



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Expresión y función de miRNAs específicos durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Elva Carolina Chávez Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rosa Navarro González
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F. AGOSTO, 2015



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM. Gracias a Leticia García Gutiérrez.

A mi comité tutor integrado por la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, el Dr. José Luis Reyes Taboada y la Dra. Rosa Estela Navarro González.

A la Facultad de Química de la UNAM:

A todos mis amigos-compañeros-colegas del laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica de la UNAM: Naholi, Thamara, Luis Contreras, Kevin, Abraham, David, Kenia, Mariela, Marisol, Marco, Daniel, Erika, Luis Castilla, Ana Lilia, Alejandra, Pedro, Eloisa y Carlos. En especial al equipo callos.

Al Departamento de Bioquímica, al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, al Departamento de Alimentos y a la BioUSAI. En especial a Laurel Élide Fabila Ibarra, a la M. en C. Maria Teresa de Jesús Olivera Flores por su apoyo en el cultivo de callos embriogénicos de maíz y a la Dra. Carolina Peña Montes por su ayuda en los experimentos de qRT-PCR.

A mis amigos del Posgrado en Ciencias Bioquímicas: Paulina, Manuel, Oscar, Joyce, Alma, Maryana y Carla.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A mi "familia" montañista por mantener mi vida en equilibrio.

Al financiamiento de los proyectos IN210912 y IN211215 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM con el cual se logró realizar este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado 2015 por medio del cual se obtuvo financiamiento para presentar este trabajo en el simposio RNA Silencing in Plants en Keystone, Colorado, USA.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Resumen

La embriogénesis somática de maíz es inducida a partir de embriones inmaduros cigóticos en presencia de las hormonas auxina y citocinina en oscuridad. Durante la embriogénesis somática de maíz la expresión de microRNAs se reprograma y ciertas familias se ven enriquecidas mientras que otras familias características del embrión cigótico decrecen. Es posible regenerar plantas de maíz a partir de callos embriogénicos al remover las hormonas en presencia de fotoperiodo. En este trabajo se analizó cómo son modificados los niveles de algunos miRNAs y sus mRNAs blanco durante la regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos de distinta edad de subcultivo. Se evaluó el efecto que tiene la reducción hormonal y la presencia de fotoperiodo por separado. Se analizaron dos genotipos de maíz (Costeño y Tuxpeño).

Se examinó la abundancia de miRNAs presentes en los callos embriogénicos de maíz (miR156, miR159, miR164, miR168, miR397, miR398, miR408, miR528) y de algunos de sus mRNAs blanco predichos (*SBP23*, *MYB138*, *CUC2*, *AGO1C*, *SOD9*, *GR1*, *SOD1A* y *PLC*). La mayoría de los miRNAs examinados, a excepción de miR159, incrementaron sus niveles en respuesta a la primera disminución hormonal independientemente de la luz. En etapas posteriores de diferenciación los miRNAs relacionados a estrés disminuyeron. Sin embargo, la expresión de los mRNAs blanco de miRNAs es dependiente de la luz y del genotipo. La correlación inversa esperada entre miRNA y su blanco sólo se observó en algunas etapas, sugiriendo que la expresión de los mRNAs blanco de miRNAs está regulada a varios niveles. También se observó que la edad del cultivo influye en el tiempo de regeneración de plantas, así como en el fenotipo y la respuesta a nivel molecular durante la regeneración a partir de embriones somáticos de maíz.

Abstract

Maize somatic embryogenesis is induced from immature zygotic embryo in the presence of the appropriate auxin levels and darkness. During somatic embryogenesis the expression of small RNAs is reprogrammed and certain microRNAs become particularly enriched, while others characteristic to the zygotic embryo are decreased. Maize plants can develop from embryogenic calli in the presence of light when hormones are depleted. Here we asked how miRNA abundance and target gene expression are modified during plant regeneration and how is this influenced by the photoperiod and the hormone depletion. Two maize cultivars, Tuxpeño and Costeño, from different batches of 6 months and two years of subculture were tested.

The expression levels of a miRNA set present in the maize embryogenic calli (miR156, miR159, miR164, miR168, miR397, miR398, miR408, miR528) and of some of their predicted targets (*SBP23*, *MYB138*, *CUC2*, *AGO1C*, *SOD9*, *GR1*, *SOD1A* and *PLC*) were examined during plant regeneration upon staged hormone depletion in the presence of light photoperiod or darkness. Almost all examined miRNAs, except miR159, increased upon hormone first decrease, regardless of light absence/presence. And at later stages of plant regeneration stress related miRNAs decreased. However, the expression of miRNA target genes appeared strongly regulated by the light exposure and genotype. The expected inverse correlation between miRNA and target abundance was only observed at some stages. This suggests that the miRNA target mRNA levels are probably regulated by additional mechanisms. We also found that the age of subculture influences the time of plant regeneration, the phenotype and molecular response of somatic embryos.

Abreviaturas

% H	Porcentaje de auxina y citocinina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
5' RACE	Rápida Amplificación de Extremos 5' de cDNA
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGO1	Argonauta 1
AMP1	<i>Altered Meristem Program 1</i>
APS	ATP sulfurilasas
ARF	<i>Auxin Response Factor</i>
ATAF	<i>Arabidopsis Transcription Activation Factor</i>
ATP	Adenosín trifosfato
<i>b_{af}</i>	Plastoquinol-plastocianin reductasa
CAP	7-metil guanosina trifosfato
CBP	Proteína de unión a CAP
CCS	Chaperona de Superóxido Dismutasa de Cobre
cDNA	ADN complementario
COX5b-1	Subunidad V de la Citocromo c Oxidasa
CSD, SOD	Superóxido Dismutasa de Cobre
CUC	<i>Cup-shaped cotyledon</i>
DCL1	<i>Dicer-like 1</i>
DDL	<i>Dawdle</i>
dNTP	Desoxirribonucleosido trifósforo
GA	Giberelina
GR1	<i>Gamma response protein 1</i>
HD-Zip	Homeodominio de cierre de leucina
HEN1	<i>Hua enhancer</i>
HST	<i>Hasty</i>
HYL1	<i>Hyponastic Leaves 1</i>
INIFAP	Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
LAC	Lacasa
MIR	Gen de microRNA
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
MYB	Factor de transcripción de la familia de Myeloblastosis
NAC	Dominio conservado de los factores transcripcionales NAM, ATAF y CUC
NAM	<i>No apical meristem</i>
ND	No detectado
P	Plántula
PAZ	Dominio conservado de Piwi, Argonauta y Zwillie

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PHB	<i>Phabulosa</i>
PIWI	<i>P-element Induced Wimpy Testis Domain</i>
PLC	Plastocianina
Pol II	RNA polimerasa II
qRT-PCR	Retrotranscripción seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.
RAM	Meristemo Apical de la Raíz
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	Meristemo Apical del Tallo
SCL	Factor de transcripción <i>Scarecrow-like</i>
SDN1	Nucleasa degradadora de RNAs pequeños
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	<i>Serrate</i>
siRNA	RNAs pequeños interferentes
SPL, SBP	Factores transcripcionales <i>Squamosa-promoter binding protein-like</i>
TBE	Buffer de Tris, Borato y EDTA
UBC24	Ubiquitina 24
UPE	<i>Unpair energy</i>
ZmDRN	Factor de transcripción <i>Dornröschen</i> de maíz

Índice

Agradecimientos	II
Resumen.....	II
Abstract	III
Abreviaturas.....	IV
Introducción	1
Embriogénesis cigótica.....	1
Embriogénesis somática.....	2
Los microRNAs y su función en el desarrollo de las plantas	6
Biogénesis de miRNAs	6
Función de algunas familias de miRNAs específicas	10
Antecedentes	13
Regulación por miRNAs en la embriogénesis somática de plantas	13
Antecedentes de miRNAs en la embriogénesis somática de plantas monocotiledóneas	16
Hipótesis.....	25
Objetivos	25
Materiales y Métodos	26
Cultivo <i>in vitro</i> de maíz.....	26
Inducción de callos embriogénicos a partir de embriones de maíz inmaduros.....	26
Subcultivo y proliferación en medio N6P.....	27
Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.....	27
Extracción de RNA total.....	28
Northern-Blot	29
Retrotranscripción.....	30
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR).....	31
Resultados	34
Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de distintos lotes de maíz.	34
Abundancia de miRNAs durante la regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos.....	38

Regulación diferencial de mRNAs blanco de miRNAs durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.	42
Discusión	56
Conclusiones	62
Perspectivas	63
Referencias.....	64
Anexo 1.....	73
Genes que participan en la embriogénesis somática de maíz	73
Medios de cultivo	74
Regeneración en fotoperiodo sin cambios hormonales	75
Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis	76

Introducción

Embriogénesis cigótica

El ciclo de vida de las plantas superiores se divide en dos generaciones: una haploide o de gametofito, y una diploide o de esporofito. La generación de gametofito inicia con la meiosis de las esporas que se diferencian en los granos de polen (gametofito masculino con dos células espermáticas) o en el saco embrionario (gametofito femenino con una célula huevo). Mientras que la generación de esporofito inicia con un proceso de doble fertilización que resulta en la formación del cigoto (diploide) y del endospermo (triploide), el cigoto dará origen a la planta madura con sus órganos vegetativos (hojas, tallo, raíz) y flores que contienen a los órganos reproductivos (anteras y pistilo) (Goldberg et al., 1994).

La embriogénesis es la etapa de desarrollo en la que el cigoto unicelular madura hasta formar una estructura multicelular: el embrión maduro (Yang & Zhang, 2010). Esta etapa es muy importante porque en ella se forman los meristemos y primordios que dan lugar a los órganos vegetativos que se diferenciarán en la planta madura (Goldberg et al., 1994). El proceso de embriogénesis en las plantas dicotiledóneas sucede en las etapas: globular, corazón, torpedo y cotiledón; mientras que en las monocotiledóneas, como es el caso del maíz, se divide en: globular, escutelar y coleoptilar (Yang & Zhang, 2010).

En el maíz, las primeras divisiones celulares del cigoto son asimétricas y determinan el eje basal-apical del embrión (Fig. 1). La célula superior calazal origina al embrión, mientras que la célula micropilar más basal forma al suspensor. Las divisiones sucesivas irregulares de la célula apical producen una estructura indiferenciada globular (pro-embrión). Al final de esta etapa globular, se diferencia el protodermo que es una capa unicelular que rodea al embrión. La diferenciación del embrión continúa con la regionalización adaxial/abaxial que es marcada por la expresión de *ZmDRN* (ortólogo de *DORNROSCHEN* de *Arabidopsis*) en el lado abaxial. Después aparece el meristemo apical del tallo (SAM; "Shoot Apical Meristem") en la superficie adaxial. Arriba del suspensor, un grupo de células meristemáticas forma el meristemo apical de la raíz (RAM; "Root Apical Meristem"). El SAM y RAM definen un eje secundario en un ángulo agudo al eje apical/basal del cigoto. Estos dos meristemos son protegidos por dos órganos exclusivos de las gramíneas: el coleóptilo y la coleoriza respectivamente. El SAM es organizado en las capas L1, L2 y L3, y forma

seis primordios de hojas antes de que inicie la dormancia de la semilla. Mientras que la organización del RAM en maíz consiste en un centro quiescente de 1000 a 1500 células con una arquitectura compleja (Forestan et al., 2010).

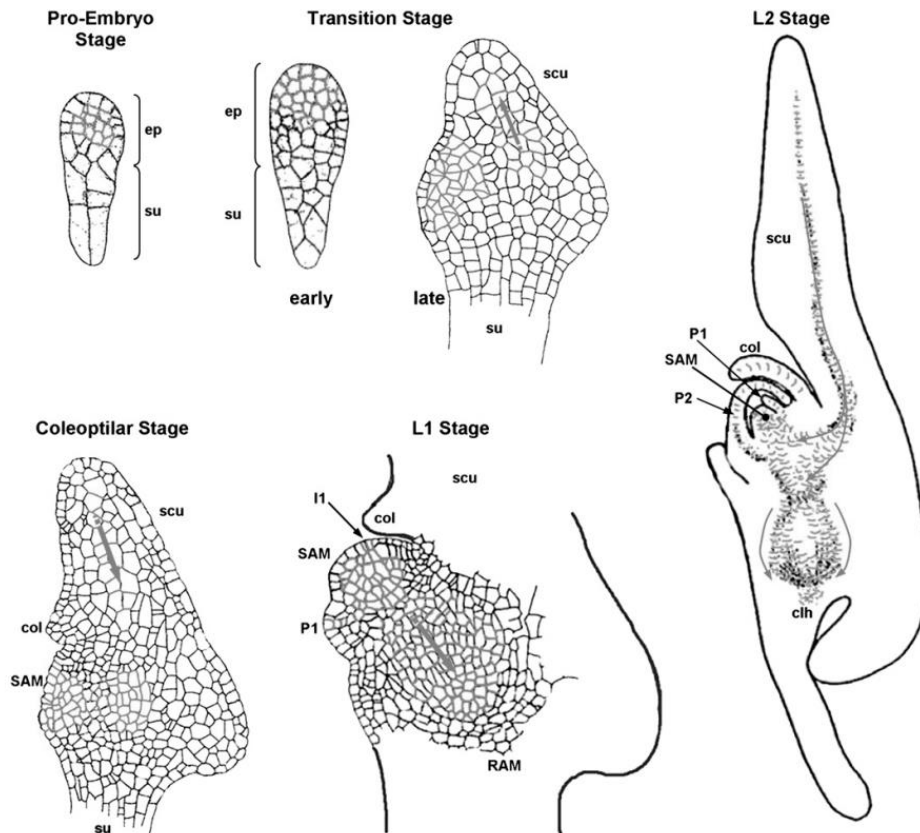


Figura 1. Etapas de la embriogénesis cigótica de maíz. Etapa proembrionaria o globular, etapa de transición o escutelar, y etapa coleoptilar temprana y tardía (L1 y L2). Ep: embrión, su: suspensor, scu: escutelo, col: coleoptilo, SAM: meristemo apical del tallo, RAM: meristemo apical de la raíz, clh, coleoriza, I1: primordio incipiente, P1 y P2: primordios de hojas. Modificado de (Forestan et al., 2010).

Embriogénesis somática

Alternativamente a la embriogénesis cigótica, una planta puede ser derivada de solo una o un grupo de células somáticas. Este proceso de regeneración es conocido como embriogénesis no cigótica o embriogénesis somática. Bajo condiciones favorables de inducción, las células somáticas diferenciadas son reclutadas a una vía de desarrollo distinta para generar células embriogénicas indiferenciadas. Estas células pasan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que

resultan en la formación de un embrión somático y la regeneración de nuevas plantas (Yang & Zhang, 2010).

La embriogénesis somática es un modelo ampliamente usado para estudiar la totipotencialidad celular, así como para entender los procesos de reprogramación necesarios para generar células embriónicas, embriones somáticos maduros y finalmente, la regeneración de nuevas plantas. La embriogénesis somática es un proceso biológico complejo en el cual están involucradas varias vías de señalización celular que son coordinadas de manera muy fina (Yang et al., 2013). Este proceso, además de servir como modelo *in vitro* para el estudio de la embriogénesis, es usado ampliamente como una herramienta biotecnológica para la propagación, transformación y regeneración de plantas (Gatica-Arias et al., 2008).

La embriogénesis somática en maíz fue descrita por primera vez en 1975 (Green & Phillips, 1975) por quienes usaron como explante a embriones inmaduros y lograron regenerar plantas a partir de callos embriogénicos somáticos (Sharma et al., 2012). A partir de entonces, se han probado diferentes condiciones para mejorar la técnica, no obstante, el potencial proliferativo del callo y su capacidad para regenerar plantas es dependiente del explante usado y el genotipo de maíz (Obert et al., 2009; Shen et al., 2012). El explante de elección siguen siendo los embriones inmaduros de maíz de 12 a 18 días después de la polinización (Armstrong & Green, 1985). En cuanto al genotipo, no todas las líneas o variedades de maíz son embriogénicas, se han reportado algunas líneas híbridas con buen potencial embriogénico como Hi II obtenida de la cruce de las líneas A188 x B73 (Armstrong & Green, 1991). La variedad mexicana Tuxpeño (VS-535) y el híbrido derivado de ésta llamado Costeño (H-565), también son altamente embriogénicos y tienen una alta frecuencia de regeneración de plantas (Garrocho-Villegas et al., 2012).

Para iniciar el proceso de embriogénesis somática se utilizan reguladores de crecimiento (hormonas vegetales). Como auxina y citocinina que regulan la división celular y la diferenciación, por lo que son ampliamente usadas para inducir la embriogénesis somática. En la embriogénesis somática de maíz se parte de los embriones inmaduros que son colocados en un medio de cultivo que contiene a una auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), la cual en oscuridad induce un proceso de dediferenciación del explante hacia células meristemáticas totipotenciales (Fig. 2). Días después de la inducción, los tejidos se cambian a medio de cultivo que además de 2,4-D, contiene a una citocinina llamada cinetina; la combinación de auxinas con citocininas

promueve el crecimiento de los agregados celulares conocidos como callos (Jakubeková et al., 2011).

En el proceso se forman callos pre-embriogénicos que proliferan y dan lugar a callos embriogénicos y callos no embriogénicos (Fig. 2F). Los callos no embriogénicos de maíz son blandos y amarillentos; suelen dejar de proliferar en los subcultivos subsecuentes y se oxidan adquiriendo un color café. Los callos embriogénicos se han clasificado como de tipo I o II, los de tipo I son compactos, duros, blancos y opacos, mientras que los de tipo II son compactos y de color amarillo translúcido (Jakubeková et al., 2011).

Si a los callos embriogénicos se les quita el estímulo hormonal y son expuestos a la luz es posible regenerar plantas (Elhiti et al., 2013). Durante la regeneración de plantas los embriones somáticos maduran, comienzan a sintetizar pigmentos volviéndose de color verde y ocurre la organogénesis que da origen a hojas y raíces (Fig. 2G-H) (Jakubeková et al., 2011).

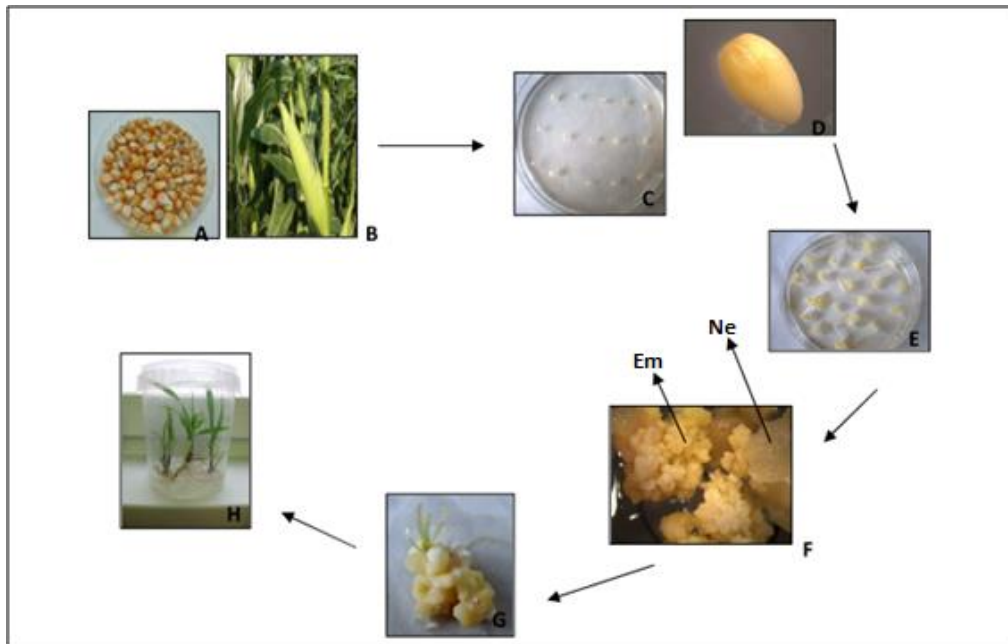


Figura 2. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de embriones inmaduros de maíz. A: semillas de maíz. B: mazorca de maíz inmadura de 20 días post-polinización. C-D: embriones inmaduros en medio de inducción después de un día de cultivo. E: formación de callos de 14 días de cultivo. F: callo embriogénico (Em) con embrión somático en la etapa globular en la superficie de callos no embriogénicos (Ne). G: maduración del callo embriogénico en medio de regeneración, se observa la primera hoja. H: plántulas regeneradas. De C-F los cultivos permanecen en oscuridad. Modificado de Jakubeková (2011).

Durante la embriogénesis somática se establece una vía de desarrollo única que incluye eventos característicos como: la des-diferenciación celular, activación de la división celular, reprogramación de la fisiología celular, su metabolismo y patrones de expresión génica (Yang & Zhang, 2010). Es evidente que para el establecimiento de los callos embriogénicos y para la regeneración de plantas deben existir mecanismos de regulación génica a varios niveles: transcripcional, postranscripcional y traduccional. Aunque en la última década se ha comenzado a entender las bases moleculares de la embriogénesis somática, este proceso de desarrollo sigue siendo un gran misterio (Elhiti et al., 2013). En particular se conoce muy poco sobre el proceso de regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos (Fig. 3). Recientemente se han descrito algunos de los genes que participan en la regulación de la embriogénesis somática (ver Anexo 1 Tabla A1; revisado en Elhiti et al., 2013) y también se ha propuesto que algunas modificaciones epigenéticas juegan un papel esencial durante este proceso (revisado en Miguel & Marum, 2011; Neelakandan & Wang, 2012) .

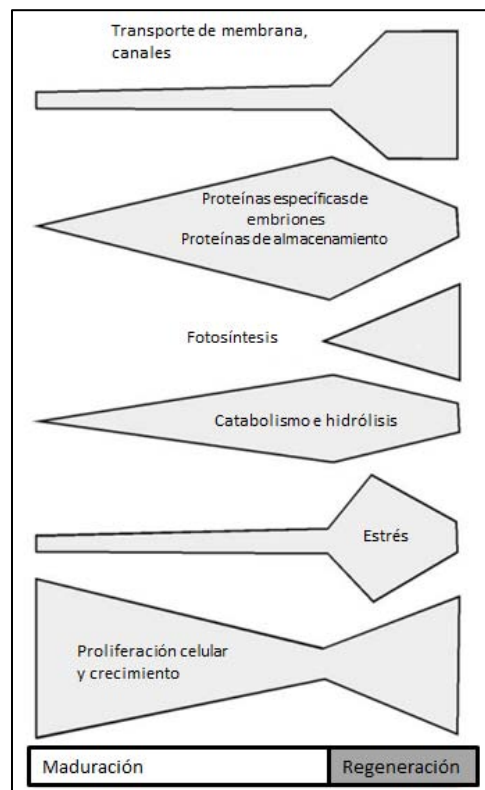


Figura 3. Tendencias de la expresión de genes por categorías funcionales durante la maduración de embriones somáticos y regeneración de plantas de maíz. Modificado de Che, et al. (2006).

El estudio de las redes génicas y de sus moléculas reguladoras durante la embriogénesis somática es de gran importancia para entender la totipotencialidad de los embriones somáticos y eventos de diferenciación durante la regeneración de plantas. Se requiere un mejor entendimiento de la embriogénesis somática para optimizar su uso como herramienta biotecnológica y para entender los mecanismos que podrían relacionar a este proceso con la embriogénesis cigótica.

Los microRNAs y su función en el desarrollo de las plantas

El desarrollo de las plantas depende de la correcta regulación de la expresión génica. Esto se logra por varios mecanismos, entre ellos el más importante tal vez sea a nivel transcripcional. Sin embargo, los eventos post-transcripcionales también son cruciales para la regulación de la expresión génica. La estabilidad de los RNAs mensajeros (mRNAs) está regulada por varias señales que actúan en secuencias específicas contenidas dentro de ellos mismos. Esta regulación está mediada por proteínas específicas de unión a RNA que se unen a elementos en las secuencias sin traducir de los mRNAs, regulando su estabilidad, traducción y localización celular. El reciente descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) y los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) reveló otro modo de regulación post-transcripcional que también depende de secuencias específicas presentes en los mRNAs. Los miRNAs son capaces de silenciar genes post-transcripcionalmente al guiar a sus mRNAs blanco a su degradación o a reprimir su traducción (Sunkar et al., 2007).

El papel de los miRNAs en el control del desarrollo de plantas ha sido el primer plano de su estudio, ya que varios genes de proteínas (*DCL1*, *HEN1*, *HYL1*, *SE* y *HST*) requeridas para la biogénesis de los miRNAs y genes blancos de miRNAs (*PHB* y *AGO1*) fueron identificados en análisis génicos de plantas con defectos en el desarrollo (Sunkar et al., 2007). Además, una gran proporción de los miRNAs conservados en plantas regulan a factores de transcripción implicados en procesos del desarrollo (Chen, 2009).

Biogénesis de miRNAs

Los miRNAs son RNAs pequeños de ~20 a 24 nucleótidos (nt) codificados en el genoma, sus precursores forman estructuras secundarias de tipo tallo-asa y son procesados en dúplex de 20 a

24 nt con extremos colgantes de 2 nt (Sunkar et al., 2007). La biogénesis de los miRNAs es un proceso de varios pasos (Fig. 4) que incluye la transcripción de los genes *MIR*, el procesamiento y modificación del transcrito y su cargado en un complejo llamado RISC (Chen, 2009).

Los genes *MIR* son transcritos por la RNA polimerasa II produciendo un RNA primario (pri-miRNA) con CAP en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3', aunque también existen evidencias de que en plantas algunos genes *MIR* pueden ser transcritos por la RNA polimerasa III (Sun, 2012). El pri-miRNA es procesado por una RNAsa tipo III llamada Dicer-like (DCL) en un precursor con estructura de tallo-asa (pre-miRNA), en *Arabidopsis* este paso es usualmente efectuado por DCL1 (Chen, 2009) y también requiere de proteínas como Dawdle (DDL) (Yu et al., 2008) y a las proteínas de unión a CAP (CBP20/80) (Kim et al., 2008). El pre-miRNA continúa siendo procesado por DCL1 en un centro nuclear llamado el cuerpo D, donde también se encuentran SERRATE (SE), que es una proteína con dedo de Zinc, y HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), la cual es una proteína de unión a RNA de doble cadena. Finalmente, por la acción de DCL1, SE y HYL1 se produce un dúplex de miRNA y miRNA* (Sun, 2012).

El dúplex de miRNA:miRNA* recién formado tiene los extremos 3' con dos nucleótidos salientes, por lo que serían fácilmente degradados por las exonucleasas llamadas SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN) (Sun, 2012). Para prevenir su degradación, éstos son metilados en el hidroxilo 2' de los nucleótidos terminales del extremo 3' por una RNA metil transferasa llamada Hua Enhancer 1 (HEN1). El miRNA es exportado del núcleo al citoplasma con la ayuda de la proteína HASTY. En el citoplasma una de las cadenas del dúplex es cargada en la proteína argonauta 1 (AGO1) (Chen, 2009). Cuando el miRNA de cadena sencilla es cargado en la proteína argonauta se forma el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés) (Sunkar et al., 2007).

El miRNA funciona como guía del RISC al dirigirlo a sus mRNAs blanco por medio de su complementariedad casi perfecta o perfecta. En plantas los sitios de complementariedad entre el mRNA y el miRNA pueden encontrarse en cualquier región del mensajero: regiones sin traducir 5' o 3', marcos abiertos de lectura o en transcritos que no codifican a proteínas (Axtell et al., 2011). El silenciamiento postranscripcional por miRNAs en plantas puede ocurrir por la degradación de sus mRNAs blanco o bien por la inhibición de su traducción (Sunkar et al., 2007). Se cree que la mayoría de los miRNAs de plantas ejercen su efecto por la degradación de sus mRNAs blanco más que por su inhibición traduccional (Axtell et al., 2011), aunque se ha demostrado que ambos mecanismos pueden actuar en la regulación (Li et al., 2013b).

Los miRNAs de plantas guían el corte de sus blancos en el enlace fosfodiéster opuesto a los nucleótidos 10 y 11 del dúplex de miRNA y mRNA (Llave et al., 2002). El corte lo realiza la actividad endonucleasa de la proteína AGO1 (Baumberger & Baulcombe, 2005). Las proteínas argonautas se caracterizan por contener los dominios PAZ y PIWI. El dominio PAZ permite la interacción con el extremo 3' de los miRNAs o siRNAs de cadena sencilla, además de ser importante para orientar y reconocer el sitio de corte en el mRNA blanco de los RNAs pequeños. El dominio PIWI tiene una función similar al del dominio RNasa H con actividad endonucleasa (Chen, 2009).

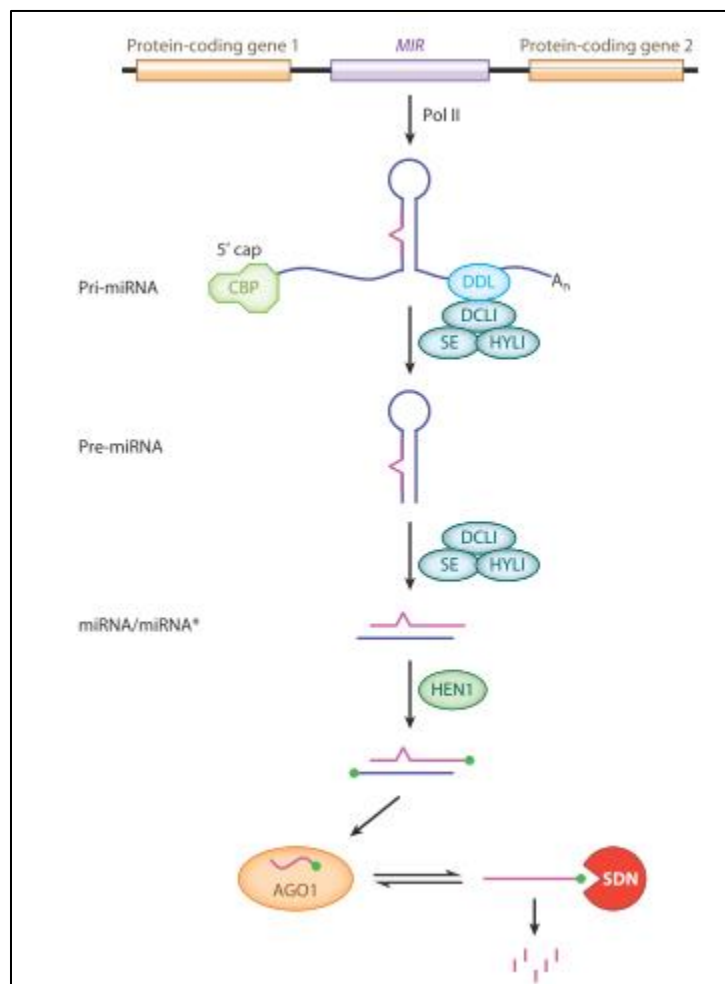


Figura 4. Biogénesis de miRNAs. CBP: cap binding complex, DDL: proteína de union a RNA, DCLI: Dicer Like 1, SE: Serrate, HYL: Hyponastic Leaves 1, HEN1: Hua Enhancer 1, AGO1: Argonauta 1, SDN: exonucleasa de RNA. Tomado de Chen (2009).

Los miRNAs también dirigen la inhibición traduccional de sus mRNAs blanco. En *Arabidopsis thaliana*, AGO1, AGO10, Katanin y componentes de cuerpos P, son requeridos para la inhibición traduccional mediada por miRNAs, por lo que se ha sugerido que el secuestro de los mRNAs blanco en cuerpos P es lo que previene su traducción (Brodersen et al., 2008). Sin embargo, recientemente se encontró que la inhibición traduccional por miRNAs en *Arabidopsis* requiere a ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1), que es una proteína integral de membrana asociada al retículo endoplásmico, por lo que se cree que la inhibición traduccional por miRNAs sucede en el retículo endoplásmico (Li et al., 2013b).

Algunos miRNAs de plantas tienen funciones “no canónicas” como el silenciamiento a nivel transcripcional y la generación de RNAs pequeños secundarios llamados ta-siRNAs (*trans-acting small RNAs*). En *Arabidopsis* los miRNAs miR165/166 pueden actuar a nivel transcripcional por medio de la metilación del gen *PHABULOSA (PHB)* cuyo transcrito tiene el sitio de reconocimiento para estos miRNAs (Bao et al., 2004). En el musgo *Physcomitrella patens* los miRNAs (miR160, 166, 156, 390 y 1026) también actúan a nivel de silenciamiento transcripcional por medio de la metilación de genes que codifican a sus blancos (Khraiweh et al., 2010). Es probable que este mecanismo se encuentre conservado en otras plantas.

Algunos miRNAs de plantas tienen como blancos transcritos de genes TAS, los cuales son RNAs no codificantes precursores de ta-siRNAs. El miR173 dirige el corte de *TAS1a-c* y *TAS2* (Yoshikawa et al., 2005), mientras que miR390 tiene como blanco a *TAS3* (Allen et al., 2005) y miR828 corta a *TAS4* (Rajagopalan et al., 2006). Una vez cortados los transcritos *TAS*, el fragmento 3' es estabilizado por la proteína SGS3 y se produce su cadena complementaria por medio de RDR6 (RNA polimerasa dependiente de RNA 6), la proteína DCL4 corta el RNA de doble cadena en fase iniciando en el extremo del corte causado por el miRNA generando RNAs pequeños interferentes de 21 nt que actúan en trans (ta-siRNAs). Los ta-siRNAs regulan negativamente a otros genes: ta-siRNAs generados a partir de *TAS1-2* regulan a PPRs (*Pentatricopeptide repeat proteins*), los generados a partir de *TAS3* regulan a factores transcripcionales tipo ARF (*Auxin response factor*), y los generados a partir de *TAS4* a factores transcripcionales tipo MYB.

