



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Papel de las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs durante la inducción de callos embriogénicos de maíz”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA

VASTI THAMARA JUÁREZ GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

Tzvetanka Dimitrova Dinkova
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adriana Garay Arroyo
[Instituto de Ecología, UNAM](#)

Dr. Javier Plasencia de la Parra
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Marzo, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Índice de Figuras.....	3
Índice Tablas.....	5
Abreviaciones.....	6
Agradecimientos	8
Abstract.....	9
Resumen	10
Introducción.....	11
Antecedentes.....	27
Planteamiento del Problema.....	29
Objetivo General.....	30
Hipótesis	30
Objetivos Particulares.....	30
Resultados.....	38
Discusión.....	75
Conclusiones.....	88
Perspectivas	90
Referencias.....	91
Anexos Figuras	102
Anexos Tablas Suplementarias.....	111

Índice de Figuras

Figura I. Ciclo de vida del Maíz	11
Figura II. Modelos de embriogénesis cigótica en <i>A. thaliana</i> y <i>Z. Mays</i>	13
Figura III. Embriogénesis Somática (SE) y Regeneración de plantas	16
Figura IV. Vía de Señalización de Auxinas descrita en <i>A. thaliana</i>	19
Figura V. Abundancia de Familias de Factores Transcripcionales en maíz	21
Figura VI. Vías de Biogénesis, interconexión y mecanismos de acción de los RNAs pequeños (sRNAs)	23
Figura VII. Mecanismos de silenciamiento genético mediados por RNAs pequeños.	25
Figura VIII. Modelo propuesto para la acción de los miRNAs durante la regeneración de plantas de maíz VS-535 mediante SE	28
Figura 1. Crecimiento de las plantas de maíz variedad VS-535.	38
Figura 2. Cortes longitudinales de Embriones Inmaduros de maíz 15; 23 DDP y Embriones Maduros (IE15, IE23 y ME).	39
Figura 3. Caracterización Morfológica e Histológica de Embriones en diferentes etapas de desarrollo y callos 1 mes después del proceso de inducción de Embriogénesis Somática.	42
Figura 4. Diferencias fenotípicas de los callos inducidos a partir de embriones de maíz VS-535 en diferentes etapas de desarrollo.	44
Figura 5. Evaluación de la abundancia y correlación de las bibliotecas de transcriptomas de embriones de maíz y tejidos después de un mes de Inducción de SE.	46
Figura 6. Expresión Diferencial durante la Embriogénesis Somática.	48
Figura 7. Procesos Biológicos enriquecidos en IE15 comparado con IE23.	50
Figura 8. Procesos Biológicos enriquecidos en IE15 comparado con ME.	51
Figura 9. Procesos Biológicos enriquecidos durante la inducción de IE15.	53
Figura 10. Acumulación Diferencial (DA) de Factores Transcripcionales (TF) entre embriones de diferentes etapas de desarrollo.	54
Figura 11. Acumulación Diferencial (DA) de Factores Transcripcionales (TF) entre embriones y callos un mes después de la inducción de SE.	55
Figura 12. Familias de TFs con valores significativos de enriquecimiento funcional en los embriones durante la Inducción de SE (comparaciones embriones vs callos).	57

Figura 13. Distribución de las familias enriquecidas en los callos durante la Inducción de SE (comparación Embrión vs Callo).	58
Figura 14. Acumulación Diferencial (DA) de Transcritos identificados en <i>Arabidopsis thaliana</i> como promotores de la Inducción de SE entre los distintos embriones cigóticos de maíz.	59
Figura 15. Acumulación Diferencial (DA) de Transcritos identificados en <i>Arabidopsis thaliana</i> como promotores de la Inducción de SE durante la Inducción de los callos a partir de embriones cigóticos de maíz en diferentes etapas de desarrollo.	61
Figura 16. Acumulación Diferencial (DA) de Marcadores de embriogénesis cigótica durante la SE.	62
Figura 17. Abundancia relativa de las distintas clases de sRNAs en los diferentes tejidos.	65
Figura 18. Regulación mediada por la vía de tasiARFs durante la embriogénesis somática (SE) de maíz.	67
Figura 2. Acumulación Diferencial (DA) de miRNAs durante la embriogénesis cigótica y la inducción de embriogénesis somática de Maíz.	69
Figura 20. Acumulación relativa de miRNAs durante la inducción	71
Figura 21. Modelo para la regulación mediada por miRNAs y tasiARFs durante la inducción de SE en maíz.	82
Figura Suplementaria 1. Gráficos MD. Expresión diferencial.	102
Figura Suplementaria 2. Procesos Biológicos enriquecidos en IE23 comparado con C23.	103
Figura Suplementaria 3. Procesos Biológicos enriquecidos en ME comparado con CM.	104
Figura Suplementaria 4. Expresión de TF.	104
Figura Suplementaria 5. Acumulación Diferencial (DA) de TF.	105
Figura Suplementaria 6. Acumulación Diferencial (DA) de Factores Transcripcionales (TFs) entre los distintos cultivos de Callos de maíz.	106
Figura Suplementaria 7. Familias de TFs con valores significativos de enriquecimiento funcional en los callos durante la Inducción de SE.	107
Figura Suplementaria 8. Acumulación Diferencial (DA) de transcritos identificados en <i>Arabidopsis thaliana</i> como promotores de la Inducción de SE entre los tejidos un mes después de la inducción.	108
Figura Suplementaria 9. Acumulación Diferencial (DA) de Marcadores de embriogénesis cigótica de maíz.	109
Figura Suplementaria 10. Secuencias de tasiARFs reportados en Maíz	109
Figura Suplementaria 11. Reconstrucción filogenética de ZmARFs.	110

Índice Tablas

Tabla 1. Total de lecturas secuenciadas y alineadas.	45
Tabla 2. Transcritos Diferencialmente Expresados	47
Tabla Suplementaria 1. Principales procesos biológicos enriquecidos en las comparaciones entre embriones.	111
Tabla Suplementaria 2. Principales procesos biológicos enriquecidos en las comparaciones entre embriones y callos.	112
Tabla Suplementaria 3. Patrones de acumulación diferencial (DA) en IE15, comparados con otros embriones cigóticos.	113
Tabla Suplementaria 4. Patrones de acumulación diferencial (DA) durante la inducción de callos embriogénicos a partir de IE15.	114
Tabla Suplementaria 5. Patrones de acumulación diferencial (DA) en C15, comparados con otros tejidos de callos (C23 y CM).	115
Tabla Suplementaria 6. Familias de TFs con valores significativos de enriquecimiento funcional en los embriones y callos durante la Inducción de SE	116
Tabla Suplementaria 7. Abundancia y Normalización de las bibliotecas de sRNA-Seq	117
Tabla Suplementaria 8. Total de lecturas de sRNAs por longitud.	117
Tabla Suplementaria 9. Localización genómica de los Loci TAS3	118
Tabla Suplementaria 10. Número de lecturas de los transcritos TAS3 y tasiARFs.	118
Tabla Suplementaria 11. Acumulación Diferencial de tasiARFs	119
Tabla Suplementaria 12. ARFs blanco de tasiARFs	119

Abreviaciones

2.4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
AGO	Argonauta
ARF	Factor de Respuesta a Auxinas
C15	Callos obtenidos a partir de IE15 un mes después de la Inducción de SE
C23	Callos obtenidos a partir de IE23 un mes después de la Inducción de SE
CEI	Callo Embriogénico tipo I
CEII	Callo Embriogénico tipo II
CM	Callos obtenidos a partir de ME un mes después de la Inducción de SE
DA	Diferencialmente Acumulados
DCL	Dicer Like
DDP	Días después de la polinización
dsRNA	RNA de doble cadena
EC	Células Embrionarias
GRF	Factor de Regulación del Crecimiento
HB	Homeobox
hc-siRNAs	RNAs pequeños de Interferencia heterocromáticos
IAA	Ácido Indol Acético
IC	Capacidad <i>In vitro</i>
IE15	Embriones Inmaduros 15 DDP
IE23	Embriones Inmaduros 23 DDP
IPyA	Ácido Indol-3-Pirúvico
LI	Line Index
log ₂ FC	Logaritmo base 2 de las veces de cambio
ME	Embriones Maduros
miRNAs	microRNAs
NAA	Ácido 1-Naftalenacético
NAT-siRNAs	RNAs pequeños de Interferencia naturales antisentido
nt	nucleótido
PEDCs	Células embriogénicas predeterminadas
phasiRNAs	RNAs pequeños de Interferencia en fase
PRC2	Complejo Represivo Polycomb 2
PTGS	Silenciamiento Postranscripcional
RAM	Meristemo Apical de la Raíz
RdDM	Metilación del DNA dirigida por RNA
RDR	RNA Polimerasa dependiente de RNA
RISC	Complejo de silenciamiento Inducido por RNA
RPTM	Lecturas por diez millones

SAM	Meristemo Apical del Brote
SE	Embriogénesis Somática
siRNAs	RNAs pequeños de Interferencia
sRNAs	RNAs pequeños
ta-siRNAs	RNAs pequeños de Interferencia que actúan en trans
tasiARFs	RNAs pequeños de Interferencia que actúan en trans en ARFs (tasiRNAs)
TE	Elemento Transponible
TF	Factor Transcripcional
TGS	Silenciamiento Transcripcional
TIR	Terminal Inverted Repeats
TPM	Transcritos por millón
VS-535	Maíz Variedad Sintética 535
WOX	Homeobox Relacionado a WUS
WUS	WUSHEL

Palabras Clave:

Embriogénesis Somática; Maíz; RNAs pequeños; Desdiferenciación; Factor Transcripcional; Auxinas; Estrés; Reprogramación Genética.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) mediante el proyecto número IN214118 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el proyecto número 238439. Así como el apoyo de El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por su apoyo para realización de una estancia de investigación y al CONACyT, por la beca otorgada durante los estudios de doctorado.

Abstract

Maize Somatic Embryogenesis (SE) requires calli induction with regenerative potential highly dependent on the explant and genotype. The molecular features underlying this potential are still poorly explored. To better understand the dedifferentiation response, we characterized the morphology and small RNA (sRNA)-mediated gene expression regulation in maize embryos at different developmental stages during the Induction of calli tissues.

Embryo explants showed contrasting phenotypes upon dedifferentiation and distinct embryogenic potential. The differential abundance of sRNA populations and that of their mRNA targets was explored by High-throughput Sequencing technology in the embryos before induction, during dedifferentiation and in the calli showing different regenerative potential. Early embryo developmental stage (15 days upon pollination) was characterized by the enrichment of development- and auxin- related sRNAs correlating with differential accumulation of Transcription Factors (TFs) possibly involved in the embryogenic potential during dedifferentiation.

Transcriptomes provided the opportunity to analyze the complete battery of maize annotated TFs and functions by Functional Enrichment analysis based on Gene Ontology Annotations. The dedifferentiation process from embryos with high regenerative potential was enriched in cell proliferation, oxidation/reduction, transcriptional regulation and metabolic processes, as well as greatly represented by plant hormone signal transduction pathway. Particular TF modules such as Auxin Response Factors (ARFs) and others related to auxin production and signal transduction (Homeobox; HB) as well as embryogenesis-related AP2-EREB were also characteristic of early embryos.

Overall, we conclude that particular sRNA and TF regulatory networks operating at 15 days upon pollination in the maize embryo are of outmost relevance to provide the required plasticity for dedifferentiation without losing the embryogenic potential, together with a proper management of auxin signaling and stress responses.

Resumen

La embriogénesis es uno de los procesos biológicos más importantes en las plantas. Complejas redes de regulación genética determinan el desarrollo del embrión a partir de células gaméticas mediante diferenciación celular (embriogénesis cigótica). Cambios en los programas de expresión genética mediante la utilización de elevadas concentraciones de hormonas provocan la desdiferenciación de células no gaméticas, su propagación como células embrionarias (EC) y la capacidad de regenerar una planta al retirar la exposición al fitoregulador (Embriogénesis Somática, SE). En maíz, se sabe que la capacidad de inducción de SE depende del genotipo y explante utilizado; sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen la embriogénesis somática no se conocen por completo y la mayoría de los modelos propuestos se han descrito en Dicotiledóneas. Recientemente, el silenciamiento genético mediado por RNAs pequeños (sRNAs) se ha implicado como posible mecanismo de regulación durante la inducción de EC a partir de embriones inmaduros de maíz; debido a cambios observados en poblaciones específicas de sRNAs y algunos componentes de sus vías de biogénesis antes y después de la inducción de EC. En este trabajo se analizaron los perfiles transcripcionales de embriones de maíz en diferentes etapas de desarrollo y se caracterizó la expresión de las vías de regulación mediadas por sRNAs antes y después de la inducción de SE. Para situar en un contexto fisiológico los cambios observados, se caracterizó la morfología de los explantes iniciales y callos un mes después de la inducción. Los embriones mostraron fenotipos contrastantes durante la inducción de la desdiferenciación, así como distinto potencial embriogénico y regenerativo. Sólo los embriones en etapas tempranas de la embriogénesis (15 días después de la polinización) poseen capacidades embriogénicas regenerativas. A nivel de expresión genética, se caracterizan por el enriquecimiento en procesos proliferativos y de división celular, así como la regulación de sRNAs involucrados durante el desarrollo y vías de señalización hormonales (auxinas), correlacionando con la acumulación diferencial de Factores Transcripcionales que pueden estar involucrados con el potencial embriogénico durante la desdiferenciación.

En conjunto, los resultados muestran que existen redes de regulación particulares operando en los embriones de 15 días después de la polinización en la variedad de maíz VS-535. Estas redes proveen la plasticidad requerida para la desdiferenciación sin perder su potencial embriogénico, en conjunto con un manejo adecuado de las respuestas ante el estrés y la señalización hormonal, particularmente de auxinas.

Introducción

Embriogénesis Cigótica

El ciclo de vida de las angiospermas inicia a partir de una sola célula (cigoto). Durante la embriogénesis, el cigoto se divide hasta formar un organismo multicelular funcional (embrión). Durante la formación del embrión, las células adquieren funciones especializadas y organización espacial, confiriéndole al embrión la información necesaria para establecer los patrones morfológicos a seguir durante el crecimiento y desarrollo en una planta adulta (Chen *et al.*, 2014; Möller *et al.*, 2017).

La embriogénesis cigótica en plantas angiospermas, es el programa de desarrollo que inicia a partir de la fertilización y formación del cigoto y continua durante etapas coordinadas para formar un embrión dormante preservado en los tejidos maternos, en estructuras específicas y complejas como la semilla o el fruto (Ronchi and Giorgetti, 1995; Figura I). Una de las características de las plantas angiospermas es el proceso de doble fertilización, en el que un óvulo se fusiona con una célula espermática para formar el cigoto diploide (a partir del cual se desarrollará el embrión), mientras que otro gameto se fusiona con las células

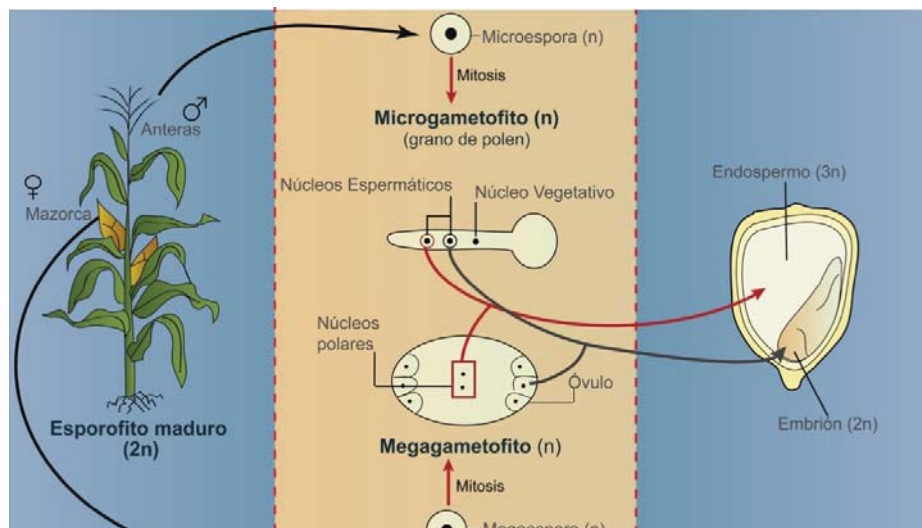


Figura I. Ciclo de vida del Maíz. Mediante meiosis, seguido de divisiones mitóticas, se producen el megagametofito femenino y el microgametofito masculino (grano de polen). Durante la microgametogénesis, la primera división mitótica produce una pequeña célula generativa y el núcleo vegetativo. Una segunda división mitótica de la célula generativa resultará en dos células que se diferencian en células espermáticas. En el megagametofito, una célula haploide diferenciada en óvulo es fertilizada por una célula espermática para producir un embrión, y dos núcleos polares haploides se fusionan para formar una célula central diploide que es fertilizada por una célula espermática, dando lugar al endospermo triploide. El endospermo es un tejido nutritivo que contribuye al desarrollo normal del embrión en angiospermas. (Modificado de Walbot and Evans, 2003).

centrales del saco embrionario para formar el endospermo, en la mayoría de las especies triploide (en angiospermas basales como los nenúfares, el endospermo es diploide; Williams and Friedman, 2002). El endospermo es importante para la nutrición del embrión, mediante la acumulación de reservas de almidón, proteínas y lípidos (Walbot & Evans, 2003).

La embriogénesis cigótica se divide en dos etapas principales: (1) La embriogénesis, propiamente dicha, que comienza durante la formación del cigoto y termina en la etapa cotiledonaria y (2) la maduración de la semilla seguida de la germinación (Dodeman *et al.*, 1997). La embriogénesis en plantas con flores es más o menos similar, sin embargo, las semillas de dicotiledóneas y monocotiledóneas difieren en su apariencia y configuración celular. La mayor diferencia recae en la presencia de uno o dos cotiledones flanqueando el futuro meristemo apical del brote (Chandler, 2008).

Gran parte de los estudios sobre embriogénesis cigótica han sido realizados en plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* o *Daucus carota* (zanahoria). Las etapas de desarrollo de los embriones de estas especies están bien caracterizadas. De manera general, los embriones de las plantas angiospermas tienen una organización corporal dividida por un eje apical y uno basal. El eje apical comprende al embrión propiamente dicho, en él se localiza el meristemo apical del brote (SAM, por sus siglas en inglés “*Shoot apical meristem*”), flanqueado por uno o dos cotiledones y el meristemo radicular (RAM, por sus siglas en inglés “*Root apical meristem*”). El eje basal comprende al suspensor, el cual provee soporte físico, nutrición y factores de crecimiento al embrión durante la embriogénesis temprana, manteniéndolo unido a los tejidos maternos y posicionándolo en la semilla. Posteriormente el suspensor se degenera y no está presente en las semillas maduras (Schwartz *et al.*, 1997).

El maíz (*Zea mays*) es una monocotiledónea herbácea que por su importancia en la agricultura es uno de los principales modelos para estudiar la embriogénesis en monocotiledóneas. Se conocen diversas etapas durante la embriogénesis cigótica de maíz. La primera es llamada “etapa proembrionaria”, en la que el cigoto diploide lleva a cabo la primera división celular, la cual es asimétrica y da como resultado una célula apical que se desarrollará en el embrión y una célula basal que formará el suspensor (Kellogg, 2015). En maíz, sólo la primera división asimétrica tiene un plano predecible, las divisiones

subsecuentes se producen al azar y sin ningún patrón característico, a diferencia de los embriones tempranos de *A. thaliana*, donde se llevan a cabo patrones de división definidos (Lau *et al.*, 2012). La siguiente etapa es la de “transición”, en la que el embrión y el suspensor se alargan a través de divisiones celulares. Entre los 7-9 días después de la polinización (ddp; dependiendo del genotipo de maíz) se comienza la formación del SAM, coincidiendo con la etapa coleoptilar, así como una pequeña protuberancia por donde emergerá la punta del coleoptilo. También, durante la etapa coleoptilar a un lado del eje embrionario, se forma una amplia estructura en forma de escudo llamada escutelo; así como el RAM, situado al lado contrario del escutelo y justo por debajo del SAM (Kellogg, 2015).

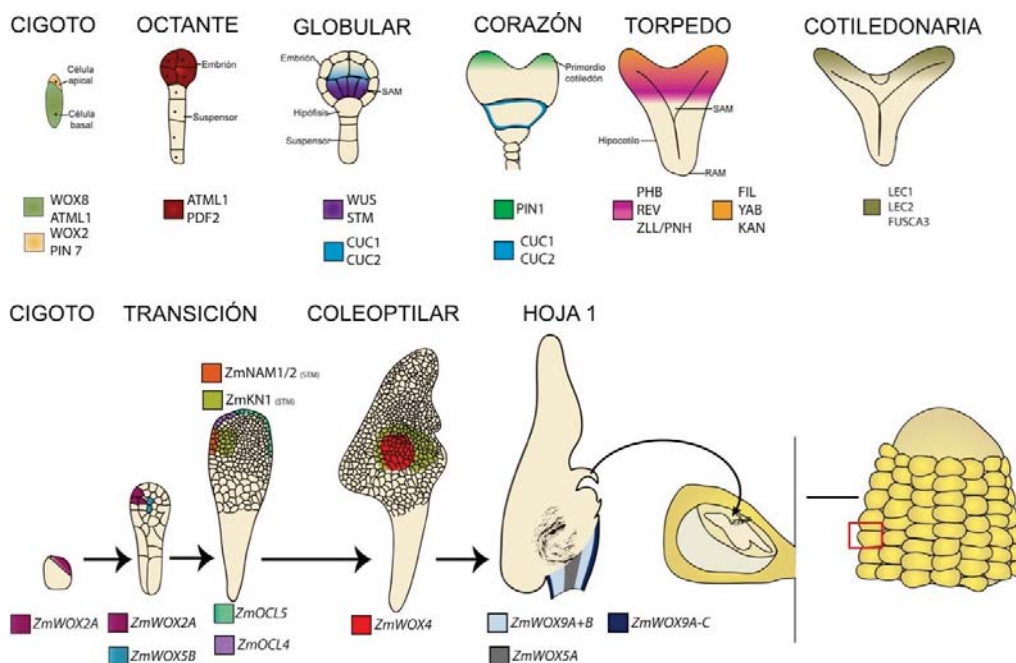


Figura II. Modelos de embriogénesis cigótica en *A. thaliana* (arriba) y *Z. Mays* (abajo). Se muestran las diferentes etapas caracterizadas en ambas especies y la localización espacio/temporal de marcadores moleculares durante el desarrollo embriogénico (Modificado de Venglat *et al.*, 2005; Nardmann *et al.*, 2009).

Las etapas tardías de la embriogénesis de maíz se nombran acorde al número de hojas (Etapa de hoja 1-6; Figura II). La última fase de la embriogénesis es la maduración, donde productos como lípidos acumulados en el escutelo incrementan y conforman una gran porción del embrión. El suspensor es degradado mediante muerte celular programada. Durante esta fase, la capacidad de resistir a la desecación se establece antes de la masiva deshidratación del embrión durante la dormancia y la maduración de la semilla de maíz (Emons & Kieft, 1995; Nardmann & Wolfgang, 2009).

La embriología de plantas comenzó como una ciencia meramente descriptiva. Como los embriones se encuentran dentro de los tejidos parentales durante todo su desarrollo, para poder estudiar paso a paso el desarrollo de un embrión es necesaria la escisión de los embriones y crecerlos en un medio de cultivo artificial. El cultivo de embriones es complejo debido a que existen requerimientos nutricionales diferentes en un embrión temprano que en un embrión maduro; por décadas se han utilizado diferentes técnicas y composiciones de medio de cultivo con el fin de reproducir *in vitro* el desarrollo normal de embriones. El cultivo de embriones es un excelente modelo de estudio para identificar los cambios en el desarrollo embrionario como resultado de una perturbación nutricional, condiciones ambientales o fitorreguladores.

El papel de las auxinas y citocininas durante la morfogénesis embrionaria de dicotiledóneas ha sido ampliamente estudiado. Los mecanismos moleculares que controlan la biosíntesis de auxinas, transporte y transducción de señales se conservan entre dicotiledóneas y monocotiledóneas. Sin embargo, los patrones de formación durante la embriogénesis y la forma final del embrión difieren enormemente entre cada clase (Chen *et al.*, 2014). Por ejemplo, en maíz (monocotiledónea) sólo la primera división celular del cigoto es igual que en *Arabidopsis*, y el transporte de auxinas en etapas tempranas de la embriogénesis se lleva a cabo en el endospermo y no en la célula apical, como sucede en *Arabidopsis* (Forestan *et al.*, 2010).

El cultivo de embriones en un medio suplementado con altas concentraciones de auxinas altera la diferenciación y las células parecen adquirir características meristemáticas (Dodeman *et al.*, 1997). Después de transferir el tejido a un medio libre de auxinas, una multitud de estructuras tipo embrión comienzan a desarrollarse hasta diferenciarse en plantas funcionales, proceso conocido como “Embriogénesis Somática” (SE; Monnier, 1995; Sugiyama, 2015).

Embriogénesis Somática.

Las plantas como organismos sésiles tienen una enorme plasticidad que les permite adaptarse a condiciones ambientales adversas (estrés biótico y abiótico). A nivel molecular las respuestas ante el estrés pueden generar cambios en los perfiles de expresión genética

y como consecuencia puede alterarse la función y la identidad de la célula. Para el mantenimiento de cualquier identidad celular es necesaria la continua señalización y la regulación de su programa de expresión genética en múltiples niveles. Durante el desarrollo embrionario, los flujos hormonales y las señales móviles entre las células convergen en la actividad de factores transcripcionales capaces de establecer un perfil de expresión genética que deriva en la formación de patrones morfogénicos particulares (Pierre-Jerome *et al.*, 2018). Debido a esta misma plasticidad, las plantas tienen respuestas naturales extremas ante estímulos particulares, siendo la SE un ejemplo de ello. En la SE los estímulos hormonales y la oscuridad inducen alteraciones morfológicas particulares, como consecuencia del cambio en sus programas de expresión genética.

La SE es el proceso de formación de un embrión a partir de una célula que no sea un gameto o el producto de la fusión gamética. Todas las células de una planta contienen la información genética necesaria para formar un organismo funcional. Sin embargo, la expresión de genes es altamente regulada para permitir la diferenciación de sistemas de órganos como los que desarrolla una planta. La inducción de embriogénesis somática parece consistir en la terminación del programa genético existente en el tejido explante, para reemplazarlo por un patrón de expresión genética embrionaria en el que las células del tejido explante darán origen a embriones somáticos (Merkle *et al.*, 1995).

Los tratamientos para la obtención de embriones somáticos dependen de si el explante inicial consiste en células que ya expresan un programa genético embrionario (PEDCs, por sus siglas en inglés "*pre-embryonic determined cells*") o células no embriogénicas. En el primer caso, un estímulo para la división celular será suficiente para producir embriones somáticos en el tejido explante, proceso conocido como embriogénesis somática directa. En contraste, los tejidos no embriogénicos, deben llevar a cabo numerosas divisiones mitóticas en presencia de auxinas para la inducción del estado de células embrionarias (EC). Las células resultantes de estas divisiones mitóticas se manifiestan como "callos" o agregados celulares y el término regeneración indirecta se utiliza para indicar que la fase de callos o proliferación interviene entre el explante original y la regeneración de plantas (Armstrong and Green, 1985; Merkle *et al.*, 1995; Figura III).

Dado que la regeneración de plantas vía embriogénesis somática comienza con unas pocas células, es una de las principales herramientas biotecnológicas para la propagación clonal y la transformación genética. El éxito en la inducción de callos embriogénicos y la subsecuente regeneración de plantas viables no es sencillo y eficiente para la mayoría de las especies de plantas. Factores nutricionales, el uso de altas concentraciones de hormonas, el explante del cual se parte y el genotipo de la planta, influyen en la capacidad de generar EC. En pastos como el maíz, la embriogénicidad de los explantes está limitada a la utilización de embriones inmaduros en cierta etapa de desarrollo e inflorescencias u hojas en estado meristemático como explante inicial. Además, genotipos individuales de

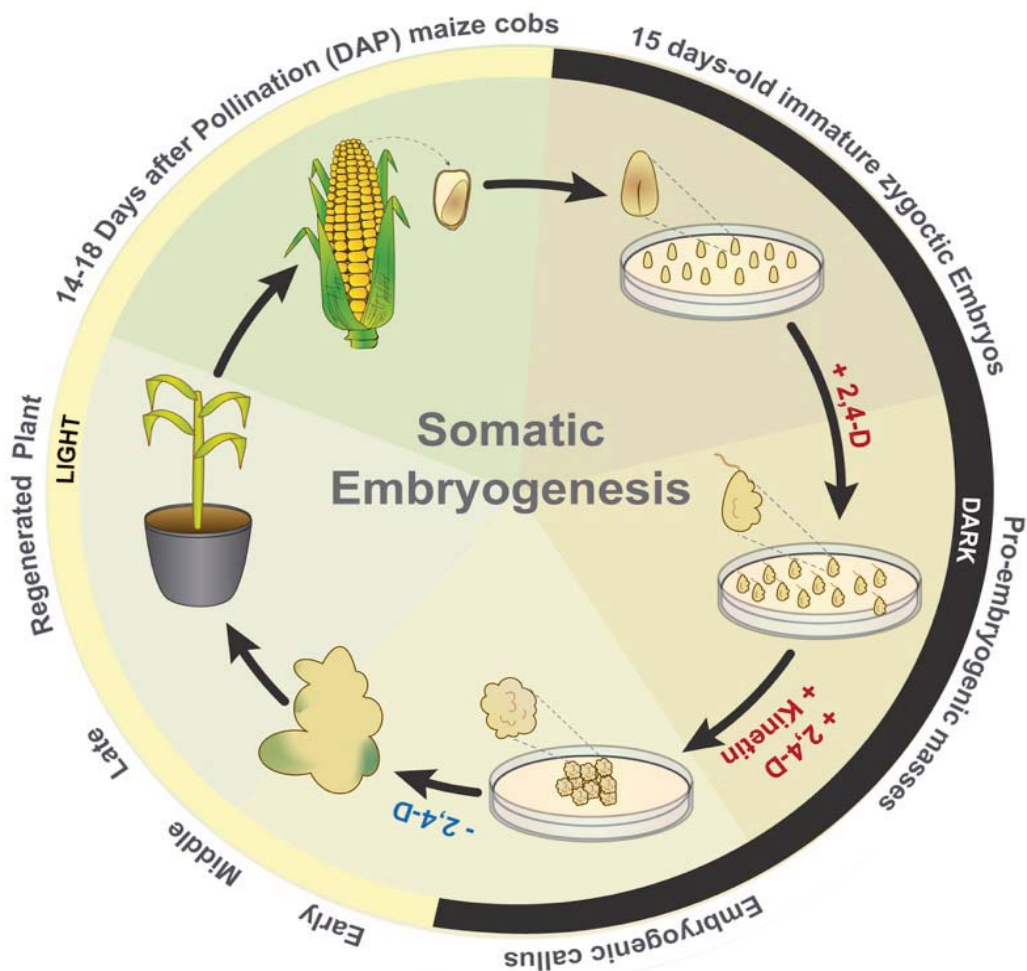


Figura III. Embriogénesis Somática (SE) y Regeneración de plantas (ejemplificado con maíz). La inducción de SE y dediferenciación se representa en la parte de arriba del círculo, utilizando como explante embriones inmaduros y un estímulo con 2,4-D/Oscuridad. Para la promoción de proliferación y el establecimiento de callos embriogénicos se utiliza cinetina, adicionalmente al 2,4-D. La parte de abajo del círculo representa la inducción de la diferenciación de los callos en proliferación, mediante la remoción de los fitoreguladores en presencia de fotoperiodo. El círculo se completa mediante la regeneración de plantas y su reproducción (Modificado de López-Ruiz *et al.*, 2019)

algunas especies (como el maíz) varían enormemente en su capacidad embriogénica. Estas diferencias podrían reflejar la divergencia entre el funcionamiento de elementos clave para la reprogramación celular durante la SE (Emons & Kieft, 1995; Merkle *et al.*, 1995).

En el laboratorio de cultivo de tejidos (Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM), se han probado experimentalmente diferentes genotipos y explantes de maíz para la inducción de callos embriogénicos y regeneración de plantas. De las variedades de maíz estudiadas, sólo los embriones inmaduros de maíz cosechados en un periodo entre los 14 y 18 ddp en los genotipos VS-535 y HS-565, son capaces de generar cultivos de callos embriogénicos (Garrocho-Villegas & Jesús-olivera, 2012).

