (*Zea mays*), multiple miRNAs have been described as part of diverse cellular and developmental processes. One of them is zma-miR528, a monocot-specific miRNA, initially reported in rice. This miRNA displays a wide spectrum of functions by targeting distinct mRNA transcripts in different species [1,17-21]. Its function and transcriptional regulation have been more extensively studied in rice [16,18]. Os-miR528 is codified by a single gene and becomes highly accumulated upon vegetative to reproductive transition, opposite to the miR156 accumulation pattern [18]. In this work, the authors nicely demonstrated that Os-miR528 is regulated during plant development, at transcriptional level by the miR156 target Os-SPL9 and at post-transcriptional level by aging-dependent alternative splicing of the pri-miRNA. They also found that *cis*-elements in miR528 gene promoters vary among different rice accessions, correlating with variable expression levels of the mature miRNA. Such complex and dynamic control of miR528 transcription awaits further exploration.

In maize, mature miR528 levels significantly increase during dry seed imbibition and drops upon germination completion [22]. It is also affected by external nitrogen supply, as seedlings grown under excess nitrogen conditions presented higher levels of this miRNA than those grown in a nitrogen-deficient media [20]. The regulation of specific miR528 targets, copper-containing laccase transcripts (*ZmLAC3* and *ZmLAC5*), affects the lignin biosynthesis and correlates with plants being prone to lodging when miR528 accumulates due to high nitrate growing conditions. Furthermore, higher miR528 levels were observed during maize embryo development and maturation [23], as well as over the course of embryo dedifferentiation [24] during maize somatic embryogenesis (SE). Likewise, in well-established embryogenic calli, miR528 regulates the abundance of target mRNAs involved in oxidative stress, auxin accumulation and differentiation. However, its level is reduced by hormone depletion during *in vitro* plantlet regeneration [25].

Even though miR528 works as a central regulatory component in several pathways [26], little is known about the regulatory elements driving its expression in maize. Here we found that during seed germination of the maize cultivar VS-535, miR528 is mostly derived from expression of the zma-*MIR528a* locus. Exploration of the zma-*MIR528a* promoter region revealed the presence of conserved transcription factor binding sites (TFBS) related to diverse signaling pathways, including the nitrate (TGA1/4) and auxin (AuxRE) response networks. Accumulation of both, pre-miR528a and mature miR528, was up-regulated by exogenous nitrate and auxin treatments during imbibition, germination, and seedling establishment. Partial 5' promoter and specific TFBS deletion analyses demonstrated that TGA1/4 and AuxRE boxes are needed for transcriptional induction under both stimuli. Our findings contribute to understand a regulatory network that controls zma-*MIR528* expression in response to previously reported stimuli and settles specific miRNA accumulation profiles in maize. This work also adds to broaden the knowledge of factors regulating *MIR* gene expression in plants.

between precursors among species. Pre-miR528a and pre-miR528b from maize clustered in a well-defined clade together with species from the *Panicoideae* subfamily like *Sorghum bicolor* (Sbi), *Panicum virgatum* (Pvi), *Setaria italic* (Sit) and *Saccharum* hybrid cultivar (**Figure 1**). Conversely, precursors such as the one present in banana (Mac-premiR528), showed a more distant evolutive relationship with sequences from maize, in agreement with previous reports [1]. The high degree of conservation is also noticeable by exploring the precursor folding, where sequences closely related to zma-premiR528a deployed mispairing at positions 12th and 16th of the duplex region, leading to similar secondary structures (**Supplementary Material, Figure S1**). Altogether, these results indicate that precursors and mature miR528 are highly conserved among monocots at sequence and structural levels, contrasting with their target diversity between species.

2.2. Identification of promoter cis-acting elements in zma-MIR528a

Although multiple miRNAs have been described in maize, regulatory regions for most *MIR* genes remain elusive. According to miRBase (release 22.1) there are two different precursors for miR528 in maize, corresponding to zma-MIR528a and zma-MIR528b located on chromosomes 1 and 9, respectively [21]. Our first approach for their promoter description was to experimentally identify the transcription start site (TSS) by taking advantage of the pri-miRNA 5'-CAP modification. Decapping and adapter ligation of imbibed seed RNA followed by RT and nested PCRs showed a fragment of about 300 nt, absent in the un-decapped sample (minus TAP control, **Figure 2A**). Cloning and sequencing of the amplification products allowed us to define the TSS position on the annotated sequence for *MIR528a*. The sequence corresponding to *MIR528b* pri-miRNA was not recovered, even though the 5' RLM-RACE protocol was performed using primers matching both genes. Sequenced clones showed three alternative start sites with a preference for the adenine located 89 bp upstream of the pre-miR528a sequence previously annotated in databases (**Figure 2B**). To corroborate our findings, we analyzed public CAGE-Seq (Cap Analysis Gene Expression and deep Sequencing) data [27]. We found a sharp cluster of CAGE-TSS reads upstream of the pre-miR528a sequence with the dominant TSS position concurrent with our 5' RLM-RACE results (**Supplementary Material, Figure S2A**).

Once the TSS was defined, we analyzed the promoter sequences of zma-MIR528a and homologous genes from different species to find putative TFBS (**Supplementary Material, Figure S3A; Table S2**). Only five of the analyzed sequences (zma-MIR528a included) presented a TATA box core element. In contrast, a higher number of genes displayed a CATT regulatory box within their promoter sequence (**Supplementary Material, Figure S3B**). Furthermore, several *MIR528* promoter regions (~1500 bp upstream of TSS) displayed conserved binding motifs for TFs involved in cytokinin response (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS, ARR1), ABA signaling (ABA Response Elements, ABRE) [28], copper homeostasis (CuRE) [29], vascular tissue formation and function (DNA-binding with one finger, Dof TFs) [30] (**Figure 2C; Supplementary Material, Figure S3B**).

Notably, the zma-MIR528a promoter harbors two TGACG motifs known as binding sites for the TGACG-BINDING FACTORS 1/4 (TGA1/4), which are important regulatory components for nitrate responses in *A. thaliana* [31]. Also, the zma-MIR528a promoter presented one TGTCTC motif (**Figure 2C**), defined as auxin response element (AuxRE), recognized by AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) proteins [32]. Both, nitrate and auxin signaling routes are directly involved in reported experimental

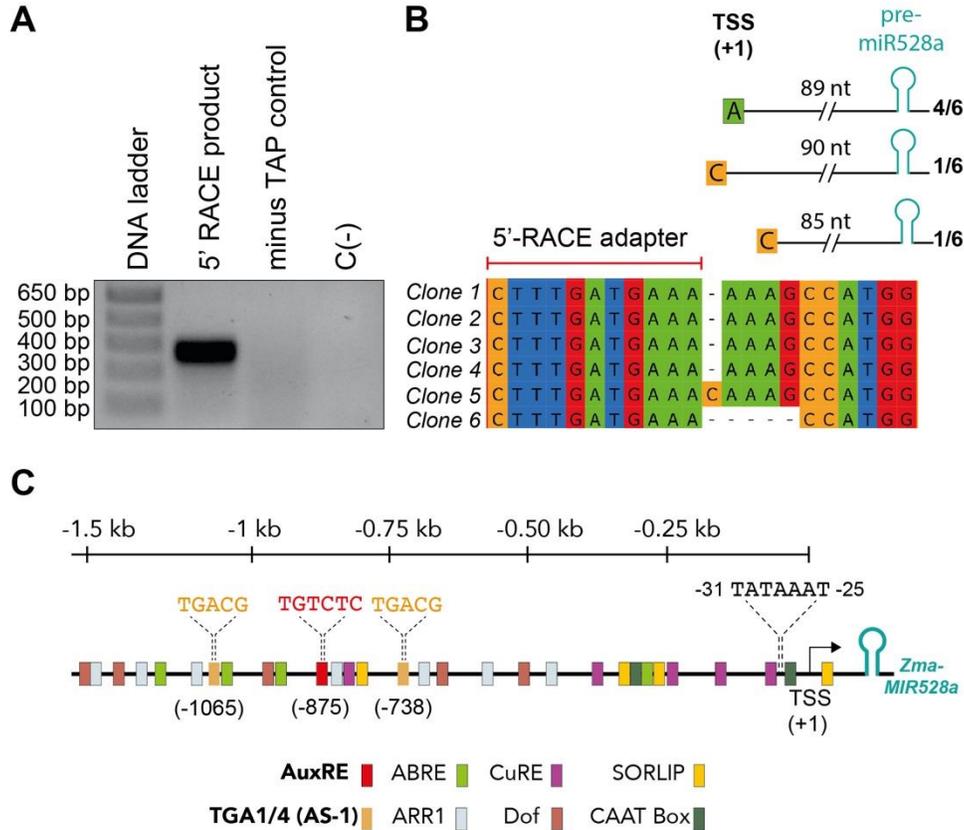


Figure 2.- Identification of *cis*-acting elements within the *zma-MIR528a* promoter. Phylogenetic (A) The *MIR528a* TSS was mapped by 5'RLM-RACE as described in methods. Nested PCR products separated by gel electrophoresis are shown. (B) Sequencing results of *MIR528a* 5'-RACE clones with identified TSS (+1) shown in the upper scheme. The distance between TSS and pre-miR528a is indicated; the number of clones identified with the same 5' end, as a proportion of the total sequenced clones, is shown at right. (C) The 1500 bp of genomic DNA sequence upstream of *zma-MIR528a* TSS was analyzed using PlantCare and New PLACE databases. Different color markers indicate major predicted *cis*-acting elements. The sequence and position of two TGA1/4 and one AuxRE elements are highlighted.

models where the accumulation of *zma-miR528* is significantly enhanced [20,33]. Considering this, the TGA1/4 and AuxRE elements were more closely inspected in this study.

2.3. Accumulation of pre-miR528a decreases as seedling establishment takes place

To address how *zma-MIR528a* is transcriptionally regulated, the presence of precursor transcripts should be evaluated. Previous reports indicate that mature miR528 highly accumulates throughout maize embryonic development, with further increase upon seed imbibition and declines at post-germinative stages [21,22]. Thus, we explored whether miR528 precursors could be detected during germination and seedling establishment until 72 h after seed imbibition (Figure 3A). Although precursors from both, *zma-MIR528a* and *zma-MIR528b* were evaluated (positive amplification from genomic DNA; gDNA), only pre-miR528a (123 nt) was detected by end-point RT-PCR (Figure 3B). Relative quantification by qRT-PCR showed that pre-miR528a abundance continuously drops from dry seed to initial seedling stages (Figure 3C). By contrast, mature miR528 accumulated towards the

first 24 hours of imbibition and then went down (**Figure 3D**), consistent with afore mentioned reports. Overall, these observations allowed us to select germination and seedling establishment as our working model to evaluate the effect of diverse stimuli upon *zma-MIR528a* expression by quantifying its precursor.