Se ha visto que la mayoría de los miRNAs tienen un patrón de expresión espacio-temporal específico o que responde a ciertos factores ambientales. La abundancia de los miRNAs depende de su expresión y procesamiento, así como de su estabilidad. La regulación transcripcional contribuye a la acumulación de miRNAs individuales. Debido a que los genes *MIR* son transcritos

por Pol II, estos mecanismos incluyen: la activación o represión por factores de transcripción, proteínas de remodelación de cromatina y marcas epigenéticas como modificaciones de histonas y metilación de DNA. La acumulación de miRNAs específicos puede ser regulada durante los pasos de su biogénesis. Un caso especial es la regulación por retroalimentación de algunas proteínas importantes en la biogénesis de miRNAs que se da a nivel postranscripcional por miRNAs específicos, por ejemplo el transcrito de AGO1 está bajo el control de miR168, además en *Arabidopsis* DCL1 es regulado por miR162 y en arroz también por miR528 (Macovei et al., 2012). La degradación de miRNAs también influye en su acumulación y por lo tanto su función. La familia de exonucleasas SDN1 degrada miRNAs de cadena sencilla limitando sus niveles (Ramachandran & Chen, 2008). La actividad de los miRNAs también puede ser modulada, uno de los mecanismos de modulación es por medio del mimetismo de blancos, por medio de RNAs no codificantes que secuestran a los miRNAs afectando negativamente su función (Franco-Zorrilla et al., 2007).

Función de algunas familias de miRNAs específicas

Las familias de miRNAs están definidas por la secuencia de los productos maduros de los genes MIR que son biológicamente activos. Algunas de estas familias están ampliamente distribuidas en las plantas, lo cual es indicativo de su origen ancestral (Zhang et al., 2009). Los miRNAs homólogos entre diferentes especies de plantas tienen genes blanco similares y funciones conservadas (Mica et al., 2006). Esto resulta muy práctico ya que la mayoría del conocimiento sobre miRNAs en plantas se debe a estudios hechos en *Arabidopsis* y este conocimiento sirve como guía para analizar a otras especies. Sin embargo, no todas las familias de miRNAs se encuentran conservadas, algunas son específicas de ciertos taxa, por lo que los genes blanco de estos miRNAs están menos conservados y su función es poco conocida (Qin et al., 2014).

Se han descrito los blancos de las familias conservadas de miRNAs y sus funciones se pueden clasificar en tres grandes categorías: procesos de desarrollo, respuestas adaptativas a estrés y la regulación de la vía de biogénesis y función de miRNAs (Mallory & Vaucheret, 2006). Entre los procesos de desarrollo se encuentran: el desarrollo y polaridad de las hojas, la identidad floral, el tiempo de floración y la respuesta a hormonas como las auxinas (Fig 5).

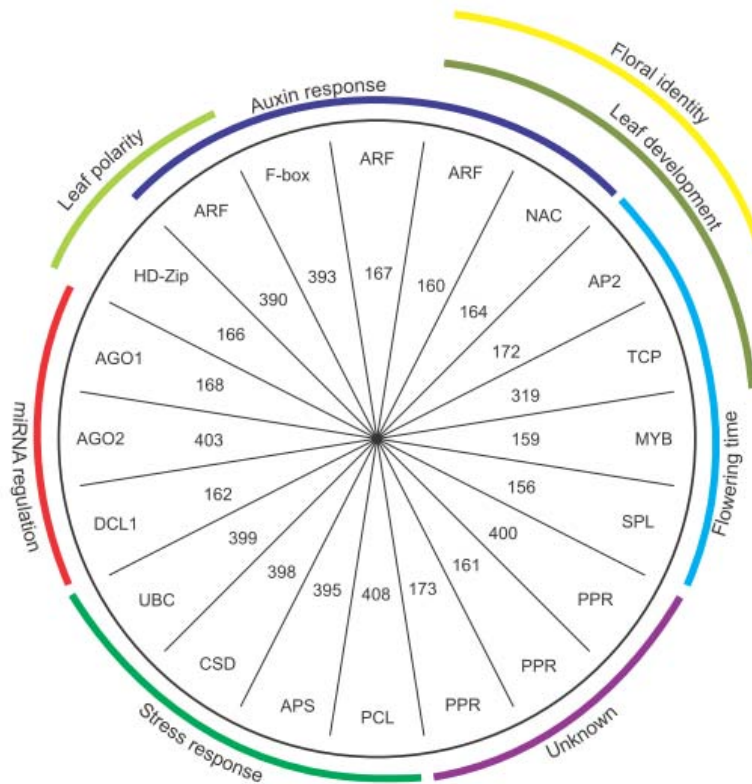


Figura 5. Funciones de algunas familias de miRNAs en plantas. En el círculo interno se encuentran las familias de miRNAs y en la parte externa se muestran sus genes blanco. Tomado de (Mallory & Vaucheret, 2006).

Papel de los miRNAs en el desarrollo

En *Arabidopsis* miR156 tiene como blanco 11 de los 17 genes SPL (Squamosa promoter binding like), los cuales regulan procesos de desarrollo como el cambio de la fase vegetativa a la reproductiva y la duración del plastocrono (periodo de iniciación de hojas sucesivas) (Wang et al., 2008; Wu & Poethig, 2006). Los blancos de miR159 son de la familia de los factores transcripcionales MYB y GAMYB que actúan en procesos que requieren a las hormonas giberelina (GA) y el ácido abscísico (ABA) como la floración en días cortos, la fertilidad masculina y la germinación (Alonso-Peral et al., 2010; Woodger et al., 2003). El miR164 regula a los genes CUC1/2 que son factores transcripcionales de la familia NAC (NAM, ATAF1/2 y CUC) que es importante para el establecimiento de límites entre órganos (Guo et al., 2005; Souer et al., 1996).

Otras familias conservadas de miRNAs importantes en el desarrollo de las plantas incluyen a miR160 y miR167 que están implicados en la señalización por auxina y son necesarias en el desarrollo de la raíz y el tallo, sus genes blancos pertenecen a la familia de factores transcripcionales en Respuesta a Auxina (ARF). Las familias de miR165/166 que tienen como blanco a los factores de transcripción con el homeodominio de cierre de leucina (HD-Zip) promueven la identidad abaxial de órganos laterales. miR169 controla la restricción espacial de los genes homeóticos C que especifican la identidad de los órganos reproductivos de las flores. miR172 también está implicado en la identidad floral. miR319 controla genes implicados en las divisiones celulares durante la morfogénesis de las hojas (Chen, 2009).

Papel de los miRNAs en estrés

En *Arabidopsis*, el miR398 se induce en respuesta a estrés por calor (Lu et al., 2013), en estrés oxidativo (Sunkar et al., 2006) y en la homeostasis de cobre (Naya et al., 2014). En otras especies también participa en estrés hídrico (Jovanović et al., 2014), deficiencia de nitrógeno (Zhao et al., 2012) y estrés biótico (Naya et al., 2014). Los blancos descritos de miR398 en *Arabidopsis* son los mRNAs de la Cu/Zn Superóxido Dismutasa 1 y 2 (CSD1, CSD2) (Sunkar et al., 2006), una chaperona de Cobre para la Superóxido Dismutasa (CCS1) (Guan et al., 2013) y la subunidad V de la Citocromo c Oxidasa (COX5b-1) (Beauclair et al., 2010).

El miR408 también participa en la homeostasis de Cobre (Abdel-Ghany & Pilon, 2008), estrés biótico (Feng et al., 2013) y estrés hídrico (Jovanović et al., 2014; D. Li et al., 2013; Mutum et al., 2013). Los blancos de miR408 en *Arabidopsis* incluyen a transcritos que codifican para lacasas (LAC3, 12 Y 13) y plantacianina (Abdel-Ghany & Pilon, 2008), ambas proteínas tienen dominio de unión a Cu.

Otras familias de miRNAs conservadas que responden a estrés son miR397, miR399 y miR395. Los blancos de miR397 en *Arabidopsis* son transcritos de lacasas (LAC2, 4 Y 17) y también participan en estrés oxidativo y homeostasis de Cu. La familia de miR399 está relacionada con deficiencia de fósforo y tiene como blancos al transcrito que codifica a la enzima E2 conjugadora de ubiquitina (UBC24) (Aung et al., 2006). El miR395 regula la homeostasis de fósforo al controlar la expresión de los transcritos que codifican a las ATP sulfurilasas (APS) en *Arabidopsis* (Liang & Yu, 2010).

De acuerdo a la base de datos de miRNAs (<http://www.mirbase.org>, versión 21) hay 29 familias distintas de miRNAs en maíz. Veintiocho de estas familias se encuentran conservadas con respecto a arroz (*Oriza sativa*) y veintidós con respecto a *Arabidopsis thaliana*. De las familias conservadas, sus genes blanco también están conservados. Mientras que en las familias específicas de un linaje o una especie no se tienen bien definidos a sus genes blanco y éstos están poco conservados (Qin et al., 2014). Por lo tanto, de aquellas familias de miRNAs conservadas es más fácil conocer en que procesos participan sus blancos, mientras que para las familias no conservadas se tiene menos información y sus blancos pueden variar entre especies.

Antecedentes

Regulación por miRNAs en la embriogénesis somática de plantas

En los últimos años se han reportado varios trabajos en los cuales analizan la expresión de miRNAs durante la embriogénesis somática y/o regeneración de plantas a partir de embriones somáticos en distintas especies de plantas: arroz (Chen et al., 2011; Luo et al., 2006), *Larix leptolepis* (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012), naranja (Wu et al., 2011; Wu et al., 2015), *Liriodendron tulipifera* (Li et al., 2012), *Dimocarpus longan* (Lin & Lai, 2013), algodón (Yang et al., 2013) y *Arabidopsis thaliana* (Qiao & Xiang, 2013).

Se analizaron mediante secuenciación masiva y PCR los miRNAs que muestran expresión diferencial durante la embriogénesis somática en cultivos *in vitro* de la conífera *Larix*, y se validaron algunos genes blancos propuestos por 5' RACE (rápida amplificación de los extremos de cDNA). Se observó que el miR397 y el miR398 muestran mayor expresión durante la propagación de las masas pro-embriogénicas y su transición a embrión maduro, el miR162 y el miR168 se encuentran expresados durante todas las etapas de la embriogénesis somática, aunque son mayormente expresados durante el paso del embrión globular a embrión cotiledonar. En etapas posteriores de la embriogénesis se expresan miR156, miR159, miR160, miR166, miR167 y miR390 (Zhang et al., 2012).

Por otro lado, durante distintas etapas de la embriogénesis somática (masa no embriogénica, masa embriogénica, etapa globular, etapa cotiledonar) de la naranja dulce de Valencia, se encontraron miRNAs que se expresaban diferencialmente en etapas y tejidos específicos. En este trabajo se analizó la expresión de diez miRNAs que se sabe tienen funciones durante el desarrollo

de las plantas y están conservados: miR156, miR159, miR164, miR166, miR167, miR168, miR171, miR390, miR397 y miR398 (Wu et al., 2011). Se distinguieron tres subgrupos de acuerdo a la expresión de los miRNAs durante la embriogénesis somática: el grupo uno conformado por miR156, miR168 y miR171, ejerce su función regulatoria durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática; en el grupo dos se encuentra miR159, miR164, miR390 y miR397 los cuales están relacionados con la formación del embrión globular; en el grupo tres miR166, miR167 y miR398 son requeridos para la morfogénesis del embrión cotiledonar; además la alta expresión de miR164, miR166 y miR397 se asoció a la etapa de callo no embriogénico. Por otro lado, se analizó la expresión de los blancos de estos miRNAs durante las mismas etapas de embriogénesis somática y la tendencia general fue que en las etapas donde los miRNAs eran más abundantes los mRNA blanco disminuían y viceversa.

El mismo grupo analizó mediante secuenciación masiva de RNAs pequeños los miRNAs y siRNAs involucrados en la embriogénesis somática de la naranja, compararon 3 bibliotecas: callos no embriogénicos, callos embriogénicos y callos embriogénicos en diferenciación (Wu et al., 2015). También analizaron por Northern-blot a miR156, miR164 y miR171 y por qRT-PCR a *CUC2* como blanco de miR164, a *SCL* como blanco de miR171 y como blancos de miR156 a *SPL4*, 6, 7, 8, 13. miR164 tiende a aumentar conforme el embrión va madurando y tiene una buena correlación inversa con los niveles de *CUC2*, mientras que miR156 es más alto en callos no embriogénicos que en callos embriogénicos y los *SPLs* analizados siguen el mismo comportamiento del miRNA. Los miRNAs 398, 159, 408, 528, 168, 397 son abundantes en callos no embriogénicos y tienden a disminuir en callos embriogénicos.

Li y colaboradores (2012) identificaron miRNAs mediante secuenciación masiva y microarreglos en la embriogénesis somática de *Liriodendron tulipifera* x *L. chinese*, mejor conocido como árbol tulipífero, perteneciente a la familia Magnoliaceae. El material a secuenciar consistió en una mezcla del RNA de los tejidos de varias etapas de la embriogénesis somática (embriones en etapa globular, corazón, cotiledonar y torpedo). Algunas familias de miRNAs destacaron en número de miembros y lecturas por millón, entre estas están miR156 y miR166. Otras familias identificadas en este estudio con lecturas abundantes incluyen a miR162, 167, 168, 390, 397, 398, 408.

En otro estudio, se analizó la expresión de miRNAs mediante secuenciación masiva y qPCR durante la embriogénesis somática de la dicotiledónea *Dimocarpus longan* (Lin & Lai, 2013), que pertenece a la misma familia del lichi. Se encontró que el miR156 y el miR166 se asocian con las etapas

tempranas del cultivo de embriones somáticos, mientras que miR160, 159, 390 y 398 se encuentran mayormente expresados en los embriones somáticos en etapa corazón y torpedo, mientras que en la etapa cotiledonar se expresan mayormente miR167, 168, 397, 398, 808 y 5077.

Yang y colaboradores (2013) identificaron miRNAs mediante secuenciación de RNAs pequeños y a sus blancos por degradoma durante la embriogénesis somática de algodón. El degradoma, también llamado PARE (*parallel analysis of RNA ends*) permite identificar productos de degradación de mRNAs de manera masiva y se pueden asociar con el corte por la acción de miRISC. Ellos compararon callos embriogénicos con el hipocotilo de plántulas. Se encontraron 15 familias de miRNAs expresadas diferencialmente; de las cuales miR390, 394, y 827 se encontraron enriquecidas en los callos embriogénicos comparados con el hipocotilo, mientras que miR156, 162, 166, 167, 172, 396, 482 se encontraban menormente expresados en los callos embriogénicos.

Quiao & Xiang (2013) encontraron diferencias en el patrón de expresión de algunos miRNAs entre callos embriogénicos totipotenciales (miR397, 398, 774, 843, 859) y no totipotenciales (miR157, 159, 160, 165, 166, 167, 319, 390, 393, 394) de *Arabidopsis*. Además, encontraron que algunos miRNAs promueven la proliferación *in vitro* (miR159, 160, 166) mientras que otros promueven la regeneración de plantas (miR397, 398, 843, 774 y 859). Su trabajo se enfocó a miR160 y encontraron que líneas sobreexpresoras de este miRNA tienen una menor eficiencia al regenerar plantas, probablemente mediante la regulación negativa de su blanco ARF10.

Otro estudio analizó miRNAs durante la organogénesis de tallos adventicios a partir de callos embriogénicos de *Acacia crassicarpa* (Liu et al., 2014). Liu y colaboradores analizaron mediante secuenciación masiva de RNAs pequeños y qRT-PCR a los miRNAs que estaban diferencialmente expresados en 6 etapas: embrión cigótico, embrión desdiferenciado, callo embriogénico, callos con brotes de tallos adventicios, agrupamientos de tallos adventicios, y tallos en elongación. De acuerdo con su patrón de expresión los miRNAs diferencialmente expresados se clasificaron en 4 grupos: los que se expresaban más tanto en los callos embriogénicos como en los callos embriogénicos con brotes de tallos (miR159, 319, 162), los que se expresaban más en los callos embriogénicos (miR156, 166), los que se expresaban más en los callos embriogénicos con brotes de tallos (miR164, 267, 168) y los que aumentaban conforme aumentaba la organogénesis (miR398, miR397).

En resumen, existe un grupo selecto de miRNAs conservados que parecen tener una función durante la embriogénesis somática de las plantas, este grupo está compuesto por miR162, miR168, miR156, miR159, miR160, miR166, miR167, miR390, miR397 y miR398. La gran mayoría de ellos han sido descritos en procesos de desarrollo y se conoce que sus blancos son factores transcripcionales. Algunos están relacionados con respuesta a auxinas (miR390, 167, 160, 164), lo cual se relaciona directamente con los cambios hormonales a los que es sometido el tejido para formar embriones somáticos y para su posterior diferenciación. Además, en cada especie se encontraron miRNAs específicos de un linaje que parecen también tener una función durante la embriogénesis somática.

Antecedentes de miRNAs en la embriogénesis somática de plantas monocotiledóneas

Arroz

En el 2006, un grupo de investigadores chinos usaron el modelo de embriogénesis somática de arroz para investigar miRNAs asociados a la embriogénesis y el desarrollo post-embrionario (Luo et al., 2006). Identificaron nuevos miRNAs en arroz a partir de la clonación de RNAs pequeños de callos embriogénicos somáticos y otros tejidos de las plantas. Además, observaron que algunos miRNAs específicos se encontraban diferencialmente expresados entre callos embriogénicos sin diferenciar y callos diferenciados que habían sido expuestos a fotoperiodo y a hormonas distintas de los no diferenciados. En este estudio se observó que miR156, miR397, miR398 y miR528 se encuentran mayormente expresados en callos embriogénicos pero no en otros tejidos de las plantas de arroz, siendo mayormente expresado miR528 y miR397 en callos no diferenciados y miR156 mayormente expresado en callos diferenciados.

En el 2011, el mismo grupo de investigación analizó la expresión de RNAs pequeños en el cultivo *in vitro* de callos embriogénicos de arroz por medio de secuenciación masiva (Chen et al., 2011). Se encontró que entre callos de arroz sin diferenciar y diferenciados el 40% de los miRNAs analizados estaban enriquecidos en una u otra condición, sugiriendo que varios procesos están bajo la regulación por miRNAs durante la diferenciación de las células troncales de plantas. Los miRNAs mayormente expresados en callos sin diferenciar fueron miR397, miR398, miR408, miR528 mientras que miR156, miR159 y miR164 estaban expresados mayormente en callos diferenciados.

Además, se confirmó mediante Northern Blot que miR528, miR408, miR397a, miR397b y miR166 se expresan más en callos sin diferenciar (Chen et al., 2011).

También hicieron un análisis de las funciones de los genes blanco predicho para los miRNAs expresados diferencialmente, encontraron que los blancos están involucrados en procesos como la transcripción, el desarrollo y la diferenciación. Uno de los blancos propuestos de miR397 es una lacasa de la familia de las oxidasas que contienen cobre, la lacasa es necesaria para la producción de lignina, un componente de la pared celular secundaria de plantas. Otros miRNAs como miR408 y miR528 tienen blancos con dominios que contienen oxidasas con cobre, y también se encontraron sobre-expresados en callos no diferenciados. Los blancos de miR408 están en su mayoría relacionados con la morfogénesis, mientras que los de miR398 se relacionan con el desarrollo post-embriionario. La abundancia de miR397, miR408 y miR528 en callos sin diferenciar puede que contribuya a mantener a las células en un estado meristemático mediante la modulación de la expresión de enzimas con dominios oxidasa que contengan cobre, lo cual resultaría en una producción menor de lignina y por lo tanto una pared celular delgada (Chen et al., 2011).

Maíz

Recientemente se analizó mediante secuenciación masiva de RNAs pequeños la expresión de miRNAs durante las primeras dos semanas de la inducción de callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros de maíz (Shen et al., 2013). Compararon cuatro bibliotecas distintas: embrión inmaduro, embrión hinchado (1-5 días en el medio de cultivo N6P con la auxina sintética 2,4-D), callo inicial (de 6-10 días), y callo “embriogénico” (de 11-15 días). Encontraron entre los miRNAs más abundantes a miR528, miR156, miR166, miR168, miR390, miR164, miR167, miR398, miR397, miR408 y miR319. Encontraron que estos miRNAs aumentaban conforme avanzaba la inducción a excepción de miR167 que disminuía y de miR319, miR166 y miR156, que casi no cambiaban. Además, validaron algunos de sus transcritos blanco mediante degradoma, y señalan que muchos de éstos están involucrados en las vías de transducción de señales hormonales de auxinas y giberelinas.

En nuestro laboratorio se analizó mediante secuenciación masiva de RNAs pequeños la expresión de miRNAs en callos embriogénicos de maíz de distintas edades de subcultivo: 1 mes, 4 meses y 10

meses. Se encontraron 28 familias distintas de miRNAs de las 29 que se han reportado en maíz. De las cuales miR156, 159, 162, 164, 166, 167, 168, 319, 397, 398, 408 y 528, fueron validados por Northern-Blot (Fig. 6). Se observó que la producción de algunos miRNAs específicos (miR156, miR159, miR164, miR168) disminuye en los callos embriogénicos conforme avanza la edad de los mismos, a la vez que otros incrementan considerablemente sus niveles (miR397, miR398, miR408, miR528) y un tercer grupo de miRNAs parece mantenerse constante como miR167, miR162 y miR319 (Alejandri-Ramírez, 2015).

Es interesante notar que los miRNAs expresados diferencialmente en los callos embriogénicos de maíz pertenecen a familias de miRNAs que también han sido descritas en otras especies durante la embriogénesis somática. Además, los miRNAs que incrementan conforme avanza la edad de los callos han sido descritos en plantas sometidas a distintos tipos de estrés, mientras que los que disminuyen se han identificado en procesos de desarrollo (ver Tabla 1).

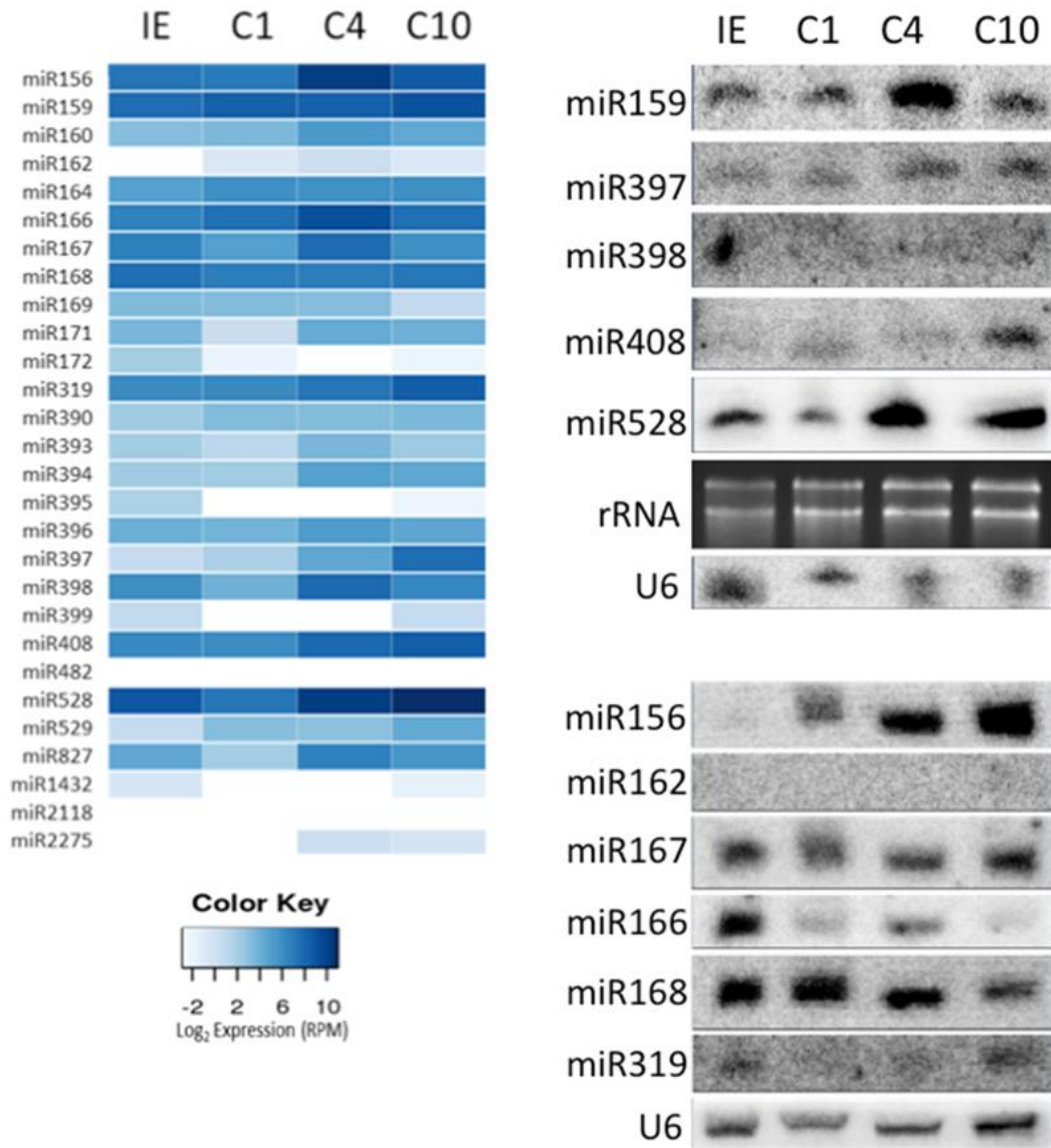


Figura 6. Expresión diferencial de miRNAs específicos en callos embriogénicos somáticos de maíz de distinta edad de subcultivo. Embrión inmaduro (IE), callo de 1 mes (C1), cuatro meses (C4) y diez meses (C10). A la izquierda se muestra un mapa de colores que representa el nivel de expresión de los miRNAs de acuerdo a los datos de secuenciación masiva. A la derecha se encuentra el análisis de la expresión por Northern-Blot de miRNAs seleccionados (Alejandri-Ramírez, 2015).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se identificaron con herramientas bioinformáticas genes blanco posibles de estos miRNAs en maíz (ver Tabla 2).

Tabla 1. Familias de miRNAs expresadas diferencialmente en la embriogénesis somática de plantas.

miRNA	Blancos descritos en la literatura	Referencias
miR156	Factor de transcripción de tipo Proteína de unión al promotor Squamosa (SBP/SPL)	(Ling & Zhang, 2012; Wu & Poethig, 2006)
miR159	Factor de transcripción MYB	(Alonso-Peral et al., 2010; Reyes & Chua, 2007)
mi164	Proteínas con dominio NAC (NAM-ATAF/CUC)	(Guo et al., 2005; Li et al., 2012a; Raman et al., 2008)
miR168	Argonauta (AGO1)	(Vaucheret, et al., 2006)
miR397	Lacasas, tubulina beta-6, Ascorbato Oxidasa	(Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Thiebaut et al., 2014)
miR398	Cobre súper óxido dismutasa, subunidad V de citocromo C oxidasa	(Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Naya et al., 2014; Sunkar et al., 2006)
miR408	Proteína tipo quimocianina (CLP), Proteínas tipo plastocianina Proteína de respuesta Gamma.	(Abdel-Ghany & Pilon, 2008; Feng et al., 2013; Li et al., 2013a; Zhao et al., 2013)
miR528	Cupredoxina, Multicobre oxidasa, Lacasa	(Li, et al., 2011; Wu et al., 2009)

Tabla 2. Genes blanco predichos para los miRNAs presentes en callos embriogénicos de maíz.

miRNA	Blanco	Descripción	Híbrido	Expectation	UPE
zma-miR156a-5p	GRMZM2G126018_T01	Transcription factor family protein isoform 1 (SBP23)	miRNA 20 CACGAGUGAGAGAAGACAGU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 978 GUGCUCUCUCUCUCUCUGUCA 997	1	18.45
zma-miR159a-3p	GRMZM2G139688_T01	Zea mays MYBGA transcription factor MYB138	miRNA 21 GUCUCGAGGGAAGUUAGGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 1399 UGGAGCUCUCCUUCACUCCAAG 1419	2.5	17.18
zma-miR164a-5p	GRMZM2G393433_T01	CUC2; Putative NAC domain transcription factor superfamily protein	miRNA 20 CGUGCACGGGACGAAGAGGU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 855 GCUCGUGCCUGCUCUCCA 874	1	17.09
zma-miR168a-5p	GRMZM2G039455_T01	Argonaute-like protein AGO1C	miRNA 20 AGGGCUAGACGUGGUUCGU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 591 UCCCGAGCUGCACCACAGCCC 610	3.5	19.11
zma_miR397a-5p	GRMZM2G146152_T01	LAC2 Multicopper oxidase Laccase, Cupredoxin	miRNA 21 GUAGUUGCGACGCAGUUACU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 803 CGUCAACCGCGGCCUCAACA 823	3	23.16
zma-miR398a-3p	GRMZM2G058522_T01	SOD9, SOD-4A; Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4AP	miRNA 21 GCCCCCGCUGGACUCUUGUGU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 233 CGGGGUGCGCUGAGAUACA 253	3.5	17.16
zma_miR408a	GRMZM2G384327_T03	Zea mays gamma response I protein	miRNA 21 CGGUCCUUCUCCGUCACGUC 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 1387 GCGAGAGAAGAGCCGUGCAG 1407	3.5	21.42
zma-miR528a-5p	GRMZM2G106928_T01	SOD-1A; Superoxide dismutase [Cu-Zn]	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGAAGGU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 171 UCCUCCGCACGCCUUUCA 191	2.5	11.29
zma-miR528a-5p	GRMZM2G107562_T01	Plastocyanin-like Blue (type 1) copper ion binding protein (PLC)	miRNA 21 GAGGAGACGUACGGGAAGGU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : Blanco 570 CUCCUCUGC-UGCCCUUCCG 589	2.5	18.15

Los blancos fueron predichos con psRNAtarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>). La columna "Expectation" se refiere al desapareamiento entre el blanco y su miRNA donde un desapareamiento cuenta como 1 y G-U cuenta como 0.5. "UPE" (Unpair energy) es la energía requerida para abrir la estructura secundaria alrededor del sitio del blanco/miRNA, entre menor energía mayor posibilidad de que el RISC corte al mRNA blanco (Chávez-Hernández et al., 2015)

Como parte del estudio funcional de los miRNAs en la embriogénesis somática de maíz, se realizó el análisis de la distribución en polirribosomas de miR159, 168, 398 y 528 (Juárez-González, 2014), ya que se sabe que la regulación por miRNAs sobre su RNA blanco puede ser tanto a nivel de degradación del mRNA como por la inhibición de su traducción (Li et al., 2013). Los ensayos de Northern blot indicaron que miR528 es el único miRNA que se localiza en fracciones traduccionalmente activas (polirribosomas) sugiriendo que podría regular a nivel traduccional a sus mRNAs blanco (Fig. 7). Los otros miRNAs analizados (miR168 y miR159) no se encontraron en los perfiles polirribosomales, aunque si se confirmó su presencia a nivel de RNA total excepto para miR398, (Juarez, VT., 2014).

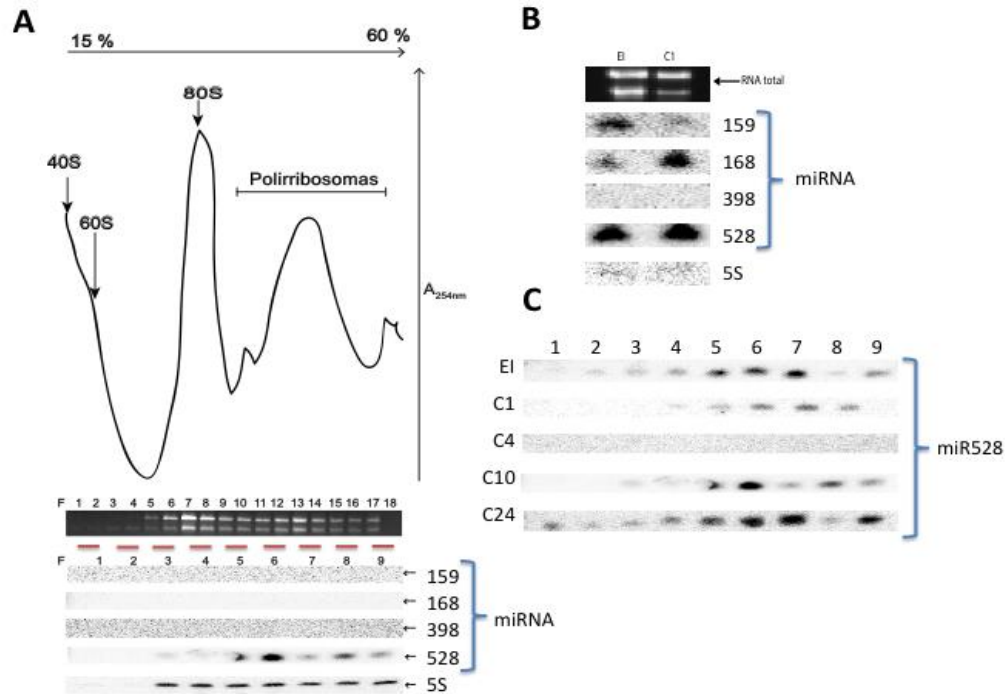


Figura 7. Distribución de miRNAs en perfiles de polirribosomas. (A) Perfil de polirribosomas obtenido a partir de callos embriogénicos de maíz de 10 meses. La integridad del RNA obtenido a partir de cada fracción fue analizada mediante electroforesis en agarosa observando los RNAs ribosomales 28S y 18S. De las 18 fracciones totales del perfil se unieron cada 2 fracciones (líneas rojas) para obtener un total de 9 fracciones que fueron analizadas mediante ensayos de Northern Blot para los diferentes miRNAs. Se observa la presencia de miR528 en fracciones correspondientes a polirribosomas y el rRNA 5S en fracciones que comprenden monosomas (80S) y polirribosomas. (B) Presencia de miRNAs en extractos de RNA total de embrión inmaduro (E) y callos de 1 mes (C1) de las mismas muestras utilizadas para los perfiles polirribosomales. (C) Distribución de miR528 en el perfil de polirribosomas de muestras de embrión inmaduro (E) y callos de 1 (C1), 4 (C4), 10 (C10) y 24 (C24) meses (Juárez, VT., 2014).