Para la iniciación y propagación de callos embriogénicos son necesarias condiciones de oscuridad y cultivar los explante en el medio de cultivo N6 (Chu *et al.*, 1975), el cual además de sales nitrogenadas, está adicionado con una auxina sintética: el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) (Figura III). Los explantes son subcultivados una semana después en un medio N6 suplementado con cinetina, una citocinina que en combinación con el 2,4-D potencia la división celular y proliferación de callos embriogénicos (Jakubeková *et al.*, 2011). Posteriormente son subcultivados cada dos semanas, removiendo las partes que presentan oxidación. Los cultivos de callos embriogénicos pueden mantenerse hasta por dos años y después regenerar una planta retirando las auxinas, citocininas y exponiendo los tejidos a la luz (Figura III).

En maíz, se distinguen dos tipos de callos, los de tipo I y tipo II. La capacidad para generar un tipo de callo en particular, está intimamente ligada al programa genético en el explante y a las elevadas concentraciones de 2,4-D utilizadas durante la inducción de los mismos. Los callos tipo II (CEII), también llamado “callos friables” consisten en agregados de células. Predominando las células del tipo meristemático (células pequeñas, con pared celular delgada, ricas en citoplasma, pequeñas vacuolas y granos de almidón). Durante la inducción de callos embriogénicos estas células se dividen activamente, mientras que también se encuentran presentes células que no se dividen, con paredes celulares más gruesas, de forma alargada y con grandes vacuolas. Los callos blancos y opacos Tipo I, representan una etapa posterior en la diferenciación de los callos Tipo II y contienen estructuras tipo escutelo. Durante la regeneración, un tercer tipo de callos puede ser identificado, los callos rizogénicos, en los que cuando la concentración de 2,4-D es

disminuida, los callos sólo forman raíces y no una planta viable. Por lo que, en maíz solamente los CEII poseen capacidades regenerativas (Emons & Kieft, 1995; Garrocho-Villegas & Jesús-olivera, 2012; Alvarez-Venegas *et al.*, 2014).

Las auxinas y su papel como reguladores de la transcripción.

Durante la SE las células que responden al estímulo exógeno de auxinas se desdiferencian y comienzan a dividirse. Los mecanismos subyacentes a esta reprogramación son poco entendidos. Se sabe que la aplicación de auxinas sintéticas afecta los niveles de auxinas endógenas, especialmente el ácido indolacético (IAA; Vondrakova *et al.*, 2018). No obstante, sea cual sea la naturaleza de la auxina, será percibida por receptores celulares para desencadenar una cascada de transducción de señales particular que dará lugar a la respuesta fisiológica final, como la división celular, desdiferenciación y organogénesis, dependiendo de las concentraciones de auxina aplicada (Baker & Wetzstein, 1994). La presencia de distintos receptores podría explicar las diferencias en la capacidad embriogénica de los explantes iniciales. Aunado a eso, la mayoría de los procesos de desarrollo controlados por auxinas incluyen la modulación de la expresión genética de manera positiva o negativa (Locascio *et al.*, 2014; Fukui & Hayashi, 2018).

La vía de señalización de auxinas está implicada en el crecimiento de las plantas, división celular, elongación y diferenciación. El IAA, es la auxina endógena más común y el producto final durante la biosíntesis de auxinas. Las auxinas sintéticas como el 2,4-D y el ácido 1-Naftalenacético (NAA) mimetizan la percepción y señalización del IAA (a excepción de los mecanismos de eflujo; Fukui and Hayashi, 2018). La regulación mediada por auxinas se lleva a cabo mediante tres procesos dinámicos: 1) La biosíntesis e inactivación de auxinas; 2) el transporte célula a célula de auxinas (transporte polar de auxinas) y 3) la transducción final de señales (López-Ruiz *et al.*, 2019a).

La biosíntesis de auxinas endógenas (IAA) se realiza mediante una vía dependiente de Triptofano (Trp), en dos pasos secuenciales: primero, la conversión del ácido indol-3-pirúvico (IPyA) por una aminotransferasa de triptofano (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TRYPTOPHAN AMINO TRANSFERASE RELATED (TAA1/TAR), posteriormente se da la conversión de IPyA a IAA catalizada por una enzima de la familia flavin monooxigenasa YUCCA (YUC). La segunda reacción es el

paso limitante, puesto que la expresión de YUCs es altamente regulada espaciotemporalmente.

El catabolismo e inactivación de auxinas son necesarios para mantener los niveles endógenos óptimos de auxinas. Las enzimas involucradas en la conjugación de IAA con aminoácidos para su posterior degradación son IAA-amida-sintetasas pertenecientes al grupo de proteínas Gretchen Hagen 3 (GH3). La conjugación de auxinas es reversible dependiendo de la identidad del aminoácido al que fue conjugada (Fukui and Hayashi, 2018; López-Ruiz *et al.*, 2019; Figura IV).

La percepción de auxinas exógenas o e (o influjo de auxinas) se lleva a cabo mediante difusión pasiva o mediante transportadores AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUXIN 1 (AUX1/LAX). El eflujo de IAA por medio de acarreadores de eflujo del tipo PIN FORMED (PIN) y mediante transportadores de la familia ATP-BINDING CASSETTE B/MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (ABCB/MDR/PGP; Figura IV). El influjo y eflujo conforman el transporte polar de auxinas, responsable de mantener los gradientes y niveles

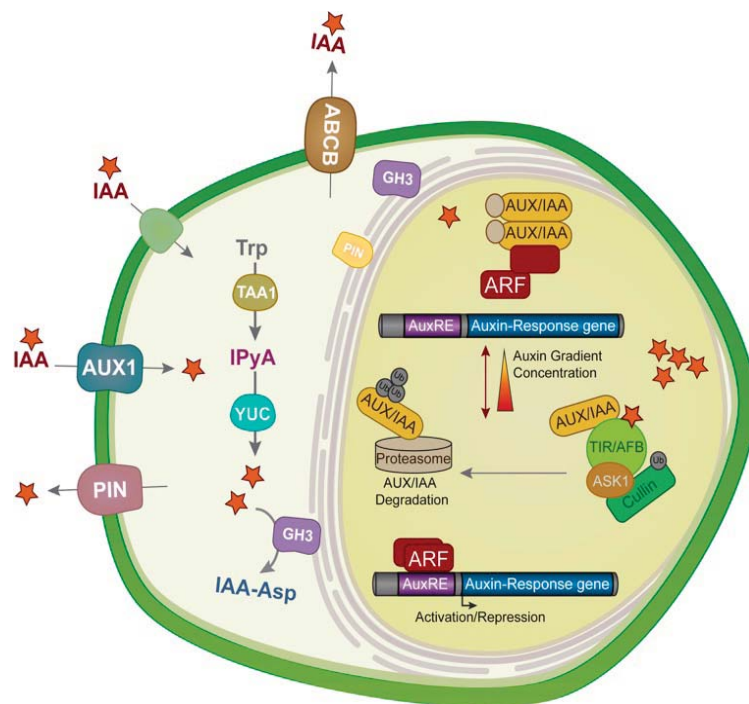


Figura IV. Vía de Señalización de Auxinas descrita en *A. thaliana*. En la ilustración se muestra el transporte polar de Auxinas en la membrana plasmática de las células, la biosíntesis y conjugación de auxinas endógenas en el citoplasma y la transducción de señales se lleva a cabo en el núcleo, mediada por las proteínas TIR1/AFB F-box, los represores transcripcionales AUXIAA y ARFs. La estrella roja representa a la molécula de IAA (Modificado de López-Ruiz *et al.*, 2019).

de auxinas entre las células, durante el crecimiento y desarrollo de la planta (López-Ruiz *et al.*, 2019).

Las auxinas regulan la transcripción de los genes de respuesta a auxinas mediante las proteínas TIR1/AFB F-box, los represores transcripcionales Aux/IAA y los ARFs (por sus siglas en inglés: “auxin response factors”). Los ARFs se unen a secuencias en el DNA (AuxRE; “elementos de respuesta a auxinas”) localizados en los genes de respuesta a auxinas y a los represores Aux/IAA (Figura IV). Cuando los ARFs se unen a un Aux/IAA, su actividad transcripcional es reprimida y no pueden activar o reprimir la transcripción. La degradación de los represores Aux/IAA es un evento crítico durante la señalización mediada por auxinas y requiere un complejo proteico ubiquitin ligasa E3, llamado SCF^{TIR1/AFB} (Skp1, Cullin y una proteína F-box). En el complejo SCF^{TIR1/AFB}, TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALLING F-BOX) funge como receptor de auxinas y a elevadas concentraciones, la unión de la molécula de auxina a un TIR, promueve la interacción del AUX/IAA con el complejo ubiquitin ligasa, para su ubiquitinación y posterior degradación vía 26S (Garay-Arroyo *et al.*, 2014; Salehin *et al.*, 2015).

La liberación de los ARFs, permite regular genes de respuesta a auxinas. La represión o activación de la expresión de un gen, depende de la identidad del ARF e interesantemente algunas de las familias de genes reguladas por los ARFs incluyen GH3, SAURs (Small auxin up-regulated RNAs) y los mismos AUX/IAA, por lo que existe una autoregulación de la vía durante la percepción final de la señal (Sanan-Mishra *et al.*, 2013).

Regulación de la Expresión Genética durante la SE

Aunque los ARFs saltan a la vista como uno de los mecanismos de percepción de auxinas más importantes durante la SE, sólo representan un grupo selecto de TFs (Figura V). Por ejemplo miembros de las familias de TFs APETALA2/ Factor de Respuesta al Etileno (AP2/EREB) y WUSCHEL (WUS)-related homeobox (WOX) están relacionados con la propagación de callos embriogénicos y durante la regeneración de plantas Su *et al.*, 2009; Ouakfaoui *et al.*, 2010).

La regulación a nivel transcripcional es un proceso fundamental en todos los organismos. Los TFs son indispensables para generar patrones de expresión espaciotemporal de

muchos genes. Las cascadas de señalización gobiernan los cambios durante procesos de estrés y desarrollo. Los TFs promueven o inhiben la actividad transcripcional de un gen o familias completas, mediante el reconocimiento de secuencias regulatorias específicas en el DNA. Entre el 5.0 – 7.0 % de los genes que codifican proteínas en los genomas de las plantas son TFs (Gray *et al.*, 2009; Franco-Zorrilla *et al.*, 2014).

Según la base de datos Grassius (GrassTFDB; Yilmaz *et al.*, 2009), en maíz se reportan 2605 genes que codifican para TF, 888 loci más que los reportados para *Arabidopsis thaliana* (Jin *et al.*, 2017). Las familias de TFs con mayor número de miembros en maíz son: MYB, Ethylene Responsive Element Binding-like (EREB), basic helix-Loop-Helix (bHLH), NAC y Homeobox (HB). El 13.2 % de los TFs presentan dominios de unión a DNA, pero no se han clasificado dentro de ninguna familia, por ello se han agrupado en la categoría de “huérfanos” (Orphan) y su potencial como reguladores de la transcripción aún es desconocido (Figura V).

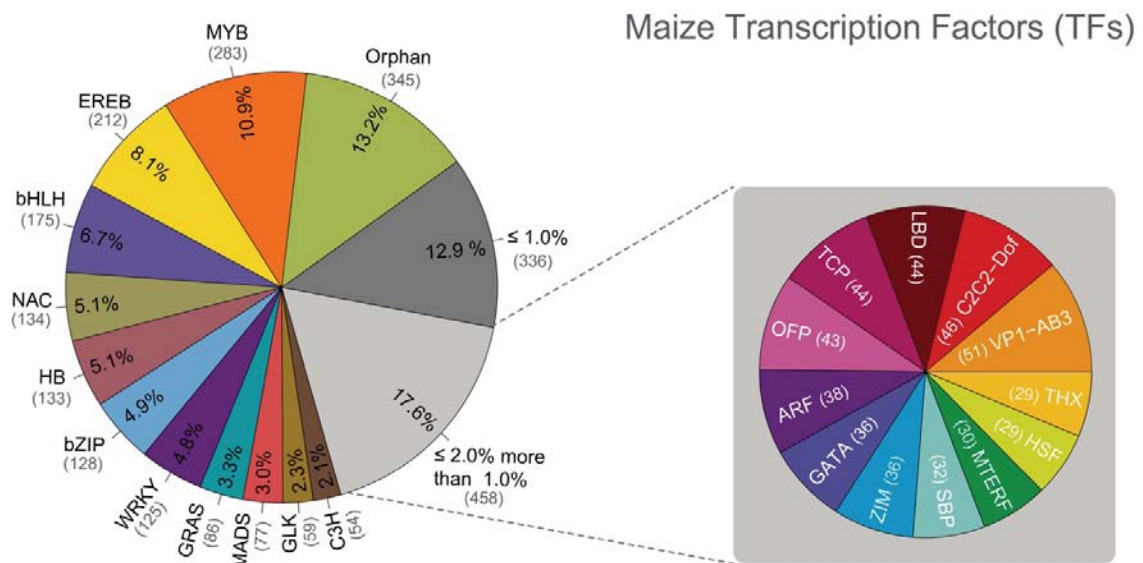


Figura V. Familias de Factores Transcripcionales en maíz, según la Base de Datos Grassius. **MYB**: TF MYB domain TF; **EREB**: Ethylene Response Element Binding; **bHLH**: Basic/helix-loop-helix domain TF; **NAC**: NAC domain TF; **HB**: Homeobox domain TF; **bZIP**: Basic region/leucine zipper motif TF; **WRKY**: WRKY domain TF; **GRAS**: GRAS domain TF; **MADS**: MADS-box motif TF; **GLK**: GOLDEN2-LIKE; **C3H**: CCCH (C3H) zinc finger motif TF; **TCP**: TCP domain TF; **LBD**: Lateral organ boundaries domain TF; **C2C2-Dof**: C2C2-DNA-binding One Zinc Finger domain TF; **VP1-AB3**: VIVIPAROUS 1- Abscic acid-insensitive 3 TF; **THX**: Trihelix DNA-binding domain TF; **HSF**: Heat shock Factors; **MTERF**: Mitochondrial termination factor; **SBP**: SQUAMOSA promoter binding TF; **ZIM**: Jasmonate ZIM-domain TF; **GATA**: GATA domain TF; **ARF**: Auxin Response Factor; **OFP**: OFP domain TF.

Hasta este punto, resulta evidente que son muchos los factores que pueden influenciar la capacidad embriogénica de un explante. Por ejemplo, se sabe que la aplicación de ciertas concentraciones de auxinas causa hipermetilación del DNA en diferentes especies (Chakrabarty *et al.*, 2003; Lejak-Levanić *et al.*, 2004), mientras que en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la formación de callos embriogénicos y su propagación, se identificó la mutante *kyp-2*, la cual tiene una mutación en el gen KRYPTONITE (KYP)/SUVH4, que codifica una metiltransferasa de la histona H3 lisina 9 (H3K9; Grafi *et al.*, 2007). La H3K9me² es una marca epigenética distintiva de silenciamiento genético y remodelación de la cromatina, sugiriendo la importancia de los mecanismos epigenéticos durante la inducción de callos mediante SE.

La reprogramación genética durante la inducción de callos embriogénicos es el eje central para entender los procesos moleculares que que explique los cambios fisiológicos observados durante la SE. Existen distintos niveles y mecanismos de regulación genética en los organismos eucariontes. El estudio de los mecanismos de regulación genética durante la embriogénesis cigótica han tomado gran importancia en las últimas décadas gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva. Perfiles de expresión genética han sido caracterizados en algunas especies de plantas, revelando que hasta el 11.4 % de los genes se expresan específicamente en la embriogénesis, por lo que la regulación de la expresión genética es indispensable (Zhang *et al.*, 2012).

Regulación genética mediada por RNAs pequeños (sRNAs)

El silenciamiento genético mediado por RNAs pequeños (sRNAs), está conservado en la mayoría de los organismos eucariontes. La diversificación de las vías mediadas por sRNAs en plantas señalan la importancia de la presencia de este tipo de regulación en la mayor parte de los procesos básicos para el desarrollo, funcionamiento y sobrevivencia de las plantas (Parent *et al.*, 2012).

Los mecanismos basados en silenciamiento por RNA en plantas brindan diversos niveles de regulación genética. Mediante formación de heterocromatina en regiones genómicas enriquecidas con transposones (TE) y secuencias repetidas (Malone & Hannon, 2009) y el silenciamiento a nivel postranscripcional (PTGS), RNAs no codificantes de 21-24

nucleótidos (nt) de longitud y sus proteínas relacionadas, regulan la estabilidad del genoma, expresión de genes y defensa del genoma contra ácidos nucleicos invasores, como los provenientes de virus y transposones (Bonnet *et al.*, 2006; Ramesh *et al.*, 2013; Wilson & Doudna, 2013).

Los sRNAs pueden dividirse en dos principales categorías: microRNAs (miRNAs) y RNAs pequeños de interferencia (siRNAs; del inglés: “small Interferent RNAs”), y principalmente se distinguen por sus mecanismos de biogénesis. Dentro de la categoría de los siRNAs se encuentran: siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs; de 24 nt de longitud, también nombrados como ra-siRNAs; siRNAs asociados a secuencias repetidas); siRNAs secundarios en fase (phasiRNAs; de 21 nt de longitud, los cuales incluyen a los ta-siRNAs; por siRNAs que actúan en trans) y siRNAs naturales antisentido (NAT-siRNAs; de 21, 22 y 24 nt de longitud).

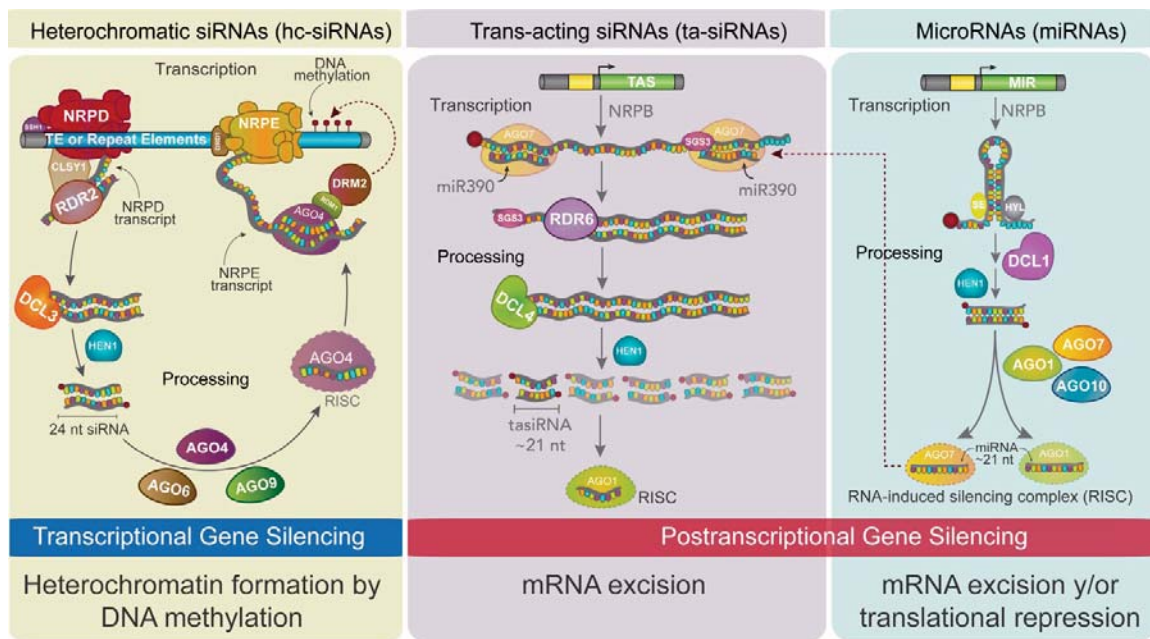


Figura VI. Vías de Biogénesis, interconexión y mecanismos de acción de los RNAs pequeños (sRNAs). En los tres paneles inferiores representan el distinto origen (loci) y mecanismos de biogénesis de los hc-siRNAs, tasiRNAs y miRNAs (de izquierda a derecha). El panel superior representa los distintos modos de acción y blancos de los miRNAs y tasiRNAs (silenciamiento postranscripcional). Las interconexiones entre los miRNAs, tasiRNAs y Factores Transcripcionales se muestran en líneas punteadas. NRPB, RNA Pol II; NRPD, RNA Pol IV; NRPE, RNA Pol V; DCL, Dicer-like; AGO, Argonauta; RDR, RNA polimerasa dependiente de RNA; HEN1, siRNA metilasa. HUA enhancer 1; DRM2, domain rearranged metilasa 2. (Modificado de López-Ruiz *et al.*, 2019).

Los miRNAs provienen de los genes MIR, al ser transcritos conforman estructuras secundarias tipo tallo-asa, generando un RNA de doble cadena (dsRNAs). Posteriormente son procesados por una proteína tipo RNasa III de la familia Dicer Like (DCL), generalmente Dicer like 1 (DCL1). El procesamiento de los precursores de miRNAs da como resultado pequeños duplex de RNA de 21-24 nucleótidos (nt) de longitud. En contraste, los siRNAs son generados a partir de dsRNAs originados por alguna de las proteínas de la familia RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDRs; Figura VI), a excepción de los NAT-siRNAs, que se originan a partir de dos transcritos complementarios antisentido (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010). De manera análoga a los miRNAs, los dsRNAs son procesados por un miembro de la familia de proteínas DCL, generando sRNAs de distintas longitudes; los hc-siRNAs son procesados por DCL3 en duplex de siRNAs de 24 nt, mientras que para la producción de ta-siRNAs de 21 nt de longitud es necesaria la participación de DCL4 (Bonnet *et al.*, 2006; Sun, 2012; Matzke *et al.*, 2014).

Durante la biogénesis de sRNAs muchas son las proteínas involucradas en su procesamiento, desde proteínas de unión a RNA para la estabilización de los transcritos precursores de sRNAs (HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) y SERRATE (SE) son proteínas de unión a ssRNA, ambas proteínas estabilizan la estructura tallo-asa de los precursores de miRNAs), proteínas que permitan exportar al citoplasma miRNAs o bien proteínas que estabilicen los sRNAs mediante la metilación de sus extremos 3' (Chen, 2009).

Para el funcionamiento de las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs es necesaria la unión de los sRNAs procesados con las proteínas Argonautas (AGOs) y la conformación del RISC (por sus siglas en inglés: RNA-Induced Silencing Complex). El RISC consiste en un sRNA de cadena sencilla, una proteína AGO y proteínas chaperonas como Cyclophilin 40/SQUINT (CYP40/SQN) y HSP90 (Chen, 2009; Saito *et al.*, 2010).

Las proteínas AGOs tienen cuatro dominios funcionales: el extremo amino terminal y los dominios PAZ, MID y PIWI. En el RISC el sRNA interactúa con el dominio MID y PAZ en sus extremos 5' y 3', respectivamente. Posteriormente, se lleva a cabo la búsqueda de transcritos blancos mediante la complementariedad de bases con el sRNA. Al encontrar un transcrito blanco, AGO sufre cambios conformacionales permitiéndole unir el mRNA, a este proceso se le conoce como nucleación e inicia con la formación del apareamiento de bases entre el sRNA y el mRNA blanco, dando como resultado la liberación del extremo 3' del

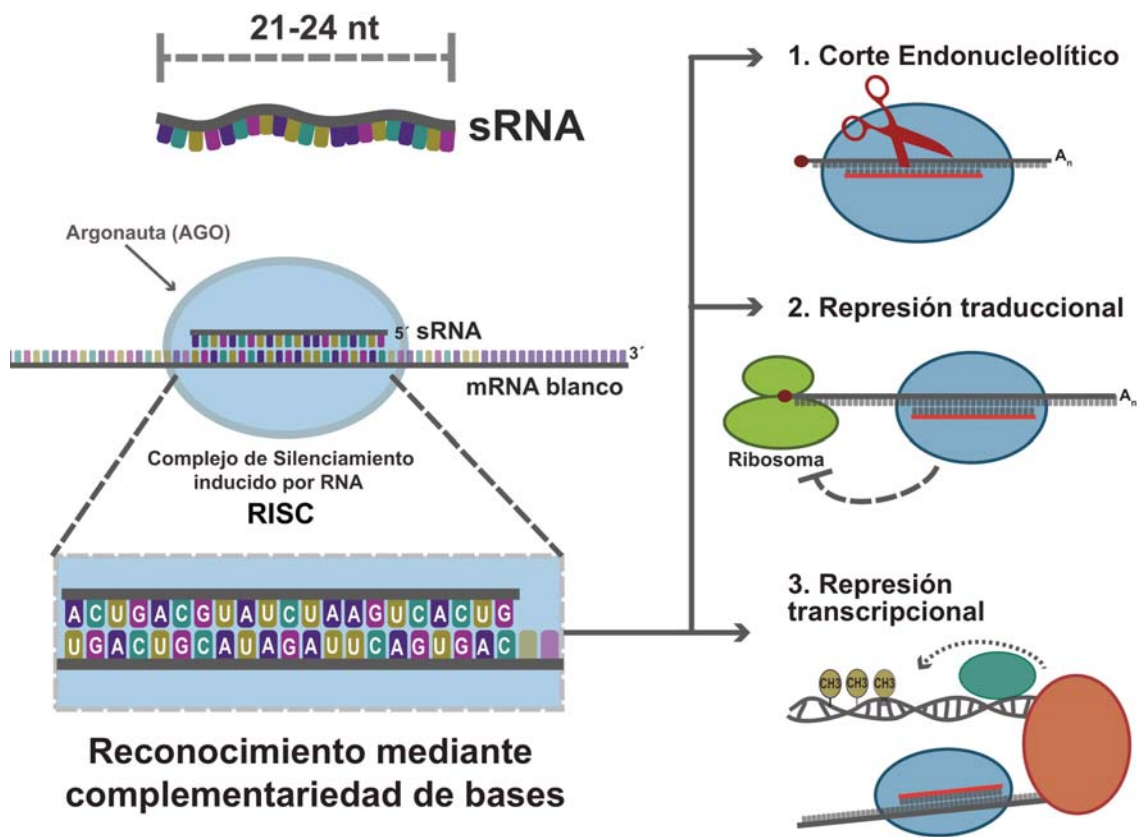


Figura VII. Mecanismos de silenciamiento genético mediados por RNAs pequeños. Los RNAs pequeños se encuentran unidos a complejos proteicos, que incluyen a la proteína argonauta para conformar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Para el silenciamiento de la expresión genética, RISC puede (1) Realizar un corte endonucleolítico al mRNA blanco, teniendo como consecuencia la degradación del transcrito, (2) Reprimir la traducción del mRNA, o (3) Reprimir la transcripción del gen blanco a través de modificaciones en la cromatina, entre ellas la metilación del DNA mediante la vía RdDM. (Modificado de Lee et al., 2012)

sRNA del dominio PAZ. De esta manera, se facilita el posicionamiento del sitio de corte del mRNA blanco cerca de los residuos catalíticos del dominio PIWI (Bouasker & Simard, 2009; Wang *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2012).

Finalmente, el silenciamiento es realizado mediante uno de tres mecanismos (Figura VII): 1) Escisión del mRNA blanco y su posterior degradación. 2) Represión traduccional (mecanismos conocidos como PTGS) y 3) Silenciamiento genético transcripcional (TGS) a través de la metilación del DNA y el posterior reclutamiento de complejos epigenéticos represivos (principalmente por la desacetilación y metilación de histonas en contextos específicos; Matzke *et al.*, 2014). La función de silenciamiento canónica de los miRNAs, cis-NAT-siRNAs y phasiRNAs es a través de eventos a nivel postranscripcional (PTGS), como la escisión del mRNA y/o su represión traduccional (sólo los miRNAs, han mostrado ser capaces de reprimir la traducción), mientras que los hc-siRNAs funcionan

principalmente a través del TGS (mediante un mecanismo exclusivo de plantas conocido como RdDM; RNA-directed DNA methylation; Lee *et al.*, 2012).

De las 10 proteínas argonautas (AGO) identificadas en *Arabidopsis*; AtAGO1, AtAGO2, AtAGO4, AtAGO5, AtAGO6, AtAGO7, AtAGO9 y AtAGO10 han sido relacionadas funcionalmente con sRNAs (Fang & Qi, 2016). AtAGO1 se asocia a la gran mayoría de los miRNAs y phasiRNAs, posee actividad de corte y media las funciones de estos RNAs pequeños *in vivo*. AtAGO1 y AtAGO10 se encuentran también implicadas en la represión traduccional de mRNAs blancos de miRNAs. AtAGO7 es la única que se asocia preferencialmente a un único miRNA: miRNA 390. En maíz, conduce a la producción de los ta-siRNAs (Chen, 2009; Bonnet, et al., 2006). AtAGO4, AtAGO6 y AtAGO9 (denominado el grupo AGO4 en *A. thaliana*) están relacionadas con modificaciones epigenéticas, en particular con el silenciamiento de transposones y secuencias repetidas mediante la vía RdDM (Pillot, et al., 2010; Havecker, et al., 2010).

Antecedentes

Los mecanismos regulatorios que involucran sRNAs son extremadamente dinámicos, desde su descubrimiento se ha caracterizado su participación en procesos complejos de desarrollo como la embriogénesis (Zhang *et al.*, 2012). Los sRNAs representan un mecanismo potencial para la regulación genética durante la embriogénesis somática porque los blancos de diversos sRNAs expresados diferencialmente durante la inducción y obtención de embriones somáticos son TFs involucrados en la activación espacio/temporal de genes relacionados con el desarrollo. Por ejemplo, los ARFs (que como anteriormente se describió regulan la transcripción de genes de respuesta a auxinas) han mostrado acumulación diferencial durante etapas tempranas de regeneración de embriones somáticos (Shen *et al.*, 2012).

En los últimos años ha surgido evidencia en diversas especies (Pinos, algodón, naranja, arroz y maíz) donde se observan cambios en los patrones de expresión de al menos 10 familias de miRNAs durante la inducción de callos embriogénicos y la regeneración de embriones somáticos (Zhang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). En maíz, genes relacionados con las vías de sRNAs han mostrado importantes cambios en sus patrones de expresión durante el cultivo de tejidos *in vitro* como callos embriogénicos (Alvarez-Venegas *et al.*, 2014). Diversas familias de miRNAs y sus blancos, han mostrado patrones de cambios conservados y coordinados no sólo durante la inducción, sino también durante la regeneración de plantas de maíz a partir de cultivos establecidos de callos embriogénicos (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018; López-Ruiz *et al.*, 2018, 2019).

Se sabe que en embriones inmaduros y callos embriogénicos de maíz a diferentes tiempos de subcultivo existen cambios en la acumulación de distintas poblaciones de sRNAs (Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018). Durante la regeneración, miRNAs, tasiRNAs y TFs claves para el funcionamiento meristemático y diferenciación celular se encuentran regulando las diferentes etapas del proceso regenerativo, saltando a la vista la regulación mediada por miR156, 160, 164, 166, 394 y sus mRNAs blanco (López-Ruiz *et al.*, 2019; Figura VIII). Además, durante la propagación de callos embriogénicos de maíz existe un aumento en la metilación del DNA en regiones que codifican familias de retrotransposones específicos

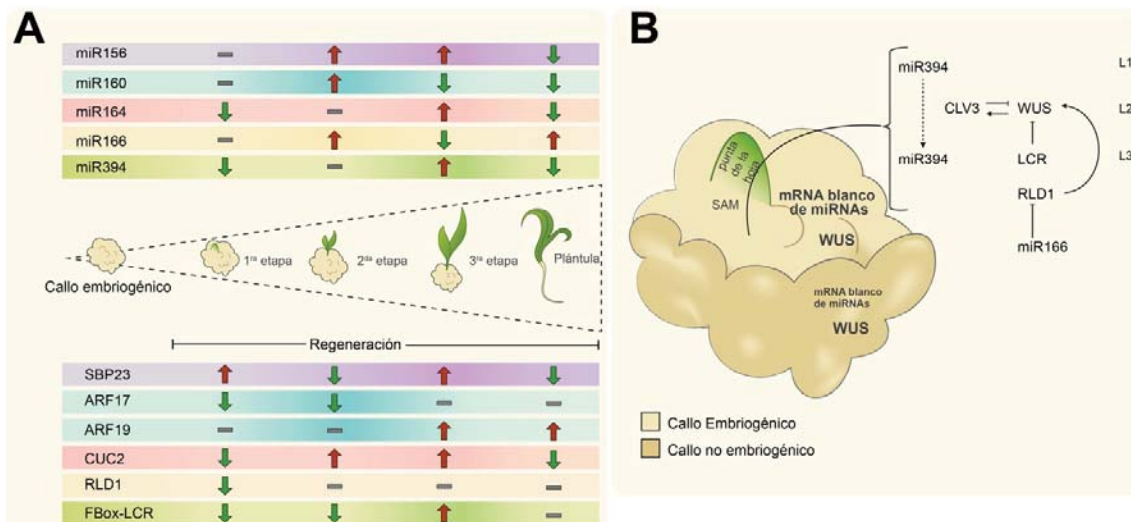


Figura VIII. Modelo propuesto para la acción de los miRNAs durante la regeneración de plantas de maíz VS-535 mediante SE. A) La regeneración de plantas en el maíz VS-535 ocurre de manera basípeta con una mayor acumulación de mRNAs blanco de miRNAs. Cambios en familias específicas de miRNAs y sus blancos ocurren en la segunda y tercera etapa de regeneración. **B)** Existe una acumulación diferencial de mRNAs blanco de miRNAs entre callos embriogénicos y no embriogénicos (una mayor acumulación corresponde a un tamaño de letra más grande). A la derecha, se muestra uno de los módulos regulados por miRNAs, el de miR394, en el que se propone una relocalización y una regulación negativa del TF LCR, resultando en la restricción espacial de WUS después del estímulo de regeneración. De la misma manera, miR166 participa como una señal móvil para el correcto mantenimiento del SAM. Las capas celulares (L1-L3) y la regulación adicional de WUS por CLAVATA (CLV3) se muestran de acuerdo a la literatura (Modificado de Lopez-Ruiz et al., 2019).