2.4. *Exogenous nitrate and auxin treatments during maize seed imbibition trigger increases in pre-miR528a and mature miR528 levels.*

After establishing the experimental model, we tested two different exogenous treatments during germination and early seedling growth to evaluate their effect on the precursor and mature miR528 accumulation (**Figure 4A**). Incubation with 30 mM KNO₃ positively impacted the seed germination rate (**Figure 4B top and Supplementary Material, Figure S4A**). In agreement with previous reports [34], extended incubation with nitrate accelerated seedling growth and shoot expansion (**Supplementary Material, Figure S4B**). By the other hand, NPA-treated seedlings subjected to a short pulse (6 h) of the auxin NAA did not show evident growth differences with respect to its control (NPA alone) and contrasted to H₂O imbibition (**Figure 4B bottom and Supplementary Material, Figure S4C**). However, extended incubation with NAA promoted the emergence of multiple lateral

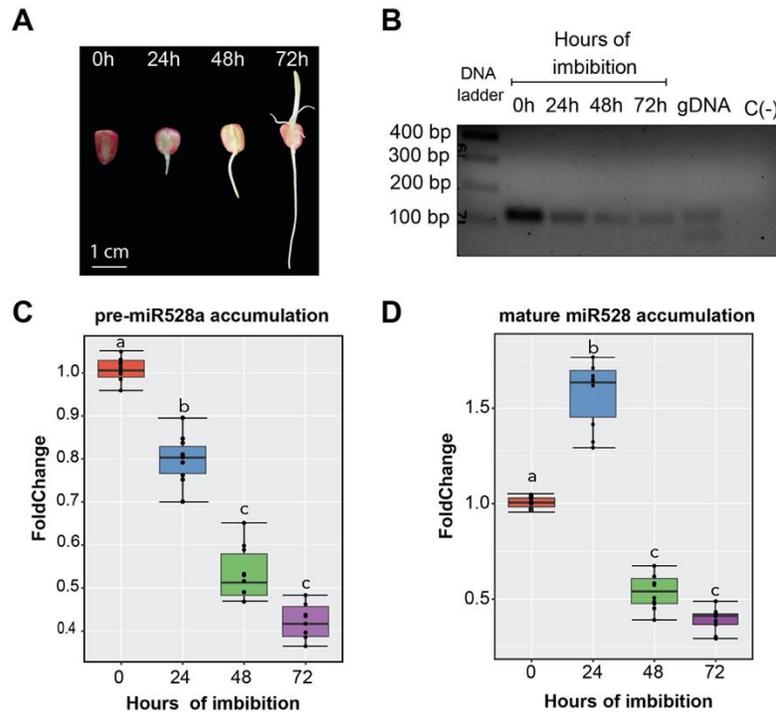


Figure 3.- Accumulation levels of *zma-miR528a* precursor upon seed germination. (A) Maize VS-535 seeds were germinated in vertical chambers according to [2] and seedling emergence was registered upon 0, 24, 48 and 72 h after imbibition. (B) Detection of pre-miR528a by end point RT-PCR in samples collected at each timepoint. Oligonucleotides were designed to amplify both, pre-miR528a (123 nt) and pre-miR528b (78nt), as shown for genomic DNA (gDNA). (C-D) Quantification by real-time PCR of pre-miR528a and mature miR528 in maize embryonic axes at the indicated stages of seed imbibition. Fold change represents the abundance relative to dry seed (0h) normalized either by 18S rRNA (precursor) or U6 snRNA internal control (mature miRNA). Error bars represent the standard error of mean from three biological replicates with three technical replicates for each one ($n = 9$). Data were analyzed by one-way ANOVA with multiple comparisons by the Tukey post hoc test. Boxes that do not share at least one identical letter differ significantly ($p < 0.05$) from each other.

roots (**Supplementary Material, Figure S4D**), confirming the reported physiological effect of exogenous auxin [2].

As expected according to previous studies [20], significant increments of pre-miR528a and miR528 were observed in the presence of nitrate solution relative to H₂O at 24, 48 and 72 h upon seed imbibition (**Figure 4C**). The treatment with NAA also increased their levels, with the highest accumulation observed at 4 and 6 h after the auxin pulse on seedlings pre-treated with NPA. Contrarily, inhibition of polar auxin transport by NPA alone did not cause significant changes on either precursor and mature miRNA levels, since at 72h of imbibition they showed considerably reduced levels (**Figure 3C-D and Figure 4D**). Owing to this, we tested if the observed increments were due to transcriptional events. As shown in **Supplementary Material Figure S5**, nitrate and auxin treatments involved transcriptional activity to promote the highest accumulation of pre-miR528a and mature miR528. The inclusion of alpha-Amanitin (inhibitor of RNA pol II, a-aman) exhibited significant reduction in the levels of both molecules with respect to the treatment alone. Subsequently, we tested whether up-regulation of *zma-MIR528a* caused by nitrate and auxin altered the accumulation of previously confirmed mRNA targets [21]. The abundance of *BASIC HELIX-LOOP-HELIX 152 (bHLH152; Zm00001d016873)*, *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/BIG EMBRYO 1 (MATE/BIGE1; Zm00001d012883)*, and *SUPEROXIDE DISMUTASE 1a (SOD1a; Zm00001d031908)* transcripts significantly decreased in samples treated either with KNO₃ or NAA (**Supplementary Material, Figure S6**). Overall, these results show that nitrate and auxin trigger transcription of *zma-MIR528a*, resulting in significant precursor and mature miRNA accumulation as well as target down-regulation during maize seed imbibition.

2.5. *zma-MIR528a* promoter harbors regulatory elements responsible for transcription enhancement in response to nitrate and auxins.

Given that nitrate and auxin treatments triggered *zma-MIR528a* expression, we sought to analyze the regions within promoter responsible for such induction. From our previous TFBS analysis, the presence of TGA1/4, AuxRE, and TATA boxes was considered to design nested 5' deletion segments of the promoter fused to the eGFP/GUS reporters (**Figure 5A**). The resulting constructs were used to perform transient activity assays in maize protoplasts and showed activity for both reporters under full-length promoter (pMIR_1, -1180 pb from TSS; **Supplementary Material, Figure S7A and S7B**). This indicated that *zma-MIR528a* promoter works as an integral and functional sequence. However, as the sequence was narrowed, transcriptional activity decayed. Deletion of 814 nt (pMIR_3) and 1157 nt (pMIR_4) upstream of the TSS significantly reduced the promoter activity under control conditions (**Supplementary Material, Figure S7C**). Next, we assayed the activity of each construct when transfected protoplasts were incubated with nitrate (10 mM KNO₃) and auxin (1 μM NAA) treatments. An increment in GUS reporter expression under nitrate stimulus was

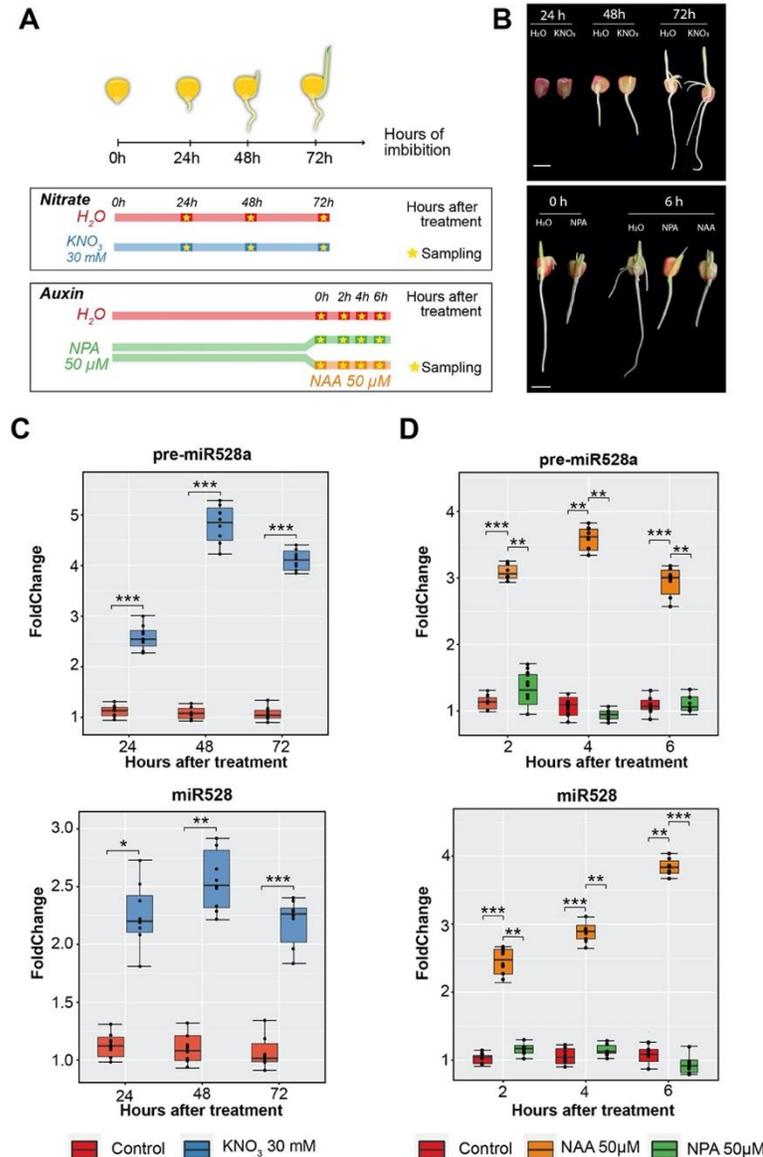


Figure 4.- The effect of exogenous nitrate and auxin treatments on pre-miR528a and mature miR528 accumulation during maize seed imbibition. (A) Experimental design for treatment application during seed imbibition and seedling establishment. To evaluate high nitrate concentration, maize seeds were incubated in water (control) or 30 mM KNO_3 for 72 h with sampling at 24, 48, and 72 h of continuous treatment. For exogenous auxin application, seeds were imbibed for 72 h in water (control) or 50 μM N-1-naphthylphthalamic acid (NPA, auxin transport inhibitor). Afterward, a portion of the NPA-treated seedlings were transferred to a 50 μM 1-Naphthalene Acetic Acid (NAA) solution and samples collected at 0, 2, 4, and 6 h after the auxin pulse. (B) Representative images for maize seed germination and seedling establishment at 24 h, 48 h, and 72 h of imbibition under high nitrate condition (top) or 72 h-imbibed seedlings at 6 h after the application of exogenous auxin (bottom). Scale bar = 1 cm. (C) Relative accumulation levels of miR528 precursor and mature form in samples treated with nitrate. (D) Relative accumulation levels of miR528 precursor and mature form in samples treated with exogenous auxin. The expression levels were normalized using 18S rRNA (for precursor) and U6 snRNA (for mature miRNA) accumulation. Error bars represent standard errors of means from at least three independent replicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P > 0.01$, and *** $P < 0.001$ (Data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey post hoc test comparing treated samples to control for each time point).

observed for protoplasts transfected with the full-length (pMIR_1) and narrowed p_MIR2 (-843 bp

from TSS) promoter versions (**Figure 5B**). In contrast, only the full-length promoter (pMIR_1) presented significant induction with NAA (**Figure 5C**). When nitrate and auxin were used in a combined treatment, the pMIR_1 and pMIR_2 constructs also significantly increased their transcriptional activity (**Figure 5D**). Since the pMIR_2 construct lacks one TGA1/4 box and the AuxRE but still harbors the proximal TGA1/4 box, this result suggests that this motif is sufficient to induce expression at least in response to high nitrate concentration.