Datos preliminares del laboratorio mostraron que algunos miRNAs (miR156, 159, 164, 167, 168 y 319) también se regulan de manera diferencial en la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014). La regeneración de plantas se logró al subcultivar los callos embriogénicos en concentraciones decrecientes de la auxina sintética 2,4-D y la citocinina cinetina cada 2 semanas, además de exponer a los cultivos a fotoperiodo. Una semana después de cada subcultivo los callos se separaron en aquellos que presentaban evidencias de diferenciación y aquellos sin evidencia de diferenciación. Cuando las hormonas fueron totalmente retiradas se obtuvieron plántulas que también fueron analizadas. Se encontró

que los miRNAs, evaluados por Northern-blot, están mayormente expresados en los callos con diferenciación evidente en comparación con aquellos sin diferenciación (Fig. 8).

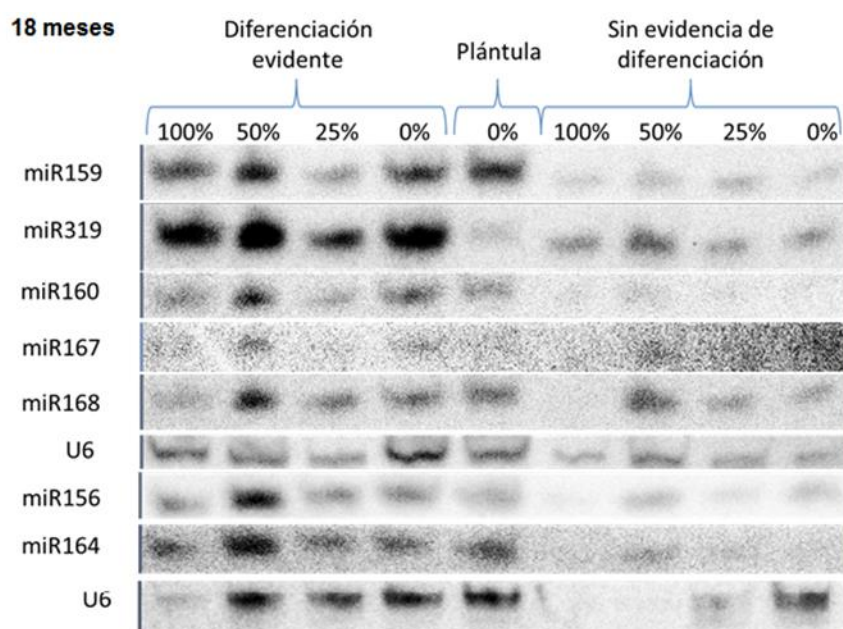


Figura 8. Análisis por Northern-Blot de la expresión de miRNAs específicos durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz de 18 meses de subcultivo. Se analizaron callos evidentemente diferenciados o sin diferenciación en medio N6P con 100%, 50%, 25% y 0% de hormonas 2,4-D y cinetina. Como control de carga se usó el RNA U6. (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014).

Los antecedentes del laboratorio sugieren que el proceso de embriogénesis somática de maíz y la regeneración de plantas podrían ser regulados, en parte, por miRNAs específicos. Los trabajos anteriores habían sido hechos en maíz de la variedad Tuxpeño, pero se ha visto que el híbrido Costeño también es altamente embriogénico. Por lo tanto, en este trabajo se analizaron ambos genotipos con el fin de encontrar patrones en común.

La maduración de los embriones somáticos y su morfogénesis en plantas requiere de dos factores importantes: el cambio hormonal y la exposición a la luz. De tal manera, también resulta interesante analizar cómo estos factores afectan la expresión de los miRNAs en estudio.

Por otro lado, la función de los miRNAs durante el desarrollo está directamente relacionada con la modulación de la expresión de sus mRNA blanco. Además, el trabajo anterior de nuestro laboratorio sugiere que la mayoría de los miRNAs analizados en embriogénesis somática de maíz

regulan a su blanco por medio de su degradación. Por lo tanto este trabajo se plantea con las hipótesis y los objetivos descritos a continuación:

Hipótesis

- El genotipo y la edad de los callos embriogénicos de maíz influye en la abundancia de miRNAs específicos y la expresión de sus genes blanco durante la regeneración de plantas.
- La luz y las hormonas tienen un papel diferencial en la expresión de miRNAs y de sus genes blanco durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.

Objetivos

Objetivos generales

- Analizar la dinámica de expresión de miRNAs implicados en el proceso de embriogénesis somática durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz de diferentes lotes y su posible función mediante la evaluación de los niveles de sus mRNAs blanco.
- Analizar por separado el efecto de la luz y las hormonas en la expresión de miRNAs y de sus genes blanco durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.

Objetivos específicos

- Establecer cultivos *in vitro* derivados de embrión inmaduro de maíz.
- Regenerar plántulas a partir de callos embriogénicos de maíz de diferente edad: 6 y 24 meses de dos variedades de maíz (Costeño y Tuxpeño).
- Obtener muestras de callo de diferentes etapas del proceso de regeneración en luz y oscuridad (100% hormona, 50% hormona, 0% hormona, plántula).
- Analizar la expresión de miR156, miR159, miR164 y miR168, miR397, miR398, miR408, miR528 por Northern-Blot durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz de diferentes lotes.
- Analizar la función de estos miRNAs en la regulación de algunos de sus blancos propuestos durante la regeneración de plantas por medio RT-qPCR.

Materiales y Métodos

Cultivo *in vitro* de maíz

El cultivo de tejidos *in vitro* se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, UNAM.

En este trabajo se analizó la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de diferente edad de subcultivo (6 y 24 meses) y de dos genotipos de maíz: Tuxpeño (VS-535) y Costeño (H-565). De esta forma se analizó la influencia de 1) el genotipo (Costeño vs Tuxpeño); 2) la edad (6 vs 24 meses); 3) el lote (los dos lotes de Costeño de 6 meses). Se muestran los cuatro diferentes lotes los cuales se usaron para la regeneración de plantas (Fig. 9).

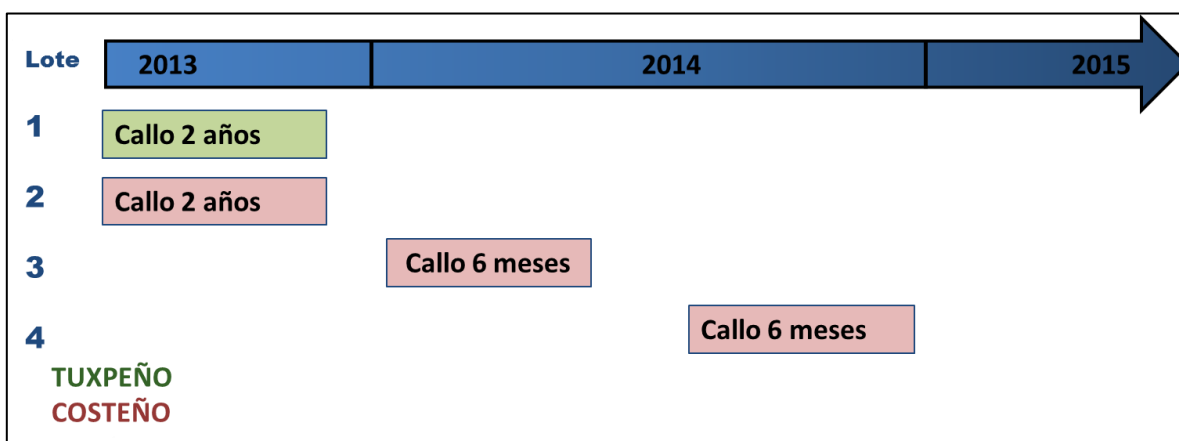


Figura 9. Lotes de callos embriogénicos de maíz que se usaron en este trabajo. En verde se muestran los correspondientes a maíz Tuxpeño, y en rojo a maíz Costeño.

Inducción de callos embriogénicos a partir de embriones de maíz inmaduros

Se utilizaron embriones inmaduros de 15-18 días después de la polinización de dos genotipos de maíz (*Zea mays L.*): Costeño y Tuxpeño. La variedad Tuxpeño mejorado (VS-535) fue desarrollada en el INIFAP y también el híbrido Costeño es derivado de Tuxpeño (INIFAP, 2010), ambos genotipos son embriogénicos y usados para regenerar plántulas (Garrocho-Villegas et al., 2012). Las muestras se obtuvieron mediante la recolección de las mazorcas dentro del lapso de tiempo mencionado.

Se retiraron las hojas de las mazorcas y se fragmentaron en porciones de 6-8 cm para su manejo. Bajo condiciones de esterilidad se hicieron los siguientes lavados con agitación suave: solución 1 (etanol 70%) por 1 min, solución 2 (Hipoclorito 50%, 8 gotas de Plata coloidal, 3 gotas de Tween-20 o Triton X-100 por 250mL de solución) por 15 minutos, agua desionizada estéril 3 veces por 5 minutos.

Con ayuda de un pinza larga se colocó un fragmento de mazorca en una caja de Petri. Con bisturí se retiró en hilera una porción superior del grano. Se extrajeron los embriones y colocaron en una caja de Petri con agua desionizada estéril y Cefotaxima 1 gr / mL (lo equivalente a 0.1 U de una jeringa de insulina). Con pinzas, se colocaron los embriones en el medio N6I (Anexo 1). Los embriones se mantuvieron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad por 3 semanas.

Subcultivo y proliferación en medio N6P

Transcurridas 3 semanas se observó la formación de callos pequeños de color blanco-amarillo que fueron seleccionados para su subcultivo en medio de proliferación N6P, los callos se acomodan muy juntos formando cúmulos en el centro del frasco que contiene al medio de cultivo. Cada 2 semanas se subcultivaron en medio de cultivo nuevo, descartando las zonas color café y dejando solo las partes blancas-amarillas de callo.

Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz

En este trabajo se usaron callos embriogénicos de distinta edad para la regeneración de plantas: de 6, 12, 18 y 24 meses. Sin embargo, sólo se analizaron a nivel molecular los de 6 y 24 meses.

Para la regeneración los callos se subcultivaron en medio N6P (Anexo 1) reduciendo en dos etapas la concentración de los reguladores de crecimiento: 2,4-D y cinetina (Fig. 10). En la primera etapa se reducen los reguladores de crecimiento a la mitad con respecto al medio N6P. Se tomó 1 g de tejido (callo) para subcultivar en cada frasco con medio fresco. Durante la regeneración los callos se mantienen en dos condiciones de luz: la mitad estuvo en oscuridad y la otra mitad en fotoperiodo (16:8 h luz/oscuridad). Una semana después del subcultivo, se tomaron muestras de callo y se guardaron a -70°C para su procesamiento.

En la segunda etapa de regeneración, dos semanas después de estar en medio N6P con 50 % reguladores de crecimiento, los callos se subcultivaron en medio NP6 sin 2,4-D ni citocinina. Se mantuvieron en las mismas condiciones: oscuridad o fotoperíodo.

Las plántulas que surgieran de los embriones que maduraron en medio N6P sin hormona, se trasplantaron a medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sin hormonas durante una semana para que crecieran, posteriormente se colectó la muestra de plántula.

Las muestras se tomaron una semana después de haber subcultivado los callos. Se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

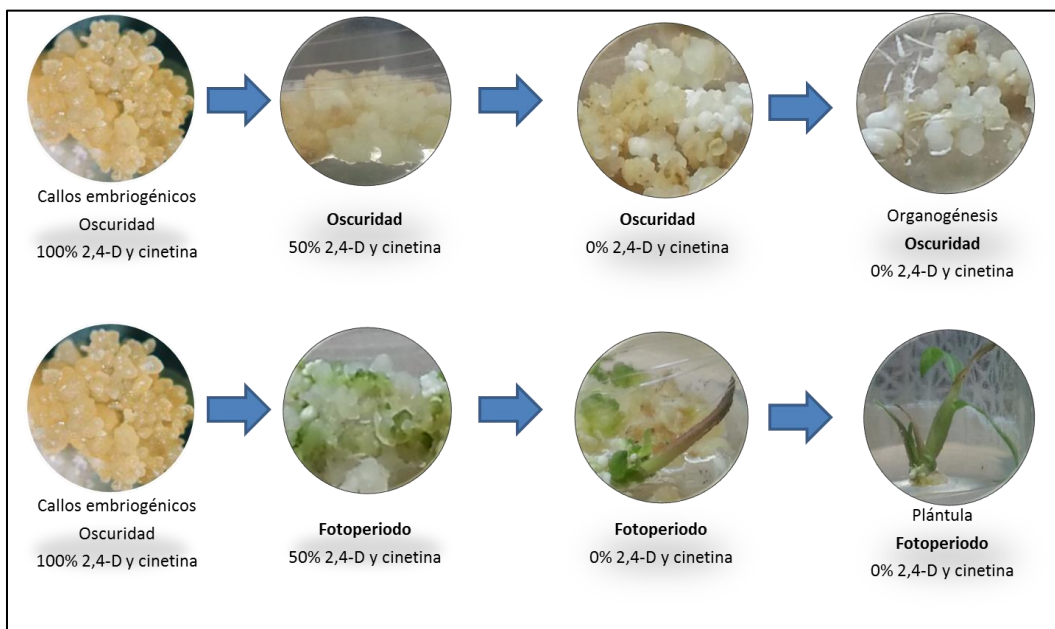


Figura 10. Etapas de la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. En cada etapa se colectan muestras de tejido para su análisis molecular una semana posterior al subcultivo.

Extracción de RNA total

Las muestras de tejido se pulverizaron en nitrógeno líquido en un mortero. La extracción de RNA total se hizo usando el método de TRIzol® Reagent (Invitrogen) modificado. Se agregó 1 ml de TRIzol® Reagent a cada microtubo con ~0.5 g de muestra pulverizada. Se mezcló con ayuda de vórtex y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos para remover el material insoluble. Se recuperó el sobrenadante y se incubó a

temperatura ambiente por 5-10 min. Se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 15,000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se le hizo un lavado con 500 µl de fenol pH 4.7 (ajustado con Tris-Cl 50 mM), se mezcló con vórtex y se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó por inversión y se dejó reposar de 5-10 min. Se centrifugó a 15,000 g por 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, se agitó por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 10-15 min. Se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla de RNA con 400 µl de etanol al 100%, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C. El lavado con etanol 100% se repitió una vez más. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 30-50 µl de formamida.

Se calculó la concentración de RNA por medio de la lectura de absorbancia en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific). La calidad del RNA fue evaluada mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% con TBE.

Northern-Blot

Se resolvieron de 20 a 25 µg de RNA total en buffer de carga FDE (Formamida desionizada y azul de bromofenol) en un gel de Poliacrilamida 15% (20:1 acrilamida-bisacrilamida)/Urea 8M/TBE 1X). La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA por 1 h. Como marcador de peso molecular se usaron 0.2 µl de microRNA marker (New England Biolabs). El RNA en el gel se transfirió a una membrana Hybond-N+ (Amersham) por 35 min a 100 mA con TBE 0.5x usando una cámara semiseca. Se fijó el RNA a la membrana mediante dos pulsos de 70 µl de luz UV usando el equipo Cross-Linker. Se tiñeron las membranas con azul de metileno para analizar la transferencia del RNA. Una vez observadas las bandas de RNA la membrana se lavó con agua destilada para quitar el azul de metileno. La membrana se pre-hibridó por 30 min en solución Ambion Ultrahyb-oligo (10 ml por membrana de 10x10 cm) a 42°C.

Se marcaron sondas de DNA (ver Tabla 3) en su extremo 5' usando ³²P-ATP. Para esto se incubó 1 h a 37°C la reacción: 1 µl de sonda (10 pmol), 1 µl de buffer, 0.2 µl de microRNA marker probe (New England Biolabs), 2.5 µl de ³²P-ATP (13 pmol), 1 µl (10 unidades) de enzima T4 polinucleotido kinasa, 4.3 µl de H₂O. Las sondas fueron purificadas con las columnas Sephadex G25 Mini Quick Spin (Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Se agregó la sonda radioactiva (~10pmol) a la solución Ambion Ultrahyb-oligo (10 ml) y se incubaron las membranas a 42°C por lo menos 10 h. Las membranas se lavaron dos veces con 15-20 ml de solución de lavado (SSC 2X/0.1% SDS) por 15 min a 42°C con agitación.

Se acomodaron las membranas en un acetato y se envolvieron en plástico autoadherente. Se colocaron en un cassette para exponerlo en la pantalla detectora Phosphor Screen GE Healthcare. Se expuso por 24 h. Se analizó la pantalla detectora en el equipo Biorad Molecular Imager FX y el programa Quantity One.

Las membranas se reusaron después de tres lavados con solución SDS 10% caliente por 20 min en agitación.

Se hizo un análisis de densitometría de las bandas usando el programa Image Lab (BioRad). Se normalizó por la densitometría de la señal del RNA 5S. Se comparó la abundancia relativa con respecto al tejido de inicio de la regeneración (callos en oscuridad con 100% de hormonas) al cual se tomó como 1.

Tabla 3. Sondas de DNA para uso en Northern-blot.

miRNA	Sonda de DNA
zma_miR164a-5p	5'-TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA
zma_miR168a-5p	5'-GTCCCGATCTGCACCAAGCGA
zma_miR156a-5p	5'-GTGCTCACTCTCTTCTGTCA
zma_miR159a-3p	5'-CAGAGGTCCCTTCAATCCAAA
zma_miR397a-5p	5'-CATCAACGCTGCGCTCAATGA
zma_miR398a-3p	5'-CGGGGCGACCTGAGAACACA
zma_miR408a	5'-GCCAGGGAAGAGGCAGTGCA
zma_miR528a-5p	5'-CTCCTCTGCATGCCCTTCCA

Tratamiento con DNAsa

Para eliminar cualquier contaminación de DNA en el RNA, este fue tratado con la DNasa RQ1 libre de RNAsa (Promega) de acuerdo a las especificaciones del comerciante. En breve, se incubó una reacción de 10 µl (3 µg de RNA, 1 µl de Buffer RQ1 10x, 3 µl de RQ1 DNasa, 3 µl de H₂O) a 37°C por 30 minutos y posteriormente para inactivar a la DNasa se agregó 1 µl de DNasa Stop Solution y se incubó a 65°C por 10 minutos.

Retrotranscripción

Para obtener cDNA se utilizó la enzima ImProm-II™ Retrotranscriptasa (Promega). Se siguió el protocolo de acuerdo al comerciante. Se mezcló: 6.3 µl de H₂O, 4 µl de Buffer de reacción 5X, 2.4 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de OligodT (10 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de Retrotranscriptasa y 1 µg de RNA tratado con DNAsa. Se incubó a 25°C por 5 minutos, a 42°C por una hora y se inactivó la Retrotranscriptasa a 70°C por 15 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

Para analizar la abundancia de los transcritos predichos como blanco de miRNAs específicos se hicieron qPCRs con oligonucleótidos específicos para cada gen (ver Tabla 4).

Se utilizó el Kit EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal y el termociclador Applied Biosystems 7500. Se prepararon reacciones de 10 µl por triplicado cada una con: 4.98 µl SYBR® GreenER™, 0.02 µl ROX, 0.4 µl de Oligonucleótidos (Forward y Reverse 10 µM c/u), 2 µl de templado (cDNA, una dilución de cDNA, o H₂O como control negativo) y 2.6 µl de H₂O. El programa del termociclador fue el estándar: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto, seguido por un análisis final para obtener una curva de desnaturalización de 60-95 °C.

Tabla 4. Diseño de los Oligonucleótidos usados para amplificar a los transcritos blanco de miRNAs.

Nombre	Acceso	Oligonucleótidos	Tamaño
<i>SBP23</i>	GRMZM2G126018_T01	Forward 5' ACACCAACGCGATGAATTGG Reverse 5' ACCCTGAAAAACCAGAACGG	150 pb
<i>MYB138</i>	GRMZM2G139688_T01	Forward 5' CAGGCAGGCTTTAGGTTTTG Reverse 5' CAGATTCAGTGAAGGGGTCG	284 pb
<i>CUC2</i>	GRMZM2G393433_T01	Forward 5' TTCGCTGCACTACATGGTTG Reverse 5' AACGACGACCCAGTCACTTAC	109 pb
<i>AGO1C</i>	GRMZM2G039455_T01	Forward 5' TGGTACTGTGAAGACTGTGGTC Reverse 5' TTGCAAGCACGGTAAAGTGG	82 pb
<i>LAC2</i>	GRMZM2G146152_T01	Forward 5' AATCGTTTGGCCTGTGCAAC Reverse 5' ATGGCGCAACAACACATGAC	127 pb
<i>SOD9</i>	GRMZM2G058522_T01	Forward 5' TTTACACCAAGAGGGAGATG Reverse 5' TTGCTCGCAGGATTGTAGTG	147 pb

<i>GRP</i>	GRMZM2G384327_T03	Forward 5' AAGTCTGTGCAAGCTGATGC Reverse 5' AAGCTTGCCAGTTTGTCCAGC	110 pb
<i>SOD1A</i>	GRMZM2G106928_T01	Forward 5'-CAATGGGTGCATATCGACAG Reverse 5'-GCAACAATGTTTCCCAGGTC	105 pb
<i>PLC</i>	GRMZM2G107562_T01	Forward 5'-TGGCCGTATGAGCATTAGC Reverse 5'-GATGTTCCCGAAGCAAAGTC	71 pb
<i>18S</i>	U42796.1	Forward 5'- GGAAACTTACCAGGTCCAGACATA Reverse 5'- GTGGCTAAACGGCCATAGTCCCTC	210 pb

Para probar los oligonucleótidos diseñados se hicieron curvas de calibración usando distintas diluciones de cDNA. Las curvas obtenidas fueron evaluadas de tal forma que cumplieran los siguientes requisitos: tener una eficiencia entre 80-120%, es decir una pendiente ~ 3.3 , tener un coeficiente de correlación ($r^2 > 0.9$) entre los triplicados (Tabla 5).

Tabla 5. Propiedades de las curvas de calibración con los oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Tejido	Diluciones RNA (ng)	PENDIENTE	EFICIENCIA	r^2
<i>SPL23</i>	Hoja	100,20,4	-3.22	104.4	0.98
<i>MYB138</i>	Embrión inmaduro	200,20,2	-3.46	99.0	0.95
<i>CUC2</i>	Hoja	100,20,4	-3.72	85.7	0.98
<i>AGO1C</i>	Embrión inmaduro	100,25,6.25	-2.94	119.0	0.99
<i>LAC2</i>	Plántula	20, 4, 0.8	-3.17	96.0	0.99
<i>SOD</i>	Ejes 72 h de germinación	50,5,0.5	-3.24	103.6	0.99
<i>GRP</i>	Embrión inmaduro	100,20,4	-3.60	89.6	0.99
<i>PLC</i>	Ejes 72 h de germinación	50,5,0.5	-3.16	107.2	0.97
<i>SOD1A</i>	Ejes 72 h de germinación	50,25,12.5	-3.35	99.0	0.92
<i>18S</i>	Ejes 72 h de germinación	50,10,2	-3.89	80.9	0.99

La cuantificación relativa de las muestras se hizo usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) el cual se basa en la normalización entre muestras usando un gen constitutivo, en este caso se usó 18S, y la comparación relativa a una muestra (callos embriogénicos en oscuridad con 100 % de hormonas) a la cual se le asignó el valor de 1. La cuantificación de las muestras se hizo con 2 réplicas técnicas, cada una con triplicados.

Los datos de expresión relativa por qRT-PCR fueron graficados con la media y el error estándar. Los datos fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías (luz vs oscuridad). Para encontrar diferencias se hizo una prueba Tukey HSD con $p < 0.01$. Los análisis estadísticos fueron realizados con R 3.0.2.

Resultados

Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de distintos lotes de maíz.

Se regeneraron plantas a partir de callos embriogénicos de 6, 12, 18 y 24 meses de dos genotipos de maíz: la variedad Tuxpeño y el híbrido Costeño derivado de Tuxpeño (VS-535 y H-565 respectivamente; INIFAP, 2010). Ambos genotipos de maíz dan callos embriogénicos tipo II que poseen una alta frecuencia de regeneración de plantas a partir de cultivos con hasta dos años de proliferación (Garrocho-Villegas et al., 2012). Sin embargo, en este trabajo sólo se analizaron a nivel molecular dos lotes de maíz Costeño de 6 meses (Fig. 11-12), uno de Costeño de dos años (Fig. 13) y uno de Tuxpeño de dos años (Fig. 14). El proceso de regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz consiste en retirar a las hormonas sintéticas cinetina (citocinina) y 2,4-D (auxina) del medio de cultivo de manera paulatina (50% de su concentración inicial durante dos semanas y después se eliminan por completo) y de exponer a los embriones somáticos a la luz (fotoperiodo 16 h luz: 8 h oscuridad). En este trabajo se evaluó el efecto de la luz y de la reducción hormonal por separado, por lo tanto, unos callos se mantuvieron en oscuridad y otros fueron puestos en fotoperiodo.

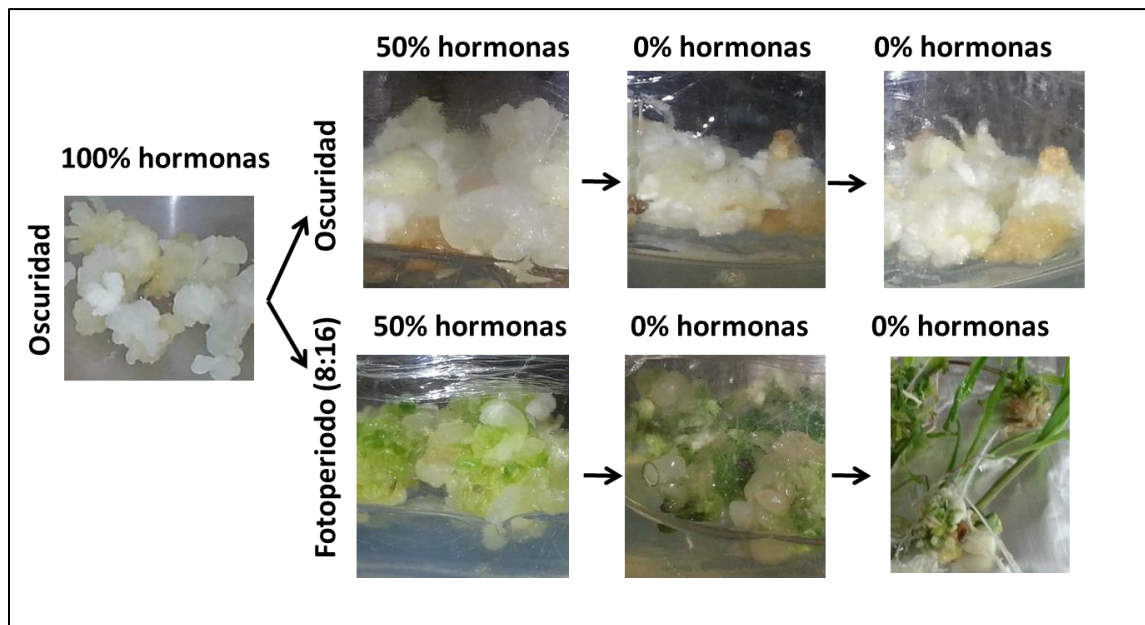


Figura 11. Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz Costeño de 6 meses de subcultivo (Lote A), en fotoperiodo u oscuridad y en distintos regímenes hormonales.

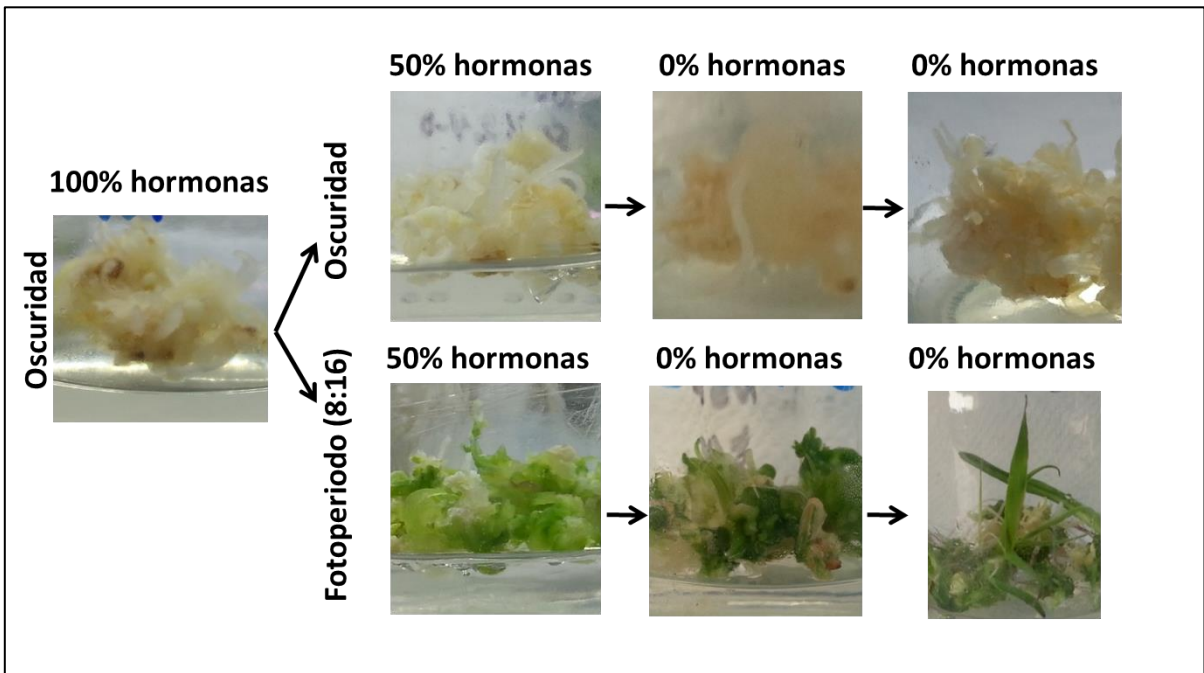


Figura 12. Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz Costeño de 6 meses de subcultivo (Lote B), en fotoperiodo u oscuridad y en distintos regímenes hormonales.

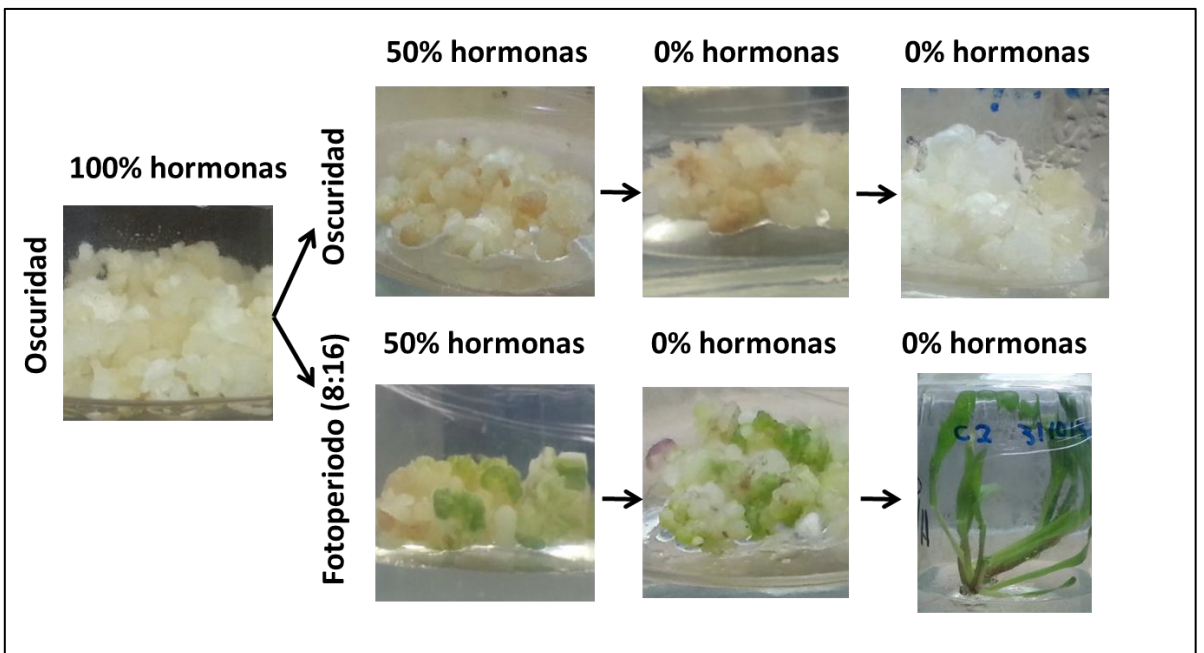


Figura 13. Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz Costeño de dos años de subcultivo, en fotoperiodo u oscuridad y en distintos regímenes hormonales.

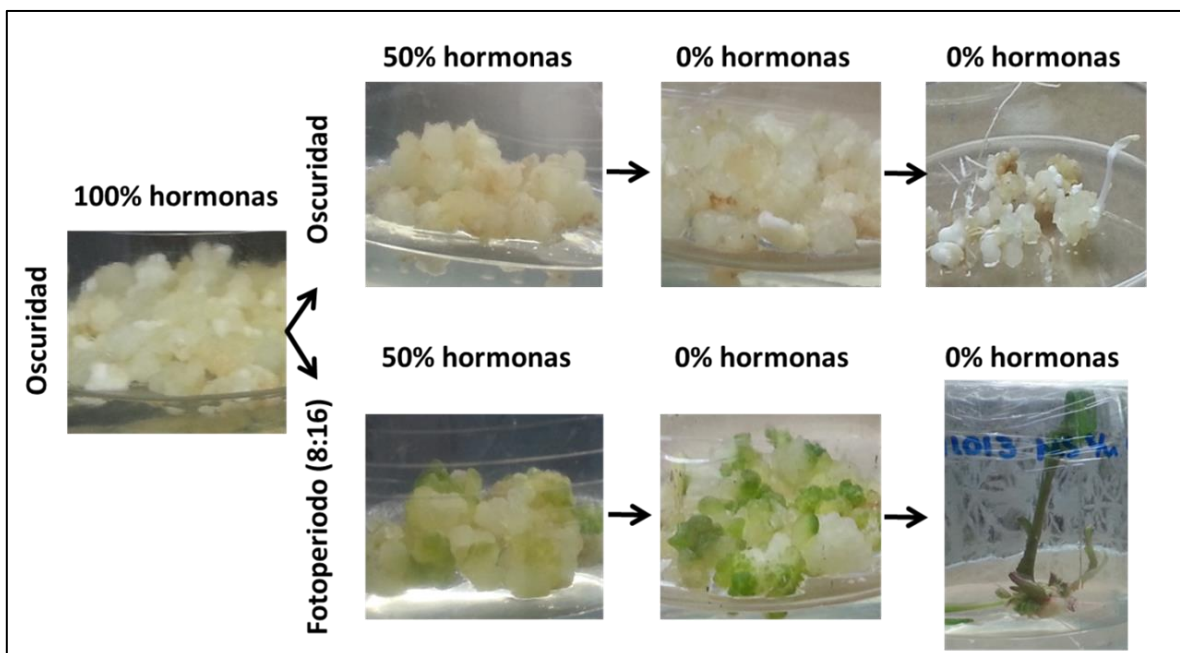


Figura 14. Regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño de dos años de subcultivo, en fotoperiodo u oscuridad y en distintos regímenes hormonales.