(Guerra JL, 2018; Tesis de Maestría), así como un reajuste en las poblaciones de hc-siRNAs de diferentes longitudes (22 y 24 nt; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018), los cuales forman parte de la vía de metilación del DNA, RdDM, mecanismo primordial en plantas para regular la estabilidad del genoma. En maíz, aproximadamente el 85.0 % del genoma se encuentra constituido de secuencias repetidas y TEs; la metilación del DNA permite el control de la expresión de estas secuencias potencialmente peligrosas que pueden interferir con el correcto funcionamiento de secuencias codificantes. Esto es de gran relevancia en la embriogénesis somática, donde son necesarios mecanismos para mantener la estabilidad del genoma por los elevados niveles de proliferación celular.

Planteamiento del Problema

Las vías de silenciamiento genético mediadas por sRNAs tienen un papel relevante durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz. Sin embargo, establecer como los sRNAs pueden influir en la obtención de callos embriogénicos es complejo, dada la diversidad de factores que pueden influir en la capacidad embriogénica de un explante. Se han generado mutaciones en componentes clave para el funcionamiento de las vías de silenciamiento mediadas por sRNAs en algunas variedades de maíz. La disrupción en las vías podría evidenciar cual es el papel de los sRNAs durante la inducción de callos embriogénicos. Desafortunadamente, estas variedades no producen callos embriogénicos (ni siquiera en plantas silvestres). La transformación en maíz no es trivial, establecer una mutación en la variedad VS-535 resulta laborioso y lento (es necesario monitorear la mutación durante varias generaciones de plantas y el desarrollo del maíz VS-535 hasta su floración toma al menos 5 meses), sin contar que algunas de las mutaciones en las vías de sRNAs en maíz provocan esterilidad (Thompson *et al.*, 2014).

Muchos de los procedimientos para la obtención de callos embriogénicos se han desarrollado de manera empírica. En el laboratorio de cultivo de tejidos se investigan las capacidades regenerativas de distintas variedades de maíz, estableciendo a VS-535 como una variedad capaz de generar callos embriogénicos y regenerar plantas a partir de ellos (Garrocho-Villegas & Jesús-olivera, 2012). No obstante, las características de los embriones VS-535 utilizados como explantes y de los callos obtenidos durante la inducción no han sido exploradas a fondo. Resulta indispensable contar con información sobre el estado de desarrollo y el perfil de expresión genética de los explantes utilizados, ya que puede influir directamente en la obtención de callos embriogénicos.

En este proyecto, se compararon los perfiles de expresión genética y la acumulación de las distintas poblaciones de sRNAs durante el desarrollo de embriones cigóticos en diferentes tiempos de desarrollo y durante la inducción de callos embriogénicos de la variedad de maíz Tuxpeño (VS-535). Aunado a esto, los embriones cigóticos fueron caracterizados a nivel morfológico, para poder establecer el estado de desarrollo óptimo para obtener callos embriogénicos capaces de regenerar una planta.

Objetivo General

Determinar la influencia de la regulación genética mediadas por RNAs pequeños (sRNAs) en la inducción de callos embriogénicos a partir de embriones de maíz VS-535 en distintos tiempos de desarrollo.

Hipótesis

- Los tejidos obtenidos a partir de embriones de maíz VS-535 en diferentes etapas de desarrollo tendrán una respuesta embriogénica contrastante. De los tres tiempos de desarrollo embrionario, sólo los embriones inmaduros de 15 DDP pueden producir callos propagables con capacidades regenerativas.
- Los cambios en la acumulación de sRNAs y sus mRNAs blanco durante la inducción de callos embriogénicos serán diferenciales en embriones de maíz con capacidad embriogénica distinta.
- El perfil de expresión genética de los embriones inmaduros de 15 DDP, 23DDP y embriones meduros VS-535, podrá describir, al menos en parte, la respuesta de los callos obtenidos al mes de la inducción de SE.

Objetivos Particulares

- Inducción de callos embriogénicos de maíz VS-535 a partir de embriones de diferentes tiempos de desarrollo.
- Análisis morfológico e histológico de embriones de maíz VS-535 en diferentes tiempos de desarrollo y callos embriogénicos de un mes de subcultivo.
- Análisis del perfil de expresión de genes promotores de la SE en los embriones cigóticos y callos de maíz VS-535.
- Evaluar la acumulación de sRNAs en las distintas etapas de desarrollo de embriones de maíz VS-535 y callos de un mes de subcultivo.
- Obtener las funciones enriquecidas en embriones de maíz VS-535 en distintas etapas de desarrollo y callos al mes de subcultivo.

Metodología

Material Biológico.

Todos los experimentos fueron realizados utilizando maíz VS-535, una variedad obtenida en el estado de Guerrero, proveniente de la raza de maíz Tuxpeño. En el ciclo temporal, su floración es de 53-55 días y alcanza la madurez fisiológica a los 120 días. Las VS (por sus siglas: “Variedad Sintética”) son generadas a partir del interés de tener individuos con distintos caracteres favorables como la productividad, precocidad y resistencia a enfermedades. En general, las VS de maíz se caracterizan por tener una población variable en altura de planta, tamaño de mazorca y una mayor adaptación a condiciones adversas de clima y suelo. El maíz VS-535 es de interés comercial por el tamaño de mazorca y la buena calidad del grano para la molienda tradicional y producción de tortilla (Juárez-González, 2015).

Las plantas se crecieron en invernadero con luz del día y una temperatura entre 25-30 °C. Las polinizaciones fueron realizadas manualmente siguiendo los protocolos establecidos por Sheridan, 1982. Se colectaron embriones inmaduros a los 15 y 23 días después de la polinización (DDP), a partir de la parte media de las mazorcas, teniendo cuidado de tomar embriones de tamaños similares para cada etapa. Los embriones maduros fueron colectados a los 45 DDP. Los embriones colectados fueron divididos en diferentes lotes, los cuales fueron utilizados para la inducción de callos mediante SE, su caracterización morfológica y extracciones de RNA.

Inducción de callos de maíz.

La inducción de callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros de 15 y 23 DDP (IE15 e IE23) y embriones maduros (ME); se realizó siguiendo el protocolo realizado por Juárez-González et al. (2019). Se obtuvieron 3 lotes de callos obtenidos a partir de los tres tipos de embriones: Callos a partir de IE15 (C15), callos a partir de IE23 (C23) y callos a partir de ME (CM). Un mes después de la inducción, se tomaron muestras de los lotes de callos para su análisis morfológico, la extracción de RNA y la construcción de las bibliotecas para los experimentos de secuenciación masiva.

Evaluación del potencial embriogénico

La evaluación del potencial embriogénico de los callos se realizó al mes de subcultivo, siguiendo la metodología reportada por González et al. (2012) con una modificación. El “Line Index” (LI) fue determinado de acuerdo a la siguiente escala fenotípica: 0 = Sin respuesta, 1 = Formación masiva de raíces, 2= Callos acuosos, 3= Callos compactos organogénicos, 4= Pocas estructuras embriogénicas, 5= Callos friables, pocas estructuras embriogénicas, 6= Callos friables, muchas estructuras embriogénicas (Callos Tipo II). Las categorías entre 0 y 3 se consideraron como respuestas no embriogénicas, mientras que aquellas entre 4 y 6 se consideran como respuestas embriogénicas. La Capacidad *In vitro* (IC) fue calculada mediante la obtención de la frecuencia de la respuesta en cada categoría al mes de la inducción de los explantes (IE15, IE23 y ME). Un explante con un LI promedio mayor a 3 se considera “Embriogénico”. El IC describe la frecuencia de cada fenotipo más allá de la clasificación general de “Embriogénico” o “No Embriogénico”. Los análisis estadísticos se realizaron en XLSTAT (2017) mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Tukey para la comparación de grupos.

Extracción de RNA

A partir de las muestras antes de la inducción (IE15, IE23 y ME) y un mes después de la inducción de callos embriogénicos (C15, C23 y CM), se realizó la extracción de RNA utilizando el kit comercial Quick-RNA™ MiniPrep; Zymo Research, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se obtuvieron dos réplicas biológicas y cada extracción se separó por tamaño mediante columnas en dos fracciones: los RNAs de un tamaño menor a 200 nucleótidos (fracción de sRNAs) y RNAs de tamaño ≤ 200 nt (López-Ruiz *et al.*, 2018). La integridad del RNA fue analizada mediante geles de agarosa y posteriormente en un bioanalizador de electroforesis capilar, el Bioanalyzer 2100; Agilent Technologies (ver Métodos, Juárez-González *et al.*, 2019). El número de Integridad del RNA (RIN) para la fracción de RNAs ≤ 200 nt se encontró en un rango de 6.7 y 9.4, para todas las muestras.

Secuenciación masiva y procesamiento (mRNA-Seq y sRNA-Seq).

A partir de las extracciones de RNA, la fracción de sRNAs se destinó para la construcción de las bibliotecas de sRNAs, mientras que la otra fracción se utilizó para la construcción de las bibliotecas de los transcriptomas.

Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología, UNAM; la secuenciación de la fracción de sRNAs se realizó mediante la plataforma NextSeq-2000 Illumina; mientras que la secuenciación de transcriptomas (RNA-Seq) se realizó utilizando tecnología HiSeq-2000-Illumina en formato paired-end. (2X75 ciclos; tamaño lectura de 100nt; ver Métodos, Juárez-González *et al.*, 2019). Los datos de secuenciación de las bibliotecas de mRNA-Seq y sRNA-Seq se encuentran disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) bajo el número de acceso GSE120438.

Alineamiento de lecturas de RNA-Seq con Genoma de Referencia y cuantificación de la abundancia de transcritos.

Se realizó la limpieza de las lecturas en los archivos de secuenciación para la remoción de adaptadores mediante el software Trimmomatic.036 (Bolger *et al.*, 2014). Se unieron las secuencias de todas las muestras en un solo archivo (uno para las lecturas *Forward* (all_foward.fastq) y en otro archivo las lecturas *reverse* (all_reverse.fastq)). Posteriormente se analizó la calidad de las librerías en los dos archivos mediante el software Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

El alineamiento de las lecturas se realizó utilizando Bowtie2 en formato pair-end con los parámetros estandar (permitiendo un máximo de 2 nt sin aparear) (Langmead & Salzberg, 2012). El transcriptoma de referencia utilizado fue el de maíz B73 (AGPv4.37) disponible en la página de Ensembl plants (ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/release-56/fasta/zea_mays/cDNA/). Con base en la anotación de los loci TAS3 (Xia *et al.*, 2017), las locaciones genómicas (coordenadas) fueron utilizadas para obtener las secuencias correspondientes que se utilizaron durante el mapeo de lecturas. La cuantificación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el software RSEM v1.2.31 (Li & Dewey, 2011), normalizando por Lecturas por millón (RPM). La anotación por homología se realizó utilizando los archivos gff y gff3 disponibles en Ensembl (Aken *et al.*, 2016).

Limpieza de lecturas de sRNA-Seq, alineamiento y normalización.

Se realizó la limpieza de las lecturas de los archivos crudos de secuenciación para la remoción de adaptadores mediante el software Trimmomatic.036 (Bolger *et al.*, 2014).

Posteriormente se analizó la calidad de las lecturas mediante el software Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

El alineamiento de las lecturas se realizó con una aproximación de lecturas sin splicing, mediante el método transformación de Burrows-Wheeler, utilizando el alineador Bowtie2 sin permitir mismatches ($n = 0$) (Langmead & Salzberg, 2012). La referencia utilizada fue el genoma de maíz B73 (RefGen_V4) disponible en la página de Ensembl plants (ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/release-55/fasta/zea_mays/dna/Zea_mays.AGPv4.dna.toplevel.fa.gz). Los archivos de alineamiento BAM con las lecturas que mapean en el genoma de referencia se convirtieron en archivos Fastq utilizando la utilidad bamtofastq de Bedtools v2.26.0 (Quinlan & Hall, 2010). A partir de estos archivos se removieron las secuencias correspondientes a rRNAs, tRNAs, snRNAs y snoRNAs, realizando un segundo alineamiento con Bowtie2; utilizando como referencia las secuencias anotadas en Genbank y en el archivo de ncRNAs correspondiente al genoma de referencia (ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/release-55/fasta/zea_mays/ncrna/Zea_mays.AGPv4.ncrna.fa.gz). Los archivos de alineamiento BAM que no alinearon con la referencia (--un-gz) se convirtieron en archivos Fastq mediante bamtofastq de Bedtools v2.26.0, los archivos resultantes representan las bibliotecas que mapean con el genoma de referencia, libres de adaptadores y que no corresponden a rRNAs, tRNAs, snRNAs y snoRNAs. Para el filtrado de lecturas procesadas con tamaños entre 18-27 nt y la generación de los archivos de conteos de lecturas únicas (tag-count) en cada librería, se utilizó el script preprocess (Mathioni *et al.*, 2017). Finalmente, se realizó la normalización en lecturas por diez millones (RPTM). Las bibliotecas fueron almacenadas en la base de datos: Next-Gen Sequence Database (Nakano, 2006; Nakano *et al.*, 2019) para posteriores análisis.

Identificación de miRNAs y sus transcritos blanco.

Mediante la herramienta en línea miRNA similarity de Next-Gen Sequence Database (Nakano, 2006; Nakano *et al.*, 2019) se realizó la búsqueda de secuencias correspondientes a miRNAs y secuencias similares a las anotadas por mirBASE volumen 21 (Griffiths-Jones, 2010). Se seleccionaron como miRNAs a las secuencias canónicas reportadas en mirBASE y como miRNAs similares a las secuencias con +/- 2 nt diferentes en el extremo 5' o 3' de la secuencia y que no correspondiesen a un miRNA de la misma

familia. Se sumaron las lecturas similares y la secuencia canónica correspondiente para cada miRNA en cada una de las bibliotecas.

La predicción de transcritos blanco de miRNAs se realizó utilizando dos herramientas: 1) *Target Prediction* de Next-Gen Sequence Database (Nakano, 2006) utilizando los parámetros estándar de puntaje (≤ 2.5 Score, 2.0 Bulge, 1.0 Mismatch, 0.5 Wobble. Perfect match 10/11 nt, no más de 1 mismatch en las posiciones de 2-9, ignorando la penalización por mismatch en la primera posición del extremo 5') y 2) psRNATarget (Dai & Zhao, 2011), utilizando los parámetros de puntaje del esquema V2 (≤ 3 Expectation, 1 penalización por par G:U, 1.0 Mismatch, 0.5 Wobble. Perfect match 10/11 nt, región semilla de 2-13 nt). Además de la predicción de blancos se tomaron los datos de las bibliotecas PARE de diferentes tejidos de maíz disponibles públicamente en Next-Gen Sequence Database (Pollen maduro B73: GSM1262608; Polen maduro mutantes mop1: GSM1262609; Anteras de 1.0 – 1,5 mm B73: GSM1262610; Anteras de 2.0 – 2,5 mm B73: GSM1262611, Anteras de 4.0 mm y polen maduro B73: GSM1262612; Mazorcas Etapa I: SRX300975; Mazorcas Etapa II: SRX300976; Mazorcas Etapa III: SRX300977 y Mazorcas Etapa IV: SRX300978) y se utilizaron para obtener los blancos de miRNAs comprobados experimentalmente utilizando la herramienta comPARE (PARE Validated miRNA Targets) disponible en Next-Gen Sequence Database (Nakano, 2006; Nakano *et al.*, 2019).

Identificación de loci PHAS.

La predicción y comparación de phasiRNAs y sus precursores se realizó mediante la suite PHASIS.V3 (Kakrana *et al.*, 2017) con un tamaño de fase de 21 y 24 nt, un valor de corte de p-value 1×10^{-6} y ningún mismatch. Se utilizó como genoma de referencia *Zea_mays*.AGPv4. Para el cálculo del *Phasing Score* se utilizó el algoritmo reportado por De Paoli *et al.*, 2009.

Identificación de ta-siRNAs y ARFs blancos de ta-siRNAs.

Mediante la herramienta Phasing Analysis Window (21 nt cycle) de Next-Gen Sequence Database (Nakano, 2006) se obtuvieron las lecturas en cada biblioteca que mapean en los 9 genes TAS3 reportados en maíz (Dotto *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2017). Se filtraron las lecturas de 21 nt y se generó el análisis de fase de cada loci TAS3; a partir de la o las secuencias de ta-siARFs maduros en cada locus, se sumaron las secuencias +/- 2 nt en

cada fase de 21 nt, calculando el *Phasing Score* (De Paoli *et al.*, 2009) para cada ciclo y locus TAS3. A partir de estos resultados, se obtuvo la abundancia de los 11 ta-siARFs maduros reportado previamente (Dotto *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2017).

Se obtuvieron las secuencias de los 36 transcritos identificados como ARFs en maíz (MaizeGDB), se realizó un alineamiento de las secuencias con MUSCLE.v5 (Edgar, 2004) y se generó una reconstrucción filogenética utilizando MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

A partir de los datos publicados por Xia *et al.* (2017) se obtuvieron las secuencias de los sitios de reconocimiento de los blancos de ta-siARFs y las secuencias de ARFs identificadas como blanco de ta-siARFs; y se realizó un Blastn (Altschul *et al.*, 1990) entre los sitios de reconocimiento del blanco (*DB*) y las secuencias de los 36 ARFs en maíz (*query*). Sólo los ARFs que resultaron como un hit de Blast se tomaron como blanco de ta-siARFs.

Distribución sRNAs por tamaño

Para el análisis de la distribución de sRNAs por tamaño, los archivos tag-count generados previamente se separaron en archivos individuales (18-27 nt). El número total de las lecturas fue calculado en cada muestra.

Identificación de hc-siRNAs

Para el análisis de sRNAs que mapean en Elementos transponibles (hc-siRNAs), se utilizaron los archivos tag-count de 21-24 nt (las lecturas correspondientes a miRNAs y tasiRNAs fueron descartadas). Las lecturas de cada tamaño fueron mapeadas a las secuencias de Transposones (TE), utilizando el archivo de notación de transposones gff3 (B73v4.TE.filtered.gff3) disponible en los archivos de anotación de maíz de Ensembl (Aken *et al.*, 2016). Se separaron las lecturas que mapean en TE (hcsiRNAs) en doce superfamilias de TE: Retrotransposones (RIL, RIT, Copia, Gypsy, Unknown-LTR, tRNA) y Transposones de DNA (Helitron, PIF-Harbinger, CACTA, hAT, Mutator, Mariner). Dado que muchas lecturas mapean en múltiples superfamilias de TE, se realizó una normalización mediante el número de veces que una lectura mapeaba en las superfamilias de TE (Bousios *et al.*, 2016). Finalmente, se realizó la normalización mediante RPTM.

Análisis de Expresión Diferencial.

Tanto para las secuencias de las diferentes poblaciones de sRNAs como para las secuencias de transcritos, el análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2015), siguiendo el protocolo estándar de la paquetería DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Los gráficos fueron generados con el paquete gplots (Warnes *et al.*, 2016), ggplots2 (Wickham & Chang, 2016) y la herramienta en línea para la construcción de diagramas de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Análisis de Enriquecimiento Funcional

A partir de los resultados de expresión diferencial, se tomaron aquellos genes con valores de Expresión Diferencial de +/- 2 veces de cambio ($\log_2FC \pm 1$) y un valor de significancia estadística menor a 0.05 ($P\text{-adj} < 0.05$). Los transcritos seleccionados se ordenaron de mayor a menor valor de veces de cambio. Como base de datos se utilizó la categoría de Procesos Biológicos de Gene Ontology (GO) de maíz, obtenida de MaizeGDB. Para realizar el análisis de Enriquecimiento Funcional se utilizó el software de GSEA (Subramanian *et al.*, 2005), y la visualización de los procesos biológicos enriquecidos en redes de co-expresión se realizó utilizando Cytoscape (El-kebir, 2014), tomando en cuenta sólo los valores de enriquecimiento $p < 0.05$ y un grado de conectividad mayor a 0.6. Todo el análisis se realizó siguiendo el protocolo de Reimand *et al.*, 2019.

Análisis de abundancia y enriquecimiento de Factores Transcripcionales.

Se identificaron las secuencias de los 2605 Factores Transcripcionales reportados en maíz en la base de datos GRASSIUS (Yilmaz *et al.*, 2009). Se obtuvieron las lecturas normalizadas para cada familia de TFs. Para el análisis de enriquecimiento, se obtuvieron los transcritos con valores de Expresión Diferencial de +/- 2 veces de cambio ($\log_2FC \pm 1$) y un valor de significancia estadística menor a 0.05 ($P\text{-adj} < 0.05$). Como base de datos se utilizó GRASSIUS. Se utilizó el software en línea g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler>), tomando en cuenta sólo los valores de enriquecimiento $p < 0.05$. Todo el análisis se realizó siguiendo el protocolo de Reimand *et al.*, 2019.

Resultados

Siembra de maíz variedad VS-535, cosecha de mazorcas y obtención de muestras.



Figura 1. Crecimiento de las plantas de maíz variedad VS-535

Para poder conocer el potencial embriogénico y regenerativo de los embriones de maíz en distintas etapas de desarrollo, fue necesario sembrar, crecer y polinizar maíz de la variedad VS-535 (se caracteriza por su alta capacidad embriogénica). Posteriormente, se realiza la cosecha de mazorcas a diferentes tiempos después de la polinización (DDP).

Como no se conocían las características de crecimiento y floración de la variedad de maíz VS-535 en invernadero, se realizó una siembra espaciada de dos lotes de maíz. Los fenotipos de las plantas fueron variados, alcanzando una altura de entre 2.5 a 4 metros, las plantas presentaron abundante tejido foliar y la aparición de las inflorescencias masculinas y femeninas comenzó a las 16 y 19 semanas, respectivamente. Se realizaron 8 rondas de polinización manual, de las cuales se obtuvieron mazorcas con embriones inmaduros 15 DDP (IE15), los cuales representan el explante mayormente utilizado para la inducción de SE; de 23 DDP (IE23), explante que cae fuera de la ventana de tiempo sugerida para la inducción de SE y embriones maduros (ME) como control negativo, ya que son incapaces de generar callos embriogénicos. A partir de estos tres lotes de mazorcas en diferentes tiempos de desarrollo, se obtuvieron los embriones, los cuales se utilizaron para la caracterización histológica de las muestras, la inducción de SE y la construcción de las bibliotecas de sRNA-Seq y RNA-Seq.

Los embriones de maíz se encuentran en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Con el fin de conocer las etapas de desarrollo correspondientes a los tres tiempos de desarrollo utilizados para el muestreo (IE15, IE23 y ME), se realizaron cortes histológicos

de los embriones. Se encontró que ninguna muestra presenta un desarrollo temprano, es decir todos los embriones han pasado de la etapa coleoptilar y presentan características morfológicas de las etapas de hoja (Figura 2). El análisis y el establecimiento de la identidad de las estructuras está basado en las descripciones anatómicas realizadas por Essau, 1976 y Fanh, 1972, observando múltiples muestras (al menos n=10).

En IE15, es posible observar el primer o segundo primordio de hoja surgiendo de la parte basal del SAM, donde el anillo coleoptilar cierra (Figura 2b y 2d). Por lo que los IE15, se encuentran en etapa hoja 1 y hoja 2 (L1-L2), conservan el suspensor (Figura 2a) y la estructura del meristemo apical de la raíz (RAM) aun no se encuentra bien diferenciada (Figura 2c). El Meristemo apical del brote (SAM) se encuentra bien diferenciado y el anillo coleoptilar cerrado (Figura 2b y 2d).

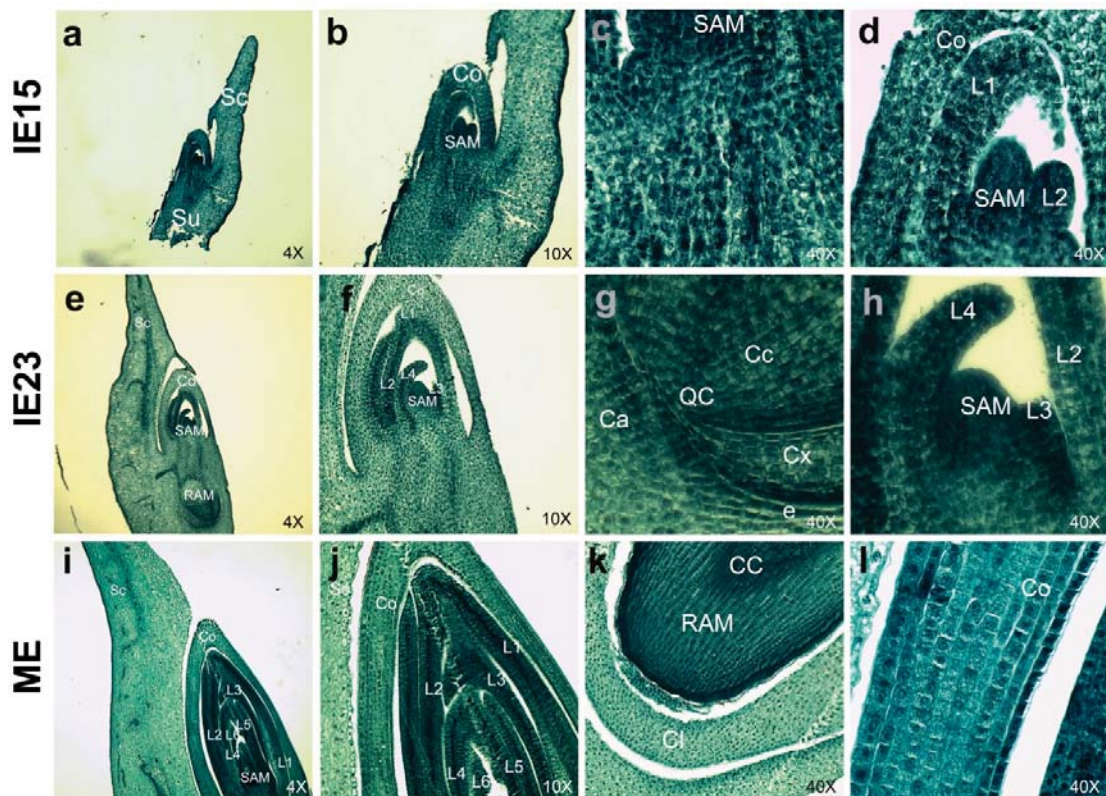


Figura 2. Cortes longitudinales de Embriones Inmaduros de maíz 15; 23 DDP y Embriones Maduros (IE15, IE23 y ME, respectivamente). Tinción Safranina "O" Verde Rápido. Se muestra IE15 en etapa Hoja 2 (a-d; Paneles superiores); IE23 en etapa Hoja 4 (e-h; Paneles centrales) y ME en etapa Hoja 6 (i-l; Paneles inferiores). Su: Suspensor; Sc: Escutelo; SAM: Meristemo apical del brote; Co: Coleoptilo; RAM: Meristemo apical de la raíz; L1-L6: Primordio foliar 1-6; Ca: Caliptra; QC: Centro quiescente; Cx: Cortex; Cc: Cilindro central; e: Epidermis.

En IE23, el suspensor se ha degenerado, el RAM está diferenciado (Figura 2e). Es posible identificar de 4 a 5 primordios de hoja. Los IE23 se encuentran en etapas L4-L5, (Figura 2f). Las diferencias entre IE23 y SE ME basan en el mejor empaquetamiento de las células en CM (Figura 2i), la presencia de células epidérmicas separando el RAM de la caliptra y en el coleoptilo (Figura 2k, l), el cual flanquea los seis primordios de hoja presentes en ME (L1-L6; Figura 2j).

A nivel morfológico, las tres muestras de embriones difieren enormemente en tamaño, IE15 miden ~4.0 mm (Figura 3a), mientras que IE23 presentaron el doble del tamaño, al igual que los ME comparados con los IE23 (Figura 3f y 3k). Además, la coloración amarillenta de los ME, indica el inicio de la etapa de desecación (Figura 3k). Finalmente, el tamaño de los embriones de un mismo tiempo de desarrollo fue homogéneo, por lo que se considera que los embriones de un mismo lote poseen características parecidas. Con base en estos resultados es posible concluir que los tres explantes utilizados (IE15; IE23 y ME), se encuentran en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

IE15 tiene la capacidad de generar callos embriogénicos propagables y regenerar una planta.

Para evaluar la respuesta de los explantes al proceso de inducción de SE, se indujeron los IE15, IE23 y ME en medio de cultivo N6I durante dos semanas, posteriormente los tejidos fueron colocados en medio de cultivo de proliferación (N6P; ver Métodos), para ser subcultivados cada tres semanas en el mismo medio. A partir de la inducción, se tomó muestra cada semana durante el primer mes, así como muestra a los dos, tres, cuatro y seis meses después de la inducción. Mediante cortes histológicos se analizó la morfología de los tejidos y los cambios que sufren a nivel celular.

La respuesta de los tres lotes de embriones a las condiciones de inducción es diferente. Un mes después de la inducción, los tejidos resultantes de IE15 (a partir de ahora nombrados como "C15") muestran necrosis del explante inicial y es apreciable la formación de callo, que por su color y morfología puede ser de Tipo I y II (Figura 3b-c). Los de tipo II (CEII) son friables, de color amarillento claro, a diferencia de los callos tipo I (CEI), cuyo color característico es blanco opaco, no son disgregables y a través de los subcultivos se degeneran, oxidan y el tejido muere. Por su parte al mes de la inducción en los cultivos de

IE23 y ME (nombrados a partir de ahora como “C23” y “CM”, respectivamente), no se produce CEII (Figura 3g-h y 3l-m). Tanto en C23 como en CM, los embriones se hinchan en la parte posterior al eje embrionario, el escutelo se engrosa y existe una producción masiva de raíces, aun mayor en CM (Figura 3m).

Con base en estas observaciones se puede afirmar que al mes de la inducción los tejidos en C15 son CEII y CEI (Figura 3c). De manera general, los tejidos de C23 no son embriogénicos (Figura 3h); sin embargo, una pequeña proporción de embriones presentaron respuesta embriogénica formando CEI, mientras que otros embriones del lote se hincharon o germinaron. Y finalmente, la principal respuesta del lote CM fue la germinación (Figura 3m). Los embriones que no germinaron permanecieron intactos con zonas de oxidación y necrosis.

Con el fin de evaluar los cambios a nivel celular que sufren los embriones durante el proceso de inducción de SE, se realizaron cortes histológicos en al menos 10 muestras de C15, C23 y CM al primer mes de la inducción. Los tres lotes de callos presentan diferenciación de tejidos vasculares (presencia de células procambiales y parenquimáticas; elementos traqueales; Schuetz, 2013; Figura 3e, 3j y 3o). El sistema vascular observado en los cultivos se desarrolla erráticamente, presentando diferentes direcciones y planos en los tejidos (Figura 3i), además de una gran proporción de células parenquimáticas (Figura 3d, 3i y 3n). A pesar del parecido en los tejidos de distintos lotes, C15 presentan una mayor desorganización celular comparada con C23 y CM y a las 4 semanas de la inducción, sólo en C15 es posible observar cúmulos de células pequeñas isodiamétricas, densamente empacadas, características principales de las células meristemáticas (Essau, 1972; Figura 3d). Estos cúmulos celulares se encuentran principalmente en los límites de los tejidos, están constituidos por capas de diferentes tipos celulares, una capa de células parenquimáticas, un cúmulo de células alargadas, una capa de células parenquimáticas rodeadas a su vez por las células densamente empaquetadas (Figura 3d).