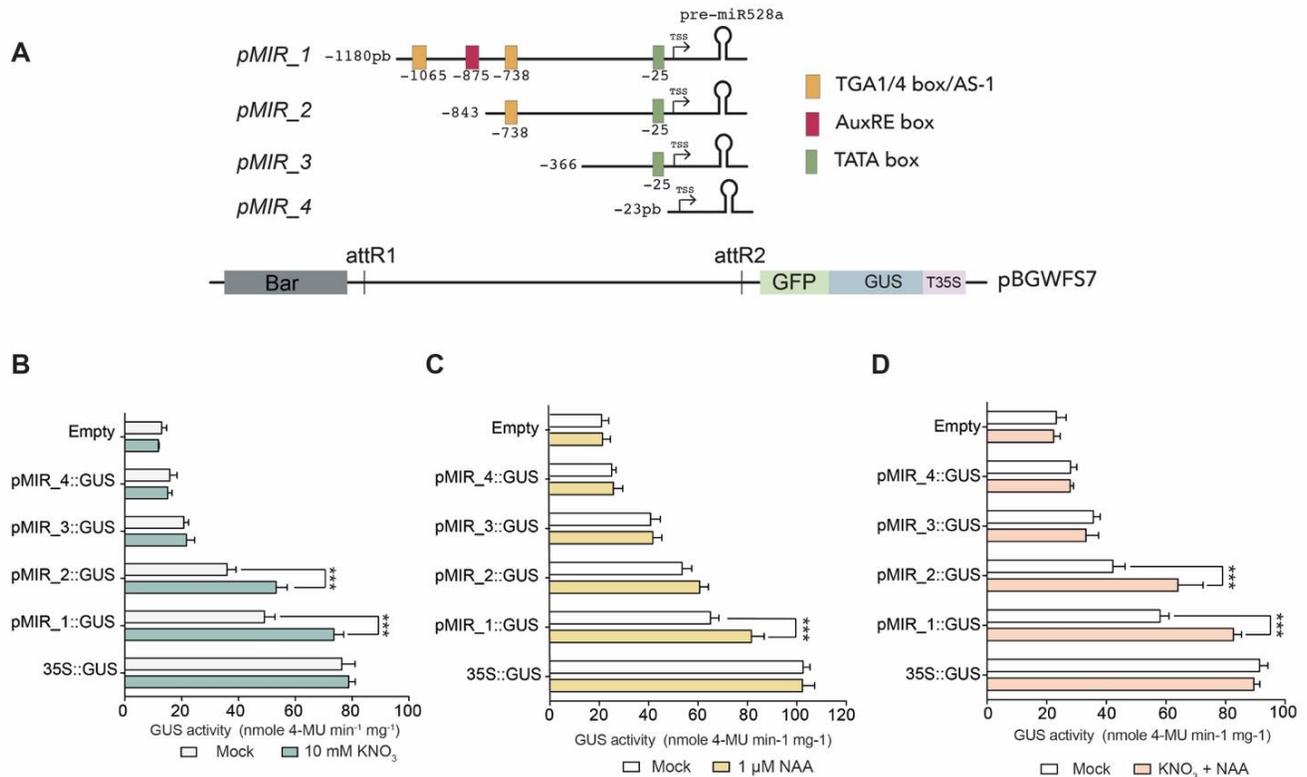


Figure 5.- Dissection of *cis*-elements required for transcriptional up-regulation of miR528 by nitrate and auxins. (A) Constructs were generated including the *MIR528a* full promoter (pMIR_1) or 5' consecutive deletions (pMIR_2-4) upstream of eGFP and GUS reporter genes (green and blue boxes, respectively). The nucleotide position of each deletion fragment is indicated at left on each panel. Colored boxes represent relevant *cis*-acting elements. (B-D) GUS activity was evaluated by fluorometric assay on maize protoplasts transfected with each construct under nitrate (B), auxin (CC), or a combination of both treatments (D). The 35S CaMV:GUS construct was used as positive control. Transfection with the vector lacking a promoter (Empty) was used as negative control. Data represent the mean \pm S.E.M. of three independent replicates with three technical replicates each (***) $P < 0.001$, paired *t* test).

2.6. TFBS within the *zma*-MIR528a promoter contribute differentially to nitrate and auxin induction.

Although transient expression assays evidenced that the *zma*-MIR528a promoter harbors *cis*-acting sequences involved in transcriptional activation in response to nitrate and auxin treatments, the contribution of each TGA1/4 box and the AuxRE element was not completely clear due to the likely presence of additional response elements within the promoter. Therefore, we tested the effect

of individual TFBS deletions in the context of a full-length promoter. In contrast to sequential deletions, single TFBS deletions did not affect basal transcription of the reporter (mock in **Figure 6**), supporting a role of other elements within the region deleted in pMIR_2 that guide expression under control conditions.

Interestingly, transcriptional induction under WT promoter was significantly greater for combined nitrate and auxin, as compared to single treatments (**Figure 6**). Deleting the distal TGA1/4 site (-1065 position; Δ TGA1) still showed significant induction by nitrate, auxin, or combined treatments. Conversely, deletion of the TGA1/4 site at position -738 (Δ TGA2) abolished the induction by either of the individual treatments but still allowed significant, although minor, increase by the combined action of nitrate and auxin (**Figure 6**). Altogether, these results indicate that the TGA1/4 site proximal to the TSS plays a pivotal role in *zma-MIR528a* transcriptional activation by either, nitrate or auxin. Finally, the mutation of the TGTCTC sequence (Δ AuxRE, position -875) negatively affected only the induction by NAA alone, proving it is required for proper activation of *zma-MIR528a* promoter by the auxin signaling pathway (**Figure 6**).

2.7. ARF34 contributes to transcriptional activation of the *zma-MIR528a* promoter.

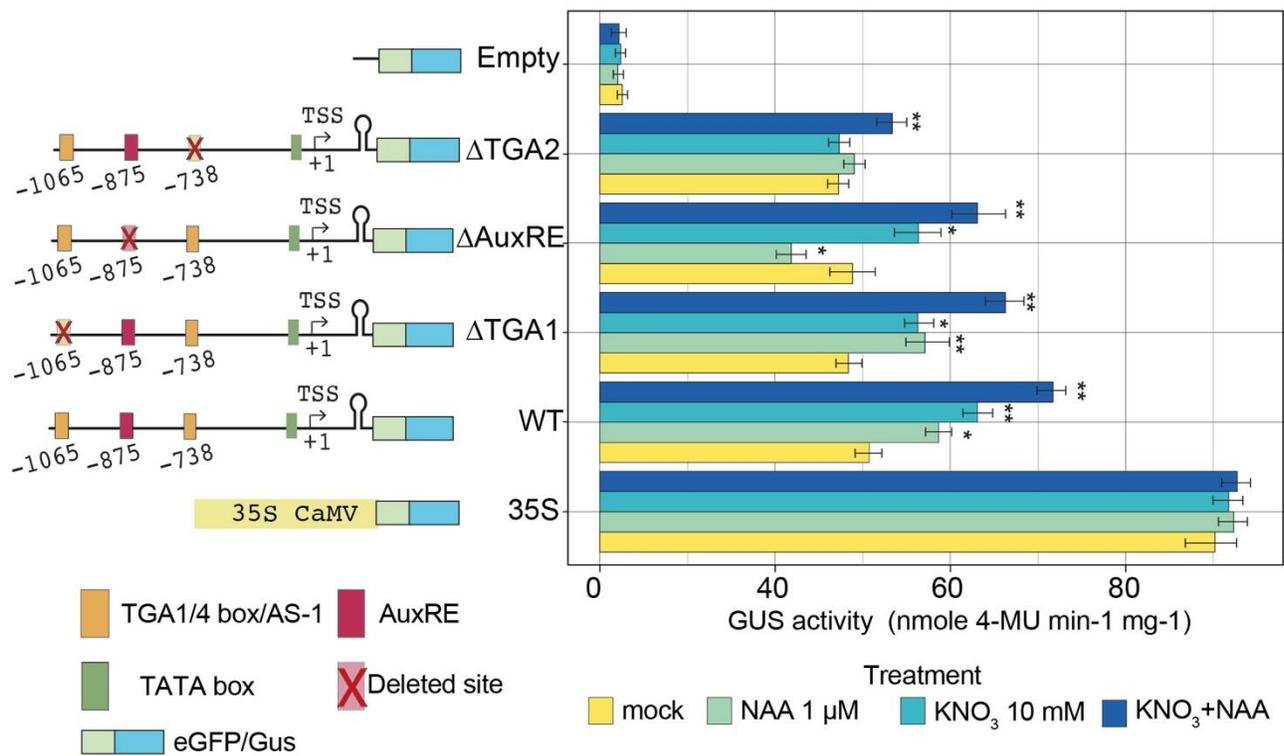


Figure 6.- Differential contribution of TFBS within *zma-MIR528a* promoter to nitrate and auxin induction. eGFP-GUS reporter constructs under full-length *zma-MIR528a* promoter or promoters harboring deleterious mutations at either of two TGA1/4 (AS-1) or the AuxRE sites, were transfected in maize protoplasts and assayed under control (mock), nitrate (10mM KNO₃), auxin (1 μ M 1-NAA), or combined treatment conditions. Deleted TFBS are shown as red-crossed boxes in each construct. Values represent GUS activity determined by fluorometry. 35S:GUS and vector lacking a promoter region (Empty) were used as positive and negative controls, respectively. Data represent mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's test were used to determine the significant difference between treatments and mock for each construct. (* P<0.05; **P<0.01)

To further explore the role of auxin response machinery on *zma-MIR528a* promoter activation, we co-transfected maize protoplasts with pMIR_1 or mutant reporter constructs along with an effector plasmid containing the ARF34 coding sequence (Zm00001eb031700, **Figure 7A**), which is a well-studied transcriptional activator ARF [35]. Significantly higher induction was evident for protoplasts co-transfected with this effector and pMIR_1 reporter (**Figure 7B** and **Supplementary Material, Figure S8**). Increase in reporter activity was not detected for protoplasts co-transfected with ARF4 (Zm00001eb067270) activator [35], suggesting that *zma-MIR528a* promoter could be particularly responsive to ARF34. Furthermore, induction was observed for co-transfections with Δ TGA1 or Δ TGA2 constructs, but not with the construct without AuxRE site (Δ AuxRE + ARF34; **Figure 7B**). Interestingly, the induction was significantly lower for Δ TGA2 than the one observed for pMIR_1 or Δ TGA1 reporters. This suggests that the proximal TGA1/4 and AuxRE motifs might cooperate for full auxin inducibility of *zma-MIR528a* promoter. Finally, the presence of a 1 μ M NAA further increased the transcriptional activity of wild type promoter (pMIR_1) in the presence of ARF34 (**Figure 7C**), supporting the involvement of additional auxin signaling pathway components

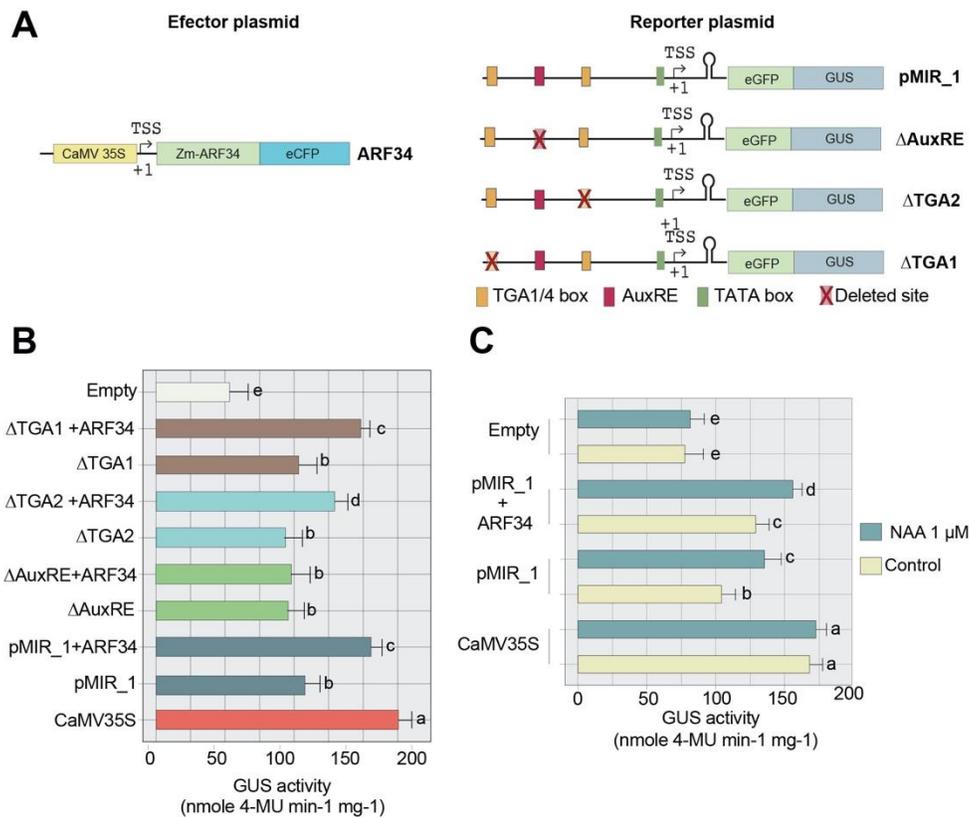


Figure 7.- Activation of *zma-MIR528a* promoter by Zm-ARF34 (A) Schematic diagram of the effector and reporter constructs used in the transactivation analysis in maize protoplasts. The effector construct contained the 35S promoter fused to the ORF of ARF34 for constitutive expression. (B) Effect of Zm-ARF34 overexpression on the activity of *zma-MIR528a* promoter in protoplasts. The pMIR_1, Δ AuxRE, Δ TGA2, and Δ TGA1 constructs were co-transfected with the effector plasmid in maize protoplasts incubated in control conditions. (C) Effect of ARF34 and auxin on the activity of *zma-MIR528a* promoter. The pMIR_1 reporter construct was co-transfected with the expression plasmid of ARF34 in protoplasts and incubated in the absence (Control) or presence of 1 μ M NAA. GUS activity was normalized by absolute quantification of transfected DNA for both constructs. Values represent GUS activity determined by fluorometry. CaMV 35S:GUS and vector lacking a promoter region (Empty) were used as positive and negative controls, respectively. Data represent mean \pm S.E.M of at least three independent experiments with three replicates each (n=9). Two-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc multiple comparison Tukey's test was used to determine the significant difference between transfections and treatments. Bars that do not share at least one letter differ significantly ($p < 0.05$) from each other.

in *zma-MIR528a* regulation. Albeit our results exposed the relevance of AuxRE and proximal TGA1/4 sites for NAA-mediated activation of *zma-MIR528a* promoter, direct interaction between these elements and ARF34 or other transcription factors will need further experimental demonstration.