Tabla 6. Influencia del genotipo y la edad en características fenotípicas durante el subcultivo y la regeneración de plantas.

	Característica	Lotes
Subcultivo	Proliferación	Costeño > Tuxpeño
	Oxidación	Tuxpeño > Costeño 6 meses > 12 meses > 18 y 24 meses
	Tamaño	Costeño > Tuxpeño
	Organogénesis espontánea	Costeño > Tuxpeño
Regeneración	Puntos regenerativos a las 24 h	Tuxpeño > Costeño
	Puntos regenerativos a los 5 días	Tuxpeño 6 meses > Costeño de 6 meses Tuxpeño de 18 meses = Costeño de 18 meses
	Porcentaje de tejido no diferenciado	Costeño > Tuxpeño 6 meses > 18 meses
	Formación de raíces	Tuxpeño > Costeño
	Tiempo de regeneración	Costeño = Tuxpeño 6 meses > 12, 18 y 24 meses

Durante el subcultivo de callos embriogénicos y la regeneración existen diferencias entre el maíz Tuxpeño y Costeño (Tabla 6). En el subcultivo de callos embriogénicos, la tasa de proliferación (medido por biomasa) es mayor en Costeño que en Tuxpeño, los callos embriogénicos de la variedad Tuxpeño tienden a oxidarse más que los de Costeño y son de menor tamaño, además, los derivados de Costeño tienden a presentar organogénesis espontánea (ver 100% hormona Fig. 12), mientras que este fenómeno es difícil de observar para Tuxpeño durante esta etapa. En la regeneración, en los callos de Costeño hay tejido que no se diferenciaba, se vuelve acuoso y muere, mientras que en los callos de Tuxpeño casi todo el tejido se diferenciaba. En la regeneración en fotoperiodo, los callos de la variedad Tuxpeño forman más puntos regenerativos y de un verde más intenso, a las 24 h de exponerlos a la luz que los de Costeño. Sin embargo, a los 5 días de ponerlos en fotoperiodo, el número de puntos regenerativos se iguala para los cultivos de Costeño y Tuxpeño viejos aunque permanece mayor para los de Tuxpeño de 6 meses que para los de Costeño de la misma edad. Otra diferencia durante la regeneración es que los callos de la variedad Tuxpeño son más propensos a formar raíces que los de Costeño.

Los cambios que se observaron durante la regeneración fueron más evidentes en los callos embriogénicos que estuvieron en luz, se observó el cambio de color de amarillo-blanco a verde y púrpura, debido a la síntesis de pigmentos como la clorofila y antocianinas (Fig. 11-14). Hubo cambios morfológicos observables a simple vista tanto en los callos que permanecieron en oscuridad como aquellos que estuvieron en luz: se formaron estructuras globulares, compactas y de color marfil-translúcido y estructuras con la misma morfología, pero de color blanco opaco (embriones en etapa globular y escutelar), en subcultivos posteriores donde ya no había hormonas se observaron estructuras alargadas y anchas de alrededor de 7 mm que se acumulaban en algunas masas embriogénicas (embriones somáticos en etapa escutelar y coleoptilar), las cuales dieron lugar a la plántula en el caso de los callos en luz, mientras que en los que permanecieron en oscuridad sólo hubo organogénesis de hojas y raíces por separado.

Por otro lado, se hizo un experimento en el cual se mantuvo la misma concentración de hormonas pero se puso a los cultivos en fotoperiodo. Se encontró que la luz es suficiente para que los tejidos se diferencien, en todos los casos se observó la síntesis de pigmentos, pero también cambios morfológicos importantes. De hacer notar, los cultivos de 6 meses de la variedad Tuxpeño formaron una intrincada red de raíces en el medio de cultivo probablemente porque una relación alta de auxinas/citocininas promueve la diferenciación de raíces (Skoog & Miller, 1957), mientras

que los de la misma variedad de 18 meses produjeron plántulas (Anexo 1, Fig. A1). Por lo tanto, la luz es suficiente para inducir la diferenciación y para obtener plántulas. Por otro lado, en aquellos cultivos que permanecieron en oscuridad pero a los cuales se les retiraron las hormonas, el mayor grado de diferenciación fue la organogénesis (Fig. 14).

En el laboratorio de tejidos vegetales se utilizan por lo general los callos con mayores tiempos de subcultivo (18-24 meses) para la regeneración de plantas de maíz (Garrocho-Villegas et al., 2012). A esa edad el cultivo está bien establecido: es más homogéneo y tiene principalmente callos embriogénicos tipo II. Los cultivos más viejos son los primeros en regenerar plántulas; por ejemplo, mientras que en los callos de dos años se obtuvieron hasta tres plántulas a las 6-7 semanas del inicio de la regeneración, en los cultivos de 18 y 12 meses a las 6-7 semanas había una plántula y en los cultivos de 6 meses apareció la primera plántula hasta las 10-11 semanas. En general, el cambio entre cultivos “jóvenes” que no están bien establecidos y cultivos “viejos” bien establecidos ocurre al año de subcultivo.

Abundancia de miRNAs durante la regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos.

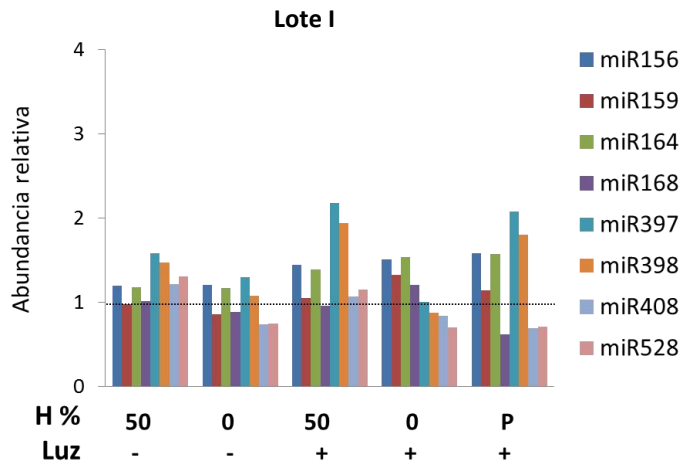
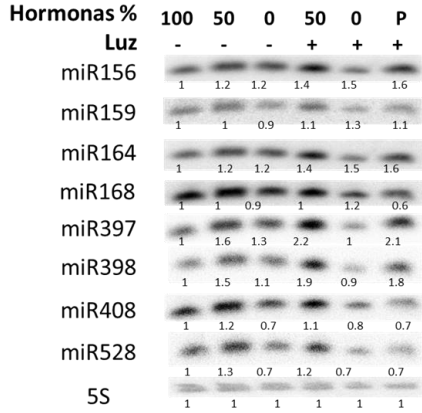
Estudios en nuestro laboratorio muestran que existe una expresión diferencial de miRNAs en cultivos embriogénicos de maíz de diferentes edades. En subcultivos prolongados algunos miRNAs como miR397, miR398, miR408 y miR528 tienden a aumentar mientras otros como miR156, miR159, miR164 y miR168 tienden a disminuir (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014). Por lo que en este trabajo se investigó ¿cómo podría influir la edad del subcultivo en la abundancia de estos miRNAs durante la regeneración de plantas? y ¿cómo afecta a la expresión de los genes blanco de estos miRNAs?

Se encontró que en callos de dos años de la variedad Tuxpeño los miRNAs analizados tienden a aumentar drásticamente como resultado de la disminución a la mitad de las hormonas auxina y citocinina tanto en luz como en oscuridad (Fig. 15B). Esta misma tendencia se encontró en los callos de dos años de la variedad Costeño (Fig. 15A) y de 6 meses (Fig. 16), aunque el cambio fue más moderado. Los miRNAs que no siguen esta tendencia son miR159 en ambos lotes de 2 años, miR168 en Costeño de 2 años y miR398 en Costeño de 6 meses (Fig. 16A). Probablemente estas diferencias se deban a la abundancia de los miRNAs en los tejidos jóvenes y viejos, ya que en

cultivos jóvenes (6 meses) miR398 es menos abundante que en cultivos viejos, mientras que miR159 y 168 son menos abundantes en cultivos de 24 meses en comparación con los de 6 meses (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014). Mientras que para uno de los lotes de 6 meses (Fig. 16B) el aumento de los miRNAs en medio con 50 % de hormonas sólo se observó en luz. Cabe resaltar que a esta edad los cultivos suelen ser bastante heterogéneos comparados con los ya establecidos de más de un año; una de las diferencias de este lote (Fig. 16B), es que el tejido con el cual se inició la regeneración tenía organogénesis (Fig. 12, 100% hormonas). Todo señala a que un aumento inicial en los niveles de los miRNAs analizados es necesario para encender el proceso de maduración de los embriones somáticos y su posterior diferenciación en plántulas. Congruente con esto, durante la maduración de embriones somáticos de arroz (Luo et al., 2006) y maíz (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014) en presencia de luz, los niveles de algunos de éstos mismos miRNAs son mayores en tejidos con evidencia de diferenciación, que en aquellos no diferenciados.

En oscuridad, en tres de los cuatro lotes analizados se observa una disminución de los miRNAs cuando se retiran completamente las hormonas; a excepción de miR156 y miR164 en callos de Costeño de 2 años que no cambian sus niveles y en el segundo lote de Costeño (Fig. 16B) donde los miRNA tienden a aumentar o mantenerse igual. Mientras que en luz, en callos de Tuxpeño de dos años todos los miRNAs tienden a disminuir cuando se retiran las hormonas (Fig. 15B) y en Costeño sólo los miRNAs relacionados a estrés, miR397, 398, 408 y 528, tienden a disminuir (Fig. 16 y 15A). Por lo tanto, los cambios hormonales modifican los niveles de los miRNAs analizados durante la regeneración de plantas, siendo la variedad Tuxpeño más sensible que Costeño a este cambio de las fitohormonas.

A



B

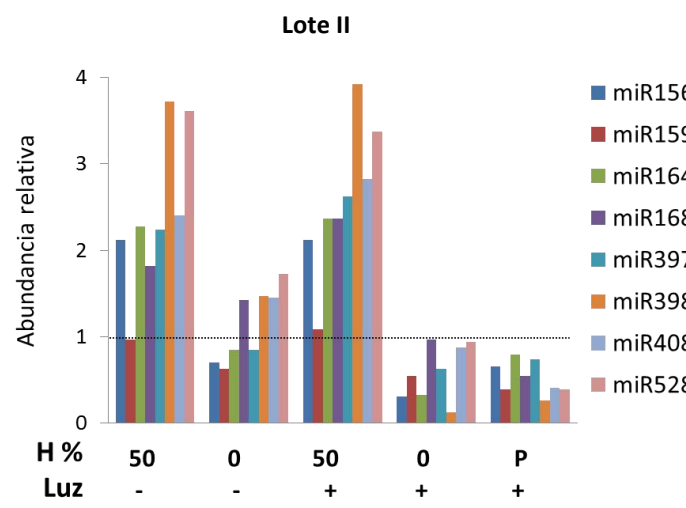
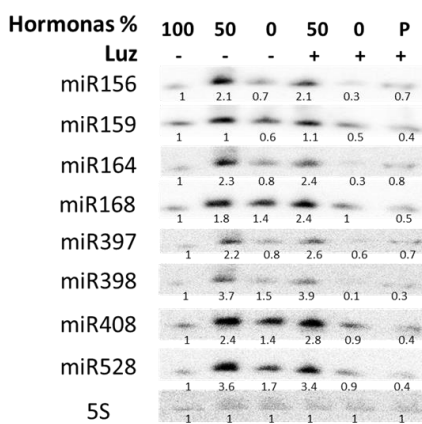
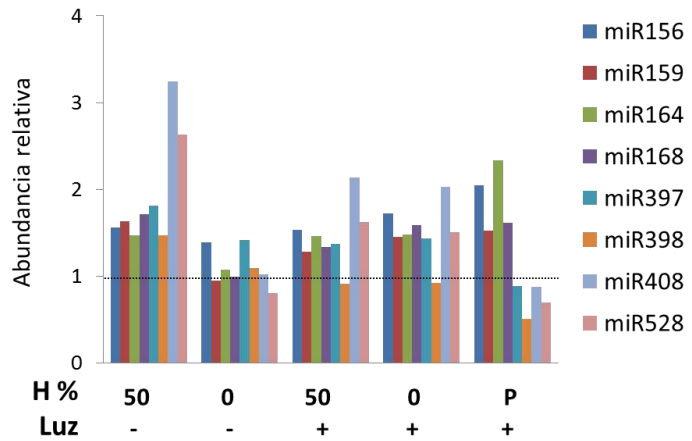
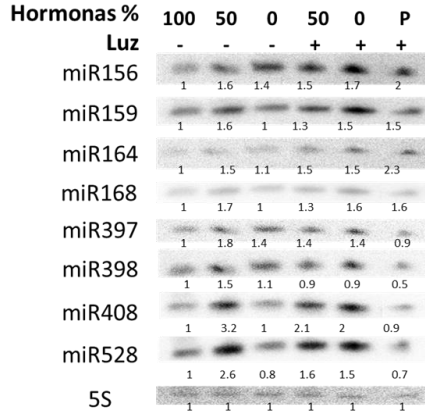


Figura 15. Abundancia de miRNAs específicos durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz Costeño (A) y Tuxpeño (B) de dos años. Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H %). Oscuridad (Luz -). Fotoperiodo 16:8 h (Luz +), plántula (P). La cuantificación por densitometría del Northern-blot fue normalizada por el control de carga 5S y es relativa a callos embriogénicos en 100% de hormonas y oscuridad al cual se le asignó el valor de 1.

A



B

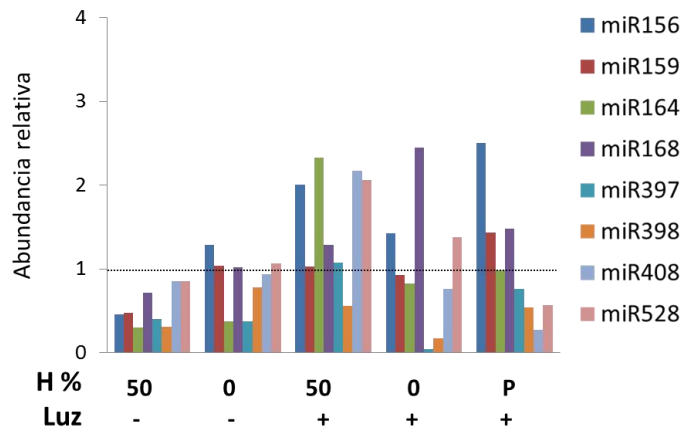
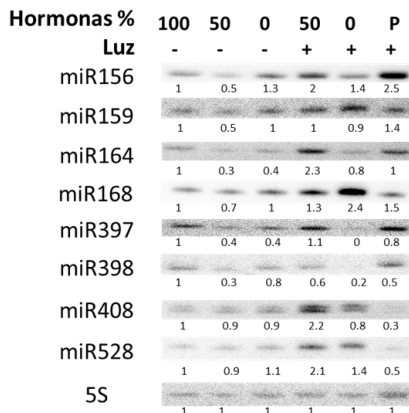


Figura 16. Abundancia de miRNAs específicos durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz de dos lotes distintos de Costeño de 6 meses (A y B). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H %). Oscuridad (Luz -). Fotoperiodo 16:8 h (Luz +), plántula (P). La cuantificación por densitometría del Northern-blot fue normalizada por el control de carga 5S y es relativa a callos embriogénicos en 100% de hormonas y oscuridad al cual se le asignó el valor de 1.

Los miRNAs analizados se pueden dividir en dos categorías: los relacionados a desarrollo: miR156, 159, 164 y 168; y los relacionados a estrés: miR397, 398, 408 y 528.

miR156 tiende a aumentar conforme avanza la diferenciación en Costeño (Fig. 16 y 15A) y aumenta más en luz que en oscuridad, alcanzando los mayores niveles en plántula; mientras que

en Tuxpeño sus mayores niveles son alcanzados en el primer cambio hormonal (Fig. 15B). miR164 también tiende a aumentar conforme avanza la diferenciación y sus niveles son mayores en luz vs oscuridad a la misma concentración de hormonas (Fig. 15 y 16). Durante la regeneración a partir de cultivos de 6 meses (Fig. 16), miR168 tiende a subir conforme se van retirando las hormonas en luz y se mantiene alto en plántula; mientras que en la regeneración a partir de cultivos de dos años tiende a disminuir en plántula donde alcanza sus menores niveles. miR159 es el que menos cambia y su cambio durante la regeneración es particular para cada lote analizado. En resumen, los miRNAs miR164 y miR156 tienden a aumentar conforme avanza la diferenciación, mientras que miR159 y miR168 son los que menos cambian y sus cambios durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz es más variable entre lotes.

En los cuatro lotes analizados, miR408 y miR528 muestran el mismo patrón de cambio durante la regeneración en luz y tres de los cuatro lotes también muestran el mismo comportamiento en oscuridad (Fig. 16A y 15). miR397 y 398 siguen el mismo patrón durante la regeneración a partir de lotes de 2 años independientemente de la variedad; mientras que en los lotes de 6 meses existen diferencias incluso entre ellos. Cabe resaltar que los cultivos de 6 meses tardan más tiempo en regenerar plántulas y que miR397 y 398 suelen ser menos abundantes a los 6 meses que a los 2 años. En general, los miRNAs relacionados a estrés tienden a disminuir conforme aumenta la diferenciación y muestran un patrón similar entre lotes durante el proceso de regeneración de plantas.

Regulación diferencial de mRNAs blanco de miRNAs durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.

Los miRNAs participan en el proceso de embriogénesis somática en diferentes especies de plantas (Chen et al., 2011; Li et al., 2012; Lin & Lai, 2013; Luo et al., 2006; Qiao & Xiang, 2013; Shen et al., 2012; Wu et al., 2011, Wu et al., 2015; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2010). Sin embargo, aún no se conoce mediante cuales mecanismos o vías podrían estar modulando el proceso de reprogramación celular necesario para la formación y maduración de los embriones somáticos. Para conocer la posible función de los miRNAs analizados durante la regeneración de plantas a partir de embriones somáticos de maíz, se seleccionaron algunos de sus mRNAs blanco (Tabla 2) y se analizó su expresión durante la regeneración de plantas por medio de RT-qPCR (Fig. 17-25).

miR156-SPL23

En *Arabidopsis* miR156 tiene como blanco a 11 de los 17 genes SBP (*Squamosa promoter binding protein like*) (Gandikota et al., 2007; Rhoades et al., 2002), en arroz 11 de los 19 genes SBP tienen sitios blanco de miR156 (Xie et al., 2006). En maíz 11 de los 26 genes SBP tienen el mismo sitio de reconocimiento de miR156a (Chávez-Hernández et al., 2015). Los SPBs son factores de transcripción involucrados en cambios de la fase vegetativa a la reproductiva, la duración del plastocrón y la embriogénesis en *Arabidopsis thaliana* (Chuck et al., 2007; Nodine & Bartel, 2010; Wang et al., 2008; Wu & Poethig, 2006). En este trabajo se analizó a *SBP23* como blanco de miR156, el cual está en el mismo clado que *SPL10* y *SPL11* de *Arabidopsis thaliana* (Preston & Hileman, 2013), que están implicados en embriogénesis cigótica (Nodine & Bartel, 2010). Los niveles de *SBP23* varían entre lotes y no se relacionan con la edad del callo (Fig 17). Por ejemplo, en callos en oscuridad de Tuxpeño de dos años (Fig. 17D) y el primer lote de Costeño de seis meses (Fig. 17A) tienden a aumentar los niveles, mientras que Costeño de dos años (Fig. 17C) y el segundo lote de 6 meses (Fig. 17B) tienden a disminuir. En luz, en callos de Costeño los niveles de *SBP23* tienden a disminuir y en Tuxpeño se mantienen bajos. En todos los casos los niveles más altos de *SBP23* están en oscuridad. En cuanto a la asociación inversa entre miR156 y *SBP23*, en los callos de Costeño hay más relación que en los de Tuxpeño, especialmente en luz, coincidente con una mayor diferenciación. En general, miR156 tiende a aumentar conforme avanza la diferenciación y *SBP23* tiende a disminuir. Lo que coincide con lo observado en la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis* (Nodine & Bartel, 2010).

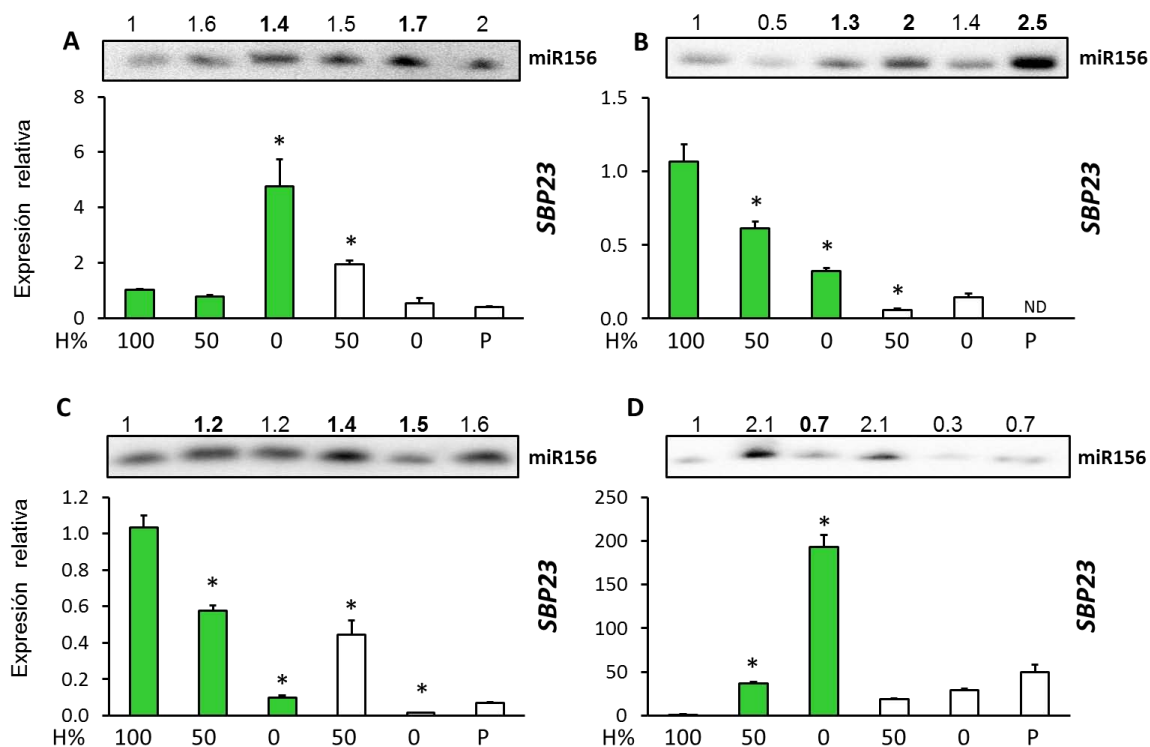


Figura 17. Niveles del transcrito *SBP23* y de miR156 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *SBP23* medida por qRT-PCR y de miR156 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A y B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

miR164-CUC2

Los blancos de miR164 pertenecen a la familia de factores de transcripción NAC (NAM, ATAF1-2, CUC2) (Mallory et al., 2004). Las proteínas de la familia NAC están involucradas en varios procesos de desarrollo como floración, embriogénesis, senescencia y señalamiento por auxinas entre otros (Fan et al., 2014). NAM es importante para la señalización del meristemo apical del tallo (SAM por sus siglas en inglés) y en el desarrollo de primordios (Souer et al., 1996), mientras que CUC2 también está involucrado en el desarrollo de SAM (Aida et al., 1997) y en la embriogénesis somática directa en *Arabidopsis* (Gordon et al., 2007). En este trabajo se analizó a *CUC2* como blanco de miR164. En oscuridad *CUC2* tiende a disminuir conforme se retiran las hormonas y

avanza la diferenciación, al menos en los callos de Costeño (Fig. 18A-C). En Tuxpeño los niveles de *CUC2* son mucho menores en callos que en Costeño y hay un aumento importante cuando se disminuyen las hormonas a la mitad (Fig. 18D). En general, en luz también tiende a disminuir conforme avanza la diferenciación. Para tres de los cuatro lotes los mayores niveles de *CUC2* están en oscuridad (Fig. 18B-D). Es más fácil encontrar una correlación inversa entre miR164 y *CUC2* en luz, aunque no se observa en todas las etapas (Fig. 18B-C). Al igual que *SBP23*, *CUC2* parece estar más expresado en tejidos menos diferenciados, coincidente con su patrón de expresión en *Arabidopsis* durante la regeneración de tallos *de novo* (Gordon et al., 2007). Es interesante notar que en callos de Tuxpeño es importante el cambio hormonal inicial para que haya un aumento de estos dos transcritos, así como que en este genotipo hay menor correlación miRNA-blanco.

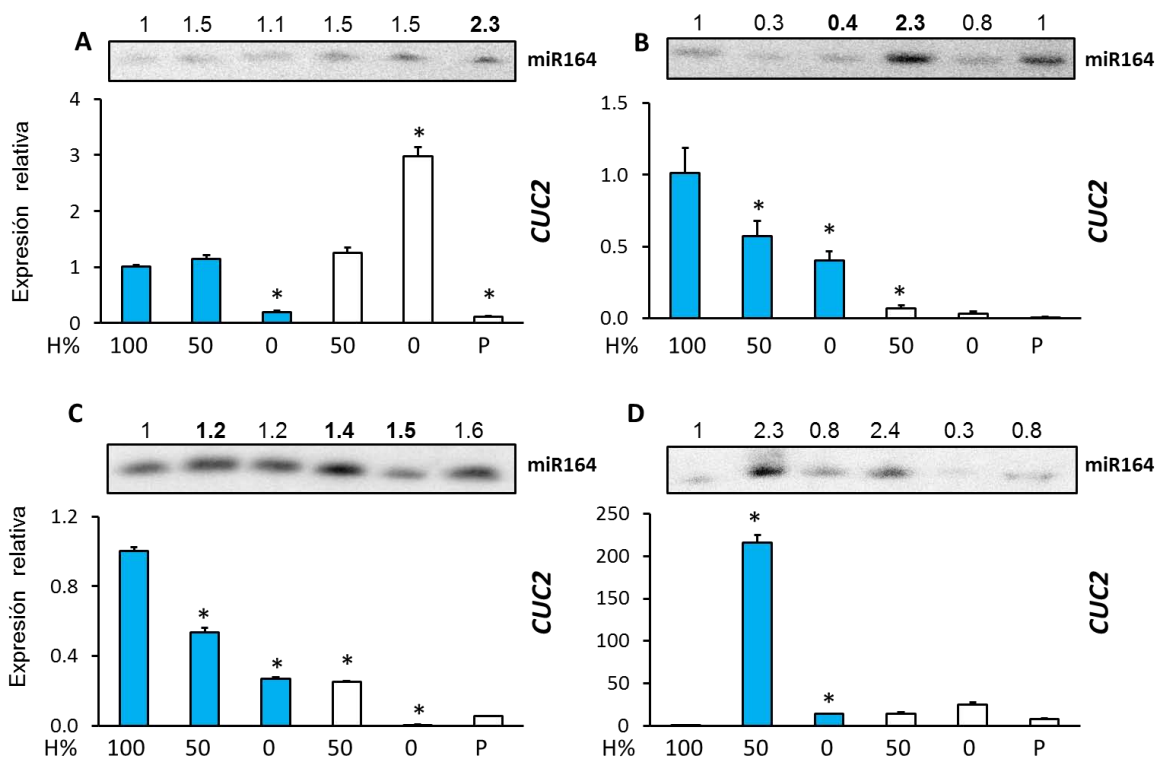


Figura 18. Niveles del transcrito *CUC2* y de miR164 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *CUC2* medida por qRT-PCR y de miR164 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

miR159-MYB138

El miR159 es el que sufre los menores cambios a lo largo del proceso de regeneración. Interesantemente, miR159 es uno de los miRNAs más abundantes tanto en el embrión inmaduro de maíz, como durante la inducción de la embriogénesis somática, pero también es uno de los que menos cambian (Shen et al., 2013). Los transcritos regulados por miR159 son factores de transcripción MYB (Alonso-Peral et al., 2010). La familia de factores de transcripción MYB es una de las más grandes en plantas y está involucrada en el desarrollo de la flor y la semilla, metabolismo secundario, identidad celular y respuesta a estrés (Li et al., 2014). En *Arabidopsis* miR159 regula a *MYB33*, *MYB65* y *MYB101*, genes relacionados a GAMYB, que son de respuesta a ácido giberélico (GA) y ácido abscísico (ABA) y están implicados en procesos como la floración en días cortos, la fertilidad masculina y la germinación (Woodger et al., 2003).

Se analizó a *MYB138* (también nombrado *MYB49*), que es uno de los tres genes tipo GAMYB de maíz que es blanco de miR159 (Du et al., 2012). Se encontró que *MYB138* y miR159 tienen una buena relación inversa en tres de los cuatro lotes analizados (Fig. 19A, C, D). Cambios sutiles en miR159 se ven reflejados en los niveles de *MYB138*. Mientras que otros miRNAs que cambian más drásticamente no tienen un efecto tan claro en la abundancia de sus blancos. La edad de subcultivo parece influir tanto en el patrón de expresión de *MYB138* como en sus niveles. *MYB138* es más abundante en callos jóvenes (datos no mostrados). En callos de dos años los cambios de *MYB138* durante la regeneración tienen el mismo comportamiento independientemente de la variedad.

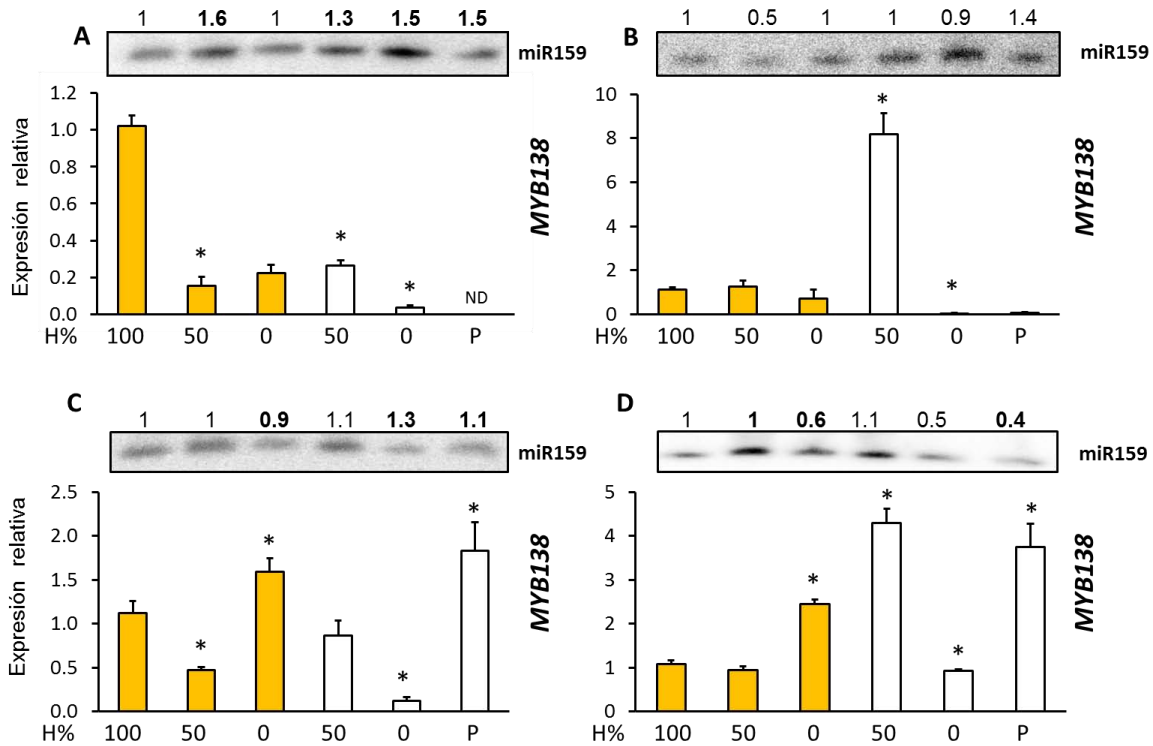


Figura 19. Expresión del transcrito *MYB138* y de *miR159* durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de MYB medida por qRT-PCR y de *miR159* medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

miR168-AGO1C

miR168 tiene como blanco al transcrito de *AGO1* (Vaucheret et al., 2006). Este miRNA es muy importante porque regula a la proteína encargada de la acción de los miRNAs sobre sus blancos. En maíz hay al menos 6 genes que codifican para proteínas de la familia *AGO1*, pero sólo 4 presentan todos los dominios necesarios para su función y tienen el sitio de reconocimiento de *miR168*. *AGO1C* presenta mayor identidad con *AGO1* de *Arabidopsis thaliana* a nivel de aminoácidos (Qian et al., 2011) y se expresa más abundantemente en tejidos en diferenciación como el meristemo apical del tallo, en la plántula, en la mazorca inmadura y en los estambres inmaduros (Sekhon et al., 2011). Por lo tanto, se analizó a *AGO1C* como blanco de *miR168* durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Su nivel inicial en callos y su

cambio ante la primera disminución hormonal es dependiente del lote, por ejemplo, hay 10 veces de diferencia en los niveles de *AGO1C* de un lote de callos de 6 meses con respecto al otro (datos no mostrados). *AGO1C* disminuye de 50% hormonas a 0% hormonas tanto en luz como en oscuridad y luego aumenta en plántula. En oscuridad, se observa relación inversa entre los niveles de miR168 y *AGO1C* para callos de Tuxpeño, pero no para Costeño (Fig. 20C, D). Por otro lado, en luz dicha relación inversa se encontró para Costeño, pero no para Tuxpeño.