La evaluación de la capacidad en la respuesta al cultivo *in vitro* se realizó en los tres lotes de embriones sometidos al proceso de inducción de CE. El primer parámetro para evaluar fue el índice de la línea (LI, por sus siglas en ingles “Line Index”; ver Métodos), el cual indica si un lote de embriones es capaz de generar una respuesta favorable para la formación de callos embriogénicos (respuesta embriogénica). Posteriormente se calculó la Capacidad

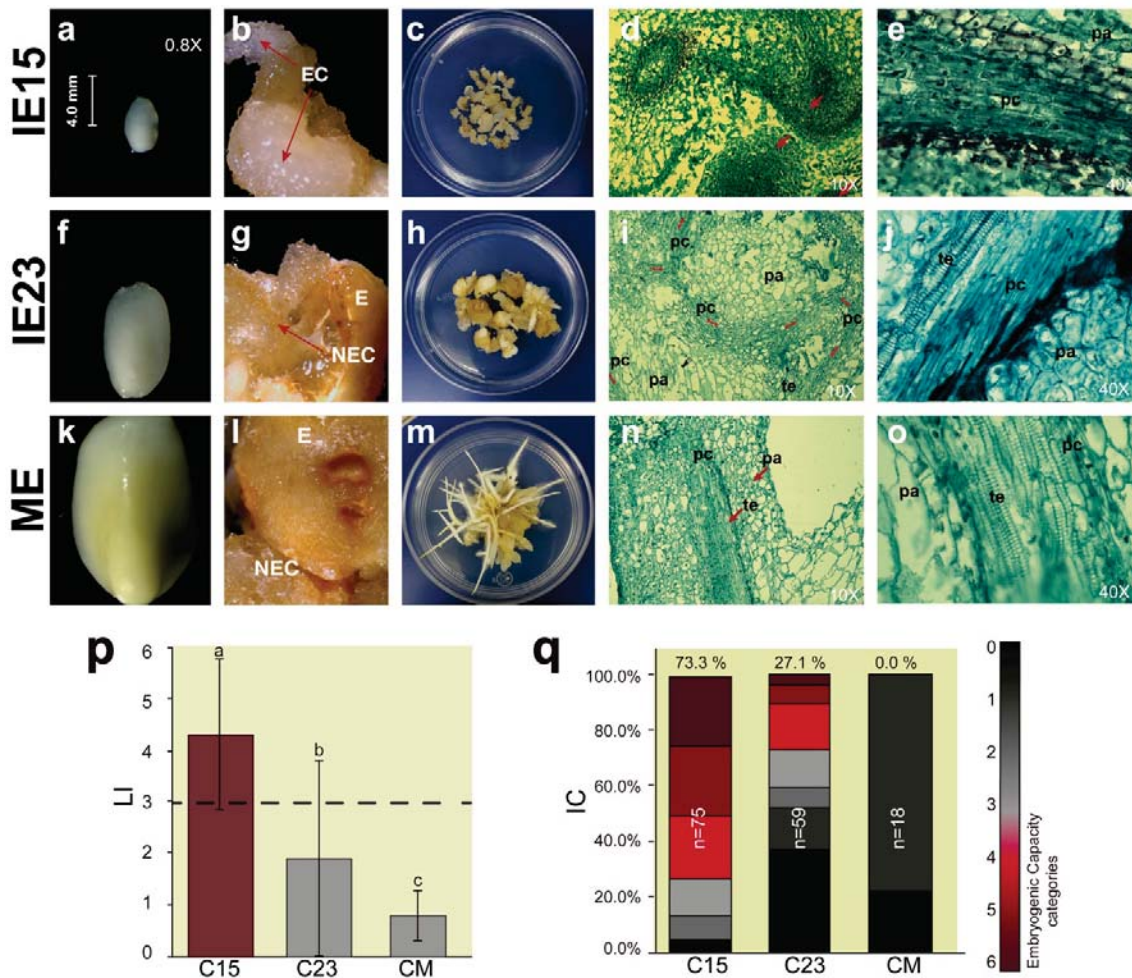


Figura 3. Caracterización Morfológica e Histológica de Embriones en diferentes etapas de desarrollo y callos 1 mes después del proceso de inducción de Embriogénesis Somática. Embriones de 15, 23 días después de la polinización (IE15 y IE23; a y f, respectivamente) y Embriones maduros (ME; k). Callos obtenidos a partir de IE15 (b-c), IE23 (g-h) y ME (l-m) un mes después de la inducción. Organización celular en callos obtenidos a partir de IE15 (d), IE23 (i) y ME (n), durante el primer mes después de la inducción. Desarrollo temprano de tejidos vasculares 1 semana después de la inducción de IE15 (e), IE23 (j) y ME (o). Evaluación de la respuesta embriogénica (p-q). Line index (LI; p) y Capacidad de los lotes *in vitro* (IC; q). El análisis se realizó basándonos en el reporte de González et al., 2012. Cortes histológicos de 12 μ m. Tinción Safranina-Verde rápido. L1-L6: Primordios de hoja L1-L6. Co: Coleoptilo; Sc: Escutelo; SM: Meristemo Apical; RM: Meristemo Radicular; Ca: Caliptra; E: embrión; CEI: Callos embriogénicos tipo I; CEII: Callos embriogénicos tipo II; NEC: Callo no embriogénico; te: Elementos traqueales; pc: procambium; pa: células parenquimáticas; pc: procambium; pa: células parenquimáticas; te: elementos traqueales; pm: pseudomeristemas; pa: células parenquimáticas; pc: células procambiales. Figura modificada de Juárez-González *et al.*, 2019.

del lote *in vitro* (IC), en el que se evalúa la proporción de embriones en el lote que son capaces de formar callos embriogénicos.

De los tres lotes de embriones, solamente IE15 (embriones en etapas L1-L2) posee una respuesta embriogénica (LI = 4.3; Figura 3p). Según el LI, se considera a un lote como embriogénico si posee un valor de LI > 3 (González *et al.*, 2012). En el lote de IE15, el 73.3

% de los embriones poseen una respuesta embriogénica (Figura 3q); mientras que en IE23 sólo el 27.1 % de los embriones tienen respuesta embriogénica, por lo que no se considera un lote no embriogénico (LI=1.8; Figura 3p). En cuanto al lote de ME, ningún embrión maduro tiene la capacidad de generar callos embriogénicos (al menos en las condiciones de inducción utilizadas; Figura 3p-q).

Dado que la inducción y obtención de callos embriogénicos sólo representa la parte inicial del proceso de SE, en el que la presencia de callos embriogénicos no garantiza las propiedades regenerativas de un tejido explante, se continuó subcultivando los tejidos para establecer la etapa proliferativa de los callos embriogénicos y posteriormente la regeneración de plantas a partir de estos callos. Se observó que, durante los dos y tres meses de subcultivo, las características de los callos a nivel morfológico son muy parecidas a las encontradas al mes de la inducción (Figura 4a).

A partir de las seis semanas C15 muestra actividad proliferativa (cuantificada mediante el peso fresco de los tejidos durante las primeras catorce semanas) y continuó proliferando durante los subcultivos (Figura 4b). En contraste, C23 mostró bajos niveles de proliferación durante los primeros meses; mientras que CM no proliferó y con el paso de los subcultivos, la mayor parte del tejido muere (Figura 4b). A los seis meses de inducción fue posible identificar las características morfológicas más contrastantes entre los lotes: C15 prolifera y tienen un tejido homogéneo representado en gran parte por callo embriogénico del Tipo II (Figura 4a-J). C23 no prolifera, pero presentó los cuatro callos descritos para maíz: callos embriogénicos Tipo I y II, callos organogénicos y callos no embriogénicos, la proporción de callos embriogénicos es mucho menor comparada con los otros dos tipos (Figura 4a-K). CM no prolifera ni forma callo embriogénico, las únicas estructuras visibles son raíces en degeneración y callo no embriogénico acuoso. (Figura 4a-L). Después de los seis meses de subcultivo, C23 continuó oxidándose, por lo que sólo fue posible regenerar plantas a partir de C15 un año después de la inducción (Figura 4c).

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que el mejor explante para inducir callos embriogénicos de maíz de la variedad VS-535 y regenerar plantas, son embriones en etapas de desarrollo L1-L2 (IE15). Los embriones en etapas L3-L4 (IE23), son capaces de producir callos embriogénicos después de varios meses de subcultivo; pero no proliferan

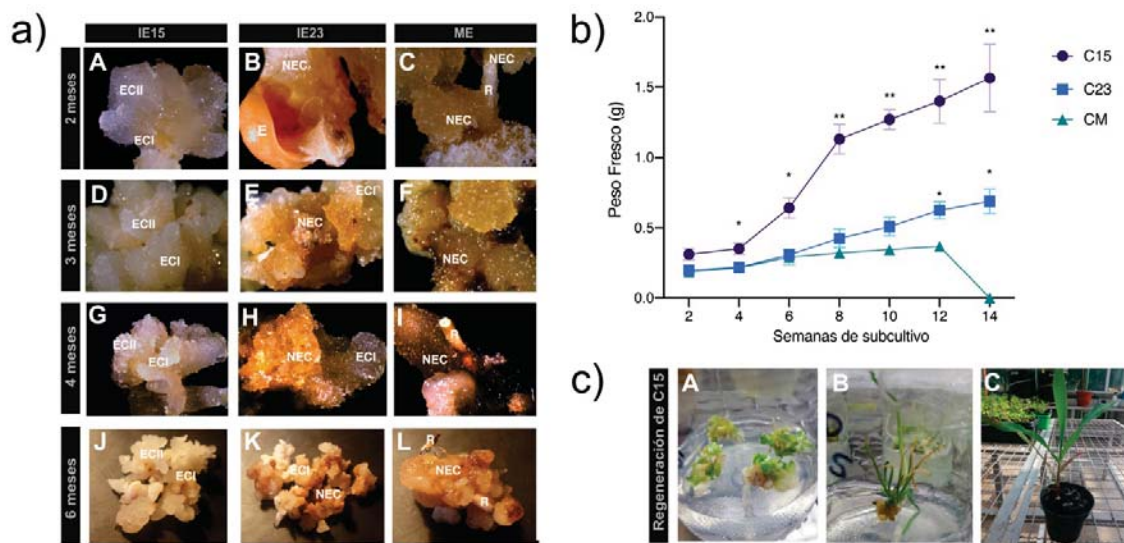


Figura 4. Diferencias fenotípicas de los callos inducidos a partir de embriones de maíz VS-535 en diferentes etapas de desarrollo (IE15, IE23 y ME). a) Seguimiento de los subcultivos a diferentes tiempos (2 – 6 meses) para C15 (páneos de la izquierda), C23 (páneos centrales y CM (Páneos a la derecha). ECI: Callos embriogénicos Tipo I; ECII: Callos embriogénicos Tipo II; NEC: Callos no embriogénicos; R: raíz. b) Perfiles de proliferación de C15, C23 y CM durante 14 semanas de subcultivo. Se cuantificó el peso fresco a diferentes tiempos en los tres subcultivos. Se graficó la media del peso fresco de cada lote (señalando con barras de desviación estándar). Los datos fueron analizados utilizando una prueba estadística de varianza ANOVA de dos factores con una prueba Tukey para las múltiples comparaciones (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$. c) Regeneración de plantas a partir de C15 al año de subcultivo. A: 2 semanas en luz y depleción de hormonas B: 2 semanas en luz y depleción de hormonas + 2 semanas en medio MS y condiciones de luz. C: 2 semanas en luz y depleción de hormonas + 2 semanas en medio MS y luz + 4 semanas en suelo. No se lograron regenerar plantas de C23 y los tejidos de CM murieron entre los 4-6 meses de subcultivo.

ni regeneran plantas. Los embriones maduros (ME) no tienen la capacidad de producir callos embriogénicos y durante los subcultivos el tejido se oxida hasta que se observa una necrosis total del mismo. El potencial embriogénico disminuye dramáticamente en embriones de 23 DDP y es nulo en etapas posteriores del desarrollo embrionario.

Obtención de perfiles transcripcionales durante la inducción de callos embriogénicos de maíz a partir de embriones en diferentes etapas de desarrollo: Las mayores diferencias en cuanto expresión genética están dadas antes de la inducción de SE.

Para evaluar y contrastar los patrones de expresión genética de los embriones en diferentes etapas de desarrollo (IE15, IE23 y ME) y los callos después de un mes de inducción de callos (C15, C23 y CM), se secuenciaron los transcriptomas de todas las muestras con una réplica biológica (ver Métodos).

Después de la remoción de los adaptadores de secuenciación, las lecturas fueron filtradas por un valor de calidad PHRED mayor a 20 y la longitud promedio fue de 100 pb. Se obtuvo el número de lecturas en cada biblioteca. El promedio de lecturas fue de 15,036,824 +/- 3,126,765 lecturas. La biblioteca con mayor y menor número de lecturas son ME Réplica 2 (ME_2) y CM Réplica 1 (CM_1), respectivamente (Tabla 1). Las lecturas fueron filtradas por un valor de calidad PHRED mayor a 20 y la longitud promedio fue de 100 pb.

Se realizó el alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia de maíz B73 (AGPv4.37). Se obtuvieron porcentajes de alineamiento concordantes de entre 81.4-72.9% y el número de lecturas que mapean en el genoma de referencia se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Total de lecturas secuenciadas y alineadas.

Biblioteca	Total de Lecturas pareadas después de limpieza de adaptadores	Total de lecturas que mapean en Genoma de Referencia (AGPv4.37)	% Lecturas Alineadas
IE15_1	16,319,115	13,387,600	82.04%
IE15_2	15,073,636	12,441,900	82.54%
IE23_1	16,298,410	13,404,500	82.24%
IE23_2	18,594,128	15,130,100	81.37%
ME_1	13,437,020	9,957,950	74.11%
ME_2	21,470,921	15,650,400	72.89%
C15_1	14,523,837	11,609,500	79.93%
C15_2	16,066,260	12,218,300	76.05%
C23_1	14,604,648	11,349,200	77.71%
C23_2	13,008,937	10,241,000	78.72%
CM_1	9,711,878	7,825,330	80.57%
CM_2	11,333,095	9,061,980	79.96%
PROMEDIO	15,036,824	11,856,480	78.85%
SD	3,126,765	2,353,270	75.26%

Posteriormente, se calculó la abundancia de los transcritos en las bibliotecas (ver Métodos), se construyeron matrices de expresión con cuentas crudas y normalizadas por transcritos por millón (TPM). La mayoría de los genes expresados tienen bajos conteos de TPM (Figura 5a). De los 46,281 genes anotados en el genoma de referencia, 36,282 tienen al menos 1 TPM en alguna de las bibliotecas. Para evaluar la correlación entre las réplicas

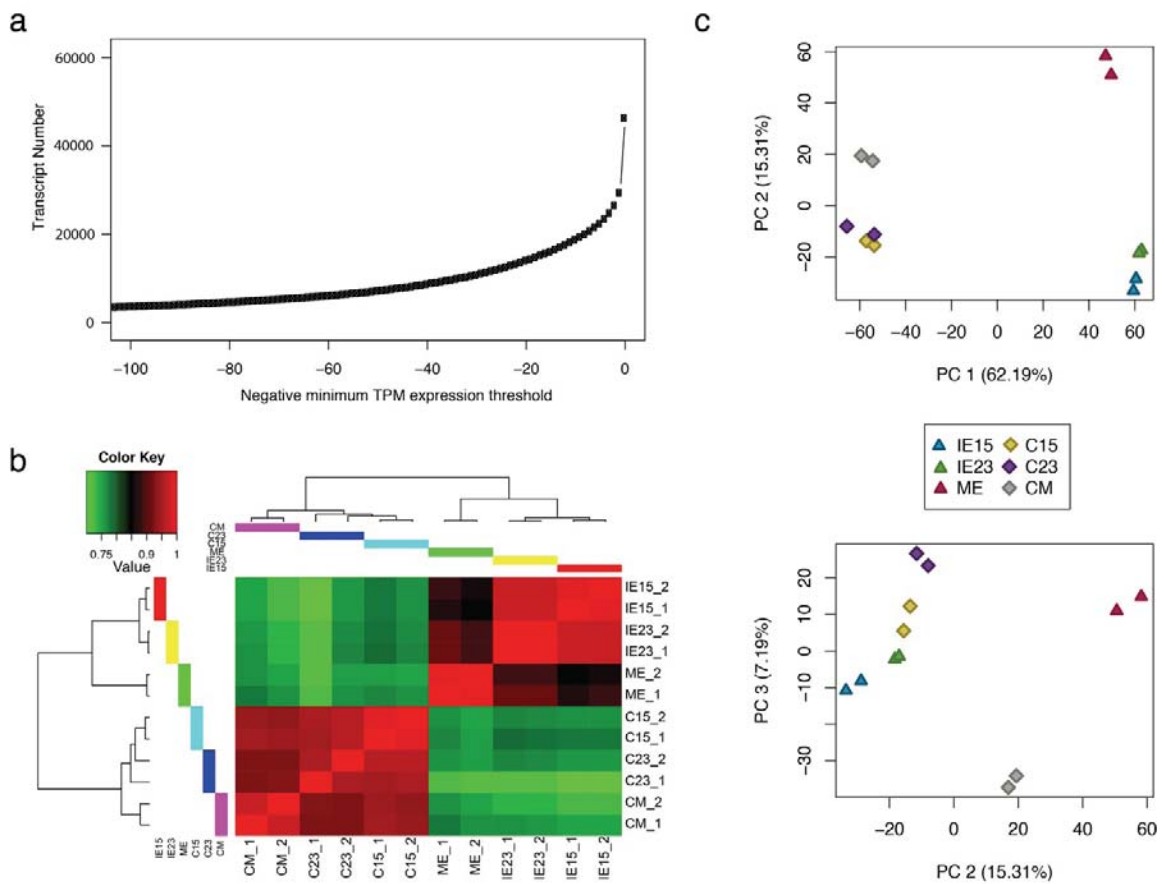


Figura 5. Evaluación de la abundancia y correlación de las bibliotecas de transcriptomas de embriones de maíz y tejidos después de un mes de Inducción de SE. **a)** Aproximación sobre el número de Genes expresados. Gráfico del número de transcritos en función de un valor de corte de TPM ($\text{TPM} \leq 1$). **b)** Matriz de correlación de muestras. **c)** Gráficos de componentes principales. La distancia entre las muestras se encuentra relacionada con las diferencias en la expresión genética entre las mismas. IE15, IE23 y ME: Embrión de 15, 23 DDP y Embrión maduro, respectivamente. C15, C23 y CM: Callos 1 mes después de inducción obtenidos a partir de IE15, IE23 y ME, respectivamente.

biológicas, se realizó una matriz de correlación entre las abundancias de cada muestra. Existe una mayor correlación entre réplicas biológicas que entre tejidos (Figura 5b). El agrupamiento de las muestras de acuerdo a las abundancias de lecturas también separa a los explantes iniciales (embriones) de los tejidos un mes después de la inducción (callos) en dos ramas independientes (Figura 5b).

El cálculo de la dispersión común entre las muestras permite observar la variación entre réplicas y las distancias entre las mismas. Los datos obtenidos a partir de los transcriptomas de los tejidos muestran cuatro patrones generales (Figura 5c):

- 1) Las réplicas biológicas presentan la menor dispersión.
- 2) Los tejidos con menor variación en la expresión genética entre si son los callos.

Tabla 2. Transcritos Diferencialmente Expresados

Comparación	UP Regulated	Non DE	Down Regulated
IE15 vs IE23	410	27,818	1,139
IE15 vs ME	4,337	19,209	5,821
IE23 vs ME	3,521	20,720	5,126
IE15 vs C15	5,172	16,804	7,391
IE23 vs C23	5,334	16,568	7,465
ME vs CM	5,349	17,993	6,025
C15 vs C23	639	28,052	676
C15 vs CM	1,382	26,584	1,401
C23 vs CM	1,847	25,890	1,630

3) Los explantes iniciales (embriones) presentan la mayor variación en la expresión genética entre si; comparados con los callos.

4) Los embriones IE15 e IE23 muestran menor variación genética comparados con los embriones maduros.

De los 36,282 que presentaron conteos (TPM); se filtraron aquellos transcritos de baja o nula expresión (menos de 1 TPM en ambas réplicas), resultando 29,367 transcritos en los que se calculó la expresión diferencial entre 9 comparaciones, que se pueden agrupar en 3 categorías:

A) Comparaciones durante el desarrollo del embrión cigótico (Embriones vs Embriones):

- Embrión 15 DDP vs Embrión 23 DDP (IE15 vs IE23).
- Embrión 15 DDP vs Embrión Maduro (IE15 vs ME).
- Embrión 23 DDP vs Embrión Maduro (IE23 vs ME).

B) Comparaciones durante la Inducción de SE (Embriones vs Callos):

- Embrión 15 DDP vs Callos a partir de IE15 (IE15 vs C15).
- Embrión 23 DDP vs Callos a partir de IE23 (IE23 vs C23).
- Embrión Maduro vs Callos a partir de ME (ME vs CM).

C) Comparaciones después de la Inducción de SE (Callos vs Callos):

- Callos a partir de IE15 vs Callos a partir de IE23 (C15 vs C23).
- Callos a partir de IE15 vs Callos a partir de ME (C15 vs CM).
- Callos a partir de IE23 vs Callos a partir de ME (C23 vs CM).

El perfil de expresión genética en cada explante puede guiarnos en la búsqueda de diferencias particulares y necesarias para la reprogramación exitosa durante la inducción de SE y la formación de callos embriogénicos tipo II. Por otro lado, la comparación entre el explante inicial y los tejidos en inducción de SE, permite evaluar los cambios que se establecieron durante el mes de inducción, los cuales pueden relacionarse con las observaciones fenotípicas obtenidas anteriormente en los tres diferentes callos inducidos. Finalmente, a partir de los perfiles de expresión genética de los callos, se pueden identificar diferencias que pudieran asegurar el éxito de los tejidos capaces de formar callos embriogénicos tipo II. La expresión diferencial se realizó estableciendo un valor de corte de $\leq 1 \log_2FC$ (logaritmo base 2 de veces de cambio; "Fold Change") y un valor de significancia máxima ajustada de 0.05 (p -value adjust >0.05).

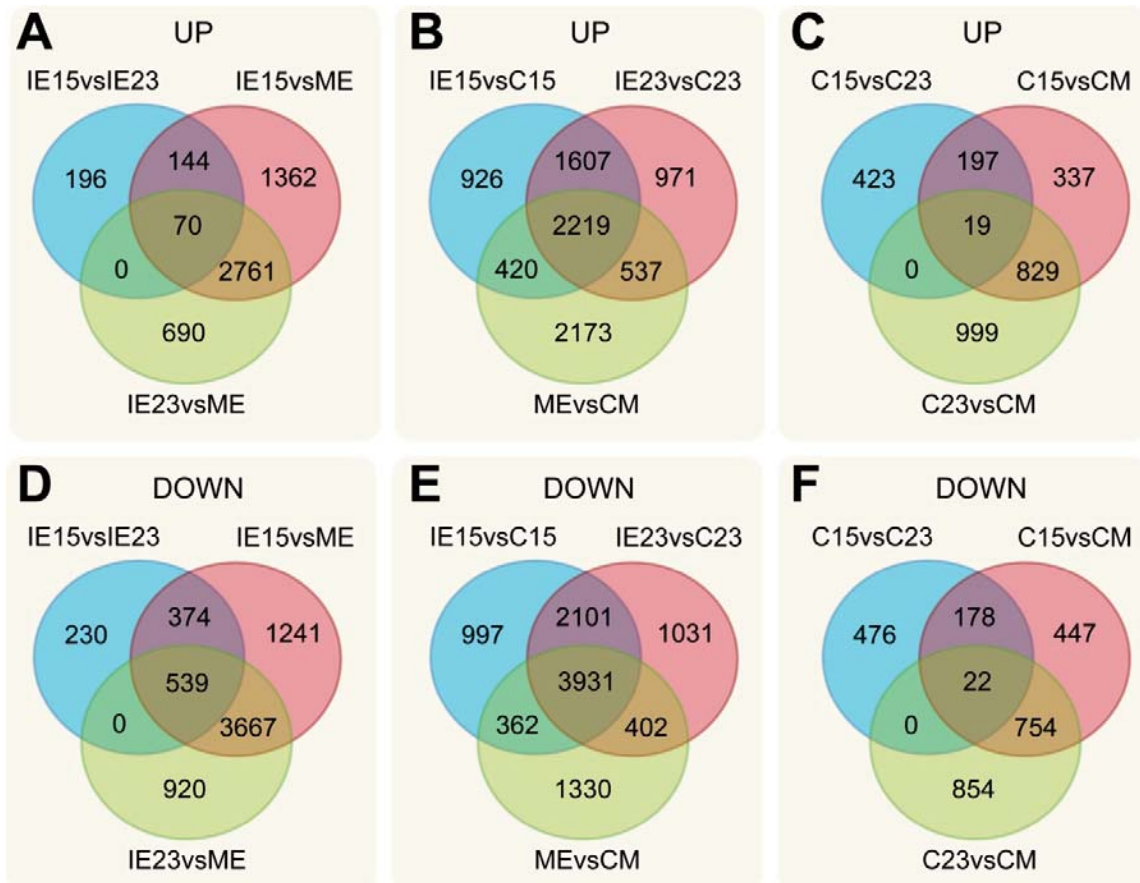


Figura 6. Expresión Diferencial durante la Embriogénesis Somática. Diagramas de Venn que muestran el número de genes diferencialmente expresados entre los diferentes embriones cigóticos (A y D); entre embriones antes de la inducción y callos obtenidos después de la Inducción (B y E) y entre los distintos tipos de callos (C y F).

Los mayores cambios se observan durante la inducción de callos a partir de embriones (Tabla 2; Figura 6B y 6E) y gran parte de estos cambios son compartidos durante la inducción, sin importar el explante utilizado (Figura 6B y 6E; intersección azul, rojo y verde). Los menores cambios se encontraron entre los callos (Tabla 2; Figura 6C y 6F), así como entre IE15 e IE23 (Figura 6A y 6D).

Enriquecimiento Funcional en los explantes de embriones y durante la desdiferenciación: Los tres explantes embrionarios presentan distintos procesos biológicos enriquecidos. Los IE15 poseen un enriquecimiento en funciones relacionadas con la proliferación, división celular y regulación transcripcional.

Con el objetivo de explorar los perfiles de expresión genética en los explantes y después de la inducción de CE, nos enfocamos, en aquellos tejidos con capacidades embriogénicas que permiten inducir la desdiferenciación celular, generar tejidos proliferativos y su capacidad de regenerar una planta. Por ejemplo:

1) ¿Cuáles son las diferencias entre los embriones de 15 días (IE15) respecto a los otros explantes (IE23 y ME)?

- 410 transcritos que aumentan en IE15, comparado con IE23 (Figura 6A; azul).
- 4,337 transcritos que aumentan en IE15, comparado con ME. (Figura 6A; rojo).

2) ¿Cuáles son los cambios que caracterizan a la inducción de IE15 para formar C15, al mes de la inducción?

- 5172 transcritos aumentan y 7391 disminuyen después de la inducción de IE15; respectivamente. (Figura 6B y 6E, azul).

3) ¿Qué patrones de Expresión diferencial, caracterizan a los Callos embriogénicos obtenidos en C15?

- 639 transcritos aumentan en C15, comparado con C23 (Figura 6C; azul).
- 1382 transcritos aumentan en C15, comparado con CM (Figura 6C; rojo).

Basándonos en el protocolo publicado por Reimand et al. (2019), se realizó un análisis de enriquecimiento funcional. Se analizaron los transcritos diferencialmente expresados en las distintas comparaciones para encontrar los procesos biológicos con una mayor

representación estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Posteriormente se generaron redes de co-expresión génica, con el fin de agrupar las principales funciones en vías de enriquecimiento funcional (ver Métodos).

En cuanto a los tejidos embrionarios, IE15 y IE23 presentan pocas diferencias (ninguna función se encuentra enriquecida en IE23 comparada con IE15), donde los procesos metabólicos relacionados con la biosíntesis de ácidos nucleicos y respuestas de reparación de daño al DNA, se encuentran enriquecidos en IE15 (Figura 7).

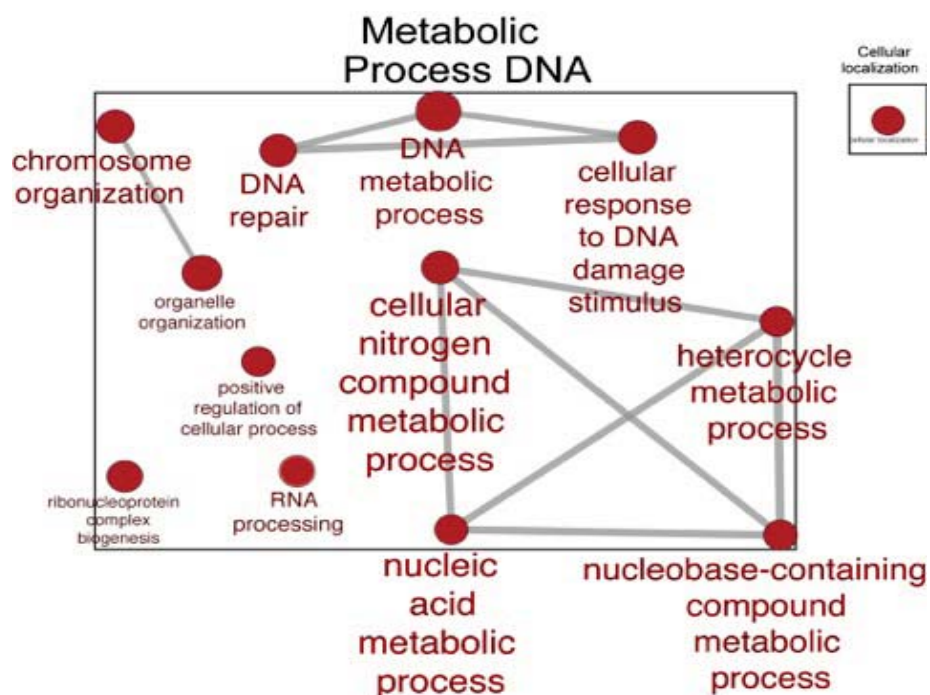


Figura 7. Procesos Biológicos enriquecidos en IE15 comparado con IE23. Red de Co-expresión Génica muestra las funciones enriquecidas (nodos) en IE15. El tamaño del nodo representa el valor de enriquecimiento normalizado (NES; ver Métodos) y el tamaño de la letra de la función representa el grado de correlación entre los nodos contenidos en un Proceso Biológico particular (rectángulos). Los procesos biológicos que se muestran están enriquecidos en IE15, no se encontró enriquecimiento significativo en IE23. La significancia mínima en el enriquecimiento de los nodos es de $p < 0.05$ y un coeficiente de correlación entre los nodos de al menos 0.6.

La principal diferencia entre los IE15 e IE23 comparados con ME, está relacionada con procesos que involucran el ciclo celular y estabilización de la cromatina durante los procesos mitóticos, biosíntesis de ribonucleótidos y fosforilación de proteínas en los embriones inmaduros (Anexos. Tabla Suplementaria 1), mientras que en los ME, las respuestas relacionadas con estrés oxidativo y estímulos endógenos y exógenos en respuesta a estrés biótico y abiótico (Figura 8).

El análisis de redes de co-expresión nos permitió agrupar las funciones enriquecidas en algún tejido en procesos celulares globales e identificar no sólo las funciones en la red (nodos) con mayores valores de enriquecimiento, sino también los nodos que influyen mayormente un proceso biológico en particular, mediante el coeficiente de correlación y el grado de conectividad de los nodos.