3. Discussion

Although several miRNAs have been studied in plants, there is a lack of information about promoter regions and regulatory elements that coordinate their expression. Their analysis will help to better understand their regulation and how different stimuli control their expression. We experimentally validated the transcription start site (TSS) for the *zma-MIR528a* gene at 89 bp upstream from the mapping site of the precursor pre-miR528a. Comparable lengths have been reported for *A. thaliana* and rice *MIR* genes, as most miRNAs display less than 200 nt between the TSS and the stem-loop structured precursor [36]. We found additional start sites adjacent to the predominant TSS, consistent with next-generation data previously reported [27]. Narrow clustering of multiple TSS is a common feature among genes with tissue-specific expression [27], which could explain the specific accumulation patterns reported for miR528 in the vascular tissue of maize leaves, stems, and immature embryos [20,21,37]. The TSS determination enabled us to limit and more accurately scrutinize the promoter region for putative *cis*-regulatory elements (CREs). Interestingly, both *zma-MIR528a* and *zma-MIR528b* displayed core-promoter regulatory elements analogous to those present in other *MIR* genes found in rice [38] and *A. thaliana* [39]. However, only *zma-MIR528a* presented a TATA-box element nearby the TSS region. This element has been reported to affect the promoter strength and increase the expression of endogenous and synthetic genes in plants [40] and is over-represented in *MIR* plant promoters [41]. Therefore, we hypothesized that TATA-box presence in *MIR528a* could be involved with the differential expression rates between both *MIR528* genes in maize, explaining our lack of detection for pre-miR528b. Also, expression of *MIR528b* may be restricted to particular tissues or developmental stages, even though, diverse expression data sources have only collected reads mapping against the *MIR528a* genomic region [42-44]. Moreover, numerous CAAT sites were found close to the TSS and throughout the promoter for both genes in maize. CAAT boxes are conserved sites believed to determine the efficiency of transcription [45]. Indeed, the insertion of multiple CAAT-boxes is a proposed model for acquisition of promoter activity for some *MIR* genes such as *MIR1444*, *MIR058*, and *MIR12112* in *Vitis vinifera* [46]. In addition, these core-promoter elements were conserved in homologous genes, which suggests they may have a general role guiding the expression of *MIR528* in monocots.

Higher degree of conservation was found among pre-miRNAs at the sequence and structural levels, as each precursor leads to identical mature miRNA in the analyzed sequences. This shared secondary structure might influence the processing and the accumulation of miR528 among species, as precise cleavage of pre-miRNA requires structural and sequence determinants, but their relative contributions are still being studied [47,48].

The presence of specific TFBS within the promoter provided hints about the metabolic and physiological pathways commanding *zma-MIR528a* expression. We found two TGA1/4 (also known as *activation sequence-1*, AS-1) binding motifs in the *zma-MIR528a* promoter that were highly conserved in other *MIR528* genes. The TGA1/4 transcription factors are members of the basic leucine zipper (bZIP) family and participate in complex transcriptional networks associated with nitrate response and salicylic acid biosynthesis [31,49,50]. *zma-MIR528a* also exhibited an auxin response element (AuxRE), even though its presence was less conserved among homologs. The auxin responsiveness is achieved by the interaction of ARFs with AuxREs at promoter regions of diverse genes involved in several developmental processes [32,51,52]. TGA1/4 and AuxRE sites are found in the promoters of several *Zea mays* sequenced accessions (**Supplementary Material, Figure S9A**) supporting their relevance for *zma-MIR528a* expression regulation in response to external stimuli. In addition, multiple TFs that potentially recognize TGA1/4 and AuxRE sites exhibited expression profiles similar to *MIR528a* expression in distinct tissues (**Supplementary Material, Figure S9B**).

Accordingly, we found that high nitrate conditions and exogenous auxin application increased the *zma-MIR528a* precursor and mature miRNA levels at early seedling stages of Tuxpeño VS-535 maize. Previous reports indicate that mature miR528 levels are affected in maize roots under nitrate starvation [20,37], while nitrogen luxury enhanced its expression [20] in different maize lines. High nitrate and auxin concentrations are commonly used for callus induction and proliferation during maize somatic embryogenesis (SE), which might explain the high miR528 abundance in dedifferentiated tissues [21,25,33].

Responsiveness of miRNAs to nitrate and auxin is well-documented in diverse plants and experimental models [37,53]. For instance, treatments with Indoleacetic acid (IAA) promote transcription of *ath-MIR393b* in aerial seedling organs [54]. Furthermore, miR393 also accumulates two hours after incubation in 5 mM potassium nitrate solution and induces target downregulation [55,56]. Interestingly, during SE induction in *A. thaliana*, expression of *MIR393a* and *MIR393b* increase to enable explant sensitivity to auxins [57], which mirrors the miR528 response in maize SE.

Transient expression assays with the *zma-MIR528a* promoter confirmed that elements responsive to nitrate and auxins are localized within the analyzed sequence. The distribution of TGA1/4 sites in *zma-MIR528a* is similar to footprints detected in promoters of genes transcriptionally activated by nitrate in Arabidopsis [58]. However, only the removal of the TGA1/4 site nearest to the TSS (Δ TGA2) significantly affected the transcription enhancement by external stimuli, evidencing a differential contribution of each site. This is congruent with studies reporting that higher gene expression correlates with TGA1/4 binding motifs located closer to TSS [58,59]. In addition, our results suggest that the proximal TGA1/4 site in *zma-MIR528a* promoter also cooperates with auxin induction. Enhancement of activity by NAA was not observed for the Δ TGA2 construct, in spite of the presence of AuxRE. This is not surprising since several TFs that bind TGACG motif guide gene expression in response to synthetic auxins, methyl jasmonate, and H₂O₂; acting as molecular linkers between different signaling pathways [60-63].

Early-auxin response genes tend to have two or more adjacent TGTCTC/TGTCGG motifs separated by a variable spacer sequence to allow ARFs dimerization and proper gene activation [32,64,65]. Nonetheless, nearly 86% of the ARFs targeted sites in maize are composed of two or more TGTC core motifs with less than 50 nucleotides of spacing [35,66]. Interestingly, the *zma-MIR528a* promoter displays a TGTC core motif located 36 nt downstream of the analyzed AuxRE site, presenting architectural features analogous to other auxin-induced genes in maize [35]. Transcriptional activator ARF34 modulates the activation of *zma-MIR528a* promoter through the AuxRE motif, as shown by our transactivation assays in protoplasts. Hence, alteration of the architecture comprising AuxRE and TGTC sites might abolish auxin signaling over *zma-MIR528a*. Similar results were reported for *Ath-MIR390a*, as deletion of a 36 bp portion containing an inverted AuxRE motif suppressed the response of this gene to auxin treatments [15].

Overall, the analysis of *zma-MIR528a* promoter suggests that nitrate and auxin pathways cooperate to induce *MIR528a* expression (**Figure 8**). This synergism may occur due to an overlap of the molecular regulatory routes previously reported for NO₃⁻ and auxins. The primary nitrate response proceeds through master regulators (TCP-NLP) that directly control TFs such as TGA1/4 to localize their binding sites in promoters of target genes. They are also implicated in auxin homeostasis and signaling by regulating *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1)* involved in IAA biosynthesis [3] and promoting the accumulation AUXIN SIGNALING F-BOX 3/ TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (AFB3/TIR1) required for degradation of ARFs repressor Aux/IAA [3,67]. Considering this, the co-existence of high auxin and nitrate conditions enhances *zma-MIR528a* expression through localizing TGA1/4 and ARF TFs at cognate motifs in the promoter region, which results in the reduction of mRNA targets levels (**Figure 8**). Such outcomes

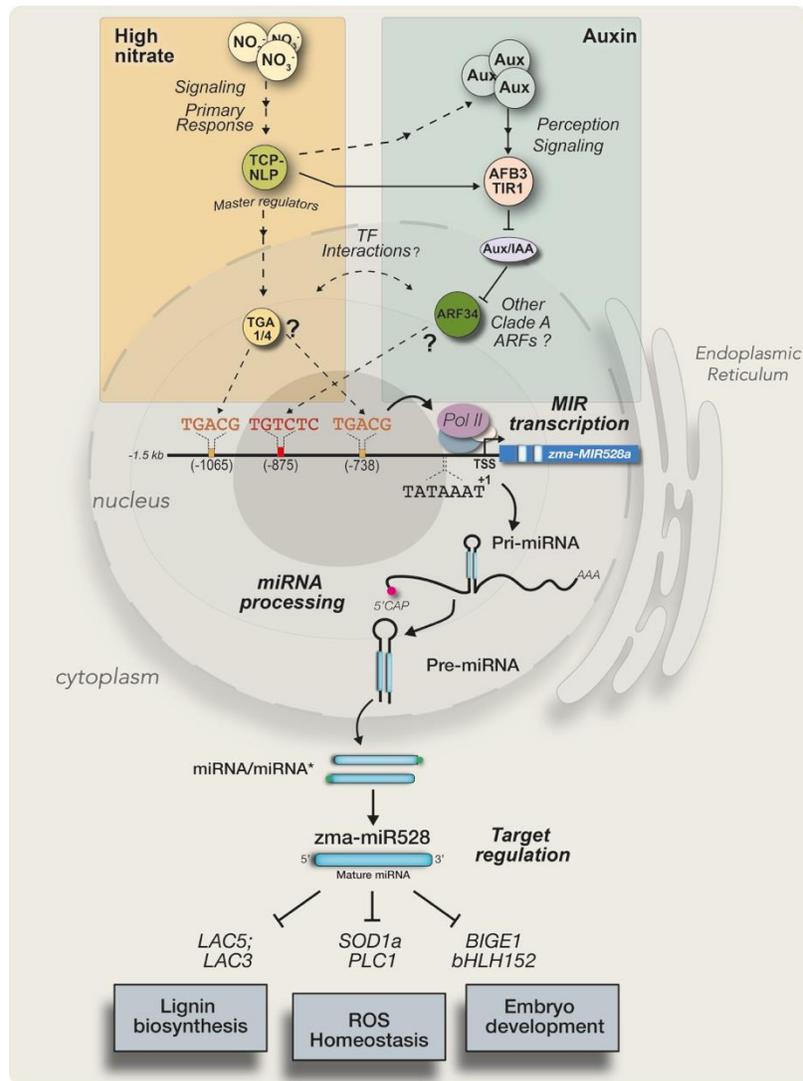


Figure 8.- A proposed model for nitrate and auxin-mediated transcriptional regulation over *zma-MIR528a*. Perception of high nitrate triggers primary signaling guided by master regulators to activate several TFs. TGA1 and TGA4 and other TFs would recognize *cis*-regulatory elements in the promoter of *zma-MIR528a* to enhance its expression in response to the stimulus. Besides, elevated auxin concentration promotes the activation of AFB3 and TIR1 to polyubiquitinate the repressor Aux/IAA setting free the clade A ARFs (transcriptional activators, such as ARF34) to interact with AuxRE at the promoter and stimulate transcription. Both pathways could overlap through TCP/NLP-mediated regulation of both auxin biosynthesis and response pathways [3]. The nitrate signal induces auxin biosynthesis (dashed lines) as master regulators of this route promote expression of genes involved in tryptophan metabolism to obtain IAA. These regulators and the nitrate sensing machinery also control the nitrate-AFB3/TIR1 auxin perception to activate ARFs (solid line). Both stimuli activate *MIR528a* expression through TFs interaction with their binding sites. As consequence of such coordinated regulation, miR528 level increases to downregulate its mRNA targets.

have been reported for the stimuli studied in this work, resulting in maize plant lodging under high

nitrate growth conditions [20] or callus induction and proliferation from immature embryos [21,25]. Moreover, auxins accumulate during late embryo development and regulate seed dormancy acquisition in several plants [68,69]. This auxin increment might be guiding the transcriptional activation of *zma-MIR528a*, as the precursor is highly accumulated in dry maize seeds. However, additional regulatory routes, such as the ROS or the cold-stress response pathways could also control the *zma-MIR528a* expression by activating other *cis*-regulatory elements. Furthermore, the regulatory mechanism might depend on the species, developmental stage or condition being studied [16,18].