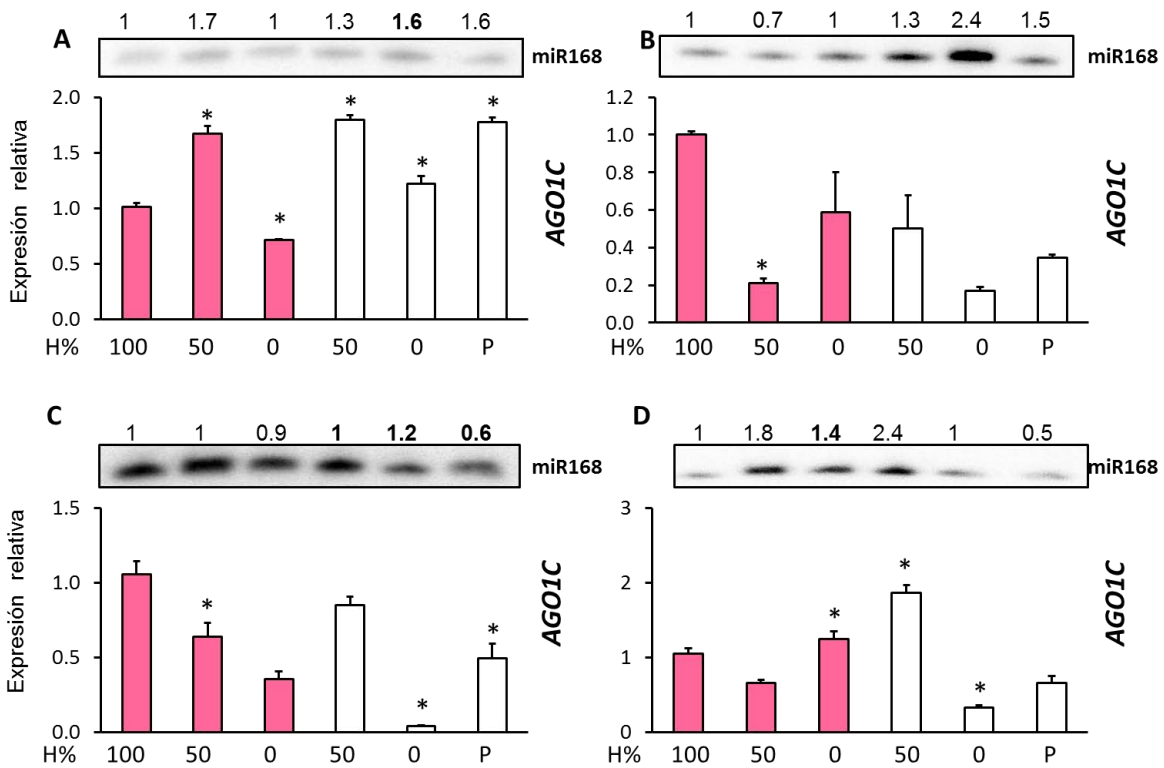


Figura 20. Expresión del transcrito *AGO1C* y de miR168 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *AGO1C* medida por qRT-PCR y de miR168 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

miR397-LAC2

Los blancos de miR397 incluyen a varias lacasas (*LAC2*, 4 y 17 en *Arabidopsis*) que tienen dominios de unión a cobre y están involucradas en estrés oxidativo y homeostasis de cobre (Abdel-Ghany & Pilon, 2008; Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Yamasaki et al., 2007). Las lacasas extracelulares tienen actividad de polifenol oxidasas aunque se conoce poco sobre su función. Algunos miembros de la familia de lacasas en *Arabidopsis* participan en la formación y remodelación de la pared celular (Ravet & Pilon, 2013). Se midió el nivel de *LAC2* como blanco de miR397 en la regeneración de plantas de maíz (Fig. 21). Hay mayores niveles de *LAC2* durante la regeneración en oscuridad que en luz en todos los lotes analizados, también hay niveles más elevados en 6 meses que en 2 años (datos no mostrados). Los cambios de *LAC2* son específicos para cada lote aunque en general son niveles más bajos en luz que en oscuridad. Esto tiene sentido, ya que el estrés se percibe diferente entre lotes, sobretodo en lotes jóvenes que son más heterogéneos. A pesar de que miR397 tiene un comportamiento muy similar entre los cuatro lotes analizados, *LAC2* es muy variable. En cuanto a la correlación entre el miRNA y su blanco, está es muy baja.

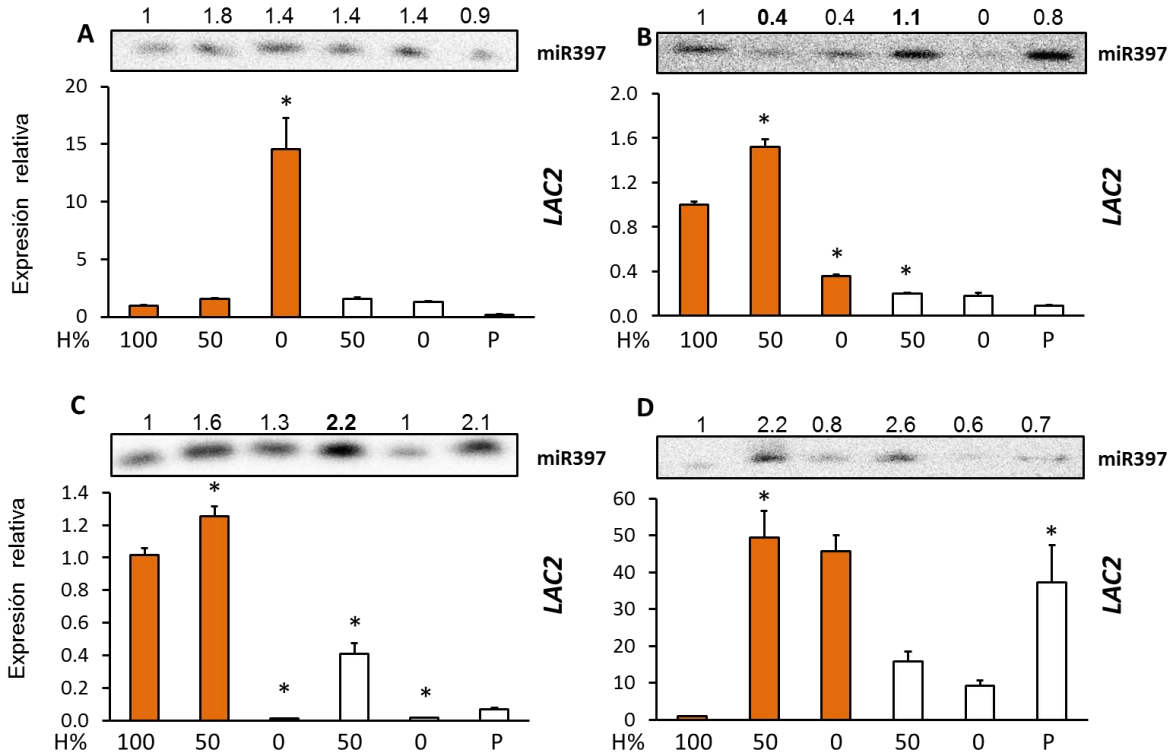


Figura 21. Expresión del transcrito *LAC2* y de miR397 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *LAC2* medida por qRT-PCR y de miR397 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

Anteriormente se analizó la expresión de *LAC4* como blanco de miR397 en callos de Tuxpeño de 2 años y se encontró que casi no se expresa durante la embriogénesis somática y la diferenciación de los embriones, pero si es detectado en la plántula coincidente con los menores niveles de miR397. De tal forma, se puede concluir que miR397 está regulando a varios blancos durante la regeneración de plantas y que la expresión de sus blancos depende de más de un mecanismo.

miR398-SOD9

El blanco de miR398 que se analizó fue SOD9 (Fig. 22), el cual se validó por datos de degradoma en maíz (Shen et al., 2013). Las superóxido dismutasas de cobre (CSD, SOD) son enzimas importantes para destruir especies reactivas de oxígeno y se sabe que este tipo de estrés ocurre en los tejidos

con alta proliferación (Ravet & Pilon, 2013). Los niveles de *SOD9* también varían entre lotes, pero son más altos en oscuridad. En tres de los cuatro lotes tienden a aumentar los niveles conforme se retira la hormona en oscuridad (Fig. 22A, B, D). Mientras que en luz, *SOD9* se mantiene bajo o tiende a disminuir. Para callos de Tuxpeño de dos años, Costeño de dos años y Costeño de 6 meses (Fig. 22A, C, D), se observa una relación inversa entre el miRNA y su blanco en oscuridad. A pesar de ser un blanco validado en maíz, *SOD9* no muestra un comportamiento inverso a los niveles de miR398 en todas las etapas durante la regeneración de plantas, lo cual implica que también es regulado a otro nivel. En *Arabidopsis* miR398 puede regular a sus blancos (CSDs) a nivel de inhibición de su traducción (Beauclair et al., 2010), sin embargo, en maíz aún no hay evidencia de que miR398 esté implicado en regulación a nivel traduccional.

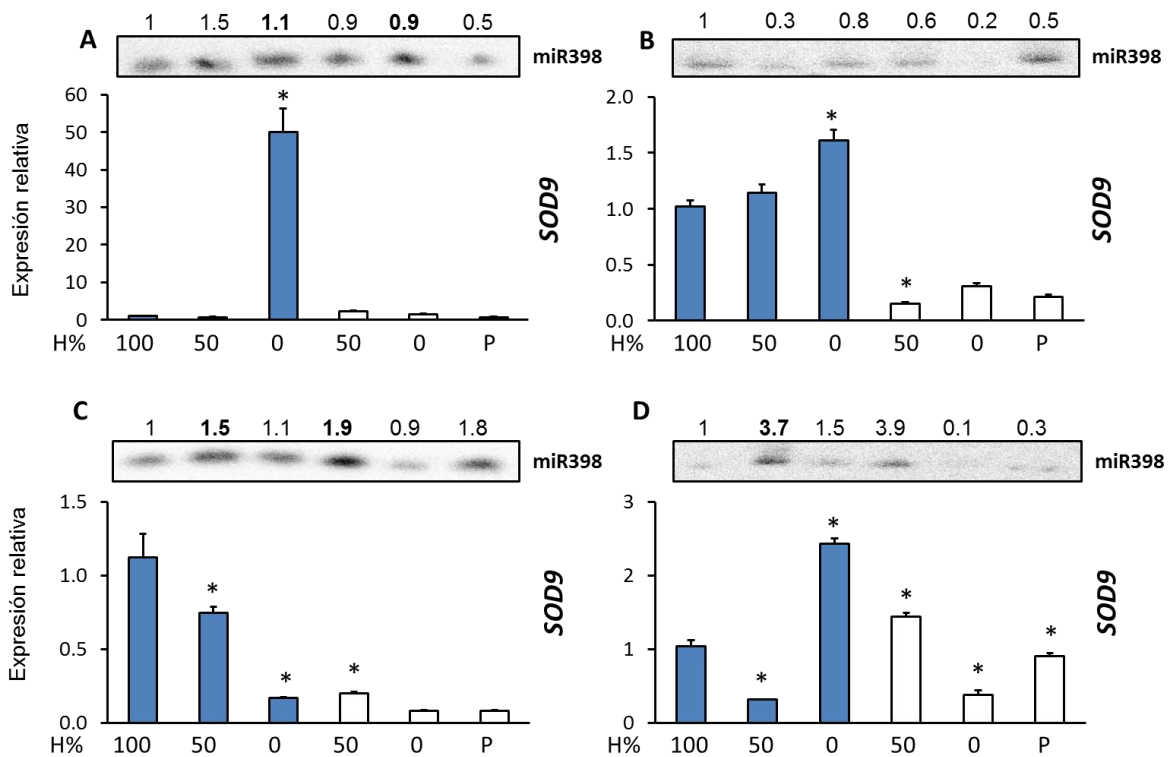


Figura 22. Expresión del transcrito *SOD9* y de miR398 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *SOD9* medida por qRT-PCR y de miR398 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

miR408-GR1

En *Arabidopsis* la familia de miR408 tiene un sólo miembro que regula a algunos transcritos de la familia de lacasas y a algunas plantacianinas (Abdel-Ghany & Pilon, 2008; Jones-Rhoades & Bartel, 2004). Los blancos predichos para miR408 en maíz con un buen alineamiento son pocos (Chávez-Hernández et al., 2015) mientras que los blancos confirmados por degradoma tienen un pobre alineamiento con el miRNA y no están conservados con los de *Arabidopsis*. Se analizó a *GR1* (*Gamma Response Protein 1*) como blanco de miR408, el cual fue predicho anteriormente (Li et al., 2013). En *Arabidopsis thaliana* GR1 es expresado en tejidos mitóticamente activos como SAM y primordios florales de manera similar a genes relacionados al ciclo celular; además, AtGR1 responde a estrés genotóxico como radiación gamma, y se piensa que bloquea las divisiones celulares en células irradiadas previniendo su entrada a mitosis antes de haber reparado el ADN dañado (Deveaux et al., 2000). *GR1* no se detectó durante la regeneración de plantas a partir de callos de Costeño de 6 meses (Fig. 23A-B). Sin embargo, está presente en uno de los lotes de callos de 6 meses (Fig. 23A). En los cultivos de dos años *GR1* es abundante tanto en callos como durante la regeneración (Fig. 23C-D), lo cual coincide con altos niveles de miR408 en cultivos viejos vs cultivos jóvenes. En callos de Costeño se observa una mejor correlación entre los niveles de miR408 y *GR1*, especialmente en oscuridad. Es interesante que *GR1* no se encuentre presente en callos jóvenes, pero si en viejos y es posible que el cultivo por tiempo prolongado en altas concentraciones hormonales cause un daño al ADN (Neelakandan & Wang, 2012). Esto es muy importante, porque daños genéticos y modificaciones epigenéticas resultado del subcultivo en la embriogénesis somática originan variación somaclonal no deseada en las plantas derivadas de un mismo cultivo (Miguel & Marum, 2011).

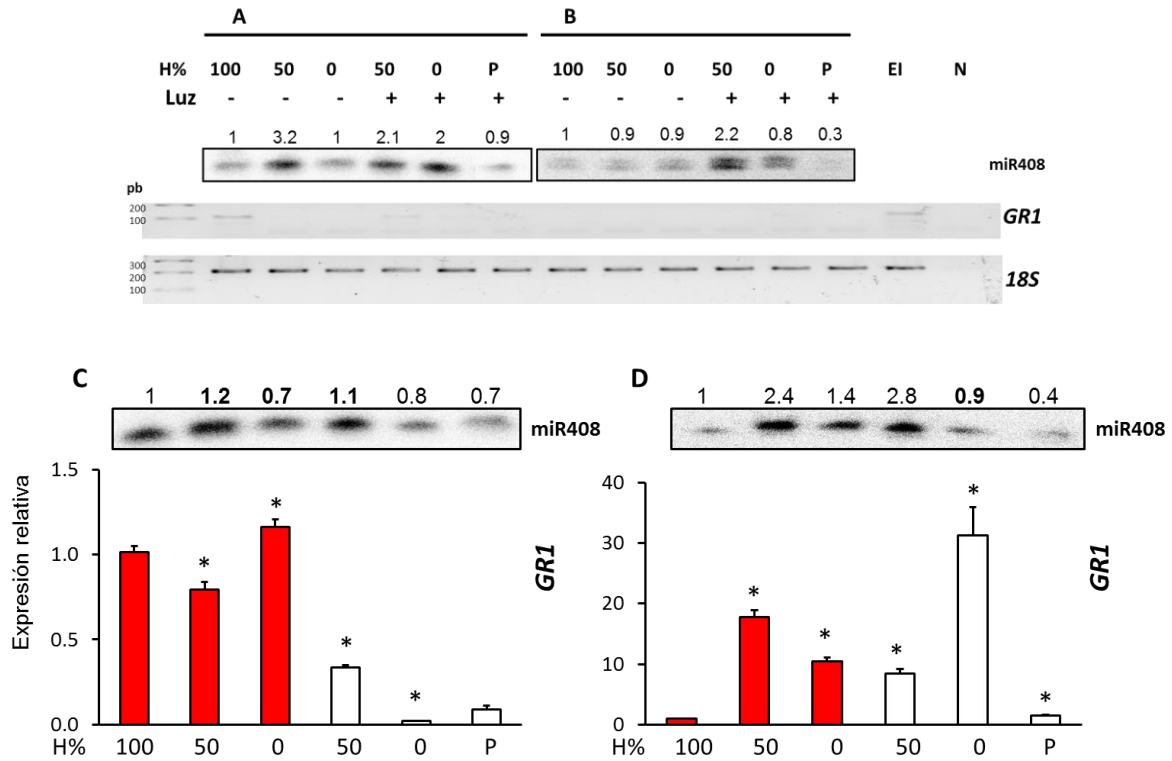


Figura 23. Expresión del transcrito *GR1* y de miR408 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. *GR1* no fue detectado en Costeño de 6 meses (A y B). (EI) embrión inmaduro. (N) control negativo. Pares de bases (pb). Expresión relativa de *GR1* medida por qRT-PCR y de miR408 medida por Northern-Blot y densitometría de Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

miR528-SOD1A/PLC

miR528 aumenta al reducir las hormonas a la mitad y posteriormente disminuye al retirar las hormonas y en la plántula. Este miRNA es el más abundante en el embrión inmaduro y tiende a aumentar en los embriones somáticos de maíz (Shen et al., 2012; Alejandri-Ramírez, 2015) y arroz (Chen et al., 2011; Luo et al., 2006). Uno de los blancos predichos bioinformáticamente para miR528 es *SOD1A*. En maíz el transcrito *SOD1A* se acumula principalmente en plántulas pero no en embriones, ni en semilla germinante (Sekhon et al., 2011). *SOD1A* tiene diferentes niveles de

expresión entre los cuatro lotes de callos aunque presenta el mismo patrón entre los cuatro lotes durante la regeneración en oscuridad, primero disminuye cuando se disminuyen las hormonas y después aumenta cuando las hormonas son retiradas completamente, relacionándose inversamente con miR528 (Fig. 24). En luz, el comportamiento de *SOD1A* se parece más entre los lotes de dos años (Fig. 24C-D). De 50% hormona a plántula en dos años *SOD1A* tiende a subir, mientras que en callos de 6 meses se mantiene sin cambio. Los menores niveles de *SOD1A* están en luz. En general hay una buena relación entre los cambios en miR528 Y *SOD1A* en luz y oscuridad, aunque no ocurre en todas las etapas para todos los lotes y grandes cambios en miR528 tienen un efecto pequeño en *SOD1A*.

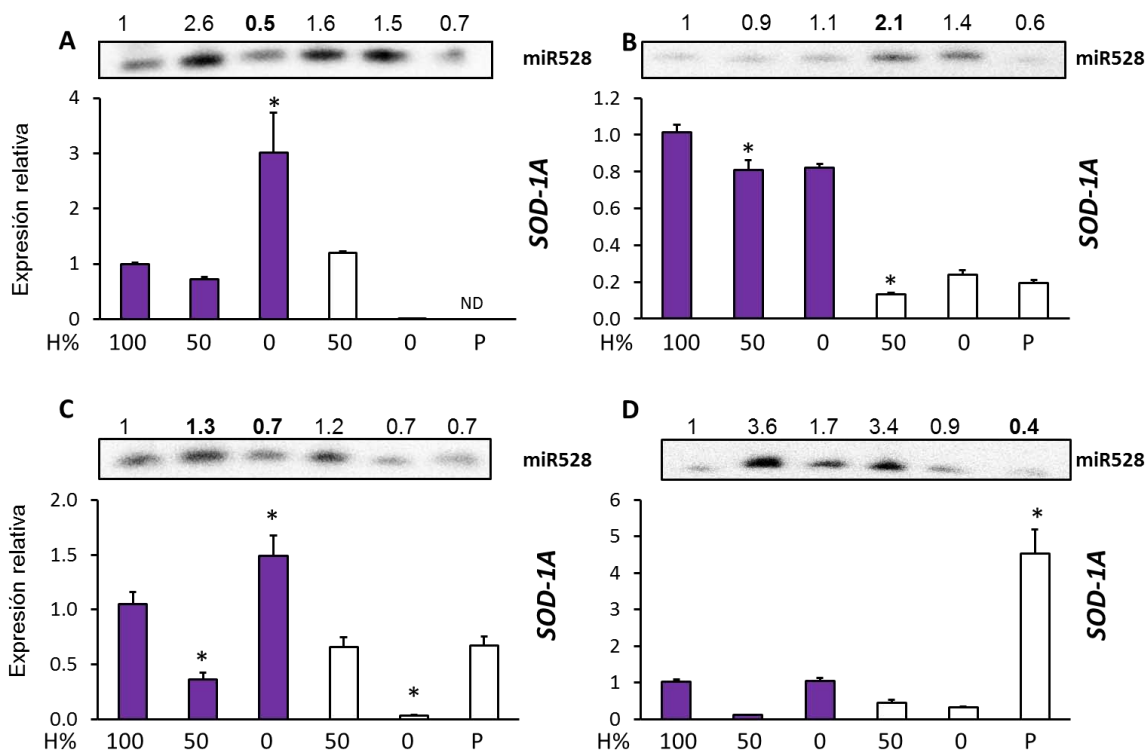


Figura 24. Expresión de los transcritos *SOD-1A* y de miR528 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *SOD-1A* medida por qRT-PCR y de miR528 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

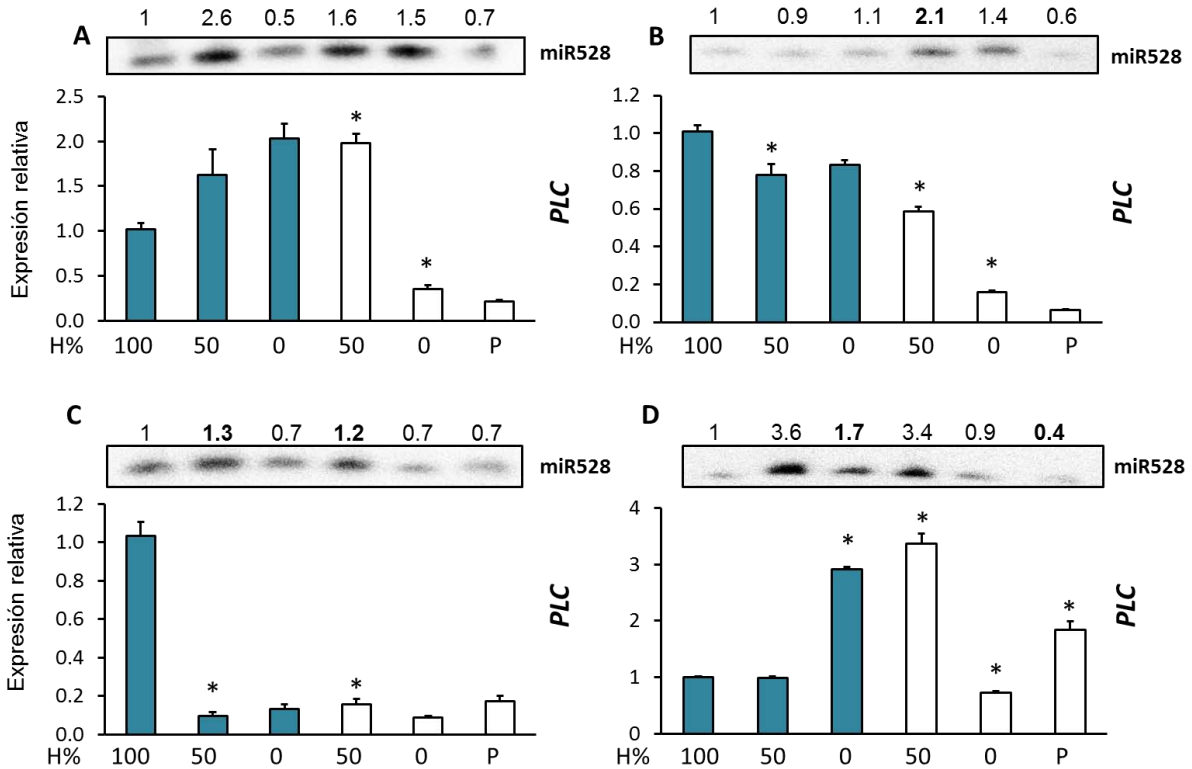


Figura 25. Expresión de los transcritos *PLC* y de miR528 durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Expresión relativa de *PLC* medida por qRT-PCR y de miR528 medida por Northern-Blot y densitometría. Costeño de 6 meses (A-B). Costeño de 2 años (C). Tuxpeño de 2 años (D). Porcentaje de hormonas 2,4-D y cinetina (H%). Plántula (P). Barras de color, oscuridad. Barras blancas, fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. No detectado (ND). Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la etapa anterior $p < 0.01$ (*). Los números de la densitometría en negritas indican las etapas donde se observa una relación inversa entre miRNA/blanco.

Otro blanco de miR528 es *PLC* (Fig. 25). Las plastocianinas (*PLC*) son proteínas que unen cobre y son esenciales para transferir electrones del complejo *b₆f* del citocromo al fotosistema I (Abdel-Ghany & Pilon, 2008). *PLC* es menos abundante a 0% hormonas en luz vs oscuridad, lo cual resulta contrario a lo que se esperaría debido a que está implicado en fotosíntesis. Sin embargo, la inducción de genes relacionados a la fotosíntesis es independiente de luz durante la embriogénesis de *Arabidopsis* (Spencer et al., 2007). En general, hay una correlación menor de miR528 con *PLC* que con *SOD1A*. Al igual que con los blancos de miR397, se muestra que la regulación de los blancos de miRNAs es diferencial y ocurre a distintos niveles durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.

Discusión

En los últimos años varios estudios apuntan a la importancia de los miRNAs durante la embriogénesis somática de plantas (Chen et al., 2011; Li et al., 2012; Lin & Lai, 2013; Luo et al., 2006; Qiao & Xiang, 2013; Shen et al., 2012; Wu et al., 2011, Wu et al., 2015; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2010). En estos estudios se observa que los miRNAs cambian durante la inducción de callos y entre callos embriogénicos y no embriogénicos, así como durante la maduración y diferenciación de los embriones somáticos. Sin embargo, tanto los patrones de cambio, como los miRNAs involucrados son específicos para cada especie analizada. Por ejemplo, en la embriogénesis somática de arroz miR171, miR390 y miR398 son expresados preferencialmente en tejidos no diferenciados (Luo et al., 2006), mientras que en naranja estos miRNAs están enriquecidos durante el proceso de diferenciación (Wu et al., 2011). Las diferencias entre los tipos de protocolos usados para la embriogénesis somática (hormonas, medios de cultivo, tejido de explante), así como las etapas evaluadas, pueden explicar la diferencia en los patrones de cambio de los miRNAs conservados entre especies. Por lo tanto, los estudios realizados en una especie no son completamente extrapolables a otras especies y es necesario evaluar de manera específica lo que ocurre en cada una. Este trabajo representa la primera aproximación para evaluar a los miRNAs y sus posibles funciones mediante la evaluación de blancos seleccionados durante la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. En la figura 26 se propone un modelo que resume lo observado en este trabajo.

El análisis por separado de la reducción hormonal y de la luz durante la regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos indica que los miRNAs responden más a cambios hormonales que a la luz. Shen y colaboradores (2013) analizaron el proceso de inducción de la embriogénesis somática en un híbrido de maíz (18-599R) en la presencia de 2,4-D. Estos autores sugieren que miR164, miR169, miR528 y miR529 participan en la inducción de la embriogénesis somática mediante la regulación de blancos involucrados en la señalización de auxinas y giberelinas. Lo cual apoya la teoría de que los reajustes en la abundancia de algunas familias de miRNAs abundantes en la embriogénesis somática ocurren en respuesta a cambios en la concentración de 2,4-D en el ambiente.

Al analizar a dos genotipos de maíz se observó que Tuxpeño es más sensible que Costeño a la reducción hormonal en la modulación de sus miRNAs. La respuesta diferencial se puede deber a su diferente fondo genético, o bien puede ser resultado de una explicación más simple, como que las masas embriogénicas de Tuxpeño son más pequeñas y por lo tanto tienen mayor superficie de contacto con el medio de cultivo. Por otro lado, en la embriogénesis somática de naranja se evaluaron los miRNAs en varios genotipos embriogénicos y no embriogénicos, se encontraron diferencias en la abundancia de miR164 y miR171 entre las variedades embriogénicas aunque en general eran más abundantes que en las no embriogénicas (Wu et al., 2015). Por lo tanto, es normal encontrar diferencias entre genotipos aunque la respuesta global es muy similar. Existen mayores diferencias entre genotipos al analizar la expresión de mRNAs blanco de miRNAs. En ese sentido, se vió que la respuesta transcripcional de líneas de maíz B73 y Mo17 comparadas con las de sus híbridos (B73 x Mo17 y Mo17 x B73) son diferentes (He et al., 2013).

La edad de subcultivo de los callos embriogénicos de maíz influye en la heterogeneidad del tejido y por lo tanto en sus características fenotípicas durante la proliferación y regeneración de plantas. Los cultivos menores de un año aún no están bien establecidos y eso se refleja en que tardan más en regenerar plantas y en que sus miRNAs y mRNAs blanco responden de manera diferencial incluso entre réplicas del mismo genotipo. Por otro lado, los cultivos con más tiempo de proliferación regeneran más rápido, pero pueden llegar a acumular modificaciones genéticas y epigenéticas resultado de la alta tasa de proliferación celular debida a las hormonas (Miguel & Marum, 2011; Neelakandan & Wang, 2012). Prueba de eso es que en cultivos de dos años se encontró la expresión de *GR1* relacionada a daño del ADN (Deveaux et al., 2000). Por lo tanto, sería conveniente establecer el momento adecuado para balancear las ventajas y desventajas de la edad del subcultivo sobre la regeneración de plantas de maíz. A partir de las observaciones que se hicieron a nivel fenotípico en este trabajo en el laboratorio de cultivo de tejidos, el establecimiento del cultivo con callos tipo II es a partir de un año de subcultivo y es mejor usar callos embriogénicos de esta edad que de dos años para regenerar plantas.

La respuesta de los miRNAs de estrés abiótico evaluados durante la regeneración de plantas de maíz fue la misma: miR408, miR528, miR398 y miR397 aumentan con la primera reducción hormonal y posteriormente tienden a disminuir conforme avanza la diferenciación. Esto resulta interesante, porque muestran un comportamiento inverso a lo que sucede en la inducción de la embriogénesis somática de maíz (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014; Shen et al., 2013). Además

de que en cultivos prolongados tienden a aumentar (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014), coincidente con un mejor establecimiento de los embriones somáticos y un menor tiempo de regeneración. Por otro lado, los miRNAs relacionados a desarrollo miR156 y miR164 tienden a aumentar en tejidos más diferenciados en la regeneración, mientras que en cultivos prolongados de callos embriogénicos tienden a disminuir (Dinkova & Alejandri-Ramirez, 2014). Probablemente el *switch* a embriones somáticos maduros este acompañado de un aumento en los miRNAs relacionados a estrés y una disminución de algunos relacionados a desarrollo, para que cuando las condiciones ambientales sean favorables (presencia de luz), puedan modificar su abundancia y diferenciarse en plantas.

Para evaluar la posible función de los miRNAs en la regeneración se evaluó la abundancia de algunos de sus mRNAs blancos. A pesar de que los miRNAs de estrés tienen un patrón reproducible entre lotes, sus blancos muestran un comportamiento lote-específico. Los transcritos analizados están relacionados a estrés oxidativo (*LAC2*, *SOD9*, *SOD1A*) y son abundantes en tejidos en oscuridad, además de que es en esta condición donde muestran una mejor correlación con sus respectivos miRNAs. El estrés es un estímulo ampliamente usado para inducir embriogénesis somática en varias plantas y de manera natural la organogénesis *de novo* sucede en respuesta a daño o estrés (Xu & Huang, 2014). El aumento de las hormonas también puede verse como un tipo de estrés, al evaluar el transcriptoma en la inducción de la embriogénesis somática de maíz se observa un aumento en la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo (Salvo et al., 2014). Por lo tanto, el estrés es importante para establecer un estado pluripotencial pero también para una posterior diferenciación durante la regeneración de plantas (Che et al., 2006). Al mismo tiempo los mecanismos para contender con el estrés deben estar bajo estricto control, por eso los miRNAs relacionados a estrés tienden a aumentar en callos embriogénicos durante el subcultivo pero disminuyen durante la regeneración.

Por otro lado, los transcritos de los factores transcripcionales *SPL23* y *CUC2*, importantes para el desarrollo del embrión (Nodine & Bartel, 2010; Preston & Hileman, 2013) y la formación del SAM y primordios (Gordon et al., 2007), tienden a disminuir en tejidos más diferenciados en la regeneración y especialmente en luz, lo cual coincide con un aumento de sus respectivos miRNAs (miR156 y miR164). La relación entre el par miRNA/mRNA blanco se observa principalmente en luz. Por lo tanto, al igual que los miRNAs de estrés, existe una relación más notoria entre los miRNAs y sus blancos en las etapas donde los miRNAs son más abundantes. Otra prueba de eso se

puede observar para miR159, el cual es uno de los miRNAs más abundantes durante la embriogénesis somática de maíz (Shen et al., 2013; Alejandri-Ramírez, 2015) y a pesar de ser el que menos cambia durante la regeneración, sus cambios se ven reflejados en la abundancia de su blanco *MYB138*.