En la comparación entre IE15 y ME, además de que el ciclo celular es el proceso más representado en IE15 (nucleasas, subunidades de NRPB y factores de replicación, topoisomerasas, helicasas y telomerasas), procesos como la remodelación de la cromatina (factores remodeladores de la cromatina) y modificaciones epigenéticas como la metilación

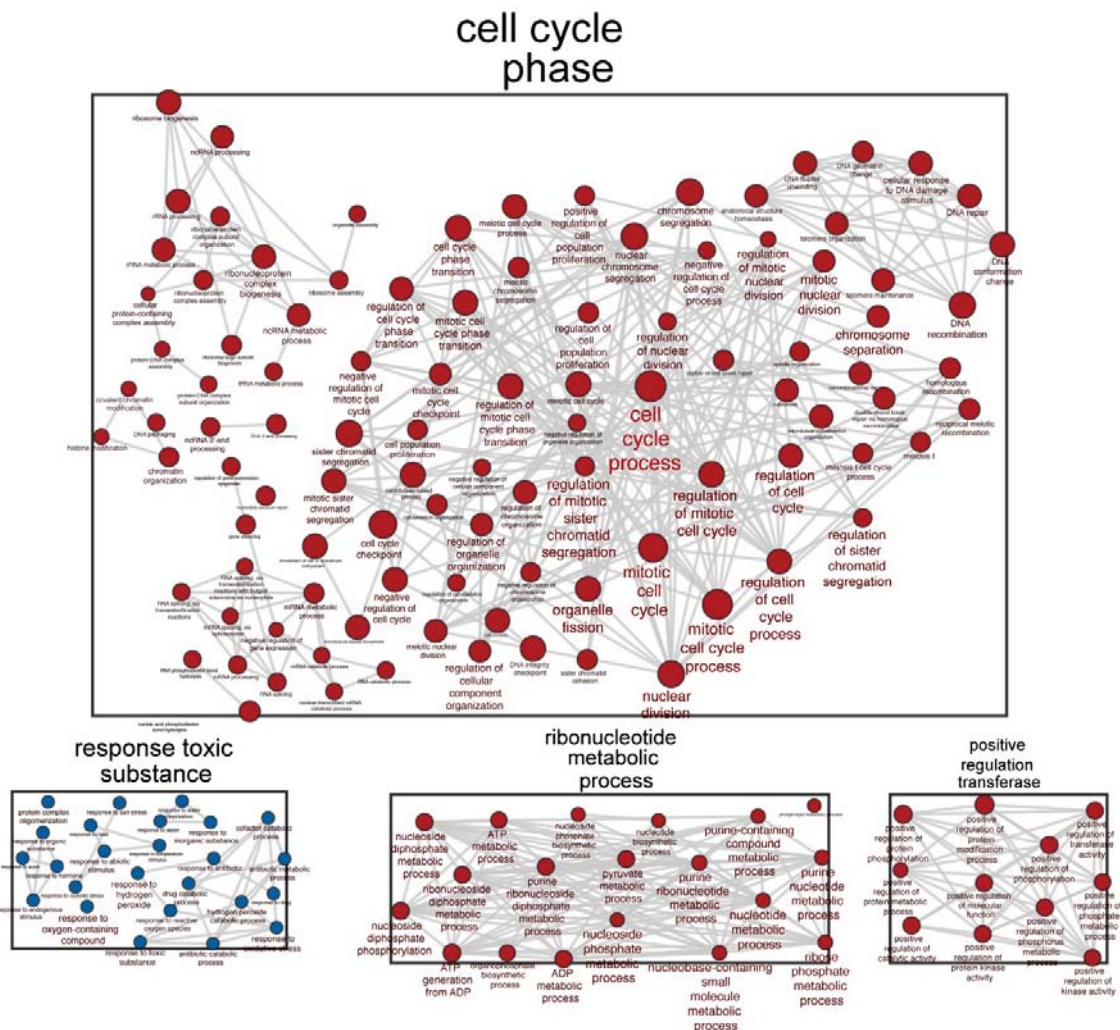


Figura 8. Procesos Biológicos enriquecidos en IE15 comparado con ME. Red de Co-expresión Genética muestra las funciones enriquecidas (nodos) en IE15 (rojo) y ME (azul). El tamaño del nodo representa el valor de enriquecimiento normalizado (NES; ver Métodos) y el tamaño de la letra de la función representa el grado de correlación entre los nodos contenidos en un Proceso Biológico particular (rectángulos). El color de los nodos representa en que tejido se encuentra enriquecida la función. La significancia mínima en el enriquecimiento de los nodos es de $p < 0.05$ y un coeficiente de correlación entre los nodos de al menos 0.6.

del DNA (DNA metiltransferasas, incluida DRM2 (Zm00001d044187), la metiltransferasa involucrada en la vía de metilación dirigida RNA; RdDM) y otras enzimas relacionadas con las vías de biogénesis de sRNAs (DCL4 (Zm00001d025830) y Argonauta 6 (Zm00001d019905)) predominan. Las respuestas relacionadas con estrés oxidativo son las mayormente enriquecidas en ME, las cuales involucran proteínas de choque térmico (Heat shock Proteins; HSPs), cinasas, de degradación de proteínas vía proteosoma y múltiples factores transcripcionales de las familias ZIM, MYB y Homeobox (HB) y AP2-EREBP, así como Enhancer of Zeste, la metiltransferasa del complejo Polycomb quien establece la marca represiva transcripcional H3K27me³.

Al mes de la inducción de callos, la respuesta de IE15 e IE23 es muy parecida, comparada con la de ME (Figura 9, Figura Suplementaria 2 y 3, Tabla Suplementaria 2). Los procesos relacionados con la proliferación celular acompañadas del ensamblado de organelos, exportación nuclear de componentes celulares y mecanismos de silenciamiento epigenético relacionados con la metilación del DNA disminuyen. La biogénesis ribosomal es el único proceso que disminuye en los tres tiempos de desarrollo embrionario analizados. Las respuestas de estrés abiótico se encuentran enriquecidas en los tres tejidos al mes de la inducción, particularmente las relacionadas con la detoxificación de hidrógeno (representada por múltiples peroxidasas y alcohol deshidrogenasas). Durante la inducción de ME se despierta una respuesta de defensa a estrés biótico que incluye funciones de señalización y transducción de señales a través de la fosforilación de proteínas (la mayoría de los transcritos diferencialmente acumulados son Receptores de cinasas de tipo Lectina), así como un aumento en las vías de producción de compuestos fenilpropanoides (Figura Suplementaria 3).

Una diferencia importante se encuentra relacionada con la biosíntesis y reorganización de la pared celular. En los tres tejidos después de un mes de la inducción, existe un enriquecimiento en el transporte de carbohidratos a través de la membrana, no obstante, sólo en C15 y CM se encuentra enriquecida la síntesis y metabolismo de la pared celular. Por lo que, aun cuando C15 y C23 mantienen programas parecidos en cuanto a división y proliferación celular, C23 no posee una restructuración celular necesaria para los cambios observados a nivel celular, puesto que también se observa una disminución en las vías de biosíntesis de fosfolípidos y ácidos grasos, necesarios para la restructuración de las membranas celulares (Figura Suplementaria 2).

Con el objeto de conocer las dinámicas globales en la expresión de TF durante la desdiferenciación y durante el desarrollo del embrión cigótico, se buscaron las secuencias correspondientes a los 2605 TFs reportados por la Base de Datos Grassius, en los transcriptomas obtenidos de IE15, IE23, ME, C15, C23 y CM.

Se encontró que, en promedio, el 94.6% de los miembros de una familia de TF se encuentran expresados en al menos uno de los tejidos analizados (Figura Suplementaria 4). Sin embargo, no todos presentan valores de acumulación diferencial con significancia estadística al comparar entre tejidos (Figura Suplementaria 5). Los menores cambios se encontraron entre C15 y C23; al comparar estos tejidos con CM, el número de TFs con acumulación diferencial (DA) es de hasta el doble de la que hay entre C15 y C23 (Figura Suplementaria 5, panel inferior). Los mayores cambios en la acumulación de TFs se encuentran al comparar los tejidos antes y después de la inducción (embriones vs callos), presentando un patrón de cambios similar entre las tres comparaciones (Figura Suplementaria 5, panel central).

Para los tejidos embrionarios (IE15, IE23 y ME), la mayor diferencia se observó entre IE15 y ME (Figura 10A, panel superior). Dado que IE15 es el único tejido capaz de producir callos embriogénicos (C15), el siguiente paso en el análisis fue obtener los patrones de expresión de TFs particulares para IE15. 365 TFs se encuentran mayormente acumulados en IE15 comparado con cualquier otro embrión (Figura 10B, en rojo y amarillo), 24 y 62 TFs tienen

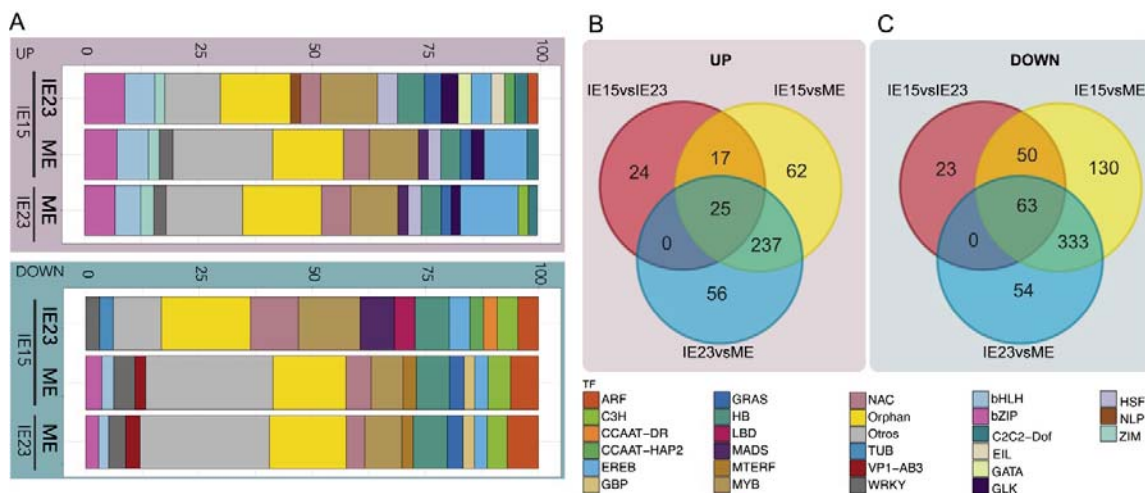


Figura 10 Acumulación Diferencial (DA) de Factores Transcripcionales (TF) entre embriones de diferentes etapas de desarrollo. A: Distribución porcentual de TF con DA al alta (A, panel superior) y a la baja (A, panel inferior), clasificados como familias de TF. B y C: Diagrama de Venn que muestra el número total de TF con DA estadísticamente significativa al alta (B) y a la baja (C), entre las distintas comparaciones de Embriones cigóticos.

DA en IE15 comparado con IE23 y ME, respectivamente. 17 TFs muestran el mismo patrón de mayor acumulación en IE15 sin importar la comparación (Figura 10B, naranja).

El patrón de sobreacumulación de TFs en IE15 respecto a IE23 y ME está conformado por 6 (AP2-EREB, HB, MADs, LBD, MYB, Orphan y NAC) y 26 familias, respectivamente. La familia NAC tiene el mayor número de TFs con DA en IE15 comparado con IE23 y con ME (Tabla Suplementaria 3). De los 21 Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs) con DA en IE15 comparado con ME, sólo *ZmARF15* y *ZmARF23* tienen un patrón de expresión particular en IE15. E interesantemente, *ZmARF23* es blanco de tasiARFs y miR171, mientras que *ZmARF15* es blanco de miR160 (Tabla Suplementaria 3).

Al comparar los tejidos antes y después de la inducción de callos (IE15 vs C15; IE23 vs C23 y ME vs CM), las familias de TFs con mayor DA en embriones son MYB, HB, bHLH (Figura 11A, panel inferior); después de la inducción son MYB, NAC, AP2-EREB (Figura 11A, panel superior), sin importar la comparación. Mientras que, los tres explantes (IE15, IE23 y ME) presentan una respuesta similar, 262 y 433 TF son DA antes y después de la inducción, respectivamente (Figura 11B y C).

Se identificaron 58, 64 y 150 TFs con DA en IE15, IE23 y ME, respectivamente (Figura 11B). Y 85, 63 y 110 TF presentan una mayor acumulación en C15, C23 y CM, respectivamente (Figura 11C).

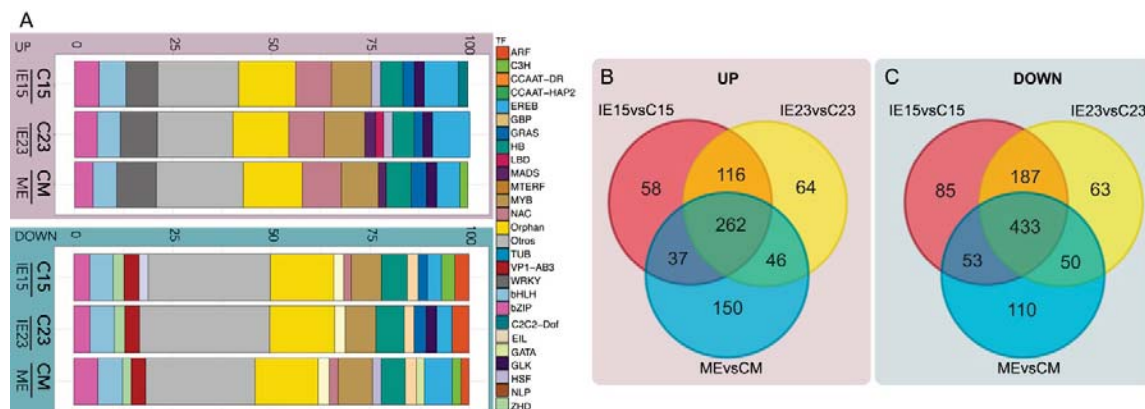


Figura 11. Acumulación Diferencial (DA) de Factores Transcripcionales (TF) entre embriones y callos un mes después de la inducción de SE. A: Distribución porcentual de TF con DA a la alta (A, panel superior) y a la baja (A, panel inferior), clasificados como familias de TF. B y C: Diagrama de Venn que muestra el número total de TF con DA estadísticamente significativa a la alta (B) y a la baja (C), entre las distintas comparaciones entre embriones y callos.

La inducción de C15 (IE15 vs C15), presenta los mayores cambios en la familia MYB (13 MYB TFs con mayor acumulación en C15), seguido de bHLH (7) y Homebox (HB; Tabla Suplementaria 4). Finalmente, de los 36 ARFs con DA en cualquier comparación, sólo *ZmARF5* y *ZmARF19* tienen una mayor acumulación antes y después de la inducción, respectivamente (Tabla Suplementaria 4).

En las comparaciones entre C15, C23 y CM, las familias de TF presentan un patrón contrastante en CM comparado con C15 y C23. La mayor DA en CM se encuentra en las familias HB, MYB y ARF, sin importar la comparación (Figura Suplementaria 6A). De los 46 y 75 TFs mayormente acumulados en C15 comparado con C23 y CM, respectivamente; 12 TFs se encuentran DA en C15 sin importar la comparación. Destacando Growth-regulating factor 1 (*ZmGRF1*; blanco de miR396) y *ZmARF7* y *ZmARF4* que están mayormente acumulados en C15 comparado con C23 y CM, respectivamente. La familia HB y MYB presenta mayor DA en C15 comparado con C23, así como tres TFs blanco de miRNAs (*ZmCA2P5* y *ZmCA2P6* (miR169); y *ZmEREB110* (miR172; Tabla Suplementaria 5).

Aunque los valores de acumulación diferencial de TFs resultaron útiles en la identificación de transcritos específicos, esto no permitió encontrar el enriquecimiento funcional significativo de una familia concreta de TFs (los datos antes mostrados sólo reflejan la abundancia de TFs particulares diferencialmente acumulados). Se realizó un análisis de co-expresión de las distintas familias de TFs en las comparaciones de los tejidos antes y

después de la inducción, con el objetivo de ver si la regulación de los patrones de expresión mediada por TFs, es diferente entre los tres tipos de inducciones (ver Métodos).

Se encontraron 6 familias de TFs enriquecidas en los embriones (comparados con los callos), la familia CCAAT-HAP2, GRF, OFP, VP1-AB3, YAB y ZHD. No obstante, la media de los valores de veces de cambio en la familia YAB es mayor en IE15 e IE23, comparada con ME. Los TFs de las familias ARF, HB, SRS y TCP se encuentran enriquecidos en IE15 e IE23, pero no en ME; explante en el que las familias AP2-EREB y HSF presentan un enriquecimiento de sus miembros en 6.1 y 37.9 % (Figura 12, Tabla Suplementaria 6).

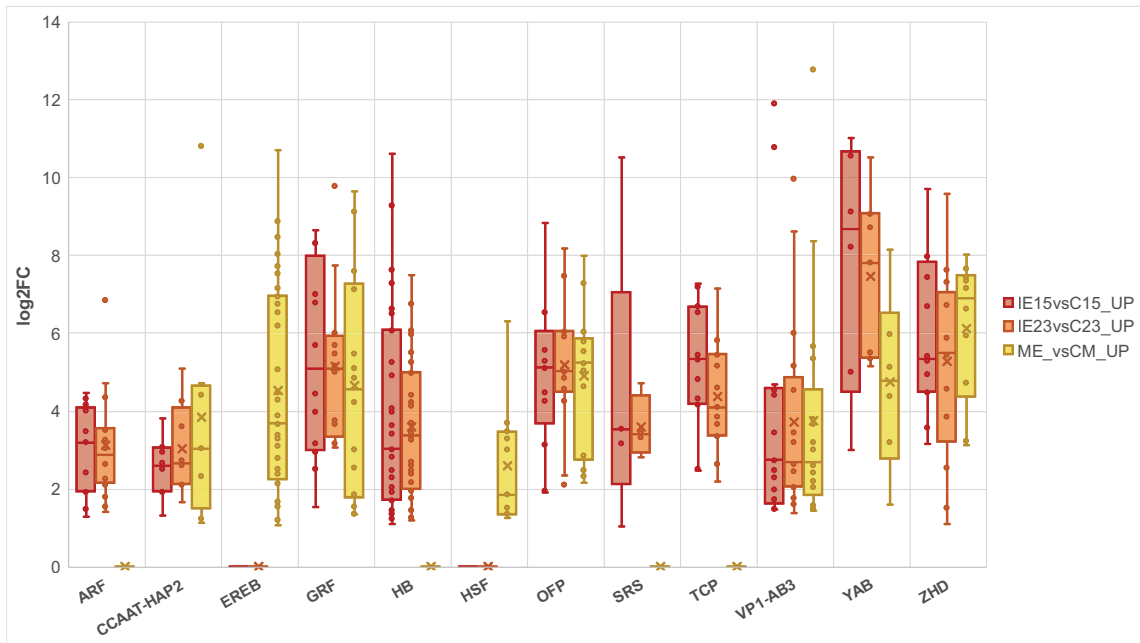


Figura 12. Familias de TFs con valores significativos de enriquecimiento funcional en los embriones antes de la Inducción de SE (comparaciones embriones vs callos). Se muestran los valores de acumulación diferencial de cada miembro de la familia (puntos) y la media en los valores de veces de cambio en la comparación de IE15vsC15 (Rojo); IE23vsC23 (Naranja) y MEvsCM (amarillo). El Gráfico sólo muestra las familias de TFs con valores significativos ($p < 0.05$) y la media se calcula con los valores individuales de cambio en cada transcrito DA.

Después de la inducción, los patrones de enriquecimiento son más contrastantes. Sólo las familias GRAS, NAC y WRKY se encuentran enriquecidas en los tres tipos de callos (Figura Suplementaria 7, Tabla Suplementaria 6). Se encontraron cambios particulares en familias completas de TF en cada tipo de Inducción. Las familias bZIP, NLP y ZIM muestra un

enriquecimiento funcional en C15, conformado por 21, 3, 13 miembros de cada familia, respectivamente (Figura 13). De igual manera, sólo en la inducción de C23 se encontró enriquecimiento de las familias de TFs LBD, MYB y PLATZ, con 10, 24 y 8 miembros con DA. Con base en estos resultados, se puede concluir que durante la inducción de SE en maíz, existen cambios en la expresión de TFs sin importar el explante utilizado. No obstante, familias enteras de TFs se encuentran reguladas diferencialmente durante la inducción C15 y C23, presentando patrones de sobreacumulación particulares en respuesta al estímulo de Inducción.

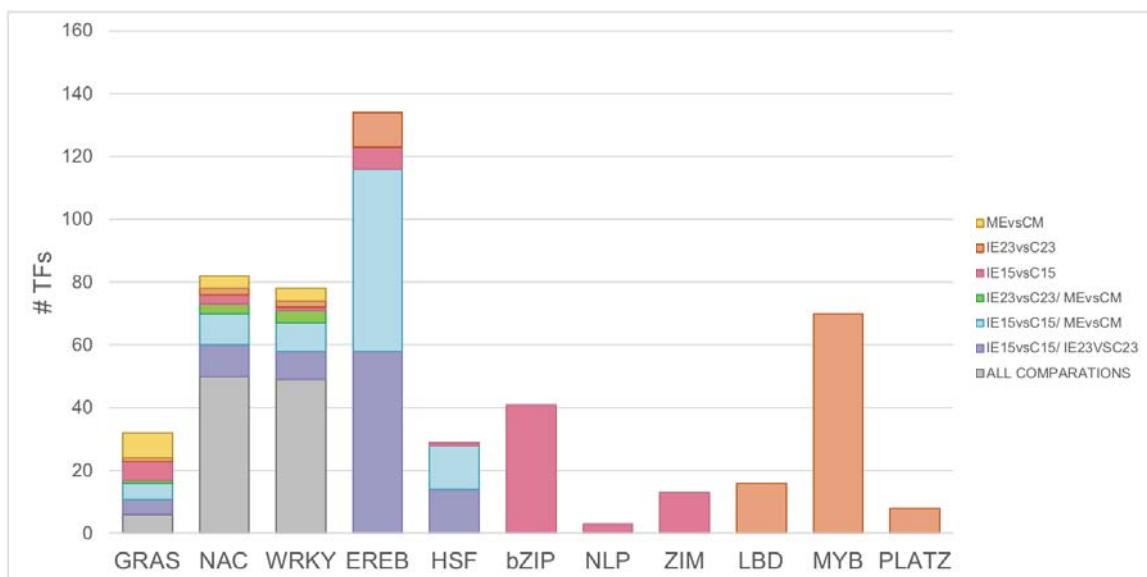


Figura 13. Distribución de las familias enriquecidas en los callos durante la Inducción de SE (comparación Embrión vs Callo). Se muestran las familias de TFs enriquecidas en alguna o todas las comparaciones, basadas en las intersecciones de un diagrama de Venn que contiene todos los TFs enriquecidos en cada comparación.

Patrones de Expresión de genes involucrados en la Embriogénesis Somática en otras plantas: La inducción de IE15 se caracteriza por una mayor acumulación de transcritos relacionados con la totipotencia celular (TFs de la clase HB y GRF, subunidades del complejo PRC2 y elementos de respuesta auxinas).

Gran parte de los estudios sobre la SE han sido desarrollados en plantas dicotiledóneas (principalmente en *Arabidopsis*). Se han identificado grupos de genes involucrados en las respuestas durante la Inducción y el establecimiento de los tejidos para la obtención de embriones somáticos (Elhiti *et al.*, 2013; Horstman *et al.*, 2017). Basándonos en dichos reportes y en la clasificación generada por Elhiti *et al.*, 2013, se buscaron los transcritos

homólogos en maíz de tres categorías de genes involucrados en la inducción de SE: Genes de totipotencia, desdiferenciación y compromiso. Es decir, durante la inducción de SE, las células en el explante deben tener el potencial para expresar un estado de totipotencia que les permita ser competentes para responder a estímulos externos y generar una respuesta específica y comprometerse con la vía de producción de Embriones somáticos.

El compromiso a la embriogénesis, requiere de un paso de desdiferenciación en el que las células maduras en el explante, pierdan su identidad específica y se comporten como células meristemáticas con la capacidad de generar un nuevo programa de desarrollo y poder regenerar embriones somáticos (Elhiti *et al.*, 2013). Sin embargo, los procesos de SE en Arabidopsis y maíz difieren en aspectos esenciales como, por ejemplo, el tejido de explante del cual se parte para la inducción (en Arabidopsis casi todos los tejidos pueden generar embriogénesis somática) o que en Arabidopsis se puede realizar SE directa



Figura 14. Acumulación Diferencial (DA) de Transcritos identificados en Arabidopsis thaliana como promotores de la Inducción de SE entre los distintos embriones cigóticos de maíz. A la izquierda se muestra un mapa de calor con los valores de DA en cada comparación (los valores con DA significativa se muestran con asteriscos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). En código de color se muestra la categoría a la cual pertenece el transcrito según la clasificación de Elhiti *et al.*, 2013: Totipotencialidad (azul), Desdiferenciación (amarillo) y Compromiso (rojo). La anotación para los transcritos homólogos en maíz se muestra en el panel amarillo y el transcrito correspondiente en Arabidopsis en el panel turquesa. En el panel lila se muestra el proceso biológico al que está principalmente relacionado el transcrito, utilizando Gene Ontology (GO).

(obtención de embriones somáticos sin el paso intermedio del tejido a callo). Aunque los procesos de SE puedan diferir entre especies, es probable que también se conserve parte de la señalización requerida para la reprogramación genética y el éxito de la SE.

Al comparar los patrones de expresión entre embriones, IE15 e IE23 presentan la mayor DA en los transcritos identificados como responsables de la totipotencia, al compararse con ME (Figura 14). Los transcritos que son mayormente acumulados en IE15 al compararse con los otros embriones comprenden TFs como *GRF14*, la proteína de inhibición de la apoptosis 5 (*API5*) y la subunidad gamma de la proteína de transporte Coatomer (*COP γ*). Los transcritos DA en IE23 y ME comparados con IE15 son el Represor transcripcional Topless 1 (*TPL1*), el TF de la familia HB *BLH3* y los reguladores de respuestas a auxinas *IAA14* y *24*.

Al analizar las dinámicas de estos transcritos durante la inducción, se encontró que la mayoría de ellos mantiene los mismos patrones de DA durante los tres tipos de inducciones, en las cuales la mayoría de los transcritos pertenecen a la categoría de compromiso (Figura 15). No obstante, los patrones que diferencian la inducción de C15 son una mayor acumulación de *IAA14* y *24*, un transcrito homólogo en plantas de la subunidad SUZ12 del complejo PRC2 (*VRN2*), *COP γ* , *GRF14* y una celulosa sintasa (*CESA1*; Figura 15).

Finalmente, C15 y C23 sólo difieren en una mayor acumulación de el homólogo del Receptor Cinasa de Embriogénesis Somática 2 (*SERK2*; teniendo una mayor acumulación en C15). Mientras que la mayoría de las diferencias de C15 al compararse con CM, están relacionadas con transcritos clasificados de compromiso (Figura Suplementaria 8), comprendiendo otra subunidad del complejo Polycomb EMBRYONIC FLOWER2 (*EMF2*) y un transcrito homólogo al TF HB de Arapidopsis, *ATH1*; ambos con una mayor acumulación en C15. Mientras que una proteína de transporte celular *EPSIN1*, tres TF de la familia HB (*KNAT7*, *HB84 (BLH6)* y *BLH9*) y un transcrito relacionado con la biosíntesis y metabolismo de Celulosa (*CESA8*); presentan una mayor acumulación en CM (Figura Suplementaria 8). Con estos resultados, se puede concluir que los patrones que caracterizan la inducción de IE15 son una mayor acumulación de TFs de la familia HB y GRF, subunidades del complejo PRC2 de Polycomb y elementos de respuesta auxinas, como *IAA14* e *IAA24*, los cuales son marcadores de totipotencialidad correlacionando con la capacidad de C15 de generar callos con capacidades proliferativas y regenerativas.

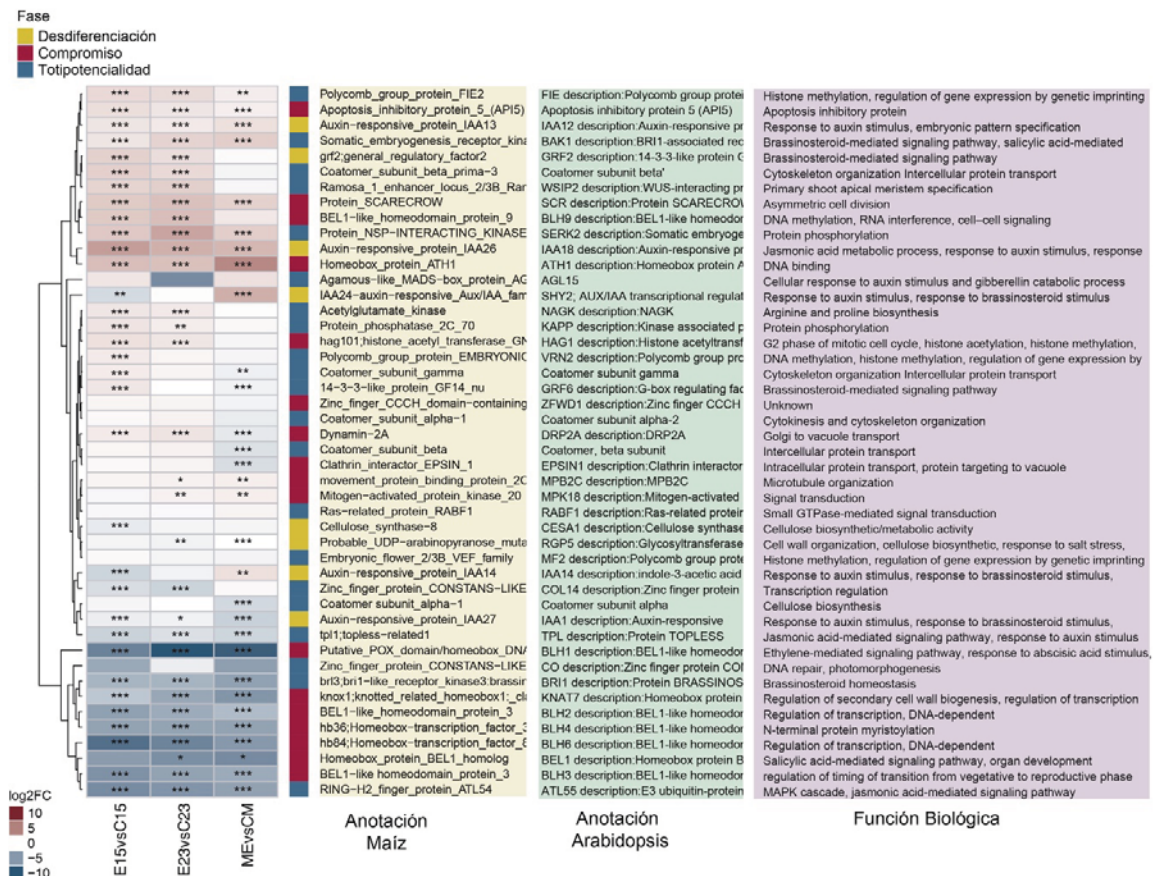


Figura 15. Acumulación Diferencial (DA) de Transcritos identificados en *Arabidopsis thaliana* como promotores de la Inducción de SE durante la Inducción de los callos a partir de embriones cigóticos de maíz en diferentes etapas de desarrollo. A la izquierda se muestra un mapa de calor con los valores de DA en cada comparación (los valores con DA significativa se muestran con asteriscos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). En código de color se muestra la categoría a la cual pertenece el transcrito según la clasificación de Elhiti et al., 2013: Totipotencialidad (azul), Desdiferenciación (amarillo) y Compromiso (rojo). La anotación para los transcritos homólogos en maíz se muestra en el panel amarillo y el transcrito correspondiente en Arabidopsis en el panel turquesa. En el panel lila se muestra el proceso biológico al que está principalmente relacionado el transcrito, utilizando Gene Ontology (GO).

Patrones de Expresión de marcadores moleculares de embriogénesis Cigótica de maíz. Los callos con capacidades embriogénicas regenerativas se caracterizan por una DA de TFs de las familias NAC, WOX y acarreadores del flujo de Auxinas (PINs).

Como se mencionó en la introducción, durante la embriogénesis cigótica existen patrones de expresión espaciotemporal de genes que permiten la correcta formación de un embrión a través de distintas etapas. Se han identificado marcadores moleculares que sirven para describir la etapa de desarrollo de los embriones, que en su mayoría son TFs de la familia WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX). No obstante, el tiempo de desarrollo

embrionario de maíz depende del genotipo (no todos los genotipos de maíz se desarrollan en los mismos tiempos). Con el objeto de conocer los patrones de expresión de marcadores moleculares de embriogénesis cigótica en las tres etapas embrionarias analizadas y entender las dinámicas de estos grandes reguladores durante la SE, se analizaron los patrones de expresión de los principales marcadores de embriogénesis cigótica en maíz.