Future work should explore additional layers of regulation for *MIR528* expression to increase knowledge about the relationship between factors determining miR528 accumulation and target regulation, as well as the implication of complex regulatory networks on the growth and development of different monocot plants.

4. Materials and Methods

4.1 Plant material and growth conditions.

The Mexican maize (*Zea mays* L.) cultivar Tuxpeño VS-535 was used due to its agronomic relevance and the available previous characterization of miR528 in SE [21]. Seeds were disinfected with 6 % commercial NaClO solution under constant agitation (250 rpm) for about 5 min and rinsed five times with 100 mL of fresh sterilized water. Imbibition, vertical germination, and seedling establishment were performed as previously reported [2]. Briefly, seeds were placed in paper towel rolls and incubated vertically in cylindrical containers with 12h light/ 12h dark photoperiod at 28°C. Nitrate stimulus application was conducted following previous reports [20] with some modifications. Rolls were soaked in 150 mL of either sterile water (control condition; mock) or 30 mM KNO₃ solution for 72 h, with sampling after 24, 48, and 72 h of continuous treatment. For exogenous auxin addition, experiments were performed as recommended by [2]. Seeds were imbibed for 72 h in water (mock) or 50 μM N-1-naphthylphthalamic acid (NPA, auxin transport inhibitor, Sigma-Aldrich). After this time, a portion of the NPA-treated seedlings were transferred to 50 μM 1-Naphthalene Acetic Acid (NAA, Sigma-Aldrich) and samples were collected at 0, 2, 4, and 6 h after the NAA pulse. Embryo axes and coleoptiles were extracted from seeds and seedlings and immediately frozen in liquid nitrogen until further use. Extended treatment with 50 μM NAA for 48 h was performed for phenotype registration. Controls remained under H₂O or 50 μM NPA alone for each time point.

4.2. RNA isolation, size fractionation, and purification.

Total RNA was extracted from collected tissues using TRIzol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA) as previously reported [70]. DNase I treatment, size fractionation, and concentration of large (>200 nt) and small (< 200 nt) RNAs were performed using the RNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research, Irvine, CA) following the manufacturer's instructions.

4.3. Precursor, mature microRNA, and target quantification by RT-qPCR

For pre-miRNA detection, 2 μg of the fraction of small RNAs (<200 nt) were polyadenylated using the Poly(A) tailing kit (Invitrogen, Waltham, MA). Reverse transcription (RT) reaction was carried out with oligo (dT) and the Improm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI). Primers for each miR528 precursor were designed using Primer3Plus [71] with qPCR settings activated. Both precursors (pre-miR528a/b) were accessible for amplification using a combination of premiR_Fw and preMIR528_Rv3 oligonucleotides as they were designed to align to conserved sites presented in both sequences (**Supplementary Material, Table S3**). For the mature miRNA, previously reported stem-loop and specific forward primer were used along with pulsed stem-loop RT reactions for miR528 and U6 snRNA using the sRNA fractions [21]. For target quantification, total RNA was reverse transcribed (RT) using oligo (dT) and the Improm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI). For each target, previously reported primers were used [21]. qPCR was

performed using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix in a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Bedford, MA). Relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with normalization to 18S rRNA (precursor and targets) or U6 snRNA (for miRNA) as internal housekeeping gene controls. Data from each experiment (3 independent experiments with 3 technical replicates each) were subjected to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison post hoc test for statistical significance.

4.4. Experimental validation of the Transcription Start Site (TSS) by 5' RLM-RACE.

Mapping of TSS was performed following a reported protocol [72] with slight modifications. About 10 μ g of total RNA were treated with the QuickCIP enzyme (NEB, Ipswich, MA) at 37 °C for 1 h. Then, 15 μ L of 5 M ammonium acetate were added to stop each reaction; treated RNA was purified by phenol-chloroform extraction and isopropanol precipitation. Decapping enzyme (NEB, Ipswich, MA) was used for 5'-CAP removal of the treated RNAs. Minus TAP reactions were also assembled as ligation controls. Ligation of 5' RACE adapter (**Supplementary Material, Table S3**) was performed employing 2 μ L of CIP-treated and decapped RNA and 2 μ L of T4 RNA ligase (2.5 U/ μ L) for 1 h at 37°C. The ligation products were reverse transcribed using oligo d(T) and the Improm-II reverse transcription system (Promega, Madison, WI). Consecutive amplification reactions (nested PCR) were conducted using adapter-specific and gene-specific primers (**Supplementary Material, Table S3**). The final PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI). Finally, the purified product was cloned into the pGEM-T easy vector (Promega Madison, WI), and the resulting clones were sequenced.

4.5. Phylogenetic analysis of miR528 precursors and promoters in monocots.

Precursor sequences of miR528 were obtained for 21 monocot species (**Supplementary Material, Table S1**) using miRBase release 22.1 [73] and the Plant microRNA Encyclopedia PmiREN version 2.0 [74]. Upstream regions (\approx 2000 nt from the precursor mapping site) were also retrieved from the Ensembl Plant database release 52 [75] for promoter homology comparisons. Sequences were aligned using nucleotide optimized MUSCLE algorithm [76] with 50 iteration cycles. The phylogenetic reconstructions were conducted using MEGA X [77] and Maximum Likelihood (ML) method with the best-adjusted model (3-parameter Tamura) and 1000 bootstrap replications. In addition, folding of some precursor sequences was predicted using the webserver RNAfold from the University of Vienna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

4.6. Promoter cis-element analysis.

In silico analysis of cis-regulatory elements in the upstream region of *MIR528* promoters was performed with the NEW PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) online analysis software, PlantPAN3.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw>) [78] and PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) [79].

4.7. Generation of plasmid constructions

Genomic DNA was extracted from maize seedlings using a reported CTAB method [80]. Specific primers for the full-length *MIR528a* promoter (pMIR_1; **Supplementary Material, Table S3**) were used to amplify the region between the position -1510 upstream of TSS and the precursor sequence (209 nt beyond TSS). Amplification was accomplished using the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA) following the manufacturer's protocol. The amplicon was gel purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) kit and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI) for sequencing.

Sequential deletion fragments of the promoter were amplified with specific primers (pMIR_1-4; **Supplementary Material, Table S3**) using the pMIR_1 plasmid as template and were cloned into the

pENTR-D-TOPO vector (ThermoFisher, Waltham, MA). Proper orientation was verified by PCR. Correct entry clones were used for sub-cloning into the pBGWFS7.0 vector employing the Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen, Waltham, MA). The integrity of constructs and reporter genes was assayed by sequencing. Deletion of binding sites (TGA1/4 and AuxRE) was achieved by site-directed mutagenesis using the overlapping PCR method, as reported by [81]. WT and mutant expression cassettes were cloned into the pGEM-T easy vector for Sanger sequencing and subsequent promoter activity assays.

Effector plasmids for co-transfection assays were obtained by Gateway recombination of the entry clones pUT6075 and pUT3104 (acquired from the ABRC) corresponding to ZmARF34 (Zm00001eb031700) and ZmARF4 (Zm00001eb067270) respectively, with pEarleyGate 102 as destination vector using the LR-clonase enzyme mix (Invitrogen, Waltham, MA). Correct insertion and integrity of the corresponding ARF coding sequence downstream the CaMV 35S promoter was checked by Sanger sequencing.

4.8. Maize leaf protoplast isolation and transfection.

Protoplast isolation was carried out following the protocol reported by [82] with modifications. Briefly, the fully expanded second leaves from etiolated maize plants were cut into ≈ 0.5 cm strips. Leaf strips were soaked, vacuum infiltrated with the enzyme solution (1.5 % cellulase R10, 0.75 % macerozyme R10 (Yakult, Tokyo, Japan), 0.6M mannitol, 10 mM MES (pH 5.7), 10 mM CaCl₂, and 0.1 % BSA), and incubated for 3 h with constant agitation (50 rpm) in darkness. Protoplasts were collected by filtration and centrifugation (200 g for 4 min), washed out twice with W5 solution (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, KCl 5 mM, and 2 mM MES pH5.7), and resuspended into cold MMg solution (15 mM MgCl₂, 0.4 M mannitol, 4 mM MES, pH 5.7) to a final concentration of 10^6 mL⁻¹ protoplasts. For transfection, about 2×10^5 protoplasts were combined with 50 μ g of each plasmid DNA and PEG transfection solution (40 % w/v PEG 4000, 0.6 M mannitol, and 0.1 M CaCl₂) and incubated for 30 min at 25°C covered from light. Next, the transfected cells were washed with W5 buffer and incubated at 25 °C in the dark for 16 h for basal expression detection. To avoid protoplast swelling and bursting, lower concentrations of each treatment (10 mM KNO₃, 1 μ M NAA, or both) were applied for the last 6 hours of incubation as reported by [83] and [84]. After this, the protoplasts were harvested for further analysis. Transfection efficiency and normalization were assessed by absolute qPCR based on the number of copies of recombinant DNA successfully delivered into protoplasts after transfection, as previously reported [85].

4.9. Promoter activity analysis.

Promoter activity was determined for each construct by measuring GUS enzymatic activity with 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (4-MUG) as substrate. After incubation and treatments, protoplasts were harvested, and protein extracts were collected following the protocol reported by [86]. Fluorescence was measured based on a 4-methylumbelliferone (4-MU) standard curve using the Varioskan LUX Multimode microplate reader (ThermoFisher, Waltham, MA). In each sample, the total protein concentration was estimated by Bradford assay. GUS activity was calculated based on the 4-MU standard curve and expressed in nmol 4-MU min⁻¹ mg⁻¹.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1 **Figure S1.** Sequence and structure conservation between miR528 precursors. **Figure S2.** CAGE TSS data analysis and the promoter sequence of *zma-MIR528a*. **Figure S3.** Conserved *cis* regulatory elements present in *MIR528* promoters in monocots. **Figure S4.** Physiological effects of the application of nitrate or auxin treatment during maize seed germination and seedling establishment. **Figure S5.** The up-regulation of pre-miR528a and mature miR528 levels by nitrate and auxin is significantly reduced by inhibition of RNA pol II activity. **Figure S6.** Negative impact of nitrate and auxin treatments on miR528 target accumulation. **Figure S7.** *Zma-MIR528a*

promoter drives basal reporter expression in maize protoplasts. **Figure S8.** Protoplasts co-transfection assays. **Figure S9.** The TATA-box, TGA1/4, and AuxRE sites of the *Zma-MIR528a* promoter are conserved among lines. **Table S1.** miR528 precursors genomic localization in monocots using PmiREN database. **Table S2.** Putative binding sites identified in the *zma-MIR528a* promoter using NewPLACE database. **Table S3.** Oligonucleotides used in the work.

Author Contributions: Conceived and designed the project: ELS and TDD; performed the experiments: ELS and PIAC; Analyzed data: ELS and TDD; Wrote and revised the paper: ELS, VTJG, JLR, MPS, and TDD. All authors approved the final version. ELS performed his Ph.D. studies in TDD lab.