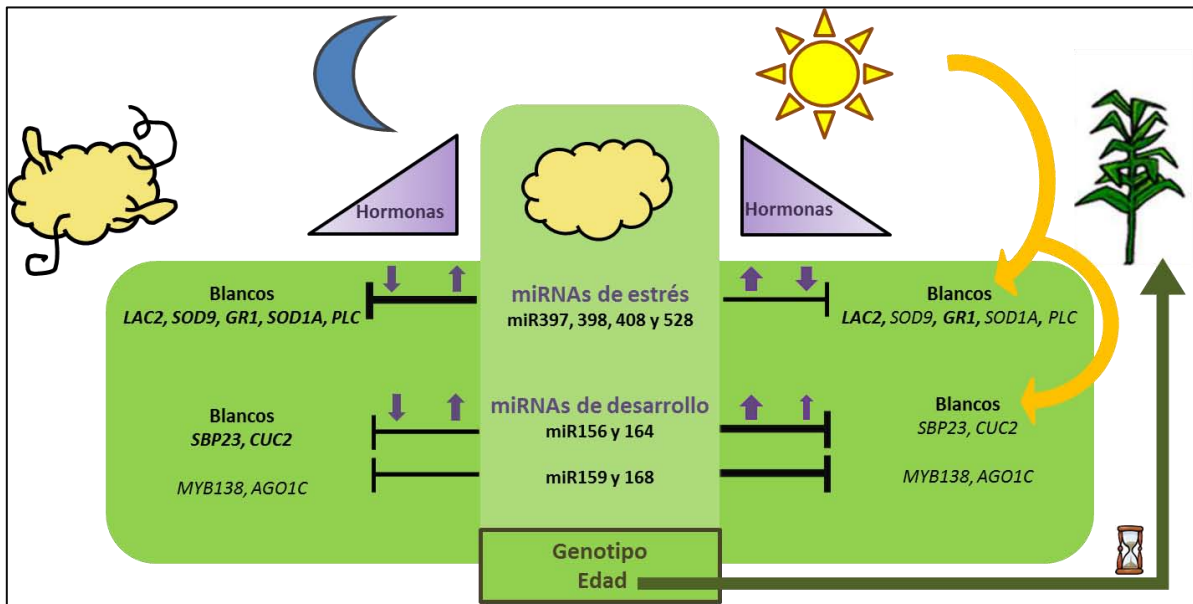


Figura 26. Modelo de la expresión de miRNAs y sus blancos durante la regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos. Los factores que afectan la regeneración son tanto ambientales (régimen hormonal y fotoperiodo) como propios del callo embriogénico (genotipo y edad de subcultivo). En oscuridad (luna) el máximo grado de diferenciación es la organogénesis (izquierda), y sólo cuando hay luz (sol) es posible regenerar plantas (derecha). La edad de subcultivo influye en el tiempo de regeneración de plantas (flecha verde). Las hormonas (gradiente morado) tienen un mayor efecto sobre la abundancia de los miRNAs (flechas color morado), mientras que la presencia de luz modifica la expresión de los blancos de miRNAs (flechas amarillas). Tanto el genotipo como la edad influyen sobre la abundancia de los miRNAs (recuadro verde claro) pero aún más sobre la expresión de sus blancos (recuadro verde oscuro). Cuando los miRNAs son más abundantes tienen un mayor efecto sobre la abundancia de sus blancos (flechas de inhibición gruesas). Los miRNAs relacionados a estrés siguen un patrón similar durante la regeneración de plantas (flechas moradas) tanto el luz como en oscuridad. La abundancia de algunos blancos de miRNAs es mayor en oscuridad que en luz (negritas). miR156 y miR164 aumentan en tejidos con mayor diferenciación coincidente con menores niveles de sus blancos. El miR159 y el miR168 son los que menos cambian durante la regeneración y sus blancos no tienen un patrón específico de expresión durante este proceso.

Los miRNAs pueden regular a sus blancos por medio de su degradación y/o inhibiendo su traducción. En plantas, es común observar una correlación inversa entre el miRNA y su mRNAs

blanco, sugiriendo que la degradación del mRNA es el mecanismo preferido. A pesar de eso, los datos de secuenciación masiva de RNAs pequeños y degradoma no siempre detectan a los productos de degradación de mRNAs blancos predichos o incluso validados (Liu et al., 2014; Shen et al., 2013). Además, varios trabajos muestran la falta de correlación entre miRNAs y sus blancos, dependiendo del tejido o el proceso analizado (Alonso-Peral et al., 2012; Brodersen et al., 2008; Vaucheret et al., 2006; Wu et al., 2011). Los transcritos propuestos como blanco de miRNAs coinciden parcialmente con la abundancia de su respectivo miRNA durante la regeneración de plantas de maíz y esta correlación parece depender tanto de la presencia de luz, como del genotipo de los callos embriogénicos. Sugiriendo que la abundancia de los blancos de miRNAs está regulada por mecanismos adicionales.

Una posibilidad es la regulación a nivel transcripcional, probablemente por el efecto de la luz. La luz regula la mayoría de los procesos de desarrollo y el crecimiento de las plantas por medio de fotoreceptores especializados: fitocromos fotoreversibles del rojo/rojo lejano, fotoreceptores UVB, y los que absorben luz en los espectros azul/UVA como las fototropinas y los criptocromos. Entre los mejores caracterizados están los fitocromos que actúan principalmente a nivel transcripcional. Los fitocromos transducen las señales de luz mediante distintas vías de señalización como la activación de la fosforilación de proteínas, activación de proteínas heterotriméricas de unión a GTP y la modulación de mensajeros secundarios como Ca^{2+} y cGMP en el citosol, así como la interacción directa de los fitocromos con factores transcripcionales en el núcleo (Chen & Chory, 2011; Kevei & Nagy, 2003).

Otra posibilidad es que la vía de silenciamiento mediada por miRNAs funcione diferente entre genotipos y en presencia y ausencia de luz. Por ejemplo, *AGO1* es inducido durante etapas tempranas de la embriogénesis somática de zanahoria y posteriormente decrece en la etapa de embrión globular (Takahata, 2008). En el laboratorio se analizó cómo se modifica la maquinaria de RNAs pequeños durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz y hay diferencias importantes entre maíz Tuxpeño y Costeño (Juárez- González, 2015), principalmente durante la inducción. El patrón de expresión de *AGO1C* es bastante distinto entre lotes durante la regeneración de plantas, sin embargo los cambios de *AGO1C* no reflejan necesariamente la abundancia de la proteína AGO1, ya que en maíz existen más genes que codifican a AGO1 cuyos transcritos no fueron analizados. Por ejemplo en semillas de maíz con 24 horas de germinación, miR168 disminuye (Li et al., 2013) y *AGO1C* casi no se expresa (Sekhon et al., 2011) pero aumentan

otros transcritos de AGO1 (Li et al., 2013). Sería interesante evaluar la abundancia de AGO1 y otros blancos de miRNAs, así como otros componentes de la vía de miRNAs a nivel de proteína durante la regeneración.

También es importante señalar que los miRNAs tienen múltiples blancos y no se sabe cuáles están siendo regulados preferencialmente durante la regeneración de plantas y la embriogénesis somática de maíz. Esto podría ser evaluado mediante un análisis global de degradoma (PARE, *parallel analysis of RNA ends*), en el que se obtienen patrones de degradación de mRNAs al acoplarse con secuenciación masiva y permite asociar los patrones de degradación a cortes dirigidos por los miRNAs. Los blancos de un mismo miRNA son regulados de manera diferencial como se observa para *PLC* y *SOD1A*, blancos de miR528, o para *LAC2* y *LAC4*, blancos de miR397. Cabe resaltar que miR528 está enriquecido en fracciones poliribosomales en callos embriogénicos de maíz (Juarez, V., 2014), lo cual sugiere que también puede estar actuando a nivel traduccional.

En conclusión, este trabajo es una aproximación a la función de los miRNAs durante la regeneración de plantas de maíz por medio de la embriogénesis somática. Se encontró el papel diferencial que ejercen la luz y las hormonas sobre la respuesta fenotípica y molecular de los embriones somáticos y también se observó que la respuesta depende del genotipo de maíz. En este estudio han surgido más preguntas que respuestas, que guiarán el consecuente estudio molecular de la embriogénesis somática de maíz.

Gracias al desarrollo del cultivo de tejidos y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos, ha sido posible la transformación y el desarrollo de la industria de la biotecnología del maíz por medio de su transformación. Esta herramienta permitió el desarrollo de maíz transgénico que actualmente acapara alrededor de la mitad del mercado. Además de que sirve para el estudio genético funcional de esta planta en investigación básica y aplicada. Sin embargo, la eficiencia de regeneración de plantas a partir de embriones somáticos de maíz aún representa una limitante para su transformación (Bennetzen & Hake, 2009). Este trabajo, junto con otros desarrollados a la par en el laboratorio, permitirá comprender mejor las bases moleculares de la embriogénesis somática de maíz que eventualmente podrían llevar a su mejoramiento.

Conclusiones

- La edad del cultivo de callos embriogénicos influye en el tiempo de regeneración de plántulas.
- La luz es un estímulo suficiente para regenerar plantas a partir de callos embriogénicos de maíz.
- El comportamiento de los miRNAs y sus blancos durante la regeneración es dependiente del lote con el que se trabaje. Tanto la edad de subcultivo como el genotipo de maíz parecen ser factores importantes.
- Los cambios hormonales afectan la expresión de miRNAs.
- La luz tiene un gran efecto sobre la acumulación de los transcritos analizados.
- miR159 y miR168 son los que menos cambian durante la regeneración de plantas y sus blancos no tienen un patrón específico de expresión durante este proceso.
- miR164 y miR156 tienden a aumentar conforme avanza la regeneración, mientras que sus blancos, *CUC2* y *SPL23*, tienden a disminuir y mantenerse bajos.
- A pesar de que los miRNAs relacionados a estrés (miR397, 398, 408 y 528) siguen el mismo patrón de disminución durante la regeneración entre lotes, sus blancos muestran una expresión lote-específica.
- La mayoría de los mRNAs predichos como blanco de miRNAs tienen una expresión que se correlaciona parcialmente con los cambios en la abundancia de su respectivo miRNA. Esta correlación ocurre principalmente cuando los miRNAs son más abundantes: en luz, para aquellos relacionados a desarrollo, y en oscuridad, para aquellos relacionados a estrés. Sugiriendo que la acumulación de los blancos de miRNAs está regulada a múltiples niveles durante la regeneración de plantas.

Perspectivas

- Para ver si los miRNAs analizados tienen un efecto sobre la expresión de sus blancos a otro nivel, se propone analizar la abundancia de estos últimos por medio de Western-blot.
- Para saber las principales funciones que son reguladas por los miRNAs durante la regeneración de plantas hace falta identificar y validar los transcritos blanco de miRNAs que están siendo regulados durante la embriogénesis somática y regeneración de plantas de maíz de manera global mediante degradoma.
- Para entender cómo los niveles de miRNAs son modulados por las fitohormonas se podría analizar si su maquinaria de biogénesis es modulada durante la regeneración de plantas por medio de secuenciación masiva y Western-blot.

Referencias

- Abdel-Ghany, S. E., & Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(23), 15932–45.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., & Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, *9*, 841–857.
- Alejandri-Ramírez, D. N. (2015). Regulación de la expresión genética mediada por RNAs pequeños en callos embriogénicos de maíz. (Tesis doctoral inédita). Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., & Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, *121*(2), 207–21.
- Alonso-Peral, M. M., Li, J., Li, Y., Allen, R. S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., White, R. G., Millar, A. A. (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *154*(2), 757–71.
- Alonso-Peral, M. M., Sun, C., & Millar, A. A. (2012). MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in Arabidopsis. *PloS One*, *7*(4), e34751.
- Armstrong, C., & Green, C. (1985). Establishment and maintenance of fiable, embryogenic maize callus and the involment of L-proline. *Planta*, *164*, 207–14.
- Armstrong, C., & Green, C. (1991). Development and availability of germoplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet Coop Newsl*, *65*, 92–93.
- Aung, K., Lin, S.-I., Wu, C.-C., Huang, Y.-T., Su, C.-L., & Chiou, T.-J. (2006). *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiology*, *141*(3), 1000–11.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, *12*(4), 221.
- Bao, N., Lye, K.-W., & Barton, M. K. (2004). MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Developmental Cell*, *7*(5), 653–62.
- Baumberger, N., & Baulcombe, D. (2005). ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *102*, 11928–33.
- Beauclair, L., Yu, A., & Bouché, N. (2010). microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *62*(3), 454–62.

- Bennetzen, J. L., & Hake, S. (Eds.). (2009). *Handbook of Maize*. New York, NY: Springer New York.
- Brodersen, P., Skvarelidze-Archard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., & Yamamoto, Y. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, *320*, 1279–91.
- Chávez-Hernández, E. C., Alejandri-Ramírez, N. D., Juárez-González, V. T., & Dinkova, T. D. (2015). Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 555.
- Che, P., Love, T. M., Frame, B. R., Wang, K., Carriquiry, A. L., & Howell, S. H. (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Molecular Biology*, *62*, 1–14.
- Chen, C.-J., Liu, Q., Zhang, Y.-C., Qu, L.-H., Chen, Y.-Q., & Gautheret, D. (2011). Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biology*, *8*(3), 538–47.
- Chen, M., & Chory, J. (2011). Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*, *21*(11), 664–71.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *25*, 21–44.
- Chuck, G., Cigan, A. M., Saeteurn, K., & Hake, S. (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, *39*(4), 544–9.
- Deveaux, Y., Alonso, B., Pierrugues, O., Godon, C., & Kazmaier, M. (2000). Molecular cloning and developmental expression of *AtGR1*, a new growth-related Arabidopsis gene strongly induced by ionizing radiation. *Radiation Research*, *154*(4), 355–64.
- Dinkova, T., & Alejandri-Ramirez, D. (2014). microRNA expression and regulation during plant Somatic Embryogenesis. In R. Alvarez-Venegas, C. De la Peña, & J. Casas-Mollano (Eds.), *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: fundamentals and applications*. (pp. 111–123). Springer. Switzerland.
- Du, H., Feng, B.-R., Yang, S.-S., Huang, Y.-B., & Tang, Y.-X. (2012). The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize. *PLoS One*, *7*(6), e37463.
- Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *49*, 631-42.
- Fan, K., Wang, M., Miao, Y., Ni, M., Bibi, N., Yuan, S., Li, F., Wang, X. (2014). Molecular evolution and expansion analysis of the NAC transcription factor in *Zea mays*. *PLoS One*, *9*(11), e111837.

- Feng, H., Zhang, Q., Wang, Q., Wang, X., Liu, J., Li, M., Huand, L., Kang, Z. (2013). Target of tae-miR408, a chemocyanin-like protein gene (TaCLP1), plays positive roles in wheat response to high-salinity, heavy cupric stress and stripe rust. *Plant Molecular Biology*, 83(4-5), 433–43.
- Forestan, C., Meda, S., & Varotto, S. (2010). ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development. *Plant Physiology*, 152(3), 1373–90.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 39(8), 1033–7.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R., Hohmann, S., Cardon, G., Saedler, H., & Huijser, P. (2007). The miRNA 156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SPB box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J*, 49, 683–93.
- Garrocho-Villegas, V., de Jesús-Olivera, M. T., & Quintanar, E. S. (2012). Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 877, 173–82.
- Gatica-Arias, A., Arrieta-Espinoza, G., & Espinoza, A. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11
- Goldberg, R. B., de Paiva, G., & Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266(5185), 605–14.
- Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development*, 134(19), 3539–48.
- Green, C., & Phillips, R. (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science*, 15, 417–21.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., & Zhu, J. (2013). Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 74(5), 840–51.
- Guo, H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F., & Chua, N.-H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell*, 17(5), 1376–86.
- He, G., Chen, B., Wang, X., Li, X., Li, J., He, H., Yang, M., Lu, L., Qi, Y., Wang, X., Deng, X. W. (2013). Conservation and divergence of transcriptomic and epigenomic variation in maize hybrids. *Genome Biology*, 14(6), R57.

- INIFAP. (2010). Reporte Anual 2009 Ciencia y Tecnología para el Campo Mexicano (1st ed.). México DF.
- Jakubeková, M., Pet'ová, A., & Obert, B. (2011). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(4), 478–87.
- Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14(6), 787–99.
- Jovanović, Ž., Stanisavljević, N., Mikić, A., Radović, S., & Maksimović, V. (2014). Water deficit down-regulates miR398 and miR408 in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 83, 26–31.
- Juárez-González, V.T. (2014) Regulación traduccional de mRNAs blanco de mirnas durante la embriogénesis somática de maíz. (Tesis para obtener el grado de Química Farmaco Bióloga). Facultad de Química. UNAM. México.
- Juárez-González, V.T. (2015) Análisis de la expresión de enzimas de la vía de biogénesis de RNAs pequeños (sRNAs) durante la embriogénesis somática de maíz. (Tesis de maestría inédita). Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM. México.
- Kevei, E., & Nagy, F. (2003). Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 117(3), 305–13.
- Khraiwesh, B., Arif, M. A., Seumel, G. I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., & Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 140(1), 111–22.
- Kim, S., Yang, J.-Y., Xu, J., Jang, I.-C., Prigge, M. J., & Chua, N.-H. (2008). Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs. *Plant & Cell Physiology*, 49(11), 1634–44.
- Li, C., Ng, C. K.-Y., & Fan, L.-M. (2014). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*. 114, 80-91.
- Li, D., Wang, L., Liu, X., Cui, D., Chen, T., Zhang, H., Jiang, C., Xu, C., Li, P., Li, S., Zhao, L., Chen, H. (2013a). Deep sequencing of maize small RNAs reveals a diverse set of microRNA in dry and imbibed seeds. *PLoS One*, 8(1), e55107.
- Li, J., Guo, G., Guo, W., Guo, G., Tong, D., Ni, Z., Sun, Q., Yao, Y. (2012a). miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*, 12, 220.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., Zhang, F., Raikhel, N., Jiang, L., Chen, X. (2013b). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell*, 153(3), 562–74.

- Li, T., Chen, J., Qiu, S., Zhang, Y., Wang, P., Yang, L., Lue, Y., Shi, J. (2012b). Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. *PLoS One*, 7(8), e43451.
- Li, T., Li, H., Zhang, Y.-X., & Liu, J.-Y. (2011). Identification and analysis of seven H₂O₂-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Nucleic Acids Research*, 39(7), 2821–33.
- Liang, G., & Yu, D. (2010). Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2;1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 5(10), 1257–9.
- Lin, Y., & Lai, Z. (2013). Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS One*, 8(4), e60337.
- Ling, L.-Z., & Zhang, S.-D. (2012). Exploring the evolutionary differences of SBP-box genes targeted by miR156 and miR529 in plants. *Genetica*, 140(7-9), 317–324.
- Liu, H., Qin, C., Chen, Z., Zuo, T., Yang, X., Zhou, H., Xu, M., Cao, S., Shen, Y., Lin H., He, X., Zhang, Y., Li, L., Ding, H., Lübberstedt, T., Zhang, Z., Pan, G. (2014a). Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*, 15(1), 25.
- Liu, W., Yu, W., Hou, L., Wang, X., Zheng, F., Wang, W., Liang, D., Yang, H., Xie, X. (2014b). Analysis of miRNAs and Their Targets during Adventitious Shoot Organogenesis of *Acacia crassicarpa*. *PLoS One*, 9(4), e93438.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, 25(4), 402–8.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K., & Carrington, J. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 297, 2053–6.
- Lu, X., Guan, Q., & Zhu, J. (2013). Downregulation of CSD2 by a heat-inducible miR398 is required for thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(8).
- Luo, Y.-C., Zhou, H., Li, Y., Chen, J.-Y., Yang, J.-H., Chen, Y.-Q., & Qu, L.-H. (2006). Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryogenic development. *FEBS Letters*, 580(21), 5111–6.
- Macovei, A., Gill, S. S., & Tuteja, N. (2012). microRNAs as promising tools for improving stress tolerance in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1296–1301.
- Mallory, A. C., Dugas, D. V, Bartel, D. P., & Bartel, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology : CB*, 14(12), 1035–46.

- Mallory, A. C., & Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics*, *38 Suppl*, S31–6.
- Mica, E., Gianfranceschi, L., & Pè, M. E. (2006). Characterization of five microRNA families in maize. *Journal of Experimental Botany*, *57*(11), 2601–12.
- Miguel, C., & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, *62*(11), 3713–25.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, *15*, 473–97.
- Mutum, R. D., Balyan, S. C., Kansal, S., Agarwal, P., Kumar, S., Kumar, M., & Raghuvanshi, S. (2013). Evolution of variety-specific regulatory schema for expression of osa-miR408 in indica rice varieties under drought stress. *The FEBS Journal*, *280*(7), 1717–30.
- Naya, L., Paul, S., Valdés-López, O., Mendoza-Soto, A. B., Nova-Franco, B., Sosa-Valencia, G., Reyes, J. L. Hernández, G. (2014). Regulation of Copper Homeostasis and Biotic Interactions by MicroRNA 398b in Common Bean. *PLoS One*, *9*(1), e84416.
- Neelakandan, A. K., & Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*, *31*(4), 597–620.
- Nodine, M. D., & Bartel, D. P. (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Development*, *24*(23), 2678–92.
- Obert, B., Petrova, A., & Samaj, J. (2009). Somatic and gametic embryogenesis in maize. *Cell Biol Appl*, *23*, 468–80.
- Preston, J. C., & Hileman, L. C. (2013). Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 80.
- Qian, Y., Cheng, Y., Cheng, X., Jiang, H., Zhu, S., & Cheng, B. (2011). Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Reports*, *30*(7), 1347–63.
- Qiao, M., & Xiang, F. (2013). A set of Arabidopsis thaliana miRNAs involve shoot regeneration in vitro. *Plant Signaling & Behavior*, *8*(3) :e23479.
- Qin, Z., Li, C., Mao, L., & Wu, L. (2014). Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 586.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., & Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development*, *20*(24), 3407–25.

- Ramachandran, V., & Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, 321(5895), 1490–2.
- Raman, S., Greb, T., Peaucelle, A., Blein, T., Laufs, P., & Theres, K. (2008). Interplay of miR164, CUP-SHAPED COTYLEDON genes and LATERAL SUPPRESSOR controls axillary meristem formation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 55(1), 65–76.
- Ravet, K., & Pilon, M. (2013). Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9), 919–32.
- Reyes, J. L., & Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 49(4), 592–606.
- Rhoades, M., Reinhart, B., Lim, L., Burge, C., Bartel, B., & Bartel, D. (2002). Prediction of plant miRNA targets. *Cell*, 110, 513–520.
- Salvo, S. A. G. D., Hirsch, C. N., Buell, C. R., Kaeppler, S. M., & Kaeppler, H. F. (2014). Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. *PLoS One*, 9(10), e111407.
- Sekhon, R. S., Lin, H., Childs, K. L., Hansey, C. N., Buell, C. R., de Leon, N., & Kaeppler, S. M. (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 66(4), 553–63.
- Sharma, S., Sandhu, M. K., Kaur, P., Kaur, A., & Gosal, S. S. (2012). Factors affecting somatic embryogenesis in maize. *Journal of Cell and Tissue Research*, 12(1), 3103–8.
- Shen, Y., Jiang, Z., Lu, S., Lin, H., Gao, S., Peng, H., Pan, G. (2013). Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(2), 425–30.
- Shen, Y., Jiang, Z., Yao, X., Zhang, Z., Lin, H., Zhao, M., Liu, H., Peng, H., Li, S., Pan, G. (2012). Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation. *PLoS One*, 7(3), e32237.
- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Sym. Soc. Exp. Biol.*, 11, 118–30.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., & Koes, R. (1996). The No Apical Meristem Gene of Petunia Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and Is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries. *Cell*, 85(2), 159–70.
- Spencer, M. W. B., Casson, S. A., & Lindsey, K. (2007). Transcriptional profiling of the Arabidopsis embryo. *Plant Physiology*, 143(2), 924–40.
- Sun, G. (2012). MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol Biol*, 80, 17–36.

- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J.-K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*, *12*(7), 301–9.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J.-K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, *18*(8), 2051–65.
- Takahata, K. (2008). Isolation of carrot Argonaute1 from subtractive somatic embryogenesis cDNA library. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *72*(3), 900–4.
- Thiebaut, F., Rojas, C. A., Grativol, C., Motta, M. R., Vieira, T., Regulski, M., Martienssen, R.A., Farinelli, L., Hemerly, A. S., Ferreira, P. C. G. (2014). Genome-wide identification of microRNA and siRNA responsive to endophytic beneficial diazotrophic bacteria in maize. *BMC Genomics*, *15*, 766.
- Vaucheret, H., Mallory, A. C., & Bartel, D. P. (2006). AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular Cell*, *22*(1), 129–36.
- Wang, J.-W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., & Weigel, D. (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, *20*(5), 1231–43.
- Woodger, F. J., Millar, A., Murray, F., Jacobsen, J. V., & Gubler, F. (2003). The Role of GAMYB Transcription Factors in GA-Regulated Gene Expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, *22*(2), 176–84.
- Wu, G., & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development*, *133*(18), 3539–47.
- Wu, L., Zhang, Q., Zhou, H., Ni, F., Wu, X., & Qi, Y. (2009). Rice MicroRNA effector complexes and targets. *The Plant Cell*, *21*(11), 3421–35.
- Wu, X.-M., Kou, S.-J., Liu, Y.-L., Fang, Y.-N., Xu, Q., & Guo, W.-W. (2015). Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA- and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. *Plant Biotechnology Journal*. *13*(3), 383-94
- Wu, X.-M., Liu, M.-Y., Ge, X.-X., Xu, Q., & Guo, W.-W. (2011). Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta*, *233*(3), 495–505.
- Xie, K., Wu, C., & Xiong, L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology*, *142*(1), 280–93.

- Xu, L., & Huang, H. (2014). Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*, 108, 1–33.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., & Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16369–78.
- Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K., & Zhang, X. (2013). Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1521–36.
- Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1), 36–57.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., & Poethig, R. S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, 19(18), 2164–75.
- Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., Walker, J.C., Chen, X. (2008). The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10073–8.
- Zhang, J., Zhang, S., Han, S., Wu, T., Li, X., Li, W., & Qi, L. (2012). Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta*, 236(2), 647–57.
- Zhang, L., Chia, J.-M., Kumari, S., Stein, J. C., Liu, Z., Narechania, A., Christopher, A. M., Katherine, G., Michael, D. M., Ware, D. (2009). A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genetics*, 5(11), e1000716.
- Zhang, S., Zhou, J., Han, S., Yang, W., Li, W., Wei, H., Li, X., Qi, L. (2010). Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), 355–60.
- Zhao, M., Tai, H., Sun, S., Zhang, F., Xu, Y., & Li, W.-X. (2012). Cloning and characterization of maize miRNAs involved in responses to nitrogen deficiency. *PLoS One*, 7(1), e29669.
- Zhao, Y., Xu, Z., Mo, Q., Zou, C., Li, W., Xu, Y., & Xie, C. (2013). Combined small RNA and degradome sequencing reveals novel miRNAs and their targets in response to low nitrate availability in maize. *Annals of Botany*, 112(3), 633–42.

Anexo 1.

Genes que participan en la embriogénesis somática de maíz

Tabla A1. Genes identificados en varias etapas de la embriogénesis somática (ES) de maíz

Etapa de la ES	Gen	Descripción	Proceso	Referencias
Inducción	<i>GST</i>	Glutación-S-transferasa	Respuesta a estrés oxidativo	(Salvo et al., 2014)
	<i>GLP</i>	Proteína tipo Germin	Respuesta a estrés oxidativo	
	<i>Cyt P540</i>	Citocromo p450	Respuesta a estrés oxidativo	
	<i>CHT A1</i>	Quitinasa A1	Respuesta a estrés biótico	
Formación del embrión	<i>BBM</i>	Factor transcripcional <i>Baby Boom</i>	Proliferación celular, embriogénesis cigótica	(Elhiti et al., 2013; Salvo et al., 2014)
	<i>PIN</i>	Pinformed	Transporte de auxinas, embriogénesis cigótica	
	<i>SERK</i>	Receptor tipo cinasa de embriogénesis somática	Transducción de señales en la embriogénesis somática, embriogénesis cigótica temprana	
	<i>LEC1-2</i>	Factor transcripcional <i>Leafy Cotyledon</i>	Desarrollo embrionario cigótico tardío	
	<i>WUS</i>	Factor transcripcional <i>Wuschel</i>	Formación de meristemas, embriogénesis cigótica	
Mantenimiento	<i>CLV</i>	Receptor tipo cinasa <i>Clavata</i>	Formación de mesitemos	
	<i>AGL15</i>	Factor transcripcional <i>Agamous 15</i>	Formación de mesitemos	
Maduración	<i>PEPCK</i>	Fosfoenol piruvato carboxilasa	Metabolismo, fotosíntesis	(Che et al., 2006)
	<i>BGD</i>	Beta glucosidasa	Remodelación de la pared celular	
	<i>Z1C</i>	Proteína de almacenamiento Zeina alfa	Desarrollo de la semilla	
	<i>ATS1</i>	Proteína específica del embrión, caleosin	Embriogénesis cigótica	
Regeneración	<i>PCNA</i>	Antígeno de proliferación nuclear, Ciclina	Ciclo celular	
	<i>HSP</i>	Proteína de choque térmico	Estrés abiótico	
	<i>BG841274</i>	Proteína de unión a clorofila <i>a/b 1</i>	Fotosíntesis	
	<i>SSU1</i>	Subunidad menor de RuBisCO	Fotosíntesis	
	<i>LEA</i>	Proteína abundante de embriogénesis tardía	Embriogénesis cigótica tardía, estrés osmótico	
	<i>GLP</i>	Proteína tipo germin	Respuesta a estrés oxidativo	

Medios de cultivo

Medio de iniciación N6I

Sales N6 (Chu et al, 1975) y vitaminas del cocktail 20 (Loza-Rubio et al, 2008), 2 mg/L de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, caseína hidrolizada 200 mg/L, sacarosa 30 g/L y GelzanTM (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L; se ajustó pH a 5,7 y antes de agregar el GelzanTM se vació el medio en un recipiente y cubrió con aluminio, se esterilizó a 120°C por 18 min. Después de esterilizar se dejó enfriar para posteriormente vaciar en cajas Petri (100 x 15 mm) en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. El medio se dejó solidificar y se guardó a 4°C hasta su uso.

Medio de proliferación N6P

Sales N6 (Chu et al, 1975) y vitaminas del cocktail 20 (Loza-Rubio et al, 2008), 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (6-Furfurilaminopurina) 0.1 mg/ml, adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, caseína hidrolizada 200 mg/L, sacarosa 30 g/L y GelzanTM (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L. Se ajustó el pH a 5.7 antes de agregar el GelzanTM; se calentó suavemente para disolver el GelzanTM y se vació 30 ml del medio en frascos de vidrio tipo Gerber 2ª etapa, se cubrió cada vaso con una tapa de polipropileno y esterilizó a 120°C por 18 min. El medio se dejó solidificar y se guardó a 4°C hasta su uso.

Medio MS para crecimiento de plántulas

Sales y vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 g/L de sacarosa, 3.3 g/L GelzanTM (Sigma-Aldrich). Se ajustó el pH a 5.7 antes de agregar el GelzanTM; se calentó suavemente para disolver el GelzanTM y se vació 30 ml del medio en frascos de vidrio tipo Gerber 3ª etapa, se cubrió cada vaso con una tapa de polipropileno y esterilizó a 120°C por 18 min. El medio se dejó solidificar y se guardó a 4°C hasta su uso.

Regeneración en fotoperiodo sin cambios hormonales

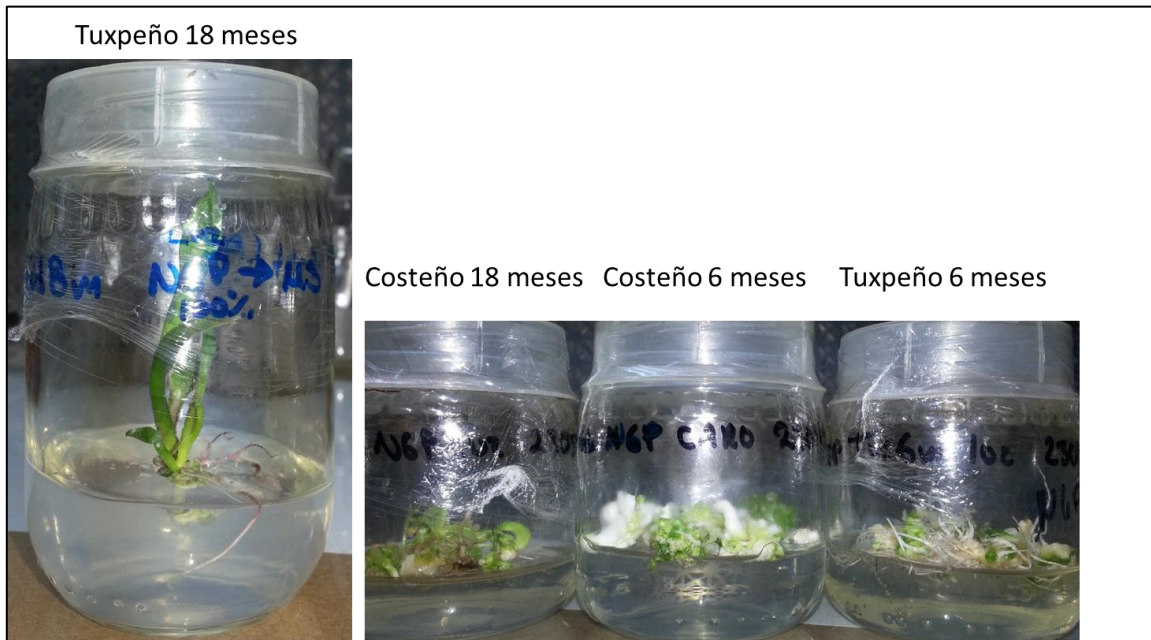


Figura A1. El estímulo de la luz es suficiente para la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos de maíz. Callos embriogénicos de maíz Costeño y Tuxpeño de 6 y 18 meses fueron expuestos a la luz (fotoperiodo 16 h luz: 8 h oscuridad) y subcultivados en medio N6P sin cambiar la concentración de 2,4-D ni cinetina. Después de 6 semanas de inicio de la regeneración se obtuvo la primera plántula para Tuxpeño de 18 meses y se transfirió a medio MS.

Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis

Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis

Elva C. Chávez-Hernández, Naholí D. Alejandri-Ramírez, Vasti T. Juárez-González and Tzvetanka D. Dinkova*

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

OPEN ACCESS

Edited by:

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

Reviewed by:

Abu Hena Mostafa Kamal,
National Agriculture and Food
Research Organization, Japan
Soumitra Paul,
Krishnagar Government College, India

*Correspondence:

Tzvetanka D. Dinkova,
Departamento de Bioquímica,
Facultad de Química, Conjunto E,
Universidad Nacional Autónoma de
México, 04510 Mexico City, Mexico
cesy@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Biotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 27 April 2015

Accepted: 07 July 2015

Published: 22 July 2015

Citation:

Chávez-Hernández EC,
Alejandri-Ramírez ND,
Juárez-González VT and Dinkova TD
(2015) Maize miRNA and target
regulation in response to hormone
depletion and light exposure during
somatic embryogenesis.
Front. Plant Sci. 6:555.
doi: 10.3389/fpls.2015.00555

Maize somatic embryogenesis (SE) is induced from the immature zygotic embryo in darkness and under the appropriate hormones' levels. Small RNA expression is reprogrammed and certain miRNAs become particularly enriched during induction while others, characteristic to the zygotic embryo, decrease. To explore the impact of different environmental cues on miRNA regulation in maize SE, we tested specific miRNA abundance and their target gene expression in response to photoperiod and hormone depletion for two different maize cultivars (VS-535 and H-565). The expression levels of miR156, miR159, miR164, miR168, miR397, miR398, miR408, miR528, and some predicted targets (*SBP23*, *GA-MYB*, *CUC2*, *AGO1c*, *LAC2*, *SOD9*, *GR1*, *SOD1A*, *PLC*) were examined upon staged hormone depletion in the presence of light photoperiod or darkness. Almost all examined miRNA, except miR159, increased upon hormone depletion, regardless photoperiod absence/presence. miR528, miR408, and miR398 changed the most. On the other hand, expression of miRNA target genes was strongly regulated by the photoperiod exposure. Stress-related miRNA targets showed greater differences between cultivars than development-related targets. miRNA/target inverse relationship was more frequently observed in darkness than light. Interestingly, miR528, but not miR159, miR168 or miR398, was located on polyribosome fractions suggesting a role for this miRNA at the level of translation. Overall our results demonstrate that hormone depletion exerts a great influence on specific miRNA expression during plant regeneration independently of light. However, their targets are additionally influenced by the presence of photoperiod. The reproducibility or differences observed for particular miRNA-target regulation between two different highly embryogenic genotypes provide clues for conserved miRNA roles within the SE process.

Keywords: hormone depletion, maize, miRNA, photoperiod response, polyribosomes, somatic embryogenesis

Introduction

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most important widely cultivated cereal crops, used as valuable source for human food, livestock feed, and raw material for the industry (Huang et al., 2002). Besides its agricultural and economic relevance, it has been a major model system in plant genetics and improvement. Common methods for maize transformation involve a process known as somatic

embryogenesis (SE). SE begins with callus induction, a process characterized by re-organization and re-structuring of somatic cells in the presence of the synthetic auxin 2,4-D (Zimmerman, 1993). The second step of SE is plant regeneration. Plants can be regenerated when somatic embryos are depleted of external hormones and are exposed to photoperiod (Garrocho-Villegas et al., 2012). SE has been advantageously used in many plant species for clonal propagation, plant transformation and genetic improvement (Stasolla and Yeung, 2003).

Plant regeneration through maize SE was first reported by Green and Phillips (1975) using immature embryos as the initial explant. Various conditions for callus induction and plant regeneration have been tested since then, encountering the embryogenic potential highly dependent on explant and maize genotype used (Obert et al., 2009; Shen et al., 2012). The immature embryo's developmental stage and size, usually from 12 to 18 days upon pollination, appear as particularly relevant to generate embryogenic callus type II associated with high plant regeneration frequency over long subculture periods (Armstrong and Green, 1985). A few inbred lines have been reported with good embryogenic potential (Armstrong and Green, 1991; Jakubeková et al., 2012; Shen et al., 2012). Creole varieties VS-535 and H-565 (Costeño mejorado), derived from the germplasm of Mexican landrace Tuxpeño, are highly embryogenic and their plant regeneration frequency could be maintained for over 2 years of subculture (Garrocho-Villegas et al., 2012). However, while VS-535 has been successfully used for more than 15 years in tissue culture, H-565, released in 2008, has shown variable behavior in callus proliferation and plant regeneration responses through SE.

The mechanisms underlying gene activation/repression in the SE process have been poorly characterized (Salvo et al., 2014). Recently, a growing number of reports evidenced essential regulatory roles for microRNAs (miRNAs) in plant developmental and differentiation processes, including zygotic embryogenesis (Nordine and Bartel, 2010; Willmann et al., 2011), hormone signaling (Guo et al., 2005; Reyes and Chua, 2007) and stress response (Sunkar and Zhu, 2004). MicroRNAs are small 21–22 nt RNAs derived from longer precursors by Dicer-like (DCL) endonuclease activity and recruited to protein complexes by Argonaute (AGO) to target specific mRNA repression, either through degradation or translation inhibition (Llave et al., 2002; Li et al., 2013b).

In the past few years, several publications reported the miRNA presence/regulation during plant SE (Luo et al., 2006; Zhang et al., 2010, 2012; Chen et al., 2011; Wu et al., 2011, 2015; Li et al., 2012; Shen et al., 2012, 2013; Lin and Lai, 2013; Qiao and Xiang, 2013; Yang et al., 2013). Most of these reports used a high-throughput sequencing technology to compare the presence of conserved and species-specific miRNAs in the embryogenic callus (EC) before and during different stages of SE. Overall, an up-regulation of specific miRNAs was observed at particular stages of the somatic embryo differentiation. For most of the analyzed plant species, the proliferative embryogenic callus is characterized by low expression of many miRNAs related to flowering and leaf development, while stress-related miRNAs are increased in comparison to the original explant. Although

miRNA expression patterns are altered upon callus induction, between embryogenic and non-embryogenic callus, as well as during SE and differentiation, the enriched or decreased miRNA species are particular for each of the plant species analyzed. Therefore, it is important to approach the miRNA regulation in the context of each plant SE system, taking into account the specific conditions and genotypes used in dedifferentiation as well as in plant regeneration induction.

Shen et al. (2013) analyzed by deep sequencing miRNA expression patterns upon callus induction from the maize inbred line 18-599R. They identified miR528, miR156, miR166, miR168, miR390, miR164, miR167, miR398, miR397, miR408, and miR319 as the most abundant during dedifferentiation. These miRNAs increased as the embryos were dedifferentiated into calli, with the exception of miR166 and miR167 that decreased. A degradome analysis indicated that most of their targets are involved in hormone signaling transduction pathways. In a previous study performed on VS-535-derived EC, we found that development-related miRNAs such as miR156, miR159, miR164 and miR168 decreased as the length of subculture increased, while stress-related miRNAs such as miR397, miR398, miR408, and miR528 remained highly expressed (Dinkova and Alejandri-Ramirez, 2014). However, the regulation on miRNA expression and their target mRNAs has not been explored in maize plant regeneration through SE. In this study, we addressed the impact of light exposure and hormone depletion as plant regeneration cues on maize miRNA levels and target gene expression. Taking into account the relevance of maize genotype on plant regeneration success through SE, we investigated how general the observed changes were by comparing two closely related cultivars, VS-535, and H-565.

Materials and Methods

Callus Induction and Subculture

To induce embryogenic callus type II, immature embryos were collected at 15–18 days after pollination from two closely related maize cultivars, VS-535 and H-565. These cultivars have been derived from the Tuxpeño landrace germplasm (Márquez-Sánchez, 2008). Tuxpeño (VS-535) was previously shown to display high embryogenic potential during *in vitro* culture (Garrocho-Villegas et al., 2012), while Costeño mejorado (H-565) was introduced more recently (Márquez-Sánchez, 2008) and its behavior in tissue culture has been variable (unpublished data). The ears from the middle part of the husk (similar developmental conditions) were gently washed, first with 70% ethanol (1 min); then with 50% bleach solution (15 min); and three times with sterile deionized water. Next, the immature embryos were dissected and placed on a Petri dish with sterile deionized water and 1 g L^{-1} Cefotaxime. Thirty embryos (embryo axis side down) were placed per Petri dish on N6I medium (Supplementary Material, Data sheet 1) and maintained for 3 weeks under darkness at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Upon this time, pre-embryogenic masses were selected for subculture on proliferation medium N6P (Supplementary Material, Data sheet 1). Every 3 weeks the embryogenic callus was subcultured on fresh N6P medium.

Plant Regeneration

To test the effects of hormone depletion and light on miRNA-mediated regulation during plant regeneration, the embryogenic callus was subjected to stage hormone depletion under darkness or light photoperiod (16 h light/8 h dark). During the first stage, the 2,4-D and kinetin concentrations were half-reduced and during the second stage (2 weeks after the first regeneration subculture) hormones were omitted from N6P. Samples were collected 1 week upon each subculture and stored at -70°C until used. Three biological samples were collected from each stage for RNA extraction. Regenerating callus was maintained on N6P devoid of hormones with every 2 weeks-subcultures until plantlets appeared under photoperiod. Plantlets were subcultured on MS medium (Murashige and Skoog, 1962; Supplementary Material, Data sheet 1).

Total and Polysomal RNA Isolation

Total RNA was isolated from triplicates with Trizol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. For polyribosome fractionation 5 g of embryogenic callus were pulverized in liquid nitrogen with mortar and pestle. The powder was suspended in 25 mL of lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl_2 , 2 mM ethylene glycol tetraacetic acid and 0.05 mg mL^{-1} cycloheximide) and clarified by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min. The supernatant was layered onto 4 mL sucrose cushion buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 25 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 60% sucrose and 0.05 mg mL^{-1} cycloheximide) and centrifuged at 45,000 rpm in a 75Ti rotor (Beckman Coulter, Mexico City, Mexico) for 3 h to concentrate ribosomes. The ribosomal pellet was suspended in 0.5 mL of DEPC water, layered onto 15–60% continuous sucrose gradient and centrifuged in SW-40 rotor (Beckman) at 36,000 rpm for 2.0 h. Fractionation and absorptivity at 260 nm of the gradient was performed in an Auto Densi-flow system (Labconco, Kansas City, MO, USA) connected to Econo UV Monitor EM-1 (BioRad). RNA was isolated from each fraction as described previously (Martinez-Silva et al., 2012). The RNA quality was tested by agarose gel electrophoresis and the concentration was measured with Nanodrop.

Northern Blot

Ten micrograms of total RNA were separated by electrophoresis on 15% polyacrylamide gels including 7 M urea, transferred to Hybond-N+ membranes (GE Healthcare Life Sciences, USA) and hybridized in ULTRAhyb[®]-Oligo hybridization buffer (Ambion, USA) with oligonucleotide probes for each miRNA (Supplementary Material, Table S1) end-labeled with [γ - ^{32}P]ATP (PerkinElmer, USA) by T4 polynucleotide kinase (NEB, USA).

miRNA Target Prediction

Targets of zma-miRNAs were predicted by psRNATarget program (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) with default parameters (Dai and Zhao, 2011), except for the Maximum expectation parameter which was set at five to get a higher prediction coverage. The selected genomic library for the target search was: "Zea mays (maize), transcript, NSF-funded Maize

Genome Sequencing Project, Release 5a, filtered set." Target gene descriptions were retrieved from biomart (Kasprzyk, 2011). Some of the predicted miRNA targets (Supplementary Material, Table S2) were chosen to evaluate their expression levels during plant regeneration (Table 1) according to the following criteria: (1) appropriate miRNA:target pairing in the seed region; (2) annotation of the target as protein coding transcript; and (3) experimental evidence as miRNA target in maize and/or in other plant species.

qRT-PCR

Total RNA was extracted from two independent biological samples, treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) and reverse-transcribed using the ImProm-II[™] reverse transcription system (Promega, USA). Each RNA sample was reverse-transcribed in two replicate reactions. Quantitative PCR (qPCR) was performed on the two biological samples for each genotype with three technical replicates per cDNA, using the Express GreenER qPCR reagents (GE Healthcare Life Sciences, USA) in a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Specific primers for qPCR were designed using Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) and are available in Supplementary Material, Table S3. Relative abundance was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Target levels were normalized by rRNA 18S as internal housekeeping control and then compared to the levels found for the initial tissue (100% hormones, darkness). qRT-PCR fold-change data were summarized as Mean + Standard Error. The results obtained for each condition were compared performing a two-way (light \times hormone)-ANalysis Of VAriance (ANOVA). The significance of mean difference within and between the groups was retrieved using Tukey Honestly Significance Difference (HSD) at $P < 0.05$.

Results

Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis

Staged hormones depletion combined with light photoperiod promotes plant regeneration through SE in maize (Jakubeková et al., 2012; Garrocho-Villegas et al., 2012). Both signals exert important effects at molecular, biochemical, and physiological levels leading to a developmental switch from highly proliferating dedifferentiated tissues to fully differentiated plantlets. In agreement with this, clear morphological changes were observed upon hormone depletion in both, light photoperiod and darkness (Figure 1). Particularly, globular compact structures appeared at 50% hormone (2,4-D and kinetin) reduction in light and 0% hormones in darkness (Figure 1E and Figure 1C, respectively). The light presence rapidly (< 24 h) induced pigment deposition in the callus. For both conditions, the globular structures became elongated, but while under light they eventually resulted in plantlets, in darkness only organogenesis was appreciated (Figure 1G vs. Figure 1D). Fully developed plantlets were derived from 2 years-subcultured EC at 6–7 weeks upon hormones depletion for both, VS-535 and H-565. However, qualitative differences during plant regeneration were evident

TABLE 1 | Analysis of miRNA targets.

miRNA	Target	Description	Hybrid	E	UPE
miR156a-5p	GRMZM2G126018_T01	Squamosa promoter binding like transcription factor family; protein isoform 1 (SBP23)	miRNA CACGAGUGAGAGAAGACAGU ::::: :::::::::::::: Target GUGCUCUCUCUCUCUGUCA	1	18.45
miR159a-3p	GRMZM2G139688_T01	Zea mays GAMYB transcription factor	miRNA GUCUCGAGGGAAGUAGGUUU .. :::::::::::::: Target UGGAGCUCUCCUACUCCAAG	2.5	17.164
miR164a-5p	GRMZM2G393433_T01	CUC2; Putative NAC domain transcription factor superfamily	miRNA CGUGCACGGGACGAAGAGU :: :::::::::::::: Target GCUUGGUCUUCUCCCA	1	17.069
miR168a-5p	GRMZM2G039455_T01	Argonaute-like protein	miRNA AGGGCUAGACGUGGUUCGU ::::: :::::::::::::: Target UCCGAGCUGCACCAAGCC	3.5	19.106
miR397a-5p	GRMZM2G146152_T01	LAC2; Multicopper oxidase, Laccase, Cupredoxin	miRNA GUAGUUGGACGCGAGUACU .: :::::::::::::: Target CGUCAACGGGGCUCACGA	3	23.155
miR398a-3p	GRMZM2G058522_T01	SOD-4A; Superoxide dismutase; [Cu-Zn] 4AP (SOD9)	miRNA GCCCGCGGACUCUUGUGU .: :::::::::::::: Target CGGGGUCGCCUGAGUACACA	3.5	17.156
miR408a	GRMZM2G384327_T03	Zea mays gamma response I protein	miRNA CGGUCCUUCUCCGUCACGC :: :::::::::::::: Target GCGAGAGAAGAGCCGUGCAG	3.5	21.422
miR528a-5p	GRMZM2G106928_T01	SOD-1A; Superoxide dismutase [Cu-Zn]	miRNA GAGGAGACGUACGGGAAGU .: :::::::::::::: Target UCCUCCGACGCCUUUCCA	2.5	11.294
miR528a-5p	GRMZM2G107562_T01	Plastocyanin-like Blue (type 1) copper ion binding protein	miRNA GAGGAGACGUACGGGAAGU .: :::::::::::::: Target CUCCUCUC-UGCCUUUCCG	2.5	18.145

miRNA targets were predicted with psRNAtarget (<http://plantgm.noble.org/psRNAtarget>). The Expectation (E) value refers to the score of complementarity between each miRNA and target transcript. The UnPair Energy (UPE) value refers to the energy required for secondary structure melting around the target site. A lower UPE implies higher possibility for establishing a contact between miRNA and target mRNA, as well as for AGO-mediated cleavage.

between these genotypes. For instance, the greenish color was more intense for VS-535 callus and a greater proportion of plantlets were obtained per gram of tissue for this variety (data not shown).

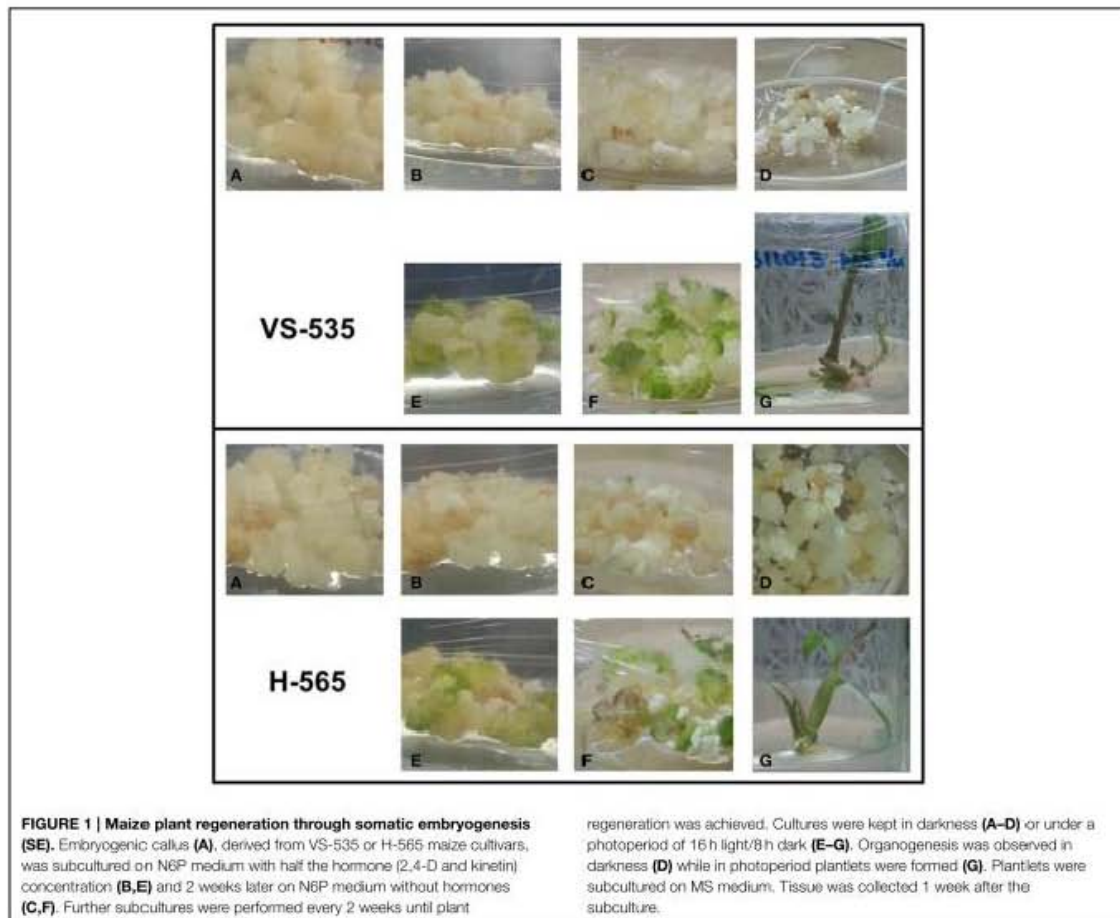
Specific miRNA Expression Is Mostly Affected by Hormones Depletion

Previous studies in maize long-term subcultured EC indicated that miR156, miR159, miR164, miR168, and miR319 importantly reduce their levels in subcultures maintained for more than 18 months (Dinkova and Alejandri-Ramirez, 2014). On the other hand, the stress-related miR397, miR398, miR408 and miR528, become enriched upon callus induction and remain at high levels once the proliferation is established. This is in accordance with the proposal that specific miRNA expression in the undifferentiated EC associates with their proliferation maintenance, suggesting a switch from this expression pattern during plant differentiation (Luo et al., 2006). To evaluate which stimulus promotes miRNA expression changes, we tested the effect of hormone depletion in darkness or light for two independent maize 2 year-subcultured EC, owing that only in the presence of light plant regeneration could be achieved.

In VS-535-derived EC, most of the analyzed miRNAs increased in response to hormone half reduction (50%), regardless the presence of light (Figure 2A; lanes b and d).

Although similar behavior was observed in H-565-derived callus, fold changes with respect to 100% hormones were distinct if compared to VS-535 (Figure 2B). For instance, at least two-fold increase in miR156, miR164, miR168 and miR408, was observed in VS-535, 50% hormones, while a modest 1.2-1.4-fold increase under the same conditions was evident for H-565 (Figure 2 and Supplementary Material, Figure S1). The next stage, 0% hormones, implied a sharp reduction for most miRNAs in VS-535, while in H-565 the reduction was lower or not observed depending on the miRNA. The levels of miR156 and miR164 decreased by three-fold (with respect to 50% hormones) for VS-535, but showed no change for H-565 (Figure 2, lanes c vs. b and e vs. d). Curiously, miRNA levels in the initial tissue (100% hormones) at 2 year-subcultures were also different between maize genotypes (data not shown). The effect of hormone depletion on miRNA expression was greater in the presence of light, at least for VS-535. miR398 decreased almost by 40-fold between 50 and 0% hormones in VS-535 against a modest two-fold decrease in H-565.

An exemption to most miRNA expression patterns was miR159, showing little or no change in response to hormones depletion in both cultures. In addition, while miR168 importantly increased (around two-fold) in 50% hormones for VS-535, it remained at similar levels for H-565. Regarding the differences observed between genotypes, it is important to stress out that



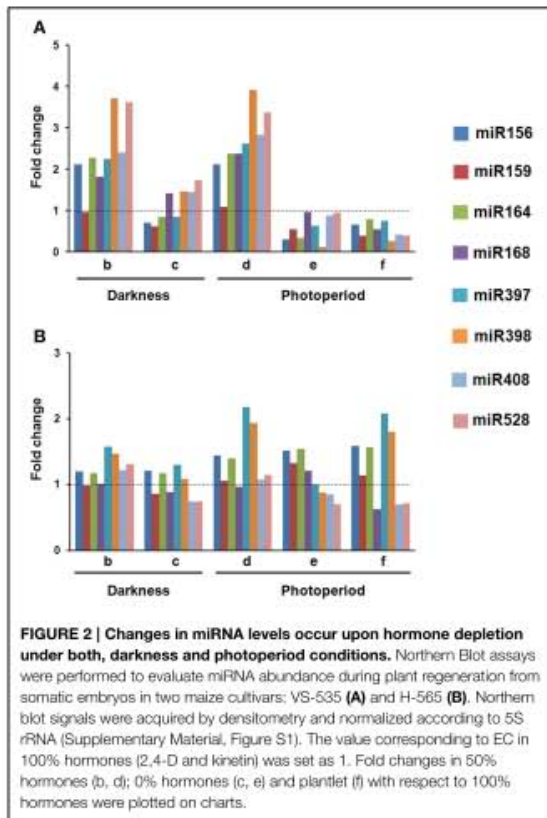
tissues cultured *in vitro* are highly heterogeneous. Although for RNA analysis, EC was always sampled a week upon subculture, and visibly embryogenic differentiating tissues were selected, the heterogeneity inherent to each cultivar could not be avoided. The miRNA expression levels achieved during hormone depletion were maintained or further decreased in plantlets regenerated from VS-535 (Figure 2, lane f). Particularly, the stress-related miR397, miR398, miR408, and miR528 showed about two-fold reduction in VS-535 fully developed plantlets with respect to dedifferentiated tissues (100% hormones). However, in H-565-derived plantlets miR397 and miR398 remained expressed at higher levels.

Light Is a Major Stimulus Affecting Development-related miRNA Target Levels during Maize SE

Several of the miRNA targets analyzed in this study (*SBP23*, *GAMYB*, *CUC2*) encode for transcription factors known to participate in plant developmental switches including zygotic

embryogenesis (Table 1). Others represent enzymes involved in plant stress response (targets of miR397, miR398, miR408, miR528) or the miRNA biogenesis pathway itself (miR168). According to this, we separated the results from qRT-PCR in development-related and stress-related miRNA targets (Figures 3, 4). The levels of *GRMZM2G039455_T01*, an AGO-like transcript also termed *AGO117* or *AGO1c* (Qian et al., 2011) were considered within the development-related targets, but according to its proposed function in miRNA biogenesis it actually corresponds to any of the subdivisions.

Development-related target mRNA levels displayed mostly contrasting behavior between darkness and photoperiod. The Squamosa Promoter Binding protein (SBP)-like transcript *GRMZM2G126018_T01* (*SBP23*) targeted by miR156 showed significantly higher levels upon hormone half reduction under darkness than in the presence of light (Figure 3, b–c vs. d–e). Under darkness, *SBP23* inversely mirrored miR156 changes due to hormone depletion (Figure 3A, lanes b–c; and Figure 3B, lanes a–b). However, its levels were higher in this condition



than in the presence of light. Such behavior correlates with the differentiation status of the tissue and with major influence of light on *SBP23* expression. Since miRNA changes were essentially similar between darkness and light, but levels of the target displayed significant differences between these conditions, additional levels of regulation are likely operating to down-regulate *SBP23* during differentiation. Although we only tested one SBP-like target of miR156, 11 out of 26 SBP-like maize genes were predicted as targets for this miRNA, all of them exhibiting the same target sequence as *SBP23* (Supplementary Material, Table S2). Targeting of SBP-like transcripts by miR156 is highly conserved in plants (Rhoades et al., 2002; Xie et al., 2006; Gandikota et al., 2007) and has been reported as relevant for vegetative to reproductive phase changes and plastochron length (Wu and Poethig, 2006; Wang et al., 2008). For maize, it has been shown that miR156 gene family overexpression renders plants with increased number of leaves and delayed flowering (Chuck et al., 2007).

Similar to *SBP23*, a miR164 previously validated target, *GRMZM2G393433_T01* (NAC-domain transcription factor *CUC2* or *NAC107*, Zhai et al., 2013; Liu et al., 2014) was more abundant in darkness than light for either genotype (Figure 3, lanes a–c). However, while for H-565 the miRNA/target levels

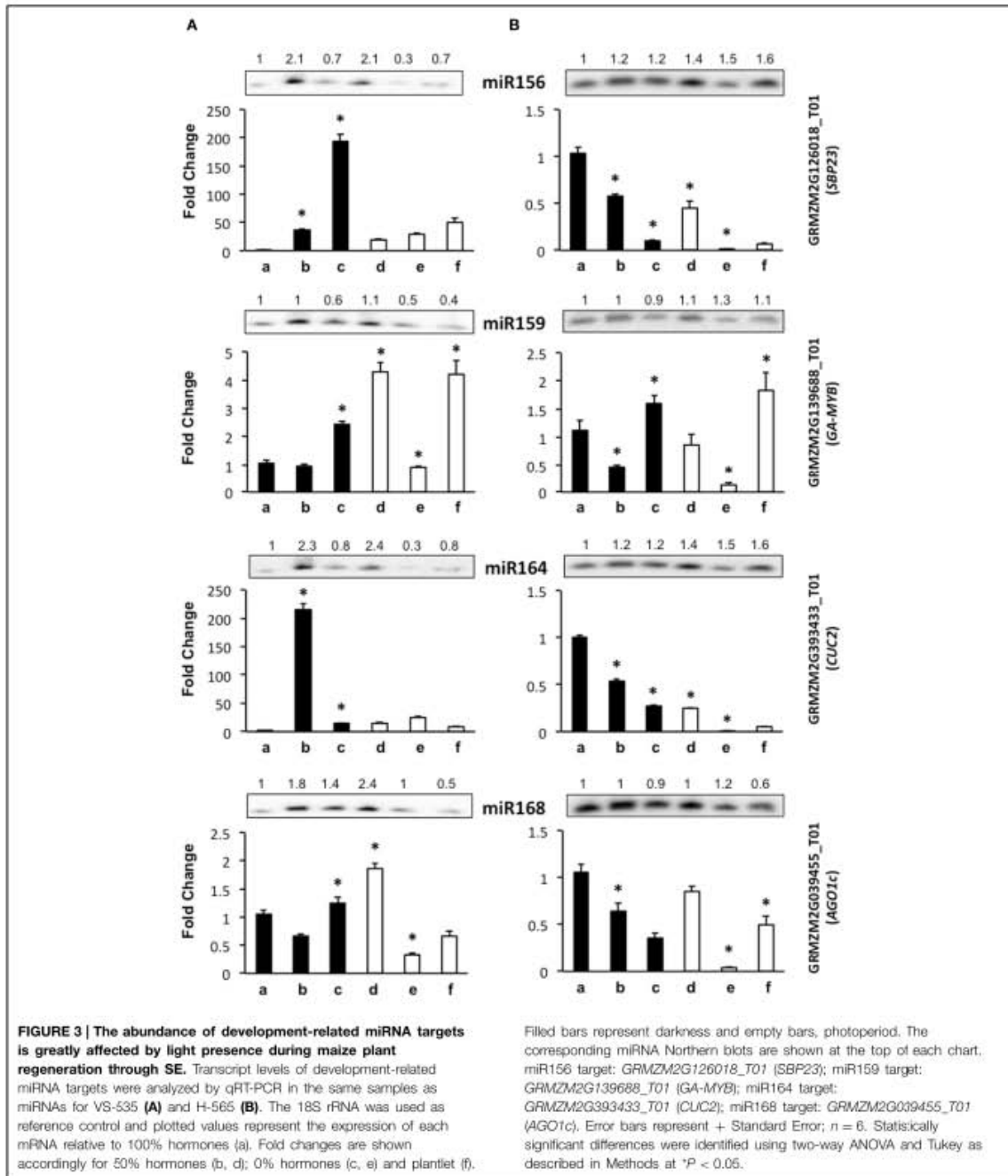
followed an inverse tendency with a consistent decrease of *CUC2* upon hormone removal and light exposure, for VS-535 a correlation was observed only under light (Figure 3A, lanes d–f). Global transcriptome analyses indicated that *CUC2* expression was restricted to immature inflorescence and ear in maize (Sekhon et al., 2011; Fan et al., 2014). Therefore, it is interesting that during SE this transcript was particularly abundant at 100% (H-565) or 50% (VS-535) hormones in darkness, both stages characterized by undifferentiated tissues (Figure 1).

Although miR159 and miR168 displayed slight changes in response to plant regeneration stimuli, their target levels (*GRMZM2G139688_T01*, *Giberellic Acid-responsive MYB*, *GA-MYB* for miR159 and *GRMZM2G039455_T01*, *AGO1c* for miR168) showed significant fluctuations at least for 0% hormones in darkness and photoperiod (Figure 3, lanes c and e). For both genotypes *GA-MYB* levels increased at 0% hormones in darkness, while strongly decreased for the same condition in light photoperiod. This correlates with the observation of drastic morphological changes in somatic embryos (Figure 1). miR159 is one of the most abundant miRNAs in maize EC (Shen et al., 2013) and its levels change the least (Figure 2). Nevertheless, an inverse correlation between *GA-MYB* and slight miR159 fluctuations were usually observed for H-565 and to a lesser extent for VS-535, suggesting that miR159 expression during SE might be important to keep *GA-MYB* levels low when not needed. Regarding normal maize plant development, *GA-MYB* expression has been detected in 24 h germinating seed and during seed development in the endosperm and pericarp, in meiotic tassel and in anthers (Sekhon et al., 2011). In addition, miR159-mediated regulation on *MYB* transcripts might depend on the tissue and developmental stage, at least in *Arabidopsis* (Woodger et al., 2003; Alonso-Peral et al., 2012).

miR168 is known as master regulator of the general miRNA pathway since it is required for fine-tuning the *AGO1* levels in *Arabidopsis* (Vaucheret et al., 2006). In maize, at least five *AGO1* putative genes were previously identified (Qian et al., 2011) in contrast to only one *AGO1* encoding gene in *Arabidopsis*. *AGO1c* shows the greatest identity with the *Arabidopsis* *AGO1* homolog and has conserved the miR168 target sequence (Table 1). Similar to miR156 and *SBP23*, there was poor correlation between miR168 and *AGO1c* transcript levels. While the greatest increase in miR168 was observed for VS-535 at 50% hormones under photoperiod, *AGO1c* levels reached a two-fold increase in the same sample (Figure 3A, lane d). It was then decreased by four-fold at 0% hormones under the same condition when also miR168 decreased (Figure 3A, lane e). A greater reduction in this *AGO1c* transcript was observed for H-565, 0% hormones and photoperiod (25-fold) without accompanying changes in miR168 (Figure 3B, lane e). This suggests a complex regulation on miRNA biogenesis in maize, probably involving additional *AGO1* isoforms during plant regeneration.