Se encontró que durante la Embriogénesis Cigótica IE15 e IE23 tienen una mayor DA en los TFs: Knotted 1 (*Kn1*); Outer layer cell (*OCL*) 1, 4, 5 y 6; *NAC5* y ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 (*ESR2*), comparados con CM. La única diferencia entre IE15 e IE23 es la mayor acumulación de *WOX11* y *NAC116* en IE23 (Figura Suplementaria 9). La expresión de los marcadores moleculares de embriogénesis cigótica durante la inducción de disminuye en los callos y son pocos los transcritos que se ven enriquecidos después de la inducción (Figura 16A). No obstante, lo que caracteriza a la inducción de IE15 es una DA

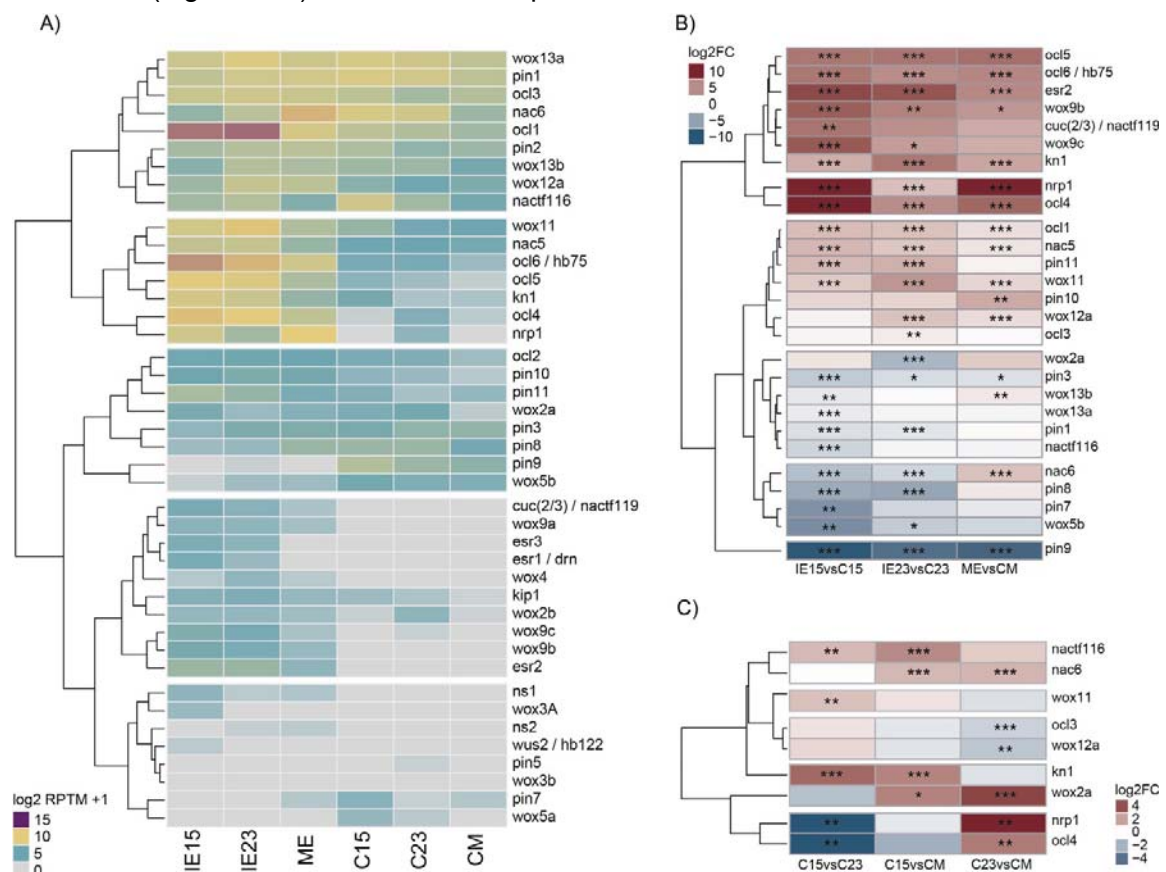


Figura 16. Acumulación Diferencial (DA) de Marcadores de Embriogénesis Cigótica durante la SE. A) Mapa de calor con los valores de abundancia normalizada en cada tejido. B) Mapa de calor con los valores de DA significativa en las distintas comparaciones de embriones vs callo. C) Mapa de calor con los valores de DA significativa en las distintas comparaciones de callo vs callo. Los valores de DA significativa se muestran con asteriscos, * p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001).

de *CUC2* (*NAC119*) en el embrión, y una DA de *PIN3* y *7*, *WOX13b*, *13a* y *NAC116* en C15 (Figura 16B). Por otro lado, los marcadores que diferencian a C15 de C23 y CM es la mayor acumulación de *Kn1* y *NAC116* en C15 (Figura 16C), lo cual resulta relevante para la respuesta de C15, al ser excelentes marcadores para el RAM y SAM (Zimmermann, 2004; Zimmermann & Werr, 2005), además de evidenciar su potencial papel durante la dediferenciación y la conservación del estado de totipotencia en células meristemáticas.

Obtención de perfiles de acumulación de sRNAs en tejidos embrionarios y callos de maíz.

El análisis fenotípico de los tejidos y los resultados que a continuación se presentan conforman la publicación de el artículo de Investigación: “The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis” (Juárez-González *et al.*, 2019), derivado de este proyecto de investigación. Parte de las figuras y métodos utilizados son referidos a este artículo adjunto en la parte de Anexos. De la misma manera, si se desea ver un análisis más exhaustivo de los resultados obtenidos, favor de referirse a la publicación.

Con el objeto de conocer el papel regulatorio de las diferentes clases de sRNAs durante la inducción de SE y la obtención de callos embriogénicos con capacidades regenerativas, se construyeron doce bibliotecas de sRNAs a partir de IE15, IE23 y ME, C15, C23, CM (2 réplicas biológicas). Todas las bibliotecas se secuenciaron; se removieron las lecturas de baja calidad, adaptadores y secuencias de longitud menor a 18 nt y mayor a 27 nt, obteniendo un promedio de 13 millones de lecturas limpias por biblioteca (en un rango 8.2-25.9 millones de lecturas; Tabla Suplementaria 10). De las cuales aproximadamente 62.1 % (en un rango del 54.6 – 66.7 %) mapearon sobre el genoma de maíz B73 (Ref_GenV4).

Después de la remoción de lecturas correspondientes a rRNAs, tRNAs, snRNAs y snoRNAs, el total de lecturas únicas por biblioteca resultó de 1.9 millones (promedio, en un rango de 1.0 – 3.9 millones de lecturas). Posterior a la normalización de las bibliotecas (RPTM; lecturas por 10 millones de lecturas), se obtuvo que los sRNAs de 21, 22 y 24 nucleótidos (nt) son los más abundantes. Sin embargo, la distribución de la abundancia cambia en los diferentes tejidos (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 2; Fig.S2):

- En los embriones, los sRNAs de 24 nt son más abundantes que cualquier otra población de sRNAs (representando hasta el 50.0 % de las lecturas en las bibliotecas); seguidas de las lecturas de 22 nt y 21 nt.
- La abundancia de sRNAs de 24 nt aumenta durante la maduración del embrión, siendo ME el tejido más enriquecido con esta población de sRNAs. El patrón contrario se observa con los sRNAs de 21 nt, que disminuyen durante la maduración del embrión.
- Los sRNAs de 21 nt son más abundantes en los callos que en tejidos embrionarios. Además, en los embriones, la diferencia entre sRNAs de 21 y 22 nt es mayor; siendo estos últimos más abundantes.
- En los callos la abundancia sRNAs de 21, 22 y 24 nt es casi la misma. No obstante, los sRNAs de 24 nt disminuyen en los callos, comparado con los embriones.

Una de las principales características de los sRNAs es el tamaño de cada clase, debido al procesamiento selectivo por alguna de las enzimas de la familia Dicer-like (Deleris *et al.*, 2006; Nagano *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2014). Se observaron cambios importantes en la generación de sRNAs durante el desarrollo embrionario, pero más aún durante la inducción de callos, debido a la drástica disminución de sRNAs de 24 nt.

Posteriormente, se identificaron las lecturas correspondientes a cada una de las principales categorías de sRNAs (Juárez-González *et al.*, 2019; ver Métodos), siendo los tasiRNAs la única clase de siRNAs en fase (phasiRNAs) identificados en los explantes embrionarios y callos. Los ta-siRNAs aumentan después de la inducción (en callos; Figura 17), y aunque su representación es mucho menor a la de otros sRNAs (0.005-0.03%), la magnitud de cambio es mayor durante la inducción (barras moradas, Figura 17), los ta-siRNAs se caracterizan por su baja abundancia en comparación con otras clases de siRNAs y miRNAs. Los siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs) muestran una menor abundancia en los tejidos de callos que en los embriones. Patrón contrario al de los miRNAs, que poseen una mayor abundancia en los callos.

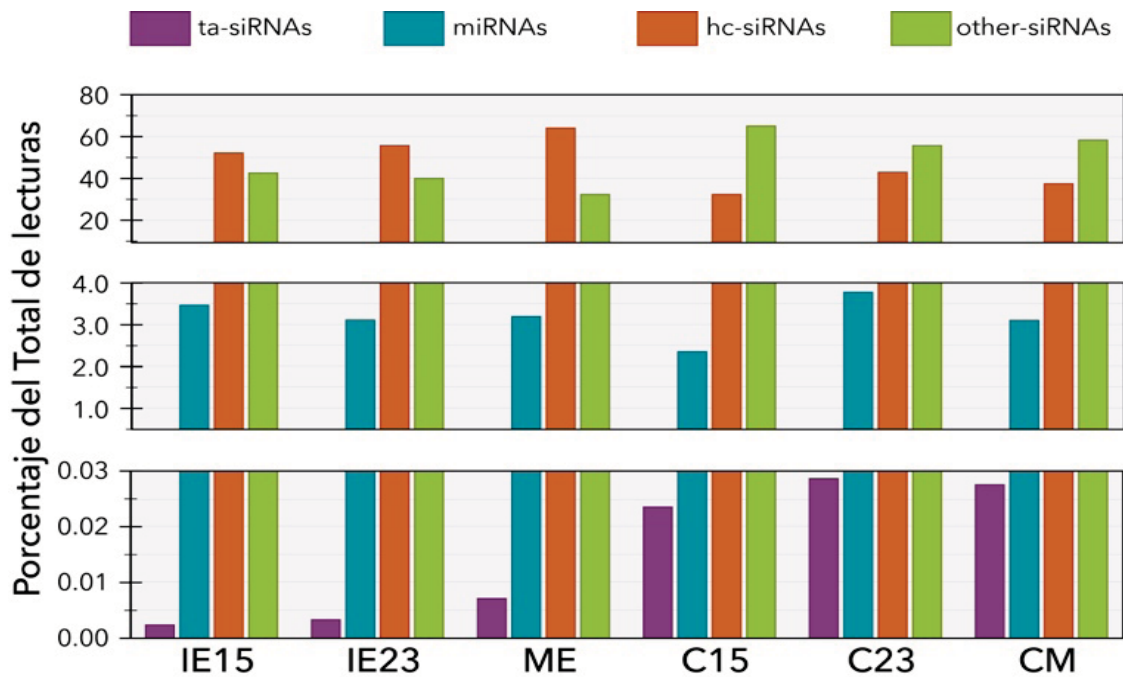


Figura 17. Abundancia relativa de las distintas clases de sRNAs en los diferentes tejidos. Se muestran los valores en porcentaje del total de lecturas promedio en las réplicas biológicas. ta-siRNAs: Transacting small Interferent RNAs; miRNAs: microRNAs; hc-siRNAs: heterochromatic siRNAs.

ta-siRNAs (tasiARFs) durante la inducción de callos embriogénicos.

Los ta-siRNAs son una categoría especial de sRNAs. Como se mencionó anteriormente, los ta-siRNAs de 21 nt se generan a partir de los transcritos precursores de los genes *TAS*. De los genes *TAS*, solamente homólogos a *TAS3* han sido identificados en maíz. Los genes *TAS3*, presentan dos sitios de reconocimiento para microRNA 390 (miR390, el cual conforma una asociación única con Argonauta 7 (AGO7), para conformar el RISC). Los ta-siRNAs que resultan, se conocen como “tasiARFs”, puesto que sus transcritos blanco son TFs de la familia ARF.

Dado que el proceso de inducción de callos durante la embriogénesis somática de maíz está íntimamente ligado a la respuesta a auxinas como se observó en los resultados obtenidos en la DA de distintos ARFs en los tejidos de embriones y callos; se obtuvieron los patrones de expresión de los tasiARFs reportados en maíz (Figura Suplementaria 10). De los 9 loci *TAS3* en maíz, se ha reportado la secuencia de el o los tasiARFs maduros de 8 de estos loci (tasiARF1-8; Tabla Suplementaria 12). Los precursores *TAS3*-1, *TAS3*-3 y *TAS3*-8, producen 2 tasiARFs, por lo que en total se analizaron 11 tasiARFs, encontrando

niveles de acumulación detectables en la mayor parte de los tejidos (Tabla Suplementaria 13; Juárez-González *et al.*, 2019, Fig. S7).

Posteriormente, se realizó una reconstrucción filogenética con las secuencias de los 36 ARFs reportados en maíz (Figura Suplementaria 11), y se identificaron los ARFs blanco de tasiARFs mediante la búsqueda de la secuencia de reconocimiento (Tabla suplementaria 15). Aunado a los 4 ARFs blanco reportados previamente, a partir de estos análisis se encontraron 2 ARFs adicionales con sitios blanco de reconocimiento para tasiARFs. Por lo que, en maíz, los tasiARFs tienen como blanco 6 ARFs, 5 de los cuales pertenecen al grupo ARF3/4 (ARF24, 23, 11, 12 y 26) y uno pertenece al grupo 2 (ARF10; Tabla Suplementaria 15). Con el fin de conocer los cambios en la regulación mediada por esta vía y contrastar las diferencias en las respuestas durante la SE, se realizaron análisis de DA entre los diferentes tejidos tanto para los tasiARFs como para sus blancos.

Al comparar la expresión de los transcritos durante el desarrollo de los embriones cigóticos, se encontró que, los tasiARFs se encuentran mayormente expresados en etapas tardías de la maduración del embrión, no obstante, sólo tasiARF3b-1 y c-1 presentan diferencias significativas y su expresión es mucho mayor en embriones maduros comparado con IE23 y IE15 (Figura 18a). La abundancia de los ARFs blanco de tasiARFs, mostró una correlación negativa con tasiARF3b-1 y c-1. Durante el desarrollo del embrión cigótico existe una acumulación de tasiARFs específicos. Mientras que la acumulación de sus blancos (ARFs) parece estar altamente regulada durante este proceso, generando una disminución en los niveles de sus transcritos (Figura 18d). Interesantemente, durante la inducción de callos a partir de los tres tipos de embriones se generan dos patrones contrastantes de acumulación de los tasiARFs: Un grupo de tasiARFs disminuye su expresión después de la inducción (tasiARF3g, h, a-1; Figura 18b, en rojo). El otro grupo de tasiARFs aumenta después de la inducción en los callos (tasiARF3b-1 y c-1; Figura 18b; en azul). No obstante, la diferencia entre este último grupo sólo es significativa durante la inducción de IE15 e IE23 y no en ME. La DA de tasiARF3b-1 y c-1, indica que durante la inducción es necesaria la activa

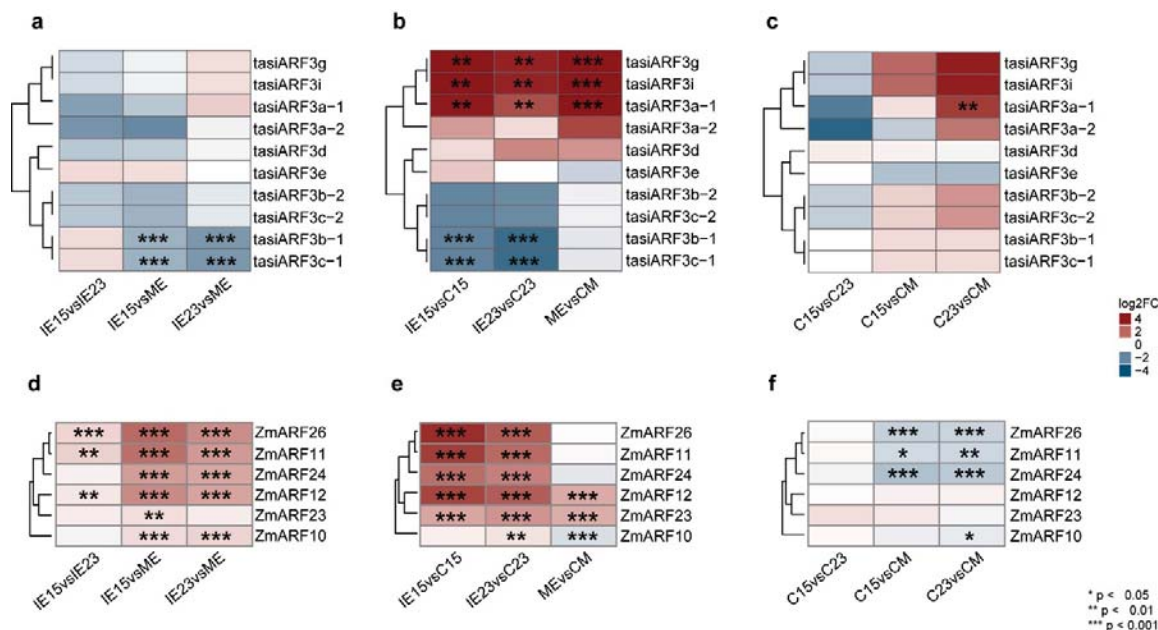


Figura 18. Regulación mediada por la vía de ta-siARFs durante la embriogénesis somática (SE) de maíz. **a:** Acumulación Diferencial (DA) de tasiARFs durante el desarrollo del embrión cigótico de maíz. **b:** DA de tasiARFs durante el proceso de inducción de embriogénesis somática de maíz. **c:** DA de tasiARFs entre los diferentes tejidos de callos obtenidos al mes de la inducción. **d, e y f:** DA de Factores de Respuesta Auxinas (ARFs) blancos de tasiARFs en maíz durante el desarrollo cigótico del embrión (**d**), la inducción de embriogénesis somática (**e**) y entre los diferentes tejidos de callos obtenidos al mes de la inducción (**f**). **IE15vsIE23:** DA entre Embriones de 15 días después de la polinización (IE15) y Embriones de 23 DDP (IE23); **IE15vsME:** DA entre IE15 y embriones maduros (ME); **IE23vsME:** DA entre IE23 y ME; **IE15vsC15:** DA entre IE15 y callos obtenidos a partir de IE15 al mes de la inducción de SE (C15); **IE23vsC23:** DA entre IE23 y callos obtenidos a partir de IE23 al mes de la inducción de SE (C23); **MEvsCM:** DA entre ME y callos obtenidos a partir de ME al mes de la inducción de SE (CM); **C15vsC23:** DA entre C15 y C23; **C15vsCM:** DA entre C15 y CM; **C23 y CM:** DA entre C23 y CM. Los valores de DA con significancia estadística se muestran con asteriscos (* p < 0.05; ** p < 0.01 y *** p < 0.001).

producción de clases particulares de tasiARFs en los tejidos de IE15 e IE23, el cual se observa en los callos al mes de la inducción. Dichos cambios en la acumulación parecen coincidir con los niveles basales de tasiARFs antes de la inducción, ya que ME posee la mayor acumulación de tasiARF3b-1 y c-1, comparado con otros embriones. Esta diferencia en la respuesta de los tasiARFs también se evidencia con los patrones de DA de sus ARFs blanco, generando una disminución en la expresión de los ARFs en los callos resultantes (C15 y C23; Figura 18e). Mientras que, durante la inducción de ME, sólo ARF12 y 23 se encuentran disminuidos en los callos (CM) y ARF10 tiene una mayor DA en este mismo tejido.

Al comparar los tres tejidos al mes de la inducción, no se obtienen diferencias significativas en los tasiARFs (Figura 18c), y sólo ARF11, 24 y 26 se encuentran DA en CM comparado con C15 y C23 (Figura 18f). Con base en estos resultados podemos establecer que, para

la inducción de callos de maíz a partir de tejidos embrionarios, es importante la acumulación de tasiARFs en los embriones cigóticos. Por lo que los altos niveles de tasiARFs en ME pueden influenciar la respuesta inicial a las auxinas exógenas. La respuesta de la vía en los tejidos durante la inducción muestra que para la obtención de callos embriogénicos es necesaria la disminución de la acumulación de ciertos ARFs y que una mayor acumulación de estos TFs puede estar relacionada con la respuesta diferencial de los tejidos después de la inducción.

miRNAs durante la inducción de SE.

Se identificaron las secuencias de los distintos miRNAs anotados en miRBase21 (Juárez-González *et al.*, 2019; ver Métodos). Se calculó la abundancia y DA de cada miRNA, posteriormente, se clasificaron en familias de miRNAs (cada familia incluye todas las isoformas de un miRNA particular). Se identificaron 28 familias de miRNAs con una acumulación detectable en al menos una de las muestras de embriones cigóticos y callos. Más de la mitad se encuentran mayormente acumuladas en los callos (Juárez-González *et al.*, 2019; Fig.S3). Según el análisis de DA de cada familia de miRNA, se encontró que los mayores cambios ocurren durante la maduración del embrión; en donde 18 de las 28 familias se expresan de manera diferencial entre al menos dos tipos de embriones (Figura 19a). No obstante, el comportamiento de las familias de miRNAs muestra distintos patrones (Figura 19a):

- miRNAs mayormente acumulados en los estadios tempranos de la embriogénesis cigótica. miR159, miR156, miR167, miR171, miR390 se encuentran DA en IE15 comparado con IE23 y ME.
- miRNAs DA en las etapas tardías de la maduración del embrión. miR164, miR168, miR169, miR393, miR444 y miR529 presentan DA en ME, pero no presentan diferencias entre IE15 e IE23.

De igual manera, durante la inducción, familias de miRNAs se encuentran DA antes y después de un mes de la inducción (Figura 19b), Por ejemplo, miR166 y miR395 están DA antes de la inducción, mientras que miR827 y miR169 están DA en los callos, sin importar el explante del cual se parta para realizar la inducción. Estos patrones conservados en la

inducción de los tres embriones pueden mostrar la respuesta general ante al estrés abiótico que los tejidos sufren durante la inducción y no a características particulares del explante.

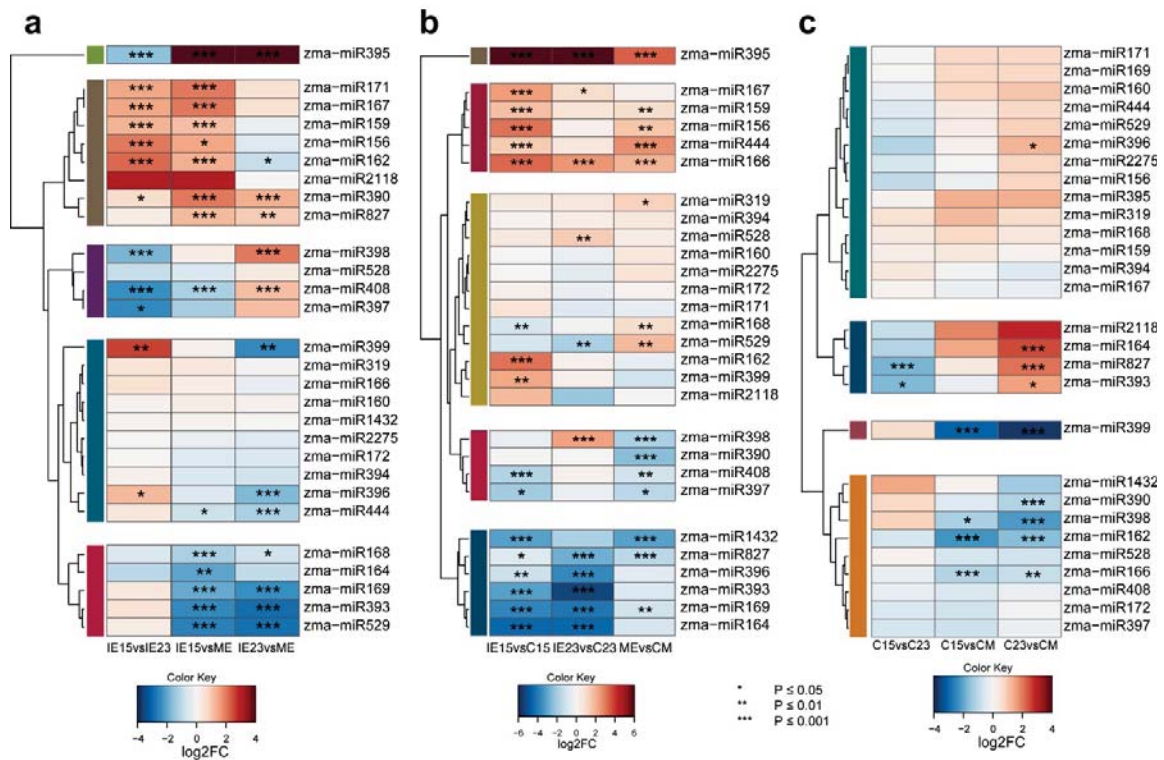


Figura 19. Acumulación Diferencial (DA) de miRNAs durante la embriogénesis cigótica y la inducción de embriogénesis somática de Maíz. **a:** DA de miRNAs durante el desarrollo del embrión cigótico de maíz. **b:** DA de miRNAs durante el proceso de inducción de embriogénesis somática de maíz. **c:** DA de miRNAs entre los callos obtenidos al mes de la inducción. **IE15vsIE23:** DA entre embriones de 15 días después de la polinización (IE15) y Embriones de 23 DDP (IE23); **IE15vsME:** DA entre IE15 y los embriones maduros (ME); **IE23vsME:** DA entre IE23 y ME; **IE15vsC15:** DA entre IE15 y callos obtenidos a partir de IE15 al mes de la inducción de callos (C15); **IE23vsC23:** DA entre IE23 y callos obtenidos a partir de IE23 al mes de la inducción de callos (C23); **MEvsCM:** DA entre ME y callos obtenidos a partir de ME al mes de la inducción de SE (CM); **C15vsC23:** DA entre C15 y C23; **C15vsCM:** DA entre C15 y CM; **C23 y CM:** DA entre C23 y CM. Los valores de DA con significancia estadística se muestran con asteriscos (* p < 0.05; ** p < 0.01 y *** p < 0.001).

Si tomamos sólo aquellos patrones de expresión de miRNAs que pudieran asociarse a la capacidad embriogénica de los embriones (Figura 3b):

- DA que sólo ocurre en la inducción de IE15 a C15: miR162 y miR399 son más abundantes antes de la inducción, mientras que miR168 después de la inducción.
- DA que sólo ocurre en la inducción de IE23 a C23: miR528 y miR398 son más abundantes antes de la inducción, mientras que miR529 después de la inducción.

- DA que sólo ocurre en la inducción de ME a CM: miR319 es más abundante antes de la inducción. miR390 y miR398 después de la inducción.
- DA que se comparte durante la inducción de IE15 e IE23 a C15 y C23, respectivamente: miR167 es más abundante antes de la inducción, mientras que miR164, miR393 y miR396 después de la inducción.

Las diferencias entre los callos son puntuales.

- miR393 y miR827 se encuentran DA en C23 comparados con C15
- miR162, miR166, miR398, miR399 miRNAs se encuentran DA en CM comparado con C15 y C23
- miRNAs DA entre C23 y CM: miR390 se encuentra DA en CM. Mientras que miR164, miR393, miR396 y miR827 en C23.

Al analizar los cambios que ocurren durante la inducción de callos, los patrones generales parecen indicar, que los cambios en las poblaciones de miRNAs son compartidos en los tres tipos de inducciones. No obstante, también muestra el impacto en la acumulación de miRNAs durante la inducción, dependiendo de la abundancia de cada familia en los tejidos explantes. Esto se evidencia mediante un análisis de acumulación relativa, dependiendo de abundancia inicial de miRNAs DA en los explantes (Figura 20).

En general, se puede observar que en IE15 existe una mayor acumulación de miRNAs relacionados a procesos de desarrollo (miR156, 159 y 167; Figura 20A), mientras que en IE23 y ME, existe una mayor presencia de miRNAs relacionados con procesos de estrés y la abundancia de miRNAs de desarrollo es casi la misma (Figura 20A). Cuando obtenemos la abundancia relativa, basada en los cambios que se dan durante la inducción (Figura 20B), se puede observar que los patrones generales de los miRNAs son distintos en los callos (Figura 20C), aunque la respuesta haya sido el aumento o la disminución en las tres inducciones. La respuesta de miRNAs relacionados con estrés es la más contrastante, puesto C23 y CM continúan teniendo una mayor acumulación de esta clase de miRNAs. Por lo que, la cantidad de miRNAs (y otras poblaciones de sRNAs) que se tiene en el explante, es importante para contender a la respuesta general durante la inducción de callos de maíz y al tener una distinta acumulación de estas moléculas, también la regulación de sus transcritos blanco será diferente.

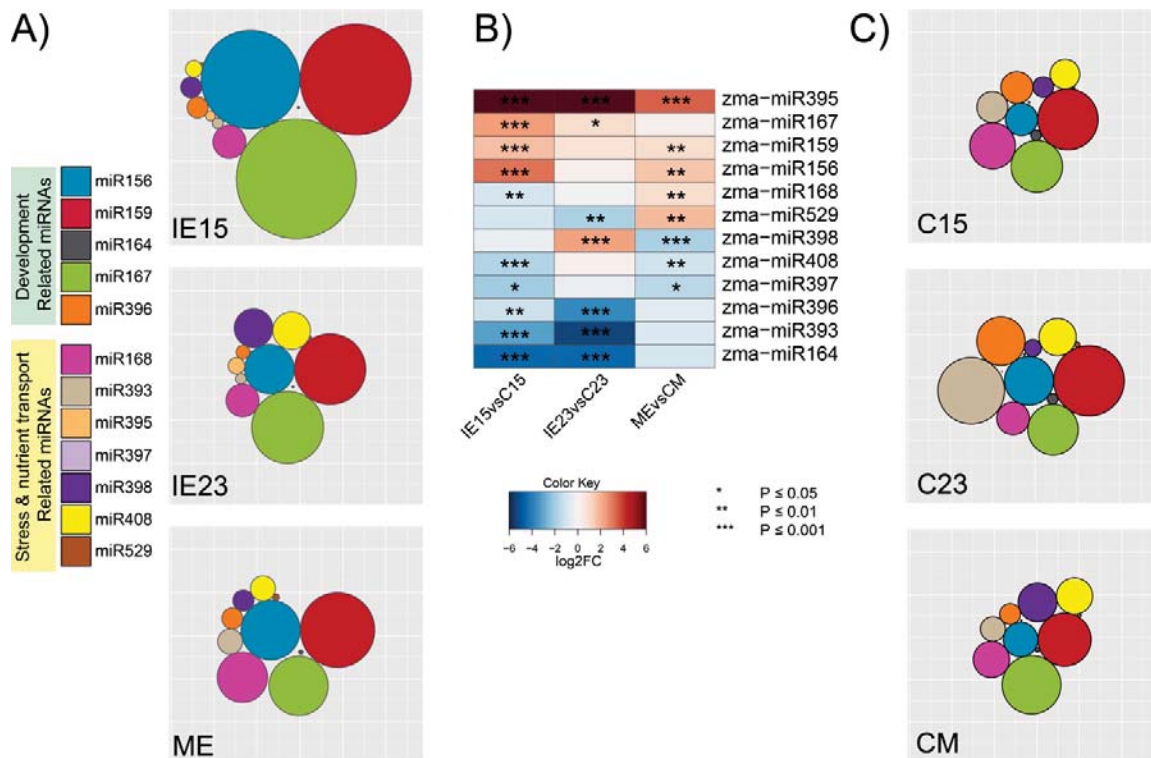


Figura 20. Abundancia relativa de miRNAs durante la inducción. A) Se muestra la abundancia de distintas familias de miRNAs que muestran una acumulación diferencial durante la inducción. **B)** Se muestran los valores de acumulación diferencial de distintas familias de miRNAs (tomado de Figura 19). **C)** Abundancia Relativa de diferentes familias de miRNAs, basada en los valores de cambio (\log_2FC) obtenidos durante la inducción (comparación embrión vs callo). El tamaño del círculo indica la abundancia de cada familia. Todas las familias de miRNAs mostrados presentan cambios significativos en al menos una comparación y las familias de miRNAs aquí presentadas pueden separarse en dos categorías. miRNAs relacionados con desarrollo y miRNAs relacionados a respuestas de estrés.

Una vez obtenidos los patrones de acumulación de miRNAs, lo siguiente era identificar el comportamiento de los transcritos blanco de estos miRNAs. Para ello, se tomaron las familias de miRNAs que presentaron patrones particulares de DA y mediante el uso de datos de bibliotecas de PARE (por sus siglas en Inglés: "Parallel Analysis of RNA End"; Juárez-González *et al.*, 2019; ver Métodos), se obtuvieron los transcritos blanco comprobados experimentalmente. Además de la predicción de transcritos blanco mediante dos plataformas distintas (Juárez-González *et al.*, 2019; ver Métodos), se obtuvieron múltiples transcritos blanco, La mayoría de estos se encuentran en estatus de predicción (Juárez-González *et al.*, 2019; Fig.S4, 5 y 6). Y dado que la regulación mediada por miRNAs no sólo es el corte endonucleolítico (lo que genera una depleción en la expresión del transcrito blanco), sino que además pueden regular mediante la inhibición de la traducción de los transcritos blancos, la relación entre los miRNAs y sus blancos es más compleja, por

lo que los niveles de DA de un miRNA no siempre tendrán una correlación negativa con sus transcritos blanco.

Se encontró DA en distintos blancos de miRNAs (Juárez-González *et al.*, 2019; Fig.S4), especialmente en la familia de TFs de las familias SQUAMOSA BINDING PROTEIN (*ZmSBP2*, 3, 18 y 27; blancos de miR156), del tipo b-HELIX-LOOP-HELIX (*ZmbHLH137*; blanco de miR162) y ARFs (*ZmARF16*, 18 and 30; blancos de miR167), las tres familias de TFs se encuentran mayormente acumuladas en ME, presentando una correlación negativa con la acumulación de el miRNA (Fig. 19a). Otros blancos de miRNAs también presentan este mismo comportamiento, tal es el caso de *ZmSBP6* (blanco de miR529) o bien *ZmSBP1* and TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (*TIR1*), blancos de miR393, los cuales muestran la menor acumulación en ME (Juárez-González *et al.*, 2019; Fig.S4), mientras que miR393 se encuentra mayormente acumulado en este tejido (Figura 19a).

Cómo se mostró anteriormente, la acumulación de miRNAs en los explantes tiene un impacto en los niveles de miRNAs después de la inducción, por lo que nuevamente, los blancos de miR156 (el cual disminuye después de la inducción), presentan una mayor DA en C15 (*ZmSBP18*, 20, 22 and 29; Juárez-González *et al.*, 2019; Fig.S5). No obstante, algunos de sus blancos no muestran el patrón de correlación negativa y disminuyen después de la inducción (*ZmSBP2*, 3, 8, 30, 32). Importantemente, y como se había mostrado en los resultados del análisis de TFs, CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (*ZmCUC2*), presenta una disminución durante la inducción de C15, pero no en la de C23 y CM, teniendo una correlación negativa con la acumulación de su blanco miR164 (Figura 19b). Otro grupo de TFs que presenta un disminución durante la inducción de C15 y C23, son los GROWTH REGULATOR FACTOR (*GRF*) blancos de miR396, quien presenta una mayor acumulación en estos tejidos (Figura 19b).

Finalmente, se comprobaron los patrones de acumulación de distintas familias de miRNAs, tasiARFs y sus blancos mediante experimentos de RT-qPCR (Juárez-González *et al.*, 2019; ver Métodos). Se corroboraron los patrones de acumulación obtenidos en la secuenciación masiva hasta en un 80% (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 5).

Abundancia y DA de siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs).

Los sRNAs de 21 – 24 nt que mapearon en alguna familia de Transposones (TE) en el genoma de maíz AGPv4.37 utilizando los archivos de anotación (ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/release-56/gff3/zea_mays/repeat_annotation/) se considerados como hc-siRNAs. La inclusión de un rango en la longitud de los hc-siRNAs para el análisis, se realizó con el objeto de identificar hc-siRNAs canónicos y no canónicos (Dna *et al.*, 2016).

La abundancia por tamaño mostró que las especies de 22 y 24 nt son las más abundantes para todos los tejidos y que durante la maduración del embrión la producción de hc-siRNAs de cualquier tamaño aumenta, teniendo la mayor abundancia en ME, mientras que durante la inducción se presenta una disminución global de los hc-siRNAs (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 6; Fig.S9). Además, C15 posee la menor abundancia de hc-siRNAs de 22 y 24 nt y en C15 los hc-siRNAs más abundantes son los de 24 nt; mientras que en C23 y CM son los de 22 nt (Juárez-González *et al.*, 2019; Fig.S9).

Al analizar la distribución de las lecturas que mapean en la Clase I LTR (Copia, Gypsy y RLX-Unknown-LTR), más del 60% de las lecturas de todos los tamaños analizados mapean en esta clase de TE (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 6), seguidos de la Superfamilia Helitron (Clase II, TE de DNA). Interesantemente, la proporción de hcsiRNAs derivados de las diferentes superfamilias muestran comportamientos variables en los callos inducidos. Mientras que la abundancia de hcsiRNAs derivados de Copia disminuye en los tejidos de callos, los hcsiRNAs que mapean en Gypsy y RLX-LTR aumentan (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 6). En cuanto a la distribución de hc-siRNAs por tamaño en las diferentes familias de TE, se encontró que los hc-siRNAs de 21-22 nt mapean preferentemente en Superfamilias de Retrotransposones. Por otro lado, las lecturas de 23 y 24 nt tienen la misma distribución, los hc-siRNAs que mapean en transposones de DNA (especialmente los del Orden TIR; Terminal Inverted Repeats), se encuentran mucho más enriquecidas comparadas con las de 21 y 22 nt.

El análisis de DA fue realizado para los hcsiRNAs, separándolos por longitud y familia de TE. Se encontraron mayores diferencias entre IE15 e IE23, que entre IE23 y ME (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 7A). Por ejemplo, los hcsiRNAs de 21-22 nt que mapean en

retrotransposones se encuentran DA, mientras que los de 23 – 24 nt disminuyen en IE15. La DA de hcsiRNAs muestra mayores diferencias durante la inducción de SE (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 7B). E importantemente, los hcsiRNAs de 24 nt derivados de la familia Gypsy y LTR-unknown TE muestra patrones de acumulación opuestos durante la inducción de IE15 e IE23.

Los hcsiRNAs derivados de TE tipo Copia, son más abundantes en tejidos de embriones comparados con callos, excepto para los de 21nt. Finalmente, y a diferencia de todos los resultados antes mostrado, las mayores diferencias de hc-siRNAs entre callos están dadas para C15 y C23, particularmente en las superfamilias de Retrotransposones tipo Copia, Gypsy y LTR-Unknown, en C15 los hcsiRNAs de 21 y 22 nt disminuyen (Juárez-González *et al.*, 2019; Figura 7C).

Discusión

En este trabajo se describió la respuesta contrastante de embriones de maíz VS-535 en diferentes etapas de desarrollo, durante el proceso de inducción de callos embriogénicos de maíz. La respuesta de los tres explantes embrionarios sometidos al mismo estímulo hormonal varía enormemente. Sólo los callos obtenidos a partir de IE15 muestran una alta frecuencia de callos embriogénicos tipo II, los cuales pueden propagarse durante los subcultivos sucesivos y son capaces de regenerar una planta. Los IE23 son capaces de generar callos, pero no pueden ser propagados ya que a tiempos prolongados de subcultivo se necrosan y mueren. Los embriones maduros son incapaces de generar callos embriogénicos, su respuesta consiste en el crecimiento masivo de raíces, las cuales se necrosan y mueren en los primeros meses de subcultivo.

La inducción de callos en los tres explantes embrionarios de maíz genera una organización celular parecida a la conformación de un xilema temprano (presencia de células procambiales, elementos traqueales y parénquima). Las traqueidas podrían ser relevantes durante el transporte de agua a través de los callos. En tanto que las células parenquimatosas además de conformar un tejido de soporte y almacenamiento, pueden brindar a los explantes la capacidad de dediferenciación, ya que las células parenquimatosas son capaces de adquirir nuevas identidades celulares (Evert, 2006).

Por lo tanto, durante la inducción de callos embriogénicos de maíz VS-535, el estímulo hormonal dado y las condiciones de oscuridad no son los únicos factores determinantes en la respuesta final. El estado de desarrollo en el cual se encuentra el explante embrionario y por ende el perfil de expresión genética preexistente en los embriones cigóticos, genera una percepción distinta al estímulo. En el caso de IE15, las células presentes durante la inducción promueven respuestas a la señal externa que les permiten tomar el camino hacia la proliferación celular y conformar callos con capacidades regenerativas.

El porqué sólo IE15 pueden producir callos embriogénicos propagables capaces de regenerar una planta es complejo. Aunque existen reportes de genes relevantes para la obtención de respuestas embriogénicas durante la SE en maíz (tal es el caso de *Baby Boom* y *Wuschel*; Lowe *et al.*, 2016), no todas las variedades de maíz responden de la misma

manera. Las capacidades regenerativas de los callos continúan siendo dependientes de la respuesta al estímulo hormonal, el explante utilizado y el genotipo.

De los genes reportados previamente como marcadores moleculares de SE (Elhiti *et al.*, 2013), se lograron identificar TFs de la familia HB enriquecidos en IE15, por ejemplo *Kn1*, cuya función es delimitar a las células que no responden a señales de diferenciación en el SAM (Smith *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1999) y *OCL1,4,5* y *6*, implicados en el mantenimiento de la identidad en las capas de células externas del SAM y el RAM (Ingram *et al.*, 1999). De la misma manera, se identificó una mayor acumulación de un homólogo de *SERK2* en C15 y C23 (utilizado como marcador molecular de células embriogénicas en cultivos celulares de zanahoria; Albrecht *et al.*, 2005). *SERK2*, se ha implicado en la promoción del estado de competencia durante la formación de callos embriogénicos de zanahoria y *Arabidopsis* (Hecht *et al.*, 2001; Albrecht *et al.*, 2005). Por consiguiente, los niveles de expresión de estos genes en explantes embrionarios de maíz VS-535 y en cultivos de callos, podrían utilizarse como marcadores moleculares para la inducción de callos embriogénicos de maíz VS-535. No obstante, el mecanismo por el cual los productos de estos genes podrían estar implicados en la SE no ha sido descrito.

Con base en el análisis de enriquecimiento funcional, se identificaron los procesos biológicos centrales en los explantes y callos al mes de subcultivo. En los embriones inmaduros (IE15 e IE23), la división celular y metabolismo de ácidos nucleicos son procesos centrales, concordando con reportes previos sobre el desarrollo embrionario en distintas variedades de maíz (Teoh *et al.*, 2013). Antes de la desecación de los embriones maduros, la activa división celular y la síntesis de ácidos nucleicos es necesaria durante la formación de los primordios de hoja a partir de las células del SAM en el embrión inmaduro. Esto se evidencia en IE15, con una menor acumulación del homólogo de TOPLESS (*TPL*), correpresor de MONOPTEROS (MP), un TF de la familia ARF (en *Arabidopsis* AtARF5) indispensable para los patrones de formación dependientes de auxinas (Möller & Weijers, 2009). Así como la sobreexpresión de *ZmARF23*, homólogo de AtARF17 (Liu *et al.*, 2011), cuya función parece contribuir durante la formación de los cotiledones en *Arabidopsis thaliana*. *ZmARF23* es además blanco de tasiARFs y miR171. El patrón de acumulación de miR171 y tasiRNAs, mostró una correlación negativa con la acumulación de *ZmARF23* en los embriones inmaduros.

Además de la proliferación celular en el SAM de los embriones inmaduros de maíz, la activa división celular y síntesis de ácidos nucleicos son indispensables durante el establecimiento del RAM. Una de las principales diferencias entre IE15 e IE23 es la presencia del RAM y una mayor acumulación de WOX11 y NAC116 en IE23. Aunque no se conoce bien el papel de NAC116; en arroz, WOX11 es necesario para el establecimiento del RAM y la pérdida de función se relaciona con su desarrollo y una desregulación de la señalización de auxinas y citocinias (Zhao *et al.*, 2009).

En general los embriones inmaduros de 15 DDP poseen un perfil transcripcional que refleja la totipotencia necesaria para desarrollar la parte apical/basal del embrión, generando patrones de expresión-temporales para definir las partes de este. Esta etapa correlaciona además con una mayor acumulación de miRNAs relacionados con el desarrollo (miR156, 159, 171 y 390). Por otro lado, en ME la acumulación de nutrientes ha cambiado el programa de expresión genética y se prepara la respuesta ante el estrés, la cual puede ser mediada por proteínas de choque térmico y una mayor acumulación de miRNAs relacionados con el metabolismo y estrés.

Además de la mayor actividad proliferativa en IE15, el análisis de enriquecimiento funcional mostró que la regulación de la expresión genética relacionada con la transducción de señales mediante fosforilación y remodelación de la cromatina (particularmente mediante la metilación del DNA), son también procesos relevantes para este explante. En plantas, la mayor vía de regulación epigenética mediada por sRNAs es la vía RdDM (Matzke *et al.*, 2014). Parece ser que durante el desarrollo de los embriones de maíz (al menos en las etapas tardías; L2-L6), el funcionamiento de RdDM es mediante la vía no canónica, mientras que durante la maduración opera la vía canónica.

Para el establecimiento de las marcas de metilación por RdDM (Pol IV-RDR2-DCL3-AGO4; llamada la vía canónica) son necesarias marcas preexistentes en la cromatina (metilación del DNA y H3K9me²). Sin una marca que reconocer, los complejos proteicos que permiten el reclutamiento de Pol IV no pueden unirse al DNA y por lo tanto el silenciamiento mediado por RdDM con sus hcsiRNAs de 24 nt no se llevará a cabo, provocando que regiones genómicas normalmente heterocromáticas (TEs y secuencias repetidas) puedan ser transcritas por Pol II (Matzke and Mosher, 2014).

La vía RdDM no canónica brinda a las células un mecanismo de defensa ante la activa transcripción de TEs. Dichos transcritos pueden ser copiados por RDR6 produciendo un dsRNA, que puede ser procesado por DCL2/DCL4 en siRNAs de 21- 22 nt, los cuales pueden asociarse con AGO1 para generar silenciamiento a nivel postranscripcional mediante el reconocimiento y la escisión del transcrito generado por Pol II. De manera alternativa, los siRNAs de 21 -22 nt pueden asociarse con un RISC conformado por AGO6, para el reconocimiento de transcritos generados por Pol V y el posterior reclutamiento de DRM2, la metiltransferasa que ejerce la metilación del DNA en RdDM (Matzke and Mosher, 2014; McCue *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2015).

Nuestros resultados mostraron que durante la maduración de los embriones de maíz VS-535, hay una acumulación de hc-siRNAs canónicos de 24 nt, lo cual coincide con lo reportado para Arabidopsis, en donde además de manera inversa, existe una disminución de hc-siRNAs de 21 y 22 nt (Köhler & Lafon-Placette, 2015). Con base en esto resultados, en IE15 puede encontrarse funcionando más activamente la vía RdDM no canónica, dicha actividad disminuye durante la maduración del embrión, reforzando la actividad de la vía canónica en ME (explante que presentó la mayor acumulación de hc-siRNAs), dando como resultado el establecimiento final de los patrones de metilación en regiones genómicas heterocromáticas al final del desarrollo embrionario. La promoción del silenciamiento genético en regiones codificantes particulares a través del establecimiento de la marca H3K27me³, puede resultar relevante durante el desarrollo embrionario del maíz VS-535, ya que un transcrito homólogo a Enhancer of Zeste, la metiltransferasa del complejo PRC2 de Polycomb, se encuentra enriquecido al final del desarrollo embrionario.

La respuesta general durante la inducción de callos se caracteriza por el arresto de la traducción y un aumento en la percepción de señales de estrés abiótico, mediante una mayor expresión de peroxidasas y alcohol deshidrogenasas que promueven la detoxificación celular. Se sabe que el IAA endógeno puede ser metabolizado por peroxidasas y que la sobreacumulación de la actividad peroxidasa en tabaco, refuerza la respuesta de defensa ante estrés abiótico e interfiere con el crecimiento, debido al incremento en la degradación de IAA (Zhou *et al.*, 2016). Además, existen reportes que relacionan la actividad peroxidasa durante la adquisición de la competencia para la formación de callos embriogénicos en diferentes especies (El Hadrami & Baaziz, 1995; Kormutak & Vookova, 2001). La actividad peroxidasa acompañada del metabolismo de

compuestos polifenólicos como los fenilpropanoides, genera una mejor respuesta regenerativa durante la embriogénesis somática de cacao (Minyaka *et al.*, 2017), mientras que durante la inducción de callos de *Euphorbia pulcherrima* (Noche buena), el metabolismo de compuestos polifenólicos mediante la actividad de peroxidasas se asocia a los callos no embriogénicos (Kormutak & Vookova, 2001).

Durante la inducción de callos embriogénicos de maíz VS-535, la respuesta al estrés abiótico es percibida de manera similar por los tres explantes. Sin embargo, las células en los explantes funcionan diferente acorde a su programa de expresión génica. En C15, el estrés oxidativo es menor y existe una mayor acumulación de los represores de ARFs, *ZmIAA24* y *14*; acarreadores de eflujo (PINs); así como la disminución de otros ARFs. Por lo que la modulación de la respuesta ante el estrés oxidativo de C15 permite el funcionamiento adecuado para la formación de callos embriogénicos.

Una de las diferencias principales en el proceso de inducción de IE15, es la disminución de *ZmNAC119* (también conocido como *ZmCUC2*) después de la inducción de callos embriogénicos. *ZmNAC119* es un transcrito blanco de miR164. En *Arabidopsis*, miR164 media la regulación de *CUC1* y *CUC2* para el correcto establecimiento de los límites entre órganos a través del desarrollo de la planta (por ejemplo, la formación del meristemo apical del brote), el patrón de floración y la morfogénesis de la hoja (Bartel *et al.*, 2004). En maíz, miR164 tiene una mayor acumulación en etapas tempranas del desarrollo embrionario manteniendo a raya los niveles de acumulación de sus blancos, mientras que en etapas tardías del desarrollo embrionario los genes *NAC* comienzan a sobreexpresarse (Li *et al.*, 2016). Durante la inducción de callos embriogénicos a partir de IE15 e IE23, existe una mayor acumulación de miR164, teniendo una correlación negativa con su blanco sólo en la inducción de C15. Por lo que la disminución en la acumulación de *ZmNAC119* puede ser una señal relacionada con la detención del avance en el patrón de formación del embrión cigótico para establecer un callo embriogénico con capacidades regenerativas.

Otro miRNA clave, relacionado con la proliferación celular, es miR396. En *Arabidopsis*, miR396 tiene como blancos siete de los nueve miembros de la familia de TFs GRF y su sobreexpresión reprime el crecimiento de órganos. La regulación mediada por miR396/GRF está relacionada con la transición de células del centro quiescente del RAM a células de amplificación transitoria (TACs, por sus siglas en inglés: "Transit-Amplifying cells"). En este

proceso, los GRFs se expresan en las TACs, mientras que miR396 se expresa en el centro quiescente. De esta manera, miR396 establece una barrera molecular para excluir la expresión de GRFs en el centro quiescente (Omidbakhshfard *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2015). Aunado a esto, un reporte reciente sugiere que el nodo de regulación miR396-GRFs regula positivamente a los genes PLETHORA (TFs de la familia AP2-EREB), pudiendo ser relevantes para el establecimiento de la sensibilidad adecuada a las auxinas durante la inducción de SE en *Arabidopsis* (Szczygieł-Sommer & Gaj, 2019). Durante la inducción de callos embriogénicos de maíz VS-535, encontramos que la mayor acumulación de miR396 en C15 y C23, ejerce una disminución en la expresión de sus GRFs blanco.

La regulación mediada por miRNAs y tasiRNAs conforma circuitos específicos y dinámicos en las complejas redes de regulación ejercidas por familias completas de TFs. Por lo que para estudiar el papel que tienen los TFs en la modulación de la expresión genética, es necesario situar a los sRNAs (particularmente a los miRNAs) como parte esencial de las redes de regulación genética durante la mayoría de los procesos en una planta. Esto resulta evidente en diversos reportes donde la actividad de una familia de TFs es modulada directamente por la percepción de señales (generalmente hormonas) o mediante alguna familia de miRNAs particular (Rubio-Somoza & Weigel, 2011; Tang & Chu, 2017; Jangra *et al.*, 2018). Basándonos en reportes previos, y tal como se mostró para miR164 y miR396, exploramos los nodos de regulación que involucran a miRNAs y tasiRNAs, los cuales mantienen un papel esencial para la plasticidad celular durante el desarrollo y las respuestas ante distintos tipos de estrés en diferentes especies (particularmente en *Arabidopsis thaliana* y arroz).

miR156 se relaciona con la promoción de la progresión de diferentes fases de desarrollo a través de la vida de la planta (en monocotiledóneas y dicotiledóneas). En *Arabidopsis*, los niveles de expresión de miR156 disminuyen con la edad de la hoja, sus blancos son once de los diecisiete TFs Squamosa Promoter Binding Protein-like (SPL; Chen, 2009). La disminución de miR156, aumenta los niveles de SPL, dando como resultado la adquisición prematura de características de la fase adulta y una floración temprana (Rubio-Somoza & Weigel, 2011). No obstante, la función de los SPL es variada y contrastante. Los SPLs se relacionan con la transición reproductiva, desarrollo de tricomas, dominancia apical, ramificación de las inflorescencias, madurez del fruto, tiempo entre la iniciación de las hojas, desarrollo del saco polínico y homeostasis de cobre (Preston & Hileman, 2013).

Además de su papel en el desarrollo de la planta, miR156 está vinculado con la capacidad embriogénica de cultivos *in vitro* de callos. En *Citrus sinensis* (naranja), se encontró que la expresión de miR156 y miR164 es significativamente más alta en callos embriogénicos, comparada con callos no embriogénicos durante los primeros días de la inducción (Wu et al., 2011). Los cultivos de callos obtenidos a partir de IE15 y ME mostraron una disminución de miR156 pero sus transcritos blanco (nombrados SPBs en maíz) tienen un perfil de expresión particular: *ZmSPB20*, *22* se encuentran mayormente acumulados durante la inducción de IE15, mientras que *ZmSPB18* y *29* se sobreexpresan en todos los tejidos inducidos, sólo por mencionar algunos ejemplos (Figura 21a).

Estos resultados parecen contradictorios al compararse con los patrones de expresión de miR156 en callos embriogénicos de naranja. No obstante, este caso en particular ejemplifica la importancia del perfil de expresión genética en el explante. miR156 se encuentra mayormente acumulado en IE15 comparado con los otros embriones. Por lo que al inicio de la inducción de callos de maíz VS-535, miR156 ejerce una mayor regulación de sus blancos en IE15, aun cuando al mes de subcultivo los niveles de miR156 disminuyan. Lo cual concuerda con lo encontrado en trigo, donde si bien miR156 se encuentra mayormente expresado en callos embriogénicos; su expresión disminuye a los 15 días de subcultivo (Chu et al., 2016).

Por otro lado, el nodo conformado por miR390-tasiARFs-miR166 nos puede guiar en cuanto a la adquisición de un estado de totipotencialidad en los tejidos sometidos a la inducción. El nodo miR390-tasiARFs-miR166 ha sido extensamente estudiado debido a su papel en la formación de los patrones morfogenéticos durante el desarrollo de la planta, y recientemente su funcionamiento se ha relacionado con la regeneración de plantas mediante SE (Lin et al., 2015; López-Ruiz et al., 2019b).

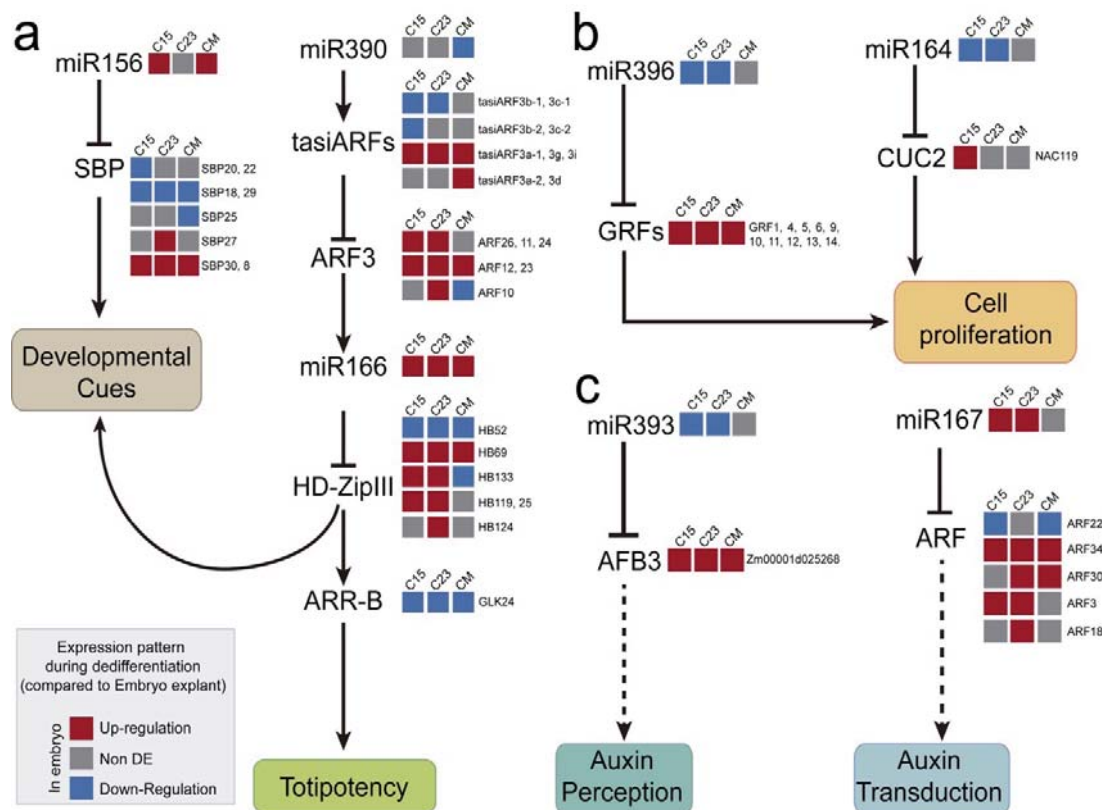


Figura 21. Modelo para la regulación mediada por miRNAs y tasiARFs durante la inducción de SE en maíz. (A) Nodos de miRNAs y tasiARFs relacionados a las transiciones en el desarrollo y el mantenimiento de los estados totipotentes. (B) Nodos de miRNAs que tienen un impacto en la proliferación celular (C) nodos de miRNAs para la señalización de auxinas. Los procesos celulares que resultan afectados por la regulación mediada por miRNAs y tasiARFs se reportan con base en estudios realizados principalmente en *Arabidopsis thaliana* y maíz (Rubio-Somoza & Weigel, 2011; Meng *et al.*, 2017). Las flechas indican regulación positiva mientras que las líneas en forma de T indican regulación negativa. Flechas con líneas punteadas señalan relaciones putativas para maíz. Los patrones de expresión de sRNAs y sus blancos durante la inducción de C15, C23 y CM se representan por cuadros de diferentes colores, tal como se explican en la caja (izquierda parte posterior). Figura Modificada de Juárez-González, *et al.*, 2019.

La regulación mediada por el nodo miR390-tasiARFs-miR166 puede resumirse de la siguiente manera: en maíz, miR390 tiene como transcritos blanco los genes TAS3, a partir del procesamiento mediado por miR390, los transcritos TAS3 son reconocidos por miR390/AGO7 y son procesados en sRNAs secundarios de 21nt conocidos como tasiARFs, cuyos transcritos blanco son ARFs pertenecientes al Clado III (Xia *et al.*, 2017). Dichos ARFs median la regulación genética dependiente de auxinas mediante su unión a secuencias específicas en los promotores de los genes de respuesta a auxinas. Es importante mantener la regulación de ARFs represores de la clase 3/4 por los tasiARFs en la respuesta de auxinas. En este sentido, se encontró que hay mayor acumulación de tasiARFs en C15 y C23 que en CM (Figura 21a). Interesantemente, se ha propuesto que miR166 puede ser regulado por este grupo de ARFs debido a la presencia de un sitio de unión para ARFs en el promotor de diversos miembros de la familia miR166, por lo que la

expresión de miR166 podría ser estimulada a partir de ciertos ARFs. A su vez, miR166 tiene como blancos TFs HB de la clase HD-ZIP III (Nogueira *et al.*, 2007). En Arabidopsis, este grupo de TFs se relaciona con la regulación de múltiples procesos en el desarrollo, como los patrones de formación en estados embrionarios, iniciación y homeostasis del meristemo y la polaridad de órganos laterales (Du & Wang, 2015).

Recientemente los TFs HB de la clase HD-ZIP III han tomado relevancia por su papel en la formación de complejos con otro grupo de TFs; ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs) del tipo B (ARR1, ARR2, ARR10 y ARR12), los cuales son estimulados bajo la percepción de citocininas. La formación de este complejo transcripcional induce directamente la expresión de *WUS*, promoviendo la conformación y mantenimiento del SAM y más aún, el establecimiento de nichos de células totipotentes durante la regeneración temprana de Arabidopsis mediante cultivos de callos embriogénicos (Zhang *et al.*, 2015, 2017).

Durante el proceso de inducción de callos, en cualquiera de los tres explantes embrionarios utilizados, la respuesta general a nivel de tasiARFs resulta en la inhibición de sus ARFs blanco, lo cual corresponde con una disminución en la expresión de miR166 durante el proceso de inducción en cualquiera de los tres explantes embrionarios. Además, un transcrito homólogo a ATHB14 de Arabidopsis (nombrado en maíz como Homeobox Transcriptor Factor 52; ZmHB52; Figura 21a) se encuentra acumulado en los tres tejidos después de la inducción de callos de maíz VS-535. Aunado a esto, otros transcritos HD-ZIP III (también blancos putativos de miR166) generan un perfil de expresión contrario y contrastante en los callos al mes de la inducción. Al igual que los SPBs, el perfil de expresión de esta familia de TFs puede conformar una cascada de señalización particular para generar distintas respuestas en los explantes y durante la inducción de callos embriogénicos de maíz. Así mismo, se encontró la sobreexpresión de un homólogo a ARR12 en los callos, sin importar el explante utilizado. Por lo que, aun cuando no existen reportes de la conservación de esta vía de regulación en maíz, abre el panorama para un estudio más profundo sobre la interacción de estas familias de TFs. Y si el mecanismo de regulación mediado por HD-ZIP/ARR se encuentra conservado en maíz, podría explicar en parte las observaciones en cuanto a capacidades de totipotencialidad celular.

En Arabidopsis, se ha descrito la regulación de la respuesta a auxinas mediada por varias familias de miRNAs durante la inducción de SE (adicional a la regulación mediada por

tasiRNAs). Ejemplo de ello es miR393, involucrado en la señalización de auxinas durante el desarrollo de la planta. Aunado a esto, durante la inducción de SE, miR393 contribuye a la transición de los tejidos en inducción, mediante la regulación de receptores de auxinas (TIR1 y AFB2) y modulando la sensibilidad del tejido al tratamiento hormonal (Szyrajew *et al.*, 2017).

En nuestros resultados, la mayor acumulación de miR393 en la inducción de IE15 y IE23 concuerda con lo reportado previamente para cultivos de callos embriogénicos de *Arabidopsis* (Szyrajew *et al.*, 2017). Por lo que, es probable que la percepción de auxinas durante la inducción de estos dos explantes sea muy parecida, lo cual concuerda con la similitud en la respuesta inicial de estos dos tejidos (Figura 21C). No obstante, la regulación de receptores de auxinas por miR393 en *Arabidopsis* no ha sido reportada en maíz y aunque un blanco putativo de miR393 ortólogo de AFB3 se encuentra inhibido en los callos después de la inducción, es necesario un estudio profundo sobre el papel de miR393 en la regulación de sus transcritos blanco para determinar cómo los explantes responden al estímulo de auxinas exógenas y su relación con la generación de callos con capacidades regenerativas.

El nodo de regulación mediado por miR167 está implicado en la promoción e inhibición de raíces adventicias en *Arabidopsis*. Este nodo involucra a miR160 y una compleja regulación de ARFs. El sistema de raíces de una planta consiste en raíces primarias, laterales y adventicias. Las raíces adventicias brindan a las plantas soporte y la absorción de nutrientes y agua del suelo. La generación de raíces adventicias es un proceso que puede ser afectado por diversos factores ambientales y endógenos. Uno de los factores endógenos son las auxinas (Geiss *et al.*, 2018). En *Arabidopsis*, ARF6 y ARF8 son reguladores positivos del crecimiento de raíces adventicias, mientras que ARF17 es un regulador negativo. A su vez, *ARF6* y *ARF8* son transcritos blanco de miR167, mientras que *ARF10*, *16* y *17* son blancos de miR160 (Gutierrez *et al.*, 2009).

El balance entre ARF17 y los reguladores positivos ARF6 y ARF8 es indispensable para la correcta formación de las raíces adventicias. La luz promueve e inhibe la expresión de ARF6 y ARF17, respectivamente. ARF6 regula positivamente la expresión de ARF8, ARF17, miR160 y miR167. A su vez, miR167 regula negativamente a ARF6 y ARF8, inhibiendo la generación de raíces adventicias. Por su parte, ARF8 regula negativamente a miR167 y

ARF17. Mientras que ARF17 promueve la expresión de miR167, por lo que tiene un efecto negativo inhibiendo la generación de raíces adventicias. Al mismo tiempo, miR160 regula negativamente la expresión de ARF17 (Gutierrez *et al.*, 2009).

Después de la inducción de callos a partir de nuestros tres explantes embrionarios, miR167 disminuye su acumulación en C15 y C23 y *ZmARF22* (ortólogo de ARF6 de Arabidopsis) está sobreexpresado en C15 y CM. *ZmARF30* (ortólogo de ARF8 de Arabidopsis) no presentó DA en la inducción de IE15, pero se encuentra significativamente disminuido en la inducción de IE23 y ME (Figura 21C). En conjunto, podríamos inferir que durante la inducción temprana de callos el exceso de auxinas exógenas (2,4-D) causa un decremento en la percepción de auxinas, probablemente para permitir una apropiada reprogramación acorde al estímulo. Las diferencias encontradas en el nodo de miR167 entre IE23 y ME, podrían explicar el fenotipo de CM, el cual se caracteriza por un crecimiento masivo de raíces.

Además de la regulación postranscripcional por miRNAs y tasiRNAs, los perfiles de acumulación de hc-siRNAs durante la inducción de callos VS-535 sugieren la inhibición de la vía RdDM canónica debido a la disminución de hc-siRNAs de 24nt. No obstante, este efecto no es general y hc-siRNAs que mapean en familias de retrotransposones específicas tienen un comportamiento diferente y aumentan después de la inducción (tal es el caso de hc-siRNAs que mapean en retrotransposones tipo Gypsy y LTR). Al comparar los callos entre sí, encontramos que C15, tienen una mayor abundancia de hc-siRNAs de 24 nt que mapean en retrotransposones, mientras que C23 y CM en hc-siRNAs de 21 y 22 nt de la misma clase. Esto resulta relevante porque la producción de hc-siRNAs en C15, comparado con los otros callos es diferente, por lo que los patrones de metilación serán distintos. Estudios realizados en diversas especies (Kumar & Van Staden, 2017) han demostrado que los callos embriogénicos tienen menores niveles de metilación global, comparados con los callos no embriogénicos. Aunque los resultados sobre la producción diferencial de hc-siRNAs en callos embriogénicos de maíz VS-535, no nos permiten conocer los patrones de metilación y su impacto en la obtención de callos embriogénicos, si abre una perspectiva para el estudio de la vía RdDM, la regulación particular de familias específicas de TE y su impacto en la SE.

De la misma manera, durante la inducción de IE15 también se observó la disminución en la expresión de transcritos esenciales para el silenciamiento epigenético mediado por la marca H3K27me₃, destacando la disminución de VRN2, parte del complejo PRC2 de Polycomb. Estudios durante el desarrollo de raíces de *Arabidopsis thaliana* muestran que la pérdida de función en alguna subunidad de PRC2, provoca una proliferación ectópica de las células diferenciadas y la formación de masas indiferenciadas tipo callo (Ikeuchi *et al.*, 2015). Esto debido a que la H3K27me³ regula negativamente la expresión de los TFs WIND (pertenecientes a la familia AP2-EREb). Los TFs WIND, regulan la expresión de los miembros de su propia familia y se asocian con correguladores transcripcionales que carecen de dominios de unión a DNA, por ejemplo los de la familia GRAS (Heyman *et al.*, 2018).

Sólo durante la inducción de C15 disminuye VRN2. E interesantemente, sólo en C15 y C23 se observa el aumento de TFs tipo AP2-EREb y los correguladores GRAS, por lo que la inhibición de este mecanismo de regulación en tejidos con capacidades de generar callos podría ser esencial durante la respuesta. *ZmEREb87*, *100*, *205*, *210* y *212* (este último además es blanco de miR172), así como *ZmGRAS16*, *20*, *38* y *67* (Tabla Suplementaria 4), todos ellos mayormente acumulados en C15, podrían servir como excelentes candidatos para estudiar la promoción de la desdiferenciación de tejidos somáticos para la obtención de callos embriogénicos mediante la inhibición del silenciamiento mediado por Polycomb.

Finalmente, las diferencias en la DA de TF entre los callos, pueden explicar la respuesta contrastante de los tejidos al mes de la inducción. La mayor acumulación de *ZmGRF1*, *ZmHB1 (Kn1)*, *ZmARF7* y *ZmARF4* en C15, los hace excelentes candidatos para estudiar a profundidad su papel durante la SE. Ya que, como anteriormente se describió, las tres familias de TFs tienen un impacto profundo en procesos de proliferación celular y señalización hormonal.

En conjunto, estos resultados presentan un panorama global del perfil transcripcional de explantes embrionarios de maíz, durante la etapa de desdiferenciación en el proceso de SE. Esto revela información puntual sobre genes que pueden estar implicados en un proceso particular, como la respuesta diferencial de embriones de maíz VS-535 utilizados como explante durante la inducción de SE, en conjunto con los mecanismos de regulación

mediados por sRNAs, íntimamente ligados al desarrollo, respuestas ante el estrés y estímulos hormonales, en particular auxinas.

Conclusiones

El perfil de expresión genética en IE15, IE23 y ME es distinto. En los embriones inmaduros se centra en procesos biológicos como la proliferación celular y la totipotencialidad. El perfil de expresión cambia durante la maduración del embrión.

Después de la inducción existe una inhibición de mecanismos epigenéticos que involucran al complejo PRC2 de Polycomb.

La respuesta embriogénica de los callos depende de la etapa de desarrollo del explante. Los resultados del trabajo sugieren que la regulación postranscripcional mediada por sRNAs es importante para esta respuesta.

- De los tres explantes utilizados, el mejor para inducir callos embriogénicos de maíz de la variedad VS-535 son los embriones en etapas de desarrollo L1-L2 (Embriones de 15 DDP; IE15). Los embriones en etapas L3-L4 (Embriones de 23 DDP; IE23) son capaces de producir callos embriogénicos después de varios meses de subcultivo; pero no proliferan y al final los tejidos se necrosan u mueren, por ende no es posible regenerar plantas a partir de IE23. Los embriones maduros (ME) no tienen la capacidad de producir callos embriogénicos y durante los subcultivos el tejido se necrosa y muere.
- Existen diferencias en la distribución de sRNAs antes y después de la inducción de callos. Las lecturas de hc-siRNAs son menos abundantes en los callos que en los embriones. Además, la longitud de los hc-siRNAs difiere antes y después de la inducción de callos, lo cual indica un reajuste entre las vías RdDM canónica y no canónica.
- La abundancia de ta-siARFs y ARFs en los tiempos de desarrollo embrionario analizados es relevante para la respuesta durante la inducción de callos. Con el estímulo hormonal utilizado, los ta-siARFs mantienen los niveles de acumulación de sus ARFs blanco en C15 e C23, pero no en CM.

- El patrón de expresión de miRNAs en el explante es relevante para la respuesta final durante la Inducción de SE. El explante con capacidades proliferativas y regenerativas posee un perfil de expresión de miRNAs relacionados a procesos de desarrollo y diferenciación. En IE23 y ME, los miRNAs relacionados con respuestas de estrés y metabolismo se encuentran más enriquecidos.
- Los nodos de regulación mediados por miR156, miR390, tasiARFs, miR166, miR393, miR164, miR396 y miR167 y los patrones de expresión de su blancos, pueden explicar en parte, las diferentes respuestas de los explantes embrionarios durante la inducción de SE.

Se encontraron candidatos para ser usados como marcadores moleculares de la desdiferenciación durante la inducción, en su mayoría son TFs de las familias HB, AP2-EREB y ARFs, así como AUXIAA y *SERK2*.

Perspectivas

En el laboratorio, se generaron los perfiles de acumulación de proteínas (proteomas) de los embriones y callos utilizados en este trabajo. Se desea analizar a detalle los proteomas y comparar con los perfiles de expresión genética a nivel transcripcional, con el objeto de conocer que tanto de la potencial regulación en la expresión de transcritos correlaciona con el producto funcional proteico. Y como el silenciamiento postranscripcional mediado por sRNAs puede impactar en la abundancia de las proteínas.

Secuenciar el Genoma de maíz VS-535, para el estudio de hc-siRNAs en regiones específicas del DNA, aunado a esto:

- Obtener los patrones de metilación globales durante la dediferenciación de IE15 y el tejido más contrastante, ME.
- Identificar la localización genómica de las distintas familias de TE, con el fin de correlacionar con los perfiles de expresión hc-siRNAs.

Explorar la distribución de la marca H3K27me³ mediada por Polycomb en los embriones y callos analizados mediante Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

Obtener los mecanismos regulatorios en los cuales podrían estar involucrados los ARFs, mediante un análisis de los dominios presentes en sus secuencias, predecir su papel como Activadores/Represores y los elementos de respuesta que podrían reconocer en el genoma de maíz.

Analizar la expresión espacio temporal de los genes propuestos como marcadores de callos con capacidades proliferativas y regenerativas (*SERK2*, *Kn1*, *NAC116*, *GRF1*, *ZmARF5* y *24*, por mencionar algunos) mediante Hibridación *in Situ* (ISH).

Referencias

- Aken BL, Ayling S, Barrell D, Clarke L, Curwen V, Fairley S, Fernandez Banet J, Billis K, García Girón C, Hourlier T, et al. 2016.** The Ensembl gene annotation system. *Database : the journal of biological databases and curation* **2016**: 1–19.
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S. 2005.** The Arabidopsis thaliana SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 Control Male Sporogenesis. *The Plant Cell* **17**: 3337–3349.
- Alejandri-Ramírez ND, Chávez-Hernández EC, Contreras-Guerra JL, Reyes JL, Dinkova TD. 2018.** Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403–10.
- Alvarez-Venegas R, De la Peña C, Casas-Mollano JA. 2014.** *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications* (R Alvarez-Venegas, Ed.). Cham: Springer International Publishing.
- Armstrong CL, Green CE. 1985.** Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**: 207–214.
- Baker CM, Wetzstein HY. 1994.** Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **36**: 361–368.
- Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. 2004.** MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. **116**: 281–297.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014.** Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.
- Bonnet E, Van de Peer Y, Rouzé P. 2006.** The small RNA world of plants. *New Phytologist* **171**: 451–468.
- Bouasker S, Simard MJ. 2009.** Tracing Argonaute binding. **461**: 8–9.
- Bousios A, Gaut BS, Darzentas N. 2016.** Considerations and complications of mapping small RNA libraries to transposable elements. *bioRxiv*: 1–22.
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY. 2003.** Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science* **165**: 61–68.
- Chandler JW. 2008.** Cotyledon organogenesis. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2917–2931.

- Chávez-Hernández EC, Alejandri-Ramírez ND, Juárez-González VT, Dinkova TD. 2015.** Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–14.
- Chen X. 2009.** Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**: 21–44.
- Chen J, Lausser A, Dresselhaus T. 2014.** Hormonal responses during early embryogenesis in maize. *Biochemical Society Transactions* **42**: 325–331.
- Chu Z, Chen J, Xu H, Dong Z, Chen F, Cui D. 2016.** Identification and Comparative Analysis of microRNA in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Callus Derived from Mature and Immature Embryos during In vitro Culture. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Chu CC, Want CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY. 1975.** Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* **18**: 659–668.
- Dai X, Zhao PX. 2011.** PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* **39**: 155–159.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. 2006.** Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science (New York, N.Y.)* **313**: 68–71.
- Dna NR, Cuerda-gil D, Slotkin RK. 2016.** Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nature Publishing Group* **2**: 1–7.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M. 1997.** Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1493–1509.
- Dotto MC, Petsch KA, Aukerman MJ, Beatty M, Hammell M, Timmermans MCP. 2014.** Genome-Wide Analysis of leafbladeless1-Regulated and Phased Small RNAs Underscores the Importance of the TAS3 ta-siRNA Pathway to Maize Development. *PLoS Genetics* **10**.
- Du Q, Wang H. 2015.** The role of HD-ZIP III transcription factors and miR165/166 in vascular development and secondary cell wall formation. *Plant signaling & behavior* **10**: e1078955.
- Duan C-G, Zhang H, Tang K, Zhu X, Qian W, Hou Y-J, Wang B, Lang Z, Zhao Y, Wang X, et al. 2015.** Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *The EMBO Journal* **34**: 581–592.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- EI-kebir M. 2014.** An integrative network analysis pipeline in Cytoscape.
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A. 2013.** Molecular regulation of plant somatic embryogenesis.

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant **49**: 631–642.

Emons AMC, Kieft H. 1995. Somatic Embryogenesis in Maize (*Zea mays* L.). In: Bajaj YPS, ed. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 24–39.

Evert RF. 2006. Parenchyma and collenchyma. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*: 175–190.

Fang X, Qi Y. 2016. RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *The Plant Cell* **28**: 272–285.

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**: 1373–1390.

Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R. 2014. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 2367–2372.

Frank F, Hauver J, Sonenberg N, Nagar B. 2012. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *The EMBO journal* **31**: 3588–95.

Fukui K, Hayashi K. 2018. Manipulation and Sensing of Auxin Metabolism, Transport and Signaling. *Plant and Cell Physiology* **59**: 1500–1510.

Garay-Arroyo A, de la Paz Sánchez M, García-Ponce B, Álvarez-Buylla E, Gutiérrez C. 2014. La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *REB. Revista de educación bioquímica* **33**: 13–22.

Garrocho-Villegas V, Jesús-olivera MT De. 2012. Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration Verónica. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Methods in Molecular Biology. Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 173–182.

Geiss G, Gutierrez L, Bellini C. 2018. Adventitious Root Formation: New Insights and Perspectives. In: *Annual Plant Reviews online*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 127–156.

González GA, Pacheco MG, Oneto CD, Etchart VJ, Kandus M V., Salerno JC, Eyherabide G, Presello D, Lewi DM. 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology* **15**.

Grafi G, Ben-Meir H, Avivi Y, Moshe M, Dahan Y, Zemach A. 2007. Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation.

Developmental Biology **306**: 838–846.

Gray J, Bevan M, Brutnell T, Buell CR, Cone K, Hake S, Jackson D, Kellogg E, Lawrence C, McCouch S, et al. 2009. A Recommendation for Naming Transcription Factor Proteins in the Grasses. *Plant Physiology* **149**: 4–6.

Griffiths-Jones S. 2010. MiRBase: MicroRNA sequences and annotation. *Current Protocols in Bioinformatics* **34**: 1291–12910.

Gutierrez L, Bussell JD, Pacurar DI, Schwambach J, Pacurar M, Bellini C. 2009. Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *The Plant Cell* **21**: 3119–3132.

El Hadrami I, Baaziz M. 1995. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in Phoenix dactylifera L. *Biologia Plantarum* **37**: 197–203.

Hecht V, Vielle-Calzada J-P, Hartog M V, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC. 2001. The Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. *Plant Physiology* **127**: 803–816.

Heyman J, Canher B, Bisht A, Christiaens F, De Veylder L. 2018. Emerging role of the plant ERF transcription factors in coordinating wound defense responses and repair. *Journal of Cell Science* **131**.

Horstman A, Bemer M, Boutilier K. 2017. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*.

Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, Harashima H, Shibata M, Ohnuma M, Breuer C, Morao AK, De Lucas M, De Veylder L, et al. 2015. PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis. *Nature Plants* **1**: 1–7.

Ingram GC, Magnard JL, Vergne P, Dumas C, Rogowsky PM. 1999. ZmOCL1, an HDGL2 family homeobox gene, is expressed in the outer cell layer throughout maize development. *Plant molecular biology* **40**: 343–54.

Jakubeková M, Pret'ová A, Obert B. 2011. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration From Immature Embryo Induced Callus of Maize (Zea Mays L.). **1**: 478–487.

Jangra S, Chaudhary V, Yadav NR. 2018. Transcription Factors and MicroRNA Interplay: A New Strategy for Crop Improvement. In: Transcriptional and Post-transcriptional Regulation. InTech, 13.

Jin J, Tian F, Yang DC, Meng YQ, Kong L, Luo J, Gao G. 2017. PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids*

Research **45**: D1040–D1045.

Juárez-González VT (Fac. Q. 2015. Análisis de la expresión de enzimas de la vía de Biogénesis de RNAs pequeños (sRNAs) durante la embriogénesis somática de maíz.

Juárez-González VT, López-ruiz BA, Baldrich P, Luján-soto E, Blake C. 2019. The explant developmental stage profoundly impacts small RNA- mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. : 1–14.

Kakrana A, Li P, Patel P, Hammond R, Anand D, Mathioni S, Meyers B. 2017. PHASIS: A computational suite for de novo discovery and characterization of phased, siRNA-generating loci and their miRNA triggers. *bioRxiv*.

Katiyar-Agarwal S, Jin H. 2010. Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annual review of phytopathology* **48**: 225–46.

Kellogg EA. 2015. *Flowering Plants. Monocots*. Cham: Springer International Publishing.

Köhler C, Lafon-Placette C. 2015. Evolution and function of epigenetic processes in the endosperm. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–5.

Kormutak A, Vookova B. 2001. Peroxidase activity in non-embryogenic and embryogenic calli and in developing somatic embryos of white fir (*Abies concolor* gord, et glend). *Plant Biosystems* **135**: 101–105.

Kumar V, Van Staden J. 2017. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum* **39**.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 . 0 for bigger datasets. : 1–11.

Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**: 357–359.

Lee T, Li P, Meyers BC, Richards CL, Verhoeven KJF, Bossdorf O. 2012. The Biology and Dynamics of Plant Small RNAs. In: Wendel JF, Greilhuber J, Dolezel J, Leitch IJ, eds. *Plant Genome Diversity Volume 1*. Vienna: Springer Vienna, 83–101.

Leljok-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S. 2004. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Reports* **23**: 120–127.

Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**: 323.

Li D, Liu Z, Gao L, Wang L, Gao M, Jiao Z, Qiao H, Yang J, Chen M, Yao L, et al. 2016. Genome-Wide Identification and Characterization of microRNAs in Developing Grains of *Zea mays* L. *Plos One* **11**: e0153168.

Lin Y, Lin L, Lai R, Liu W, Chen Y, Zhang Z, XuHan X, Lai Z. 2015. MicroRNA390-Directed

TAS3 Cleavage Leads to the Production of tasiRNA-ARF3/4 During Somatic Embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–15.

Liu Y, Jiang HY, Chen W, Qian Y, Ma Q, Cheng B, Zhu S. 2011. Genome-wide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in maize (*Zea mays*). *Plant Growth Regulation* **63**: 225–234.

Locascio A, Roig-Villanova I, Bernardi J, Varotto S. 2014. Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin. *Frontiers in Plant Science* **5**: 412.

López-Ruiz BA, Juárez-González VT, Luján-Soto E, Dinkova TD. 2019a. The Role of Small RNAs in Plant Somatic Embryogenesis. In: *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*. Cham: Springer International Publishing, 311–338.

López-Ruiz BA, Juárez-González VT, Sandoval-Zapotitla E, Dinkova TD. 2019b. Development-related miRNA expression and target regulation during staggered in vitro plant regeneration of tuxpeño VS-535 maize cultivar. *International Journal of Molecular Sciences* **20**.

López-Ruiz BA, Thamara Juárez-González V, Chávez-Hernández EC, Dinkova TD. 2018. MicroRNA Expression and Regulation During Maize Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology*. Hatfield, Hertfordshire, AL10 9AB, UK: Humana Press, 397–410.

Love MI, Anders S, Huber W. 2014. *DESeq2 package__Differential analysis of count data*.

Malone CD, Hannon GJ. 2009. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* **136**: 656–68.

Mathioni SM, Kakrana A, Meyers BC. 2017. Characterization of Plant Small RNAs by Next Generation Sequencing. *Current Protocols in Plant Biology* **2**: 39–63.

Matzke M a, Kanno T, Matzke AJM. 2014. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annual review of plant biology*.

Matzke M a, Mosher R a. 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature reviews. Genetics* **15**: 394–408.

McCue AD, Panda K, Nuthikattu S, Choudury SG, Thomas EN, Slotkin RK. 2014. ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *The EMBO Journal* **34**: 20–35.

Meng W, Cheng ZJ, Sang YL, Zhang MM, Rong XF, Wang ZW, Tang YY, Zhang XS. 2017. Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Is Critical to the Specification of

Shoot Stem Cell Niche by Dual Regulation of WUSCHEL. *The Plant Cell* **29**: tpc.00640.2016.

Meng Y, Shao C, Wang H, Chen M. 2014. Uncovering DCL1-dependent small RNA loci on plant genomes: a structure-based approach. *Journal of experimental botany* **65**: 395–400.

Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS. 1995. Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: Thorpe TA, ed. *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, 155–203.

Minyaka E, Niemenak N, Ngangue LTA, Madina BCV, Bahoya JA, Omokolo ND. 2017. Peroxidase and polyphenol oxidase activities associated to somatic embryogenesis potential in an elite hybrid genotype of *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology* **16**: 2278–2288.

Möller BK, ten Hove CA, Xiang D, Williams N, López LG, Yoshida S, Smit M, Datla R, Weijers D. 2017. Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early *Arabidopsis* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: E2533–E2539.

Möller B, Weijers D. 2009. Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**: 1–13.

Monnier M. 1995. Culture of Zygotic Embryos. In: Thorpe TA, ed. *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, 117–153.

Nagano H, Fukudome A, Hiraguri A, Moriyama H, Fukuhara T. 2014. Distinct substrate specificities of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Research* **42**: 1845–1856.

Nakano M. 2006. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Research* **34**: D731–D735.

Nakano M, McCormick K, Demirci C, Demirci F, Gurazada SGR, Ramachandrani D, Dusia A, Rothhaupt JA, Meyers BC. 2019. Next-Generation Sequence Databases: RNA and Genomic Informatics Resources for Plants. *Plant Physiology*: pp.00957.2019.

Nardmann J, Werr W, Evans MMS, Grossniklaus U, Vollbrecht E, Schmidt RJ, Bedinger PA, Fowler JE, Schnable PS, Swanson-wagner RA, et al. 2009. Handbook of Maize: Its Biology (JL Bennetzen and SC Hake, Eds.). : 105–119.

Nardmann J and W, Wolfgang. 2009. Patterning of the Maize Embryo and the Perspective of Evolutionary Developmental Biology. In: Bennetzen JL, Hake SC, eds. *Handbook of Maize: Its Biology*. New York, NY: Springer New York, 105–119.

Nogueira FTS, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MCP. 2007. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes and Development*

21: 750–755.

Omidbakhshfard MA, Proost S, Fujikura U, Mueller-Roeber B. 2015. Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular Plant* **8**: 998–1010.

Ouakfaoui S EI, Schnell J, Abdeen A, Colville A, Labbé H, Han S, Baum B, Laberge S, Miki B. 2010. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology* **74**: 313–326.

De Paoli E, Dorantes-Acosta A, Zhai J, Accerbi M, Jeong D-H, Park S, Meyers BC, Jorgensen R a, Green PJ. 2009. Distinct extremely abundant siRNAs associated with cosuppression in petunia. *RNA (New York, N.Y.)* **15**: 1965–1970.

Parent J-S, Martínez de Alba AE, Vaucheret H. 2012. The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–9.

Pierre-Jerome E, Drapek C, Benfey PN. 2018. Regulation of Division and Differentiation of Plant Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **34**: 289–310.

Preston JC, Hileman LC. 2013. Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–13.

Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**: 841–842.

R Core Team. 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.*

Ramesh SV, Admane N, Husain SM. 2013. Review article Small RNAs landscape (sRNAome) of Soybean [*Glycine max* (L .)]: Biogenesis , vital functions and potential applications. **2**: 24–37.

Reimand J, Isserlin R, Voisin V, Kucera M, Tannus-Lopes C, Rostamianfar A, Wadi L, Meyer M, Wong J, Xu C, et al. 2019. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nature Protocols* **14**: 482–517.

Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF. 2015. MicroRNA miR396 Regulates the Switch between Stem Cells and Transit-Amplifying Cells in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell* **27**: 3354–3366.

Ronchi VN, Giorgetti L. 1995. The Cell's Commitment to Somatic Embryogenesis. In: Bajaj YPS, ed. *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 3–19.

- Rubio-Somoza I, Weigel D. 2011.** MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science* **16**: 258–264.
- Russo VEA, Cove DJ, Edgar LG, Rudolf J, Francesco S. 1999.** *Development Genetics, Epigenetics and Environmental Regulation* (VEA Russo, DJ Cove, LG Edgar, R Jaenisch, and F Salamini, Eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Saito K, Miyoshi K, Siomi MC, Siomi H. 2010.** The Key Features of RNA Silencing Kuniaki (VA Erdmann and J Barciszewski, Eds.). : 1–28.
- Salehin M, Bagchi R, Estelle M. 2015.** ScfTIR1/AFB-based auxin perception: Mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* **27**: 9–19.
- Sanan-Mishra N, Varanasi SPRM, Mukherjee SK. 2013.** Micro-regulators of auxin action. *Plant Cell Reports* **32**: 733–740.
- Schwartz BW, Vernon DM, Meinke DW. 1997.** Development of the Suspensor: Differentiation, Communication, and Programmed Cell Death During Plant Embryogenesis. : 53–72.
- 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**.
- Sheridan W. 1982.** Maize for Biological Research. In: Maize for Biological Research. Charlottesville, VA 2290: Plant Molecular Biology Association, 434.
- Smith LG, Jackson D, Hake S. 1995.** Expression of knotted1 marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. *Developmental Genetics* **16**: 344–348.
- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS. 2009.** Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Journal* **59**: 448–460.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, et al. 2005.** Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15545–50.
- Sugiyama M. 2015.** Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *Journal of Plant Research* **128**: 349–359.
- Sun G. 2012.** MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant molecular biology* **80**: 17–36.
- Szczygiel-Sommer A, Gaj MD. 2019.** The miR396–GRF regulatory module controls the embryogenic response in Arabidopsis via an auxin-related pathway. *International Journal of*

Molecular Sciences **20**: 1–18.

Szyrajew K, Bielewicz D, Dolata J, Wójcik AM, Nowak K, Szczygieł-Sommer A, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Gaj MD. 2017. MicroRNAs Are Intensively Regulated during Induction of Somatic Embryogenesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–16.

Tang J, Chu C. 2017. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nature Plants* **3**: 17077.

Teoh KT, Requesens DV, Devaiah SP, Johnson D, Huang X, Howard J a, Hood EE. 2013. Transcriptome analysis of embryo maturation in maize. *BMC plant biology* **13**: 19.

Thompson BE, Basham C, Hammond R, Ding Q, Kakrana A, Lee T-F, Simon S a., Meeley R, Meyers BC, Hake S. 2014. The *dicer-like1* Homolog *fuzzy tassel* Is Required for the Regulation of Meristem Determinacy in the Inflorescence and Vegetative Growth in Maize. *The Plant Cell Online* **26**: 4702–4717.

Venglat SP, Xiang D, Kusshalappa K, Keller W, Palmer D, Selvara G, Datla R. 2005. OBPC Symposium: Maize 2004 & beyond-developmental and molecular genetics of embryogenesis in plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **41**: 378–387.

Vondrakova Z, Dobrev PI, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V. 2018. Profiles of endogenous phytohormones over the course of norway spruce somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–13.

Walbot V, Evans MMS. 2003. Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Reviews Genetics* **4**: 369–379.

Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T, Patel DJ. 2009. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**: 754–61.

Warnes AGR, Bolker B, Bonebakker L, Huber W, Liaw A, Lumley T, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M. 2016. Package ‘gplots’.

Wickham H, Chang W. 2016. Package ‘ggplot2’.

Williams JH, Friedman WE. 2002. Identification of diploid endosperm in an early angiosperm lineage. *Nature* **415**: 522–526.

Wilson RC, Doudna J a. 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics* **42**: 217–39.

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*: n/a-n/a.

- Wu XM, Liu MY, Ge XX, Xu Q, Guo WW. 2011.** Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* **233**: 495–505.
- Xia R, Xu J, Meyers BC. 2017.** The Emergence, Evolution, and Diversification of the miR390-TAS3-ARF Pathway in Land Plants. *The Plant Cell* **29**: tpc.00185.2017.
- Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X. 2013.** Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1521–1536.
- Yilmaz A, Nishiyama MY, Fuentes BG, Souza GM, Janies D, Gray J, Grotewold E. 2009.** GRASSIUS: A Platform for Comparative Regulatory Genomics across the Grasses. *Plant Physiology* **149**: 171–180.
- Zhang T-Q, Lian H, Tang H, Dolezal K, Zhou C-M, Yu S, Chen J-H, Chen Q, Liu H, Ljung K, et al. 2015.** An Intrinsic MicroRNA Timer Regulates Progressive Decline in Shoot Regenerative Capacity in Plants. *The Plant Cell Online* **27**: tpc.114.135186.
- Zhang T-Q, Lian H, Zhou C-M, Xu L, Jiao Y, Wang J-W. 2017.** A Two-Step Model for de Novo Activation of *WUSCHEL* during Plant Shoot Regeneration. *The Plant Cell* **29**: 1073–1087.
- Zhang J, Zhang S, Han S, Wu T, Li X, Li W, Qi L. 2012.** Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* **236**: 647–657.
- Zhao Y, Hu Y, Dai M, Huang L, Zhou D-X. 2009.** The *WUSCHEL*-Related Homeobox Gene *WOX11* Is Required to Activate Shoot-Borne Crown Root Development in Rice. *the Plant Cell Online* **21**: 736–748.
- Zimmermann R. 2004.** Musterbildung im Maisembryo : Klonierung *NAM* / *CUC* -Orthologer aus *Zea mays* L .
- Zimmermann R, Werr W. 2005.** Pattern formation in the monocot embryo as revealed by *NAM* and *CUC3* orthologues from *Zea mays* L. *Plant Molecular Biology* **58**: 669–85.

Anexos Figuras

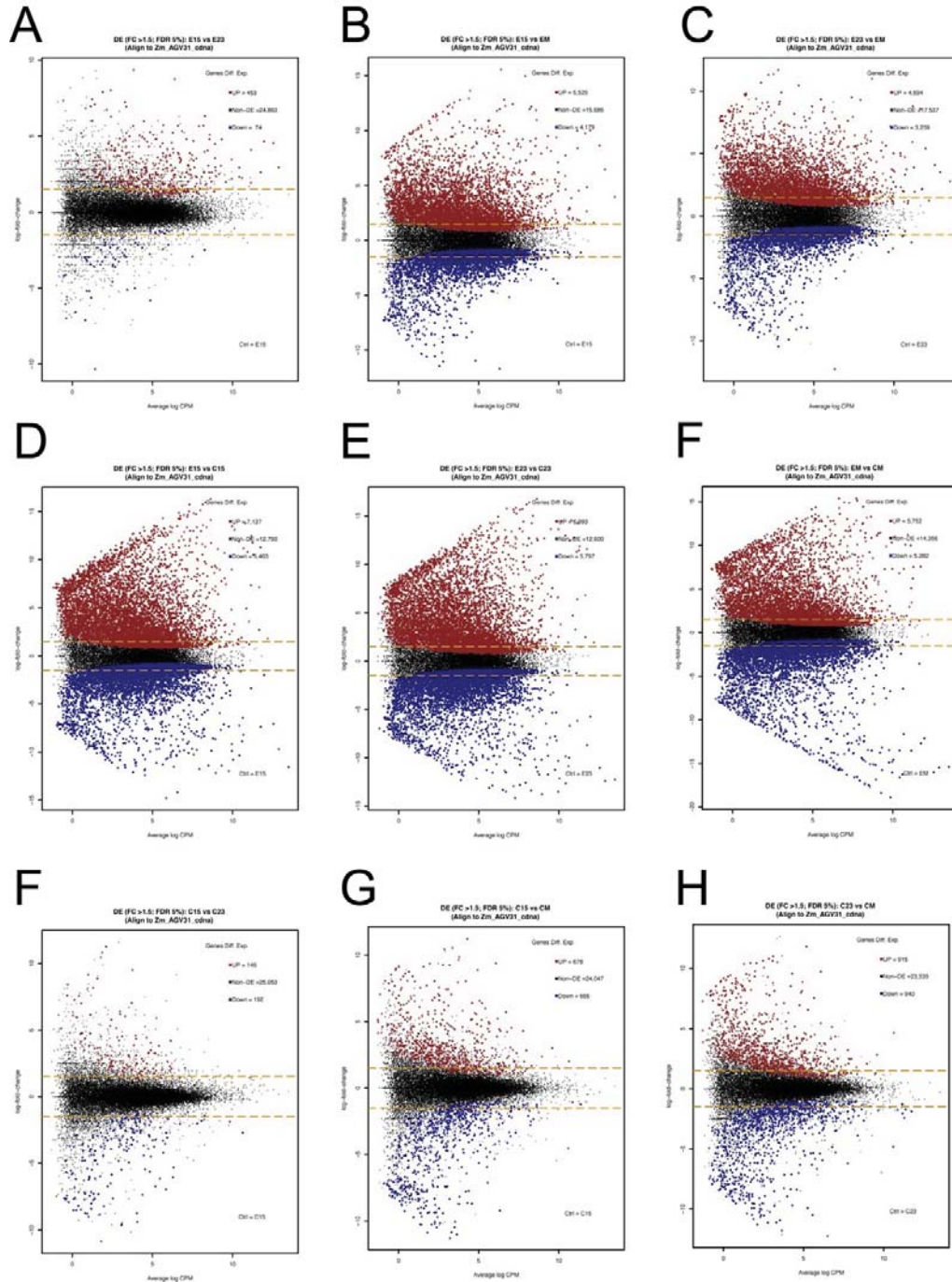


Figura Suplementaria 1. Gráficos vulcano de acumulación diferencial (DA) en las comparaciones de embriones y callos. Se muestran los transcritos con acumulación diferencial a la alta (rojo) o a la baja (azul), en cada una de las comparaciones. El valor de corte de DA es de 2 veces de cambio (FC) y cada punto representa el valor de DA de un transcrito, en cada comparación. A: Comparación IE15vsIE23; B: Comparación IE15vsME; C: comparación IE15vsME; D: Comparación IE15vsC15; E: comparación IE23vsC23; F: Comparación MEvsCM; G: Comparación C15vsC23; H: Comparación C15vsCM; I: Comparación C23vsCM.

cell cycle organization