Funding: This work was funded by Universidad Nacional Autónoma de México: PAPIIT 218921, and Facultad de Química PAIP 5000-9118. Both institutions had no role in the study design, collection, analysis, or interpretation of the data, writing the manuscript, or the decision to submit the paper for publication.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We deeply appreciate the technical support and advice provided by Dr. Karina Jiménez Durán and Biol. Jorge Herrera Díaz at the Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Zhu, H.; Chen, C.; Zeng, J.; Yun, Z.; Liu, Y.; Qu, H.; Jiang, Y.; Duan, X.; Xia, R. MicroRNA528, a hub regulator modulating ROS homeostasis via targeting of a diverse set of genes encoding copper-containing proteins in monocots. *New Phytol* **2020**, *225*, 385-399, doi:10.1111/nph.16130.
2. Crombez, H.; Roberts, I.; Vangheluwe, N.; Motte, H.; Jansen, L.; Beeckman, T.; Parizot, B. Lateral Root Inducible System in Arabidopsis and Maize. *J Vis Exp* **2016**, 10.3791/53481, e53481, doi:10.3791/53481.
3. Guan, P. Dancing with Hormones: A Current Perspective of Nitrate Signaling and Regulation in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **2017**, *8*, 1697, doi:10.3389/fpls.2017.01697.
4. Li, M.; Yu, B. Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA Biol* **2021**, *18*, 2087-2096, doi:10.1080/15476286.2021.1899491.
5. Gao, Z.; Nie, J.; Wang, H. microRNA biogenesis in plant. *Plant Growth Regulation* **2021**, *93*, 1-12, doi:10.1007/s10725-020-00654-9.
6. Pandey, P.; Srivastava, P.K.; Pandey, S.P. Prediction of Plant miRNA Targets. *Methods Mol Biol* **2019**, *1932*, 99-107, doi:10.1007/978-1-4939-9042-9_7.
7. Pegler, J.L.; Grof, C.P.L.; Eamens, A.L. The Plant microRNA Pathway: The Production and Action Stages. *Methods Mol Biol* **2019**, *1932*, 15-39, doi:10.1007/978-1-4939-9042-9_2.
8. Barman, A.; Phukan, T.; Ray, S.K. Harnessing Perks of MiRNA Principles for Betterment of Agriculture and Food Security. In *Omics Technologies for Sustainable Agriculture and Global Food Security*, Kumar, A., Kumar, R., Shukla, P., Patel, H.K., Eds. Springer: Singapore, 2021; Vol. 2, pp. 123-191.
9. Yan, J.; Zhang, H.; Zheng, Y.; Ding, Y. Comparative expression profiling of miRNAs between the cytoplasmic male sterile line MeixiangA and its maintainer line MeixiangB during rice anther development. *Planta* **2015**, *241*, 109-123, doi:10.1007/s00425-014-2167-2.
10. Njaci, I.; Williams, B.; Castillo-Gonzalez, C.; Dickman, M.B.; Zhang, X.; Mundree, S. Genome-Wide Investigation of the Role of MicroRNAs in Desiccation Tolerance in the Resurrection Grass *Tripogon loliiformis*. *Plants (Basel)* **2018**, *7*, doi:10.3390/plants7030068.
11. Kravchik, M.; Stav, R.; Belausov, E.; Arazi, T. Functional Characterization of microRNA171 Family in Tomato. *Plants (Basel)* **2019**, *8*, doi:10.3390/plants8010010.
12. Pegler, J.L.; Grof, C.P.L.; Eamens, A.L. Profiling of the Differential Abundance of Drought and Salt Stress-Responsive MicroRNAs Across Grass Crop and Genetic Model Plant Species. *Agronomy* **2018**, *8*, 118, doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy8070118>.

13. Pegler, J.L.; Oultram, J.M.J.; Grof, C.P.L.; Eamens, A.L. Profiling the Abiotic Stress Responsive microRNA Landscape of *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)* **2019**, *8*, doi:10.3390/plants8030058.
14. Xie, Z.; Allen, E.; Fahlgren, N.; Calamar, A.; Givan, S.A.; Carrington, J.C. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol* **2005**, *138*, 2145-2154, doi:10.1104/pp.105.062943.
15. Dastidar, M.G.; Scarpa, A.; Magele, I.; Ruiz-Duarte, P.; von Born, P.; Bald, L.; Jouannet, V.; Maizel, A. ARF5/MONOPTEROS directly regulates miR390 expression in the Arabidopsis thaliana primary root meristem. *Plant Direct* **2019**, *3*, e00116, doi:10.1002/pld3.116.
16. Yao, S.; Yang, Z.; Yang, R.; Huang, Y.; Guo, G.; Kong, X.; Lan, Y.; Zhou, T.; Wang, H.; Wang, W., et al. Transcriptional Regulation of miR528 by OsSPL9 Orchestrates Antiviral Response in Rice. *Mol Plant* **2019**, *12*, 1114-1122, doi:10.1016/j.molp.2019.04.010.
17. Wu, J.; Yang, R.; Yang, Z.; Yao, S.; Zhao, S.; Wang, Y.; Li, P.; Song, X.; Jin, L.; Zhou, T., et al. ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nat Plants* **2017**, *3*, 16203, doi:10.1038/nplants.2016.203.
18. Yang, R.; Li, P.; Mei, H.; Wang, D.; Sun, J.; Yang, C.; Hao, L.; Cao, S.; Chu, C.; Hu, S., et al. Fine-Tuning of MiR528 Accumulation Modulates Flowering Time in Rice. *Mol Plant* **2019**, *12*, 1103-1113, doi:10.1016/j.molp.2019.04.009.
19. Yuan, S.; Li, Z.; Li, D.; Yuan, N.; Hu, Q.; Luo, H. Constitutive Expression of Rice MicroRNA528 Alters Plant Development and Enhances Tolerance to Salinity Stress and Nitrogen Starvation in Creeping Bentgrass. *Plant Physiol* **2015**, *169*, 576-593, doi:10.1104/pp.15.00899.
20. Sun, Q.; Liu, X.; Yang, J.; Liu, W.; Du, Q.; Wang, H.; Fu, C.; Li, W.X. MicroRNA528 Affects Lodging Resistance of Maize by Regulating Lignin Biosynthesis under Nitrogen-Luxury Conditions. *Mol Plant* **2018**, *11*, 806-814, doi:10.1016/j.molp.2018.03.013.
21. Lujan-Soto, E.; Juarez-Gonzalez, V.T.; Reyes, J.L.; Dinkova, T.D. MicroRNA Zma-miR528 Versatile Regulation on Target mRNAs during Maize Somatic Embryogenesis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22105310.
22. Li, D.; Wang, L.; Liu, X.; Cui, D.; Chen, T.; Zhang, H.; Jiang, C.; Xu, C.; Li, P.; Li, S., et al. Deep sequencing of maize small RNAs reveals a diverse set of microRNA in dry and imbibed seeds. *PLoS One* **2013**, *8*, e55107, doi:10.1371/journal.pone.0055107.
23. Li, D.; Liu, Z.; Gao, L.; Wang, L.; Gao, M.; Jiao, Z.; Qiao, H.; Yang, J.; Chen, M.; Yao, L., et al. Genome-Wide Identification and Characterization of microRNAs in Developing Grains of *Zea mays* L. *PLoS One* **2016**, *11*, e0153168, doi:10.1371/journal.pone.0153168.
24. Shen, Y.; Jiang, Z.; Lu, S.; Lin, H.; Gao, S.; Peng, H.; Yuan, G.; Liu, L.; Zhang, Z.; Zhao, M., et al. Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *441*, 425-430, doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.113.
25. Chavez-Hernandez, E.C.; Alejandri-Ramirez, N.D.; Juarez-Gonzalez, V.T.; Dinkova, T.D. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front Plant Sci* **2015**, *6*, 555, doi:10.3389/fpls.2015.00555.
26. Chen, C.; Liu, Y.; Xia, R. Jack of Many Trades: The Multifaceted Role of miR528 in Monocots. *Mol Plant* **2019**, *12*, 1044-1046, doi:10.1016/j.molp.2019.06.007.
27. Mejia-Guerra, M.K.; Li, W.; Galeano, N.F.; Vidal, M.; Gray, J.; Doseff, A.I.; Grotewold, E. Core Promoter Plasticity Between Maize Tissues and Genotypes Contrasts with Predominance of Sharp Transcription Initiation Sites. *Plant Cell* **2015**, *27*, 3309-3320, doi:10.1105/tpc.15.00630.
28. Xie, Z.; Nolan, T.M.; Jiang, H.; Yin, Y. AP2/ERF Transcription Factor Regulatory Networks in Hormone and Abiotic Stress Responses in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **2019**, *10*, 228, doi:10.3389/fpls.2019.00228.
29. Printz, B.; Lutts, S.; Hausman, J.F.; Sergeant, K. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics. *Front Plant Sci* **2016**, *7*, 601, doi:10.3389/fpls.2016.00601.
30. Le Hir, R.; Bellini, C. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **2013**, *4*, 164, doi:10.3389/fpls.2013.00164.
31. Alvarez, J.M.; Riveras, E.; Vidal, E.A.; Gras, D.E.; Contreras-Lopez, O.; Tamayo, K.P.; Aceituno, F.; Gomez, I.; Ruffel, S.; Lejay, L., et al. Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription

- factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* **2014**, *80*, 1-13, doi:10.1111/tpj.12618.
32. Freire-Rios, A.; Tanaka, K.; Crespo, I.; van der Wijk, E.; Sizontsova, Y.; Levitsky, V.; Lindhoud, S.; Fontana, M.; Hohlbein, J.; Boer, D.R., et al. Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2020**, *117*, 24557-24566, doi:10.1073/pnas.2009554117.
33. Alejandri-Ramirez, N.D.; Chavez-Hernandez, E.C.; Contreras-Guerra, J.L.; Reyes, J.L.; Dinkova, T.D. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeno maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiol Biochem* **2018**, *122*, 78-89, doi:10.1016/j.plaphy.2017.11.013.
34. Osuna, D.; Prieto, P.; Aguilar, M. Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. *Front Plant Sci* **2015**, *6*, 1023, doi:10.3389/fpls.2015.01023.
35. Galli, M.; Khakhar, A.; Lu, Z.; Chen, Z.; Sen, S.; Joshi, T.; Nemhauser, J.L.; Schmitz, R.J.; Gallavotti, A. The DNA binding landscape of the maize AUXIN RESPONSE FACTOR family. *Nat Commun* **2018**, *9*, 4526, doi:10.1038/s41467-018-06977-6.
36. Zhao, X.; Li, L. Comparative analysis of microRNA promoters in *Arabidopsis* and rice. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2013**, *11*, 56-60, doi:10.1016/j.gpb.2012.12.004.
37. Trevisan, S.; Nonis, A.; Begheldo, M.; Manoli, A.; Palme, K.; Caporale, G.; Ruperti, B.; Quaggiotti, S. Expression and tissue-specific localization of nitrate-responsive miRNAs in roots of maize seedlings. *Plant Cell Environ* **2012**, *35*, 1137-1155, doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02478.x.
38. Meng, Y.; Huang, F.; Shi, Q.; Cao, J.; Chen, D.; Zhang, J.; Ni, J.; Wu, P.; Chen, M. Genome-wide survey of rice microRNAs and microRNA-target pairs in the root of a novel auxin-resistant mutant. *Planta* **2009**, *230*, 883-898, doi:10.1007/s00425-009-0994-3.
39. Megraw, M.; Baev, V.; Rusinov, V.; Jensen, S.T.; Kalantidis, K.; Hatzigeorgiou, A.G. MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA* **2006**, *12*, 1612-1619, doi:10.1261/rna.130506.
40. Jores, T.; Tonnie, J.; Wrightsman, T.; Buckler, E.S.; Cuperus, J.T.; Fields, S.; Queitsch, C. Synthetic promoter designs enabled by a comprehensive analysis of plant core promoters. *Nat Plants* **2021**, *7*, 842-855, doi:10.1038/s41477-021-00932-y.
41. Megraw, M.; Cumbie, J.S.; Ivanchenko, M.G.; Filichkin, S.A. Small Genetic Circuits and MicroRNAs: Big Players in Polymerase II Transcriptional Control in Plants. *Plant Cell* **2016**, *28*, 286-303, doi:10.1105/tpc.15.00852.
42. Stelpflug, S.C.; Sekhon, R.S.; Vaillancourt, B.; Hirsch, C.N.; Buell, C.R.; de Leon, N.; Kaepler, S.M. An Expanded Maize Gene Expression Atlas based on RNA Sequencing and its Use to Explore Root Development. *Plant Genome* **2016**, *9*, doi:10.3835/plantgenome2015.04.0025.
43. Walley, J.W.; Sartor, R.C.; Shen, Z.; Schmitz, R.J.; Wu, K.J.; Urich, M.A.; Nery, J.R.; Smith, L.G.; Schnable, J.C.; Ecker, J.R., et al. Integration of omic networks in a developmental atlas of maize. *Science* **2016**, *353*, 814-818, doi:10.1126/science.aag1125.
44. Woodhouse, M.R.; Sen, S.; Schott, D.; Portwood, J.L.; Freeling, M.; Walley, J.W.; Andorf, C.M.; Schnable, J.C. qTeller: A tool for comparative multi-genomic gene expression analysis. *Bioinformatics* **2021**, *10.1093/bioinformatics/btab604*, doi:10.1093/bioinformatics/btab604.
45. Porto, M.S.; Pinheiro, M.P.; Batista, V.G.; dos Santos, R.C.; Filho Pde, A.; de Lima, L.M. Plant promoters: an approach of structure and function. *Mol Biotechnol* **2014**, *56*, 38-49, doi:10.1007/s12033-013-9713-1.
46. Lu, S. De novo origination of MIRNAs through generation of short inverted repeats in target genes. *RNA Biol* **2019**, *16*, 846-859, doi:10.1080/15476286.2019.1593744.
47. Chorostecki, U.; Moro, B.; Rojas, A.M.L.; Debernardi, J.M.; Schapire, A.L.; Notredame, C.; Palatnik, J.F. Evolutionary Footprints Reveal Insights into Plant MicroRNA Biogenesis. *Plant Cell* **2017**, *29*, 1248-1261, doi:10.1105/tpc.17.00272.
48. Narjala, A.; Nair, A.; Tirumalai, V.; Hari Sundar, G.V.; Shivaprasad, P.V. A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48*, 3103-3118, doi:10.1093/nar/gkaa077.
49. Li, N.; Muthreich, M.; Huang, L.J.; Thurow, C.; Sun, T.; Zhang, Y.; Gatz, C. TGACG-BINDING FACTORS (TGAs) and TGA-interacting CC-type glutaredoxins modulate hyponastic growth in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **2019**, *221*, 1906-1918, doi:10.1111/nph.15496.

-
50. Ullah, I.; Magdy, M.; Wang, L.; Liu, M.; Li, X. Genome-wide identification and evolutionary analysis of TGA transcription factors in soybean. *Sci Rep* **2019**, *9*, 11186, doi:10.1038/s41598-019-47316-z.
51. Roosjen, M.; Paque, S.; Weijers, D. Auxin Response Factors: output control in auxin biology. *J Exp Bot* **2018**, *69*, 179-188, doi:10.1093/jxb/erx237.
52. Walcher, C.L.; Nemhauser, J.L. Bipartite promoter element required for auxin response. *Plant Physiol* **2012**, *158*, 273-282, doi:10.1104/pp.111.187559.
53. Hu, Q.Q.; Shu, J.Q.; Li, W.M.; Wang, G.Z. Role of Auxin and Nitrate Signaling in the Development of Root System Architecture. *Front Plant Sci* **2021**, *12*, 690363, doi:10.3389/fpls.2021.690363.
54. Chen, Z.H.; Bao, M.L.; Sun, Y.Z.; Yang, Y.J.; Xu, X.H.; Wang, J.H.; Han, N.; Bian, H.W.; Zhu, M.Y. Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **2011**, *77*, 619-629, doi:10.1007/s11103-011-9838-1.
55. Vidal, E.A.; Araus, V.; Lu, C.; Parry, G.; Green, P.J.; Coruzzi, G.M.; Gutierrez, R.A. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 4477-4482, doi:10.1073/pnas.0909571107.
56. Luo, P.; Di, D.; Wu, L.; Yang, J.; Lu, Y.; Shi, W. MicroRNAs Are Involved in Regulating Plant Development and Stress Response through Fine-Tuning of TIR1/AFB-Dependent Auxin Signaling. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23010510.
57. Wojcik, 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, doi:10.1007/s00425-016-2505-7.
58. Alvarez, J.M.; Moyano, T.C.; Zhang, T.; Gras, D.E.; Herrera, F.J.; Araus, V.; O'Brien, J.A.; Carrillo, L.; Medina, J.; Vicente-Carbajosa, J., et al. Local Changes in Chromatin Accessibility and Transcriptional Networks Underlying the Nitrate Response in Arabidopsis Roots. *Mol Plant* **2019**, *12*, 1545-1560, doi:10.1016/j.molp.2019.09.002.
59. Brooks, M.D.; Cirrone, J.; Pasquino, A.V.; Alvarez, J.M.; Swift, J.; Mittal, S.; Juang, C.L.; Varala, K.; Gutierrez, R.A.; Krouk, G., et al. Network Walking charts transcriptional dynamics of nitrogen signaling by integrating validated and predicted genome-wide interactions. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1569, doi:10.1038/s41467-019-09522-1.
60. Gatz, C. From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **2013**, *26*, 151-159, doi:10.1094/MPMI-04-12-0078-IA.
61. Weiste, C.; Droge-Laser, W. The Arabidopsis transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3883, doi:10.1038/ncomms4883.
62. Noshi, M.; Mori, D.; Tanabe, N.; Maruta, T.; Shigeoka, S. Arabidopsis clade IV TGA transcription factors, TGA10 and TGA9, are involved in ROS-mediated responses to bacterial PAMP flg22. *Plant Sci* **2016**, *252*, 12-21, doi:10.1016/j.plantsci.2016.06.019.
63. Wang, Y.; Salasini, B.C.; Khan, M.; Devi, B.; Bush, M.; Subramaniam, R.; Hepworth, S.R. Clade I TGACG-Motif Binding Basic Leucine Zipper Transcription Factors Mediate BLADE-ON-PETIOLE-Dependent Regulation of Development. *Plant Physiol* **2019**, *180*, 937-951, doi:10.1104/pp.18.00805.
64. Boer, D.R.; Freire-Rios, A.; van den Berg, W.A.; Saaki, T.; Manfield, I.W.; Kepinski, S.; Lopez-Vidrieo, I.; Franco-Zorrilla, J.M.; de Vries, S.C.; Solano, R., et al. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* **2014**, *156*, 577-589, doi:10.1016/j.cell.2013.12.027.
65. Pierre-Jerome, E.; Moss, B.L.; Lanctot, A.; Hageman, A.; Nemhauser, J.L. Functional analysis of molecular interactions in synthetic auxin response circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113*, 11354-11359, doi:10.1073/pnas.1604379113.
66. Lieberman-Lazarovich, M.; Yahav, C.; Israeli, A.; Efroni, I. Deep Conservation of cis-Element Variants Regulating Plant Hormonal Responses. *Plant Cell* **2019**, *31*, 2559-2572, doi:10.1105/tpc.19.00129.
67. Asim, M.; Ullah, Z.; Oluwaseun, A.; Wang, Q.; Liu, H. Signalling Overlaps between Nitrate and Auxin in Regulation of The Root System Architecture: Insights from the Arabidopsis thaliana. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21082880.

-
68. Matilla, A.J. Auxin: Hormonal Signal Required for Seed Development and Dormancy. *Plants (Basel)* **2020**, *9*, doi:10.3390/plants9060705.
69. Wu, M.; Wu, J.; Gan, Y. The new insight of auxin functions: transition from seed dormancy to germination and floral opening in plants. *Plant Growth Regulation* **2020**, *91*, 169-174.
70. Lopez-Ruiz, B.A.; Juarez-Gonzalez, V.T.; Chavez-Hernandez, E.C.; Dinkova, T.D. MicroRNA Expression and Regulation During Maize Somatic Embryogenesis. *Methods Mol Biol* **2018**, *1815*, 397-410, doi:10.1007/978-1-4939-8594-4_28.
71. Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, W71-74, doi:10.1093/nar/gkm306.
72. Liu, F.; Zheng, K.; Chen, H.C.; Liu, Z.F. Capping-RACE: a simple, accurate, and sensitive 5' RACE method for use in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, e129, doi:10.1093/nar/gky739.
73. Kozomara, A.; Birgaoanu, M.; Griffiths-Jones, S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, D155-D162, doi:10.1093/nar/gky1141.
74. Guo, Z.; Kuang, Z.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Tao, Y.; Cheng, C.; Yang, J.; Lu, X.; Hao, C.; Wang, T., et al. PmiREN: a comprehensive encyclopedia of plant miRNAs. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48*, D1114-D1121, doi:10.1093/nar/gkz894.
75. Bolser, D.; Staines, D.M.; Pritchard, E.; Kersey, P. Ensembl Plants: Integrating Tools for Visualizing, Mining, and Analyzing Plant Genomics Data. *Methods Mol Biol* **2016**, *1374*, 115-140, doi:10.1007/978-1-4939-3167-5_6.
76. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, 1792-1797, doi:10.1093/nar/gkh340.
77. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Niyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **2018**, *35*, 1547-1549, doi:10.1093/molbev/msy096.
78. Chow, C.N.; Lee, T.Y.; Hung, Y.C.; Li, G.Z.; Tseng, K.C.; Liu, Y.H.; Kuo, P.L.; Zheng, H.Q.; Chang, W.C. PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, D1155-D1163, doi:10.1093/nar/gky1081.
79. Lescot, M.; Dehais, P.; Thijs, G.; Marchal, K.; Moreau, Y.; Van de Peer, Y.; Rouze, P.; Rombauts, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 325-327, doi:10.1093/nar/30.1.325.
80. Irfan, M.; Ting, Z.T.; Yang, W.; Chunyu, Z.; Qing, M.; Lijun, Z.; Feng, L. Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. *Research Journal of Biotechnology* **2013**, *8*, 41-45.
81. Hussain, H.; Chong, N.F. Combined Overlap Extension PCR Method for Improved Site Directed Mutagenesis. *Biomed Res Int* **2016**, *2016*, 8041532, doi:10.1155/2016/8041532.
82. Yoo, S.D.; Cho, Y.H.; Sheen, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 1565-1572, doi:10.1038/nprot.2007.199.
83. Liu, K.H.; Niu, Y.; Konishi, M.; Wu, Y.; Du, H.; Sun Chung, H.; Li, L.; Boudsocq, M.; McCormack, M.; Maekawa, S., et al. Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature* **2017**, *545*, 311-316, doi:10.1038/nature22077.
84. Chen, Z.; Agnew, J.L.; Cohen, J.D.; He, P.; Shan, L.; Sheen, J.; Kunkel, B.N. Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 20131-20136, doi:10.1073/pnas.0704901104.
85. Hanifiah, F.H.A.; Abdullah, S.N.A.; Othman, A.; Shaharuddin, N.A.; Saud, H.M.; Hasnulhadi, H.A.H.; Munusamy, U. GCTTCA as a novel motif for regulating mesocarp-specific expression of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) stearoyl-ACP desaturase gene. *Plant Cell Rep* **2018**, *37*, 1127-1143, doi:10.1007/s00299-018-2300-y.
86. Cervera, M. Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. *Methods Mol Biol* **2005**, *286*, 203-214, doi:10.1385/1-59259-827-7:203.