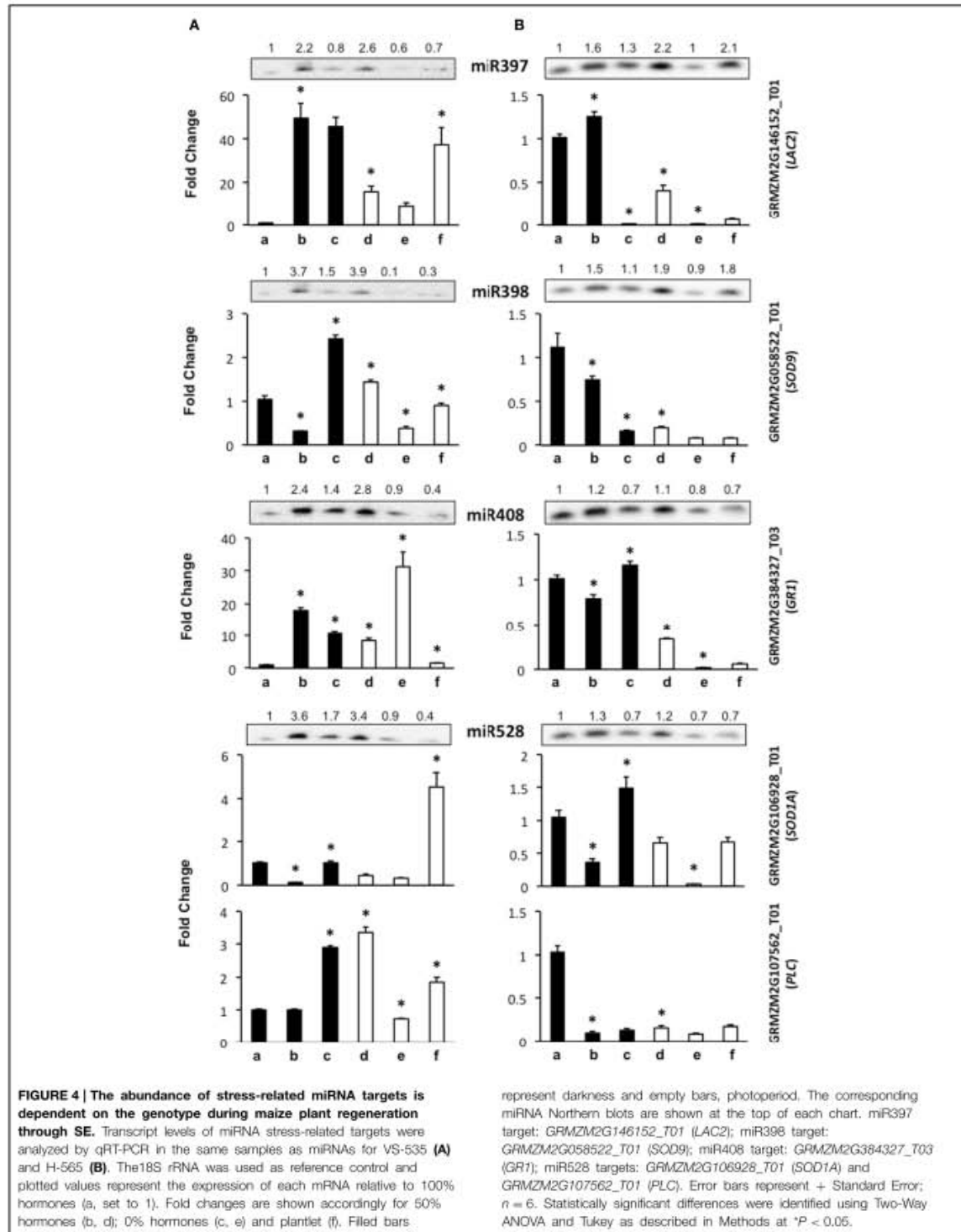
Targets of Stress-related miRNAs Display Essentially Contrasting Patterns between Maize Genotypes during SE

Stress-related miRNAs are highly expressed in the process of EC induction for one Chinese maize genotype (Shen



et al., 2013). Stress has been also regarded as one of the main stimuli promoting dedifferentiation as well as SE. Major targets for stress-related miRNAs are copper proteins, multi-copper oxidases, superoxide dismutases and laccases

(Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Yamasaki et al., 2007; Abdel-Ghany and Pilon, 2008). Here we tested the mRNA levels for maize *GRMZM2G146152_T01* (laccase-like, *LAC2*) as target for miR397, *GRMZM2G058522_T01* (*SOD9*) as validated target for



miR398 (Shen et al., 2013), *GRMZM2G106928_T01* (*SOD-1A*) and *GRMZM2G107562_T01* (plastocyanin-like protein, PLC) as targets for miR528, and *GRMZM2G384327_T03* (Gamma Response 1 protein, GR1), as previously predicted miR408 target (Li et al., 2013a). It is worth mentioning that although stress-related miRNAs have been identified as very highly expressed during germination, immature embryo dedifferentiation and stress-response, their target identification has remained elusive in maize. Our selection included both, validated and predicted targets according to the properties indicated in Table 1.

The level of miR397 target, *LAC2*, showed contrasting changes between VS-535 and H-565 genotypes throughout hormone depletion. For VS-535, it increased upon 50% hormone reduction under darkness or light (to a lesser extent), and remained unaltered after complete hormone removal (Figure 4A). On the contrary, for H-565 it was strongly reduced in 0% hormones, darkness or light (Figure 4B). For other stress-related miRNA targets, such as *SOD9* (miR398), *SOD1A* (miR528) and *GRI* (miR408), lower levels were also detected in H-565 than in VS-535, particularly in differentiating tissues under light (Figure 4A vs. Figure 4B, lanes e and f). There was poor correlation between miR397 and *LAC2* levels for either of the embryonic cultivars, suggesting this transcript is regulated by additional mechanisms during plant regeneration. We observed an inverse correlation between miR398 (increase) and *SOD9* (decrease) upon 50% reduction in hormones for both cultivars in darkness, but only for H-565 in light (Figure 4A vs. Figure 4B). This indicates even for a validated target it is difficult to find strong miRNA/target correlation under light, particularly upon full hormone depletion. Similarly, *SOD1A* showed a clear inverse correlation with miR528 levels for both, VS-535 and H-565, in darkness but not in light (Figure 4, upper panels corresponding to miR528). It is interesting to notice that although *SOD9* and *SOD-1A* catalyze the same reaction, their high and differential transcript expression supports a non-overlapping function in maize plant regeneration through SE. Similar to other stress-related miRNA targets, *GRI* levels were different between the tested maize genotypes (Figure 4). It increased upon hormone depletion in darkness or light for VS-535, while strongly decreased in the presence of light for H-565 (Figure 4A vs. Figure 4B). A correlation between *GRI* and miR408 was observed for H-565, but not for VS-535, suggesting this target regulation during SE could be genotype-specific.

miR528 is one of the most abundant, stress-related miRNAs in SE for maize (Shen et al., 2013), rice (Luo et al., 2006; Chen et al., 2011), and citrus (Wu et al., 2015). In our miR528 target prediction analysis, several copper-binding protein encoding transcripts, many uncharacterized genes and even transcription factors were found (Supplementary Material, Table S2). Taking into account the expected relevance for miR528-mediated regulation in SE, we tested, in addition to *SOD1A*, the expression levels of *GRMZM2G107562_T01* that codes for a plastocyanin-like protein (PLC). Unlike *SOD1A*, *PLC* showed a very weak correspondence with miR528 changes. However, consistent with other stress-related miRNA targets, its levels differed between VS-535 and H-565 throughout the hormone depletion stages (Figure 4A vs. Figure 4B, lower panels corresponding to

miR528). Curiously, *PLC* levels were high in darkness, in spite of its predicted photosynthesis-related function (Abdel-Ghany and Pilon, 2008). In this regard, a light-independent induction of photosynthesis genes has been documented throughout embryogenesis stages (from globular to torpedo) in *Arabidopsis*. Genes involved in energy production comprised the largest up-regulated functional group, strongly biased toward components of the photosynthetic apparatus (Spencer et al., 2007). Taking this into account, high expression of *PLC* is probably required at early stages of SE.

Polyribosomal Distribution of miR528 in Maize EC

According to the lack of consistent correlation between levels of conserved development- or stress-related miRNAs and their targets (predicted or confirmed) during maize SE and plant regeneration, the regulation by additional mechanisms was evident. Primary regulation at transcription levels was already described for several of the analyzed targets (*SBP23*, *GA-MYB*, *CUC2*), particularly in response to developmental cues and hormones' presence. However, another level of regulation might be exerted by miRNAs at translation without affecting the transcript levels (Brodersen et al., 2008; Lanet et al., 2009; Iwakawa and Tomari, 2013). To assess the possible role of some conserved miRNAs at translation level, polyribosomal fractions were obtained from 2 years-subcultured VS-535 EC and the

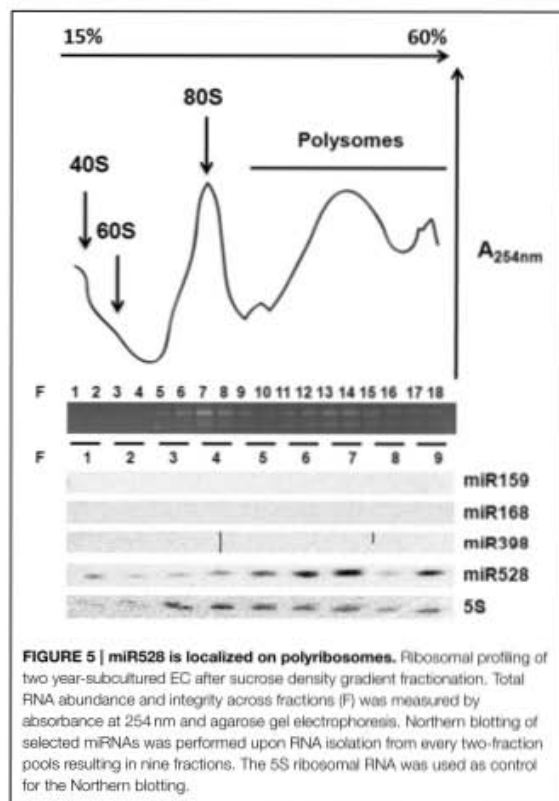


FIGURE 5 | miR528 is localized on polyribosomes. Ribosomal profiling of two year-subcultured EC after sucrose density gradient fractionation. Total RNA abundance and integrity across fractions (F) was measured by absorbance at 254 nm and agarose gel electrophoresis. Northern blotting of selected miRNAs was performed upon RNA isolation from every two-fraction pools resulting in nine fractions. The 5S ribosomal RNA was used as control for the Northern blotting.

presence of miR159, miR168, miR398, and miR528 was analyzed (Figure 5). Only miR528 was detected in polyribosomal fractions (F 10–18) suggesting this miRNA could regulate some of its targets at translation level. In *Arabidopsis*, the presence of miR168 and miR398 in polyribosomes was previously demonstrated in 10 days-old seedlings (Lanet et al., 2009). However, we could not detect these miRNAs in maize polyribosomes from EC, although they had detectable levels in total RNA obtained from this tissue (Figure 2, Supplementary Material, Figure S1).

Discussion

In the past few years, several publications reported conserved and species-specific miRNA levels during plant SE (Luo et al., 2006; Zhang et al., 2010, 2012; Chen et al., 2011; Wu et al., 2011, 2015; Li et al., 2012; Shen et al., 2012, 2013; Lin and Lai, 2013; Qiao and Xiang, 2013; Yang et al., 2013). These studies found that miRNA patterns change upon callus induction, between embryogenic and non-embryogenic callus, as well as during SE and differentiation in a plant species-dependent fashion. For example, while miR171, miR390, and miR398 are preferentially expressed in EC before induction of plant differentiation in rice (Luo et al., 2006); these miRNAs are increased during the differentiation process in citrus (Wu et al., 2011). Even miRNAs from the same family, i.e., miR156a and miR156b, may display differential expression patterns during the SE differentiation process, as demonstrated in a recent study on *Larix leptolepis* (Zhang et al., 2012). Hence, the current knowledge based on global miRNA approaches highlights the relevance of exploring particular miRNA landscapes and their target regulation in the context of species-specific SE conditions.

miRNA Expression in Maize SE

Separated analysis on hormone depletion and light effects during maize SE indicated that miRNA expression patterns are affected mostly by hormones, rather than the light presence. By analyzing the process in two independent embryogenic genotypes we expected to confirm whether the observed miRNA changes are inherent to the process rather than the cultivar. However, we noticed a great influence of the genotype, first on the initial miRNA level appreciated in the 2 years-subcultured EC, and second on the degree of changes registered during hormone depletion. In this sense, miRNA expression regulation resulted more dramatic in VS-535 than in H-565. Strikingly lower levels were detected for all tested miRNAs in VS-535 at 0% hormones and regenerated plantlets under light, whereas H-565 maintained the presence of some of the stress-related miRNAs (miR397 and miR398) higher. A recent study explored miRNA differential expression during immature embryo dedifferentiation in the presence of 2,4-D using a highly embryogenic maize inbred line 18-599R (Shen et al., 2013). The authors suggested miR164, miR169, miR528, and miR529 might be primarily participating in the process of EC induction through the regulation of targets involved in auxin and gibberellin signaling. However, other miRNAs, significantly up-regulated in the dedifferentiation process, were miR156k, miR168, miR397, miR398, and miR408. We found the same miRNAs transiently increased by the

reduction of hormones concentration in half during plant regeneration. However, in the absence of hormones their levels were reduced. These observations support the occurrence of specific miRNA expression readjustments in embryogenic tissues in response to hormone changes in the environment.

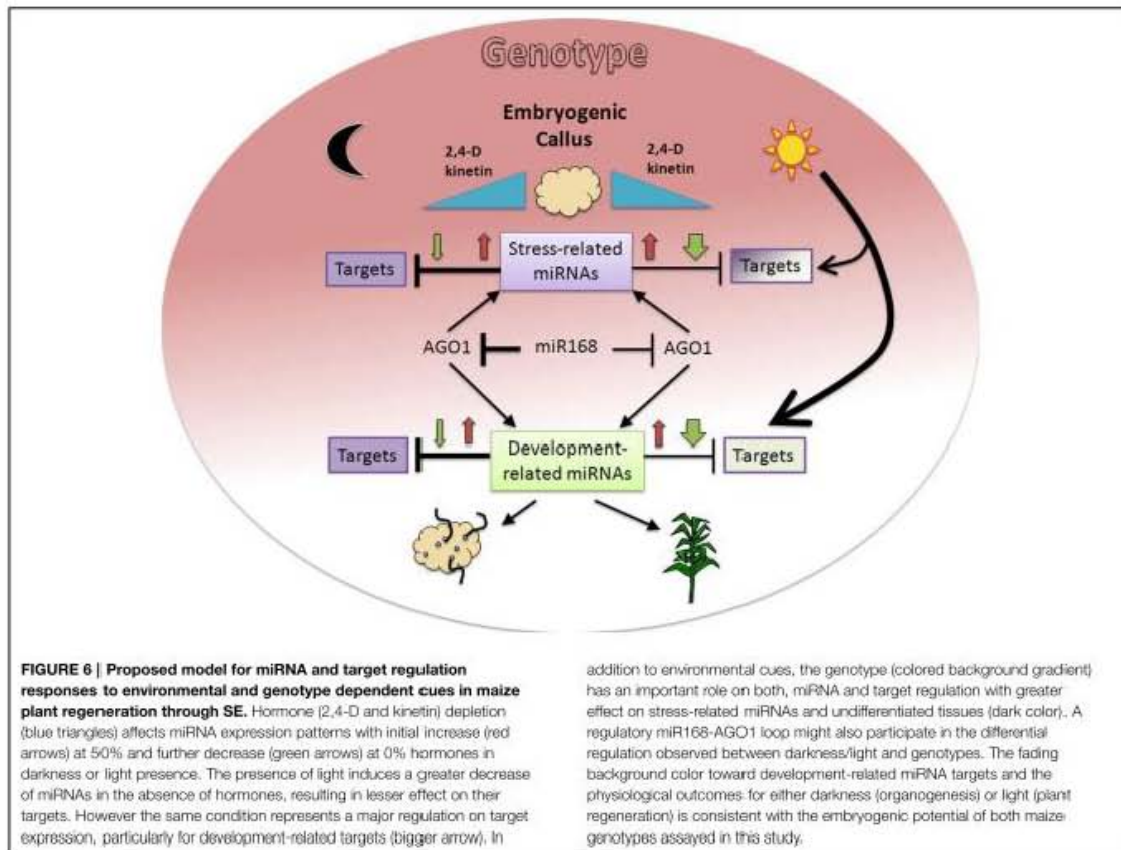
One important question is whether the high concentration of specific miRNAs associates with the embryogenic potential of the callus. Shen et al. (2013) found that the initial increase in miRNAs was either enhanced or maintained during the dedifferentiation process. However, in maize EC subcultured for long periods (up-to 2 years) we have found a gradual reduction in miR156, miR164 and miR168 levels without impairment on the callus embryogenic potential (Dinkova and Alejandri-Ramirez, 2014). In agreement, the data presented here support an initial burst on certain miRNA levels preceding their further decrease during maize SE. Hence, miRNA expression response to hormone changes could be a major factor impacting on the embryogenic potential of maize cultivars during both, dedifferentiation and plant regeneration.

Correlation between miRNA and Target Levels in Maize SE

miRNAs are known to regulate their target mRNAs by degradation, translation inhibition or both. In plants, an inverse correlation between miRNA and target levels is commonly observed, suggesting that mRNA degradation is the preferred regulatory mechanism. However, global miRNA and degradome sequencing data have shown that not always the degradation products of predicted or even validated targets could be detected in the libraries (Shen et al., 2013; Wu et al., 2015). Conversely, these studies have identified novel targets for conserved miRNAs such as miR156 and miR164, or known targets with novel miRNA sites. An increasing number of reports have also revealed the lack of inverse relationship between miRNAs and their targets, depending on the tissue or the process analyzed (Brodersen et al., 2008; Wu et al., 2011; Alonso-Peral et al., 2012).

Here we found the expected inverse correlation between a miRNA and its predicted and/or validated target is highly dependent on environmental (light presence) and internal (genotype) signals during maize plant regeneration through SE (Figure 6). Major differences were observed for development-related miRNA target levels between genotypes under darkness, but not under light where plant regeneration took place. On the other hand, inverse relationship between miRNA/target levels was more easily found in darkness than in light. Therefore, for most of the analyzed targets we propose there is a major influence of additional regulation under a photoperiod, making it difficult to appreciate the effect of miRNAs. On the other hand, increments of both, miRNA and target, upon hormone 50% reduction (e.g., miR156, miR164, miR168) suggest miRNA up-regulation might be required to control the levels of transcripts induced during SE.

Assessing miRNA-mediated regulation through quantitative transcript evaluation has been widely used in plants, particularly during SE (Li et al., 2012; Yang et al., 2013; Wu et al., 2011, 2015). However, an inverse miRNA/target relationship has not always been observed, even in the presence of miRNA-mediated



degradation evidence (degradome or 5'RACE fragments). Our finding on miR528 distribution in maize EC polysomal fractions supports the notion that target regulation is probably exerted at multiple levels depending on the developmental process, miRNA, and analyzed target. In agreement, we observed such expected inverse correlation between miR528 and *SOD1A* target, but not for *PLC* target. Therefore, for future studies, it would be relevant to include miRNA-target evaluations at protein in addition to transcript levels.

Physiological Relevance of Development-related miRNA Regulation in Maize SE

miR156 and miR164 have been found as SE-abundant miRNAs in several species, including maize (Li et al., 2012; Shen et al., 2013; Dinkova and Alejandri-Ramirez, 2014; Wu et al., 2015). The miR156-mediated suppression of *SBP* transcripts is probably required for early SE, as demonstrated for *Arabidopsis* zygotic embryogenesis (Nordine and Bartel, 2010). Similarly, miR164 initial increase during SE is consistent with maintaining low levels of its *CUC2* target during plant regeneration under light. In plants, conserved miR164 targets are NAC transcription factors

(Mallory et al., 2004). The NAC family of proteins includes NAM, ATAF1-2, and CUC2. Proteins belonging to the NAC family are involved in many plant developmental processes, such as flowering, embryogenesis, senescence, auxin signaling, secondary wall thickening and others (Fan et al., 2014). NAM was reported as related to the shoot apical meristem and primordium formation in *Petunia hybida* (Souer et al., 1996) and CUC2 has been involved in *Arabidopsis* shoot apical meristem development (Aida et al., 1997). This context is consistent with the observed *CUC2* reduction in the absence of hormones and in fully differentiated tissues. Therefore, although miR164 and miR156 targets might display contrasting behavior in undifferentiated tissues (darkness, hormones' presence) between maize genotypes, their expression regulation is apparently required for plant regeneration through SE, regardless the genotype (Figure 6).

One possibility underlying the contrasting behavior of miRNA targets between darkness and light could be their transcription responsiveness to photoperiod. Another is a differential function of miRNA-mediated silencing pathways depending on light presence/absence during SE. It was previously reported that

AGO1 expression is highly induced early in carrot SE and further decreased after the globular-staged embryo (Takahata, 2008). In maize, the presence of several putative *AGO1* genes, not all of them exhibiting the miR168 target sequence, further adds a complexity level to the interpretation of miRNA-mediated regulation. According to a global transcriptome analysis for the maize B73 line, *AGO1c* transcript (target of miR168) is highly expressed in differentiating tissues, such as the shoot apical meristem, immature cob, and tassel (Sekhon et al., 2011). It remains high for few days upon pollination, while in the mature and germinating maize seed *AGO1c* and miR168 are both decreased. Another *AGO1* isoform also exhibiting the miR168 target sequence (*GRMZM2G441583_T01*, *AGO113* or *AGO1a*) remains highly expressed during seed maturation and germination (Sekhon et al., 2011). The behavior of *AGO1c* in maize SE is consistent with the transient increase observed in carrot and in early zygotic embryogenesis. We did not analyze other *AGO1* transcripts during maize plant regeneration, but it remains possible that they were differentially expressed depending on the genotype and regulated during SE.

Physiological Relevance of Stress-related miRNA Regulation in Maize SE

Stress-related miRNAs and their targets have been associated with sweet orange callus embryogenic potential (Wu et al., 2011, 2015) and SE in other species (Li et al., 2012). Highly proliferating tissues are thought to produce an excess of reactive oxygen species (ROS) making transcript accumulation of stress-related genes such as superoxide dismutase, cupredoxin, and multi-copper oxidases necessary to minimize cell damage and promote SE. Members of the copper superoxide dismutase (CSD, SOD) family are miRNA targets in several plant species (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Jovanović et al., 2014; Naya et al., 2014). These enzymes are in charge of destroying oxygen reactive species accumulating during fast plant growth (Ravet and Pilon, 2013). On the other hand, an *Arabidopsis* ortholog of the predicted maize miR408 target, *GRI1*, is expressed in mitotically active tissues, such as the shoot apical meristem and floral primordium from unstressed plants in a similar to cell cycle-related gene expression profiles (Deveaux et al., 2000). AtGRI1 is responsive to genotoxic stress, such as gamma radiation, and has been proposed to block mitotic cell divisions in irradiated cells to prevent premature entry into mitosis before completion of DNA repair. Therefore, the control of this transcript by miRNA makes sense in highly proliferating undifferentiated callus (Luo et al., 2006; Shen et al., 2013). Here we found that during maize hormone depletion, targets of stress-related miRNAs

often displayed higher expression under darkness. In addition, their expression patterns under light showed striking differences between genotypes contrary to what observed for development-related targets. Accordingly, we propose that while stress-related miRNAs are required to control their targets in undifferentiated tissues, their participation during the plant regeneration process could be dependent on the genotype and the physiology of the EC used to initiate SE (Figure 6).

Conclusion

The present study provides important novel information about the separate effects of hormone depletion and light presence on miRNA patterns and their target regulation during plant regeneration from maize embryogenic callus. While development or stress-related miRNAs are responsive to hormone concentration, their targets are additionally influenced by the presence of photoperiod. The reproducibility or differences observed for particular miRNA-target regulation between two different highly embryogenic genotypes provide clues for conserved miRNA roles within the SE process. Future work should aim to approach the mechanism underlying regulation of SE-related miRNAs on their targets and its relevance for the plant regeneration success.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EC, NA, TD. Performed the experiments: EC, NA, VJ. Analyzed the data: EC, NA, VJ. Contributed reagents/ materials/ analysis tools: EC, NA, VJ. Wrote the paper: EC, TD. Revised the manuscript: EC, TD. Steered the whole study: TD.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM, IN210912 and IN211215. We wish to thank M.Sc. Ma. Teresa de J. Olivera-Flores for the support and advice in maize *in vitro* tissue culture and Dr. Carolina Peña-Montes for the help in qRT-PCR experiments.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00555>

References

- Abdel-Ghany, S. E., and Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283, 15932–15945. doi: 10.1074/jbc.M801406200
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9, 841–857. doi: 10.1105/tpc.9.6.841
- Alonso-Peral, M. M., Sun, C., and Millar, A. A. (2012). MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 7:e34751. doi: 10.1371/journal.pone.0034751

- Armstrong, C., and Green, C. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164, 207–214. doi: 10.1007/BF00396083
- Armstrong, C., and Green, C. (1991). Development and availability of germoplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 65, 92–93.
- Brodersen, P., Skvarelidze-Archard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., and Yamamoto, Y. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and sRNAs. *Science* 320, 1279–1291. doi: 10.1126/science.1159151
- Chen, C.-J., Liu, Q., Zhang, Y.-C., Qu, L.-H., Chen, Y.-Q., and Gautheret, D. (2011). Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biol.* 8, 538–547. doi: 10.4151/rna.8.3.15199
- Chuck, G., Cigan, A. M., Saetern, K., and Hake, S. (2007). The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat. Genet.* 39, 544–549. doi: 10.1038/ng2001
- Dai, X., and Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res.* 39, W155–W159. doi: 10.1093/nar/gkr319
- Deveaux, Y., Alonso, B., Pierrugues, O., Godon, C., and Kazmaier, M. (2000). Molecular cloning and developmental expression of AtGRI, a new growth-related Arabidopsis gene strongly induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 154, 355–364. doi: 10.1667/0033-7587(2000)154[0355:MCADEO]2.0.CO;2
- Dinkova, T., and Alejandri-Ramirez, D. (2014). “MicroRNA expression and regulation during plant somatic embryogenesis,” in *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, eds R. Alvarez-Venegas, C. De la Peña, and J. Casas-Mollano (New York, NY: Dordrecht, London: Springer), 111–123. doi: 10.1007/978-3-319-07971-4_7
- Fan, K., Wang, M., Miao, Y., Ni, M., Bibi, N., Yuan, S., et al. (2014). Molecular evolution and expansion analysis of the NAC transcription factor in *Zea mays*. *PLoS ONE* 9:e111837. doi: 10.1371/journal.pone.0111837
- Gandikota, M., Birkenbihl, R., Hohmann, S., Cardon, G., Saedler, H., and Huijser, P. (2007). The miRNA 156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SPN box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J.* 49, 683–693. doi: 10.1111/j.1365-3113.2006.02983.x
- Garrocho-Villegas, V., de Jesús-Oliviera, M. T., and Quintanar, E. S. (2012). Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. *Methods Mol. Biol.* 877, 173–182. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_14
- Green, C., and Phillips, R. (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 15, 417–421. doi: 10.2135/cropsci1975.0011183X001500030040x
- Guo, H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F., and Chua, N.-H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* 17, 1376–1386. doi: 10.1105/tpc.105.030841
- Huang, J., Pray, C., and Rozelle, S. (2002). Enhancing the crops to feed the poor. *Nature* 418, 678–684. doi: 10.1038/nature01015
- Iwakawa, H., and Tomari, Y. (2013). Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol. Cell* 52, 591–601. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.033
- Jakubeková, M., Peřová, A., and Obert, B. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 1, 478–487.
- Jones-Rhoades, M. W., and Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell* 14, 787–799. doi: 10.1016/j.molcel.2004.05.027
- Jovanović, Ž., Stanisavljević, N., Mikić, A., Radović, S., and Maksimović, V. (2014). Water deficit down-regulates miR398 and miR408 in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 83, 26–31. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.07.008
- Kasprzyk, A. (2011). BioMart: driving a paradigm change in biological data management. *Database* 2011: bar049. doi: 10.1093/database/bar049
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crété, P., et al. (2009). Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *Plant Cell* 21, 1762–1768. doi: 10.1105/tpc.108.063412
- Li, D., Wang, L., Liu, X., Cui, D., Chen, T., Zhang, H., et al. (2013a). Deep sequencing of maize small RNAs reveals a diverse set of microRNA in dry and imbibed seeds. *PLoS ONE* 8:e55107. doi: 10.1371/journal.pone.0055107
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., et al. (2013b). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell* 153, 562–574. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.005
- Li, T., Chen, J., Qiu, S., Zhang, Y., Wang, P., Yang, L., et al. (2012). Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. *PLoS ONE* 7:e43451. doi: 10.1371/journal.pone.0043451
- Lin, Y., and Lai, Z. (2013). Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS ONE* 8:e60337. doi: 10.1371/journal.pone.0060337
- Liu, H., Qin, C., Chen, Z., Zuo, T., Yang, X., Zhou, H., et al. (2014). Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics* 15:25. doi: 10.1186/1471-2164-15-25
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K., and Carrington, J. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297, 2053–2056. doi: 10.1126/science.1076311
- Luo, Y.-C., Zhou, H., Li, Y., Chen, J.-Y., Yang, J.-H., Chen, Y.-Q., et al. (2006). Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryonic development. *FEBS Lett.* 580, 5111–5116. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.046
- Mallory, A. C., Dugas, D. V., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr. Biol.* 14, 1035–1046. doi: 10.1016/j.cub.2004.06.022
- Márquez-Sánchez, F. (2008). From creole corn varieties (*Zea mays* L.), to transgenic hybrids. I germplasm collection and improved cultivars. *Agric. Soc. y Desarrollo* 5, 151–166.
- Martínez-Silva, A., Aguirre-Martínez, C., Flores-Tinoco, C., Alejandri-Ramírez, N., and Dinkova, T. (2012). Translation initiation factor AtE1F(iso)4E is involved in selective mRNA translation in Arabidopsis thaliana seedlings. *PLoS ONE* 7:e31606. doi: 10.1371/journal.pone.0031606
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naya, L., Paul, S., Valdés-López, O., Mendoza-Soto, A. B., Nova-Franco, B., Sosa-Valencia, G., et al. (2014). Regulation of Copper Homeostasis and Biotic Interactions by MicroRNA 398b in Common Bean. *PLoS ONE* 9:e84416. doi: 10.1371/journal.pone.0084416
- Nordine, M. D., and Bartel, D. P. (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev.* 24, 2678–2692. doi: 10.1101/gad.1986710
- Obert, B., Petrova, A., and Samaj, J. (2009). “Somatic and gametic embryogenesis in maize,” in *Applications of Plant Biotechnology: In Vitro Propagation, Plant Transformations and Secondary Metabolite Production*, eds A. Kumar and S. K. Sopory (New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.), 463–481.
- Qian, Y., Cheng, Y., Cheng, X., Jiang, H., Zhu, S., and Cheng, B. (2011). Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. *Plant Cell Rep.* 30, 1347–1363. doi: 10.1007/s00299-011-1046-6
- Qiao, M., and Xiang, F. (2013). A set of Arabidopsis thaliana miRNAs involve shoot regeneration in vitro. *Plant Signal. Behav.* 8:e23479. doi: 10.4161/psb.23479
- Ravet, K., and Pilon, M. (2013). Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 919–932. doi: 10.1089/ars.2012.5084
- Reyes, J. L., and Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J.* 49, 592–606. doi: 10.1111/j.1365-3113.2006.02980.x
- Rhoades, M., Reinhart, B., Lim, L., Burge, C., Bartel, B., and Bartel, D. (2002). Prediction of plant miRNA targets. *Cell* 110, 513–520. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00863-2
- Salvo, S. A. G. D., Hirsch, C. N., Buell, C. R., Kaeppeler, S. M., and Kaeppeler, H. F. (2014). Whole transcriptome profiling of maize during early somatic

- embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. *PLoS ONE* 9:e111407. doi: 10.1371/journal.pone.0111407
- Sekhon, R. S., Lin, H., Childs, K. L., Hansey, C. N., Buell, C. R., de Leon, N., et al. (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J.* 66, 553–563. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04527.x
- Shen, Y., Jiang, Z., Lu, S., Lin, H., Gao, S., Peng, H., et al. (2013). Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 425–430. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.113
- Shen, Y., Jiang, Z., Yao, X., Zhang, Z., Lin, H., Zhao, M., et al. (2012). Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation. *PLoS ONE* 7:e32237. doi: 10.1371/journal.pone.0032237
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., and Koes, R. (1996). The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85, 159–170. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81093-4
- Spencer, M. W. B., Casson, S. A., and Lindsey, K. (2007). Transcriptional profiling of the Arabidopsis embryo. *Plant Physiol.* 143, 924–940. doi: 10.1104/pp.106.087668
- Stasolla, C., and Yeung, E. C. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74, 15–35. doi: 10.1023/A:1023345803336
- Sunkar, R., and Zhu, J.-K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2001–2019. doi: 10.1105/tpc.104.022830
- Takahata, K. (2008). Isolation of carrot Argonaute1 from subtractive somatic embryogenesis cDNA library. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 900–904. doi: 10.1271/bbb.70730
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., and Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, W71–W74. doi: 10.1093/nar/gkm306
- Vaucheret, H., Mallory, A. C., and Bartel, D. P. (2006). AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol. Cell* 22, 129–136. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.011
- Wang, J.-W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., and Weigel, D. (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 20, 1231–1243. doi: 10.1105/tpc.108.058180
- Willmann, M. R., Mehalick, A. J., Packer, R. L., and Jenik, P. D. (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155, 1871–1884. doi: 10.1104/pp.110.171355
- Woodger, F. J., Millar, A., Murray, F., Jacobsen, J. V., and Gubler, F. (2003). The Role of GAMYB transcription factors in GA-regulated gene expression. *J. Plant Growth Regul.* 22, 176–184. doi: 10.1007/s00344-003-0025-8
- Wu, G., and Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development* 133, 3539–3547. doi: 10.1242/dev.02521
- Wu, X.-M., Kou, S.-J., Liu, Y.-L., Fang, Y.-N., Xu, Q., and Guo, W.-W. (2015). 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.* 13, 383–394. doi: 10.1111/pbi.12317
- Wu, X.-M., Liu, M.-Y., Ge, X.-X., Xu, Q., and Guo, W.-W. (2011). Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* 233, 495–505. doi: 10.1007/s00425-010-1312-9
- Xie, K., Wu, C., and Xiong, L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol.* 142, 280–293. doi: 10.1104/pp.106.084475
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by microRNA in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 282, 16369–16378. doi: 10.1074/jbc.M700138200
- Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K., and Zhang, X. (2013). Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 64, 1521–1536. doi: 10.1093/jxb/ert013
- Zhai, L., Liu, Z., Zou, X., Jiang, Y., Qiu, F., Zheng, Y., et al. (2013). Genomewide identification and analysis of microRNA responding to long-term waterlogging in crown roots of maize seedlings. *Physiol. Plant.* 147, 181–193. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01653.x
- Zhang, J., Zhang, S., Han, S., Wu, T., Li, X., Li, W., et al. (2012). Genomewide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* 236, 647–657. doi: 10.1007/s00425-012-1643-9
- Zhang, S., Zhou, J., Han, S., Yang, W., Li, W., Wei, H., et al. (2010). Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of Larix leptolepis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 355–360. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.056
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5, 1411–1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Chávez-Hernández, Alejandri-Ramírez, Juárez-González and Dinkova. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.