Review

Time to Wake Up: Epigenetic and Small-RNA-Mediated Regulation during Seed Germination

Eduardo Luján-Soto and Tzvetanka D. Dinkova * 

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; eduardolujan@quimica.unam.mx

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

Abstract: Plants make decisions throughout their lifetime based on complex networks. Phase transitions during seed growth are not an exception. From embryo development through seedling growth, several molecular pathways control genome stability, environmental signal transduction and the transcriptional landscape. Particularly, epigenetic modifications and small non-coding RNAs (sRNAs) have been extensively studied as significant handlers of these processes in plants. Here, we review key epigenetic (histone modifications and methylation patterns) and sRNA-mediated regulatory networks involved in the progression from seed maturation to germination, their relationship with seed traits and crosstalk with environmental inputs.

Keywords: DNA methylation; dormancy; germination; histone modification; small RNAs



Citation: Luján-Soto, E.; Dinkova, T.D. Time to Wake Up: Epigenetic and Small-RNA-Mediated Regulation during Seed Germination. *Plants* **2021**, *10*, 236. <https://doi.org/10.3390/plants10020236>

Academic Editor: Christel Carles

Received: 21 December 2020

Accepted: 22 January 2021

Published: 26 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Seed is a fundamental entity in the life cycle of higher plants that functions to protect the embryo. It senses environmental cues to couple germination with optimal developmental conditions for the new plant. Timing of seed germination is a central trait controlled by complex network of biochemical and molecular mechanisms. The balance between inactive and germinating states impacts not only the offspring viability but also agronomical and industrial features like crop production and yield, harvesting period and post-harvesting processing. Molecular dissection of seed development phase transitions has revealed cell-signaling pathways, hormonal balance interactions, biotic or abiotic stress effects and biomechanical aspects leading to germination arrest and progression. Lately, attention has been directed to learning from large-scale genome reprogramming, where coordinated expression profiles are required for phase transitions during seed life cycle and are often associated with major changes in chromatin structure. Dynamic transcriptional control is endorsed by interactions between epigenetic effectors. Several mutants with known defects in seed maturation, dormancy and germination correspond to genes involved in chromatin structure, DNA methylation and sRNA pathways, evidencing the importance of epigenetic regulation and chromatin dynamic maintenance during these developmental stages. Here we discuss recent knowledge on epigenetic and non-coding small RNA-mediated regulation during late embryonic maturation driving to dormancy acquisition and posterior germination, with particular highlights on interactions between effectors of each regulatory path to achieve these transitions.

2. Seed Dormancy and Germination

2.1. Securing the Future Plant

Several molecular, biochemical and physiological events take place in the embryo and surrounding tissues throughout seed development. These have been grouped into three major stages: embryo development, seed maturation and dormancy (Figure 1). At the late embryogenesis stage, seeds integrate signals and undergo final desiccation to become



ORIGINAL RESEARCH

Starch degradation in the bean fruit pericarp is characterized by an increase in maltose metabolism

Lilia Bernal¹ | Eduardo Luján-Soto¹ | Carlos A. Fajardo-Hernández² |
Patricia Coello¹ | Mario Figueroa² | Eleazar Martínez-Barajas¹ ¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico²Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico**Correspondence**Eleazar Martínez-Barajas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad de México 04510, México.
Email: emtz@unam.mx**Funding information**

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Numbers: IN222220, IN226520; Facultad de Química, UNAM, Grant/Award Numbers: PAIP 5000-9127, PAIP 5000-9145

Edited by H. Brumer

Abstract

The bean fruit pericarp accumulates a significant amount of starch, which starts to be degraded 20 days after anthesis (DAA) when seed growth becomes exponential. This period is also characterized by the progressive senescence of the fruit pericarp. However, the chloroplasts maintained their integrity, indicating that starch degradation is a compartmentalized process. The process coincided with a transient increase in maltose and sucrose levels, suggesting that β -amylase is responsible for starch degradation. Starch degradation in the bean fruit pericarp is also characterized by a large increase in starch phosphorylation, as well as in the activities of cytosolic disproportionating enzyme 2 (DPE2, EC 2.4.1.25) and glucan phosphorylase (PHO2, EC 2.4.1.1). This suggests that the rate of starch degradation in the bean fruit pericarp 20 DAA is dependent on the transformation of starch to a better substrate for β -amylase and the increase in the rate of cytosolic metabolism of maltose.

1 | INTRODUCTION

Starch is an important element in the metabolic strategies used by plants to cope with the negative effects of environmental variability. A large fraction of the carbon assimilated during the day is transiently stored as starch in chloroplasts and used to support metabolic needs during the night. Starch degradation has been extensively analyzed in *Arabidopsis* leaves. The available information shows that the process is under circadian control and subjected to additional regulation to meet the need for reduced carbon (C) levels during the night (Fernandez et al., 2017; Sulpice et al., 2014). Starch degradation in *Arabidopsis* leaves involves sequential phosphorylation of the C6 and C3 residues by glucan water dikinase (GWD) and phosphoglucan water dikinase (PWD), respectively (Hejazi et al., 2009; Ritte et al., 2006). Starch

phosphorylation alters the granule surface and facilitates its hydration (Hejazi et al., 2009). However, starch-bound phosphate can impede the movement of starch-degrading enzymes along the glucan chain and must be removed by the phosphoglucan phosphatases STARCH EXCESS4 (SEX4) and LIKE SEX FOUR2 (LSF2). SEX4 hydrolyses both C6- and C3-phosphate esters, whereas LSF2 is specific for glucans phosphorylated at C3 (Hejazi et al., 2010; Santelia et al., 2011). β -Amylases (EC 3.2.1.2.) catalyze the hydrolysis of α -1,4-glycosidic bonds and release maltose from the exposed nonreducing end of the glucan chain. In the *Arabidopsis* genome, four genes encode chloroplast β -amylases (BAM1, -2, -3, and -4), with BAM1 and BAM3 being the most important for starch degradation (Fulton et al., 2008). ISOAMYLASE3 and LIMIT DEXTRINASE hydrolyze α -1,6-glycosidic bonds and are required for removing branches. Maltose and glucose produced by starch

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Physiologia Plantarum* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Scandinavian Plant Physiology Society.

OPEN

The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis

Received: 29 March 2019
Accepted: 23 September 2019
Published online: 10 October 2019

Vasti T. Juárez-González¹, Brenda A. López-Ruiz¹, Patricia Baldrich², Eduardo Luján-Soto¹, Blake C. Meyers^{2,3} & Tzvetanka D. Dinkova¹

Maize somatic embryogenesis (SE) requires the induction of embryogenic callus and establishment of proliferation before plant regeneration. The molecular mechanisms underlying callus embryogenic potential are not well understood. Here we explored the role of small RNAs (sRNAs) and the accumulation of their target transcripts in maize SE at the dedifferentiation step using VS-535 zygotic embryos collected at distinct developmental stages and displaying contrasting *in vitro* embryogenic potential and morphology. MicroRNAs (miRNAs), *trans*-acting siRNAs (tasiRNAs), heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs) populations and their RNA targets were analyzed by high-throughput sequencing. Abundances of specific miRNAs, tasiRNAs and targets were validated by qRT-PCR. Unique accumulation patterns were found for immature embryo at 15 Days After Pollination (DAP) and for the callus induction from this explant, as compared to 23 DAP and mature embryos. miR156, miR164, miR166, tasiARFs and the 24 nt hc-siRNAs displayed the most strikingly different patterns between explants and during dedifferentiation. According to their role in auxin responses and developmental cues, we conclude that sRNA-target regulation operating within the 15 DAP immature embryo explant provides key molecular hints as to why this stage is relevant for callus induction with successful proliferation and plant regeneration.

Plant zygotic embryogenesis is determined by complex gene regulatory networks to achieve appropriate spatiotemporal cell division and differentiation^{1–3}. An alternative gene expression program, promoted by high phytohormone concentrations, allows the accomplishment of embryogenesis and plant regeneration from somatic cells. This process is known as Somatic Embryogenesis (SE)^{4,5}. The required conditions and regulatory programs vary between plant species. For maize, embryogenic callus induction and plant regeneration success strongly depends on the genotype and tissue used as explant^{6,7}.

Gene regulation by small RNAs (sRNAs), as revealed by differential abundance analyses, has emerged as an important aspect of SE induction in a variety of plant species^{8–10} including maize^{11–13}. sRNA silencing mechanisms are involved in genome stability, defense against virus and transposable elements (TEs), epigenetic modifications, and post-transcriptional regulation^{14,15}. microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs) distinguish by their biogenesis pathways¹⁶. The siRNA class is further sub-divided in heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs), secondary siRNAs and natural anti-sense siRNAs (natsiRNAs)¹⁷. Secondary siRNAs comprise phased siRNAs (phasiRNAs) and *trans*-acting siRNAs (tasiRNAs).

miRNAs are derived from single strand RNAs (ssRNAs) transcribed by RNA polymerase II that fold into stable stem-loop secondary structures called primary miRNAs (pri-miRNAs). The double-stranded RNA (dsRNA) portion of a pri-miRNA is recognized by a DICER-LIKE (DCL) enzyme, DCL1 in plants, to generate the miRNA

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, México. ²Donald Danforth Plant Science Center, 975 North Warson Road, St. Louis, MO, 63132, USA. ³Division of Plant Sciences, University of Missouri, Columbia, Missouri, 65211, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.D.D. (email: cesy@unam.mx)



Differential gene expression of virulence factors modulates infectivity of TcI *Trypanosoma cruzi* strains

Ruben D. Arroyo-Olarte^{1,2} · Ignacio Martínez¹ · Eduardo Lujan³ · Fela Mendlovic⁴ · Tzvetanka Dinkova³ · Bertha Espinoza¹

Received: 4 May 2020 / Accepted: 16 September 2020 / Published online: 2 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, whose clinical outcome ranges from asymptomatic individuals to chronic fatal megasyndromes. Despite being central to pathogenesis, the regulation of parasite virulence factors' expression remains largely unknown. In this work, the relative expression of several parasite virulence factors between two TcI strains (Ninoa, low virulence and Qro, high virulence) was assessed by qRT-PCR of total and of polysome-associated mRNA, as well as by western blots. Trypomastigotes were also incubated with specific anti-sense morpholino oligonucleotides to block the translation of a selected virulence factor, calreticulin, in both strains. Ninoa trypomastigotes showed significantly lower levels of trypomastigote-decay acceleration factor, complement regulatory protein, complement C2 receptor inhibitor trispanning, and glycoproteins 82 and 90 mRNAs compared with Qro. There was a significantly lower recruitment of complement regulatory protein and complement C2 receptor inhibitor trispanning mRNAs to polysomes and higher recruitment of MASP mRNA to monosomes in Ninoa strain. Calreticulin mRNA displayed both a higher total mRNA level and recruitment to translationally active polysomes in the Ninoa strain (low virulence) than in the Qro strain (high virulence). When calreticulin was downregulated by $\approx 50\%$ by anti-sense morpholino oligonucleotides, a significant decrease of parasite invasion in mammalian cells was found in both strains. Calreticulin downregulation, however, only increased significantly the activation of the complement system by Ninoa trypomastigotes. These results suggest a role for the regulation of virulence factors' gene expression in the differential virulence among *T. cruzi* strains. Furthermore, a possible function of calreticulin in parasite invasion not related to its binding to complement factors is shown.

Keywords *Trypanosoma cruzi* · Virulence factors · Polysome profiling · Morpholino oligonucleotides

Section Editor: Panagiotis Karanis

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06891-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bertha Espinoza
besgu@iibiomedicas.unam.mx

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

² Present address: Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 07360 Mexico City, Mexico

³ Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

⁴ Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

Introduction

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite and the etiological agent of Chagas disease. Chagas disease shows a highly variable pathology ranging from indeterminate cases with no symptoms to chronic conditions like cardiomyopathy and megasyndromes with potential deadly consequences. Both parasite and host factors have been proposed as responsible for this variability in the pathology outcome. The immunological host response has been extensively characterized and has been deemed essential for the control of parasitemia. However, a parasitological cure is very rarely achieved. On the other hand, there has been little success in linking the high diversity of *T. cruzi* strains grouped in 6 different discrete typing units (DTUs) with their biological features including their virulence properties, i.e., potential to cause host death or damage, although recent work has shown strain-specific pathophysiological signatures (Santi-Rocca et al. 2017).

Chapter 12

The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis



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

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

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

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

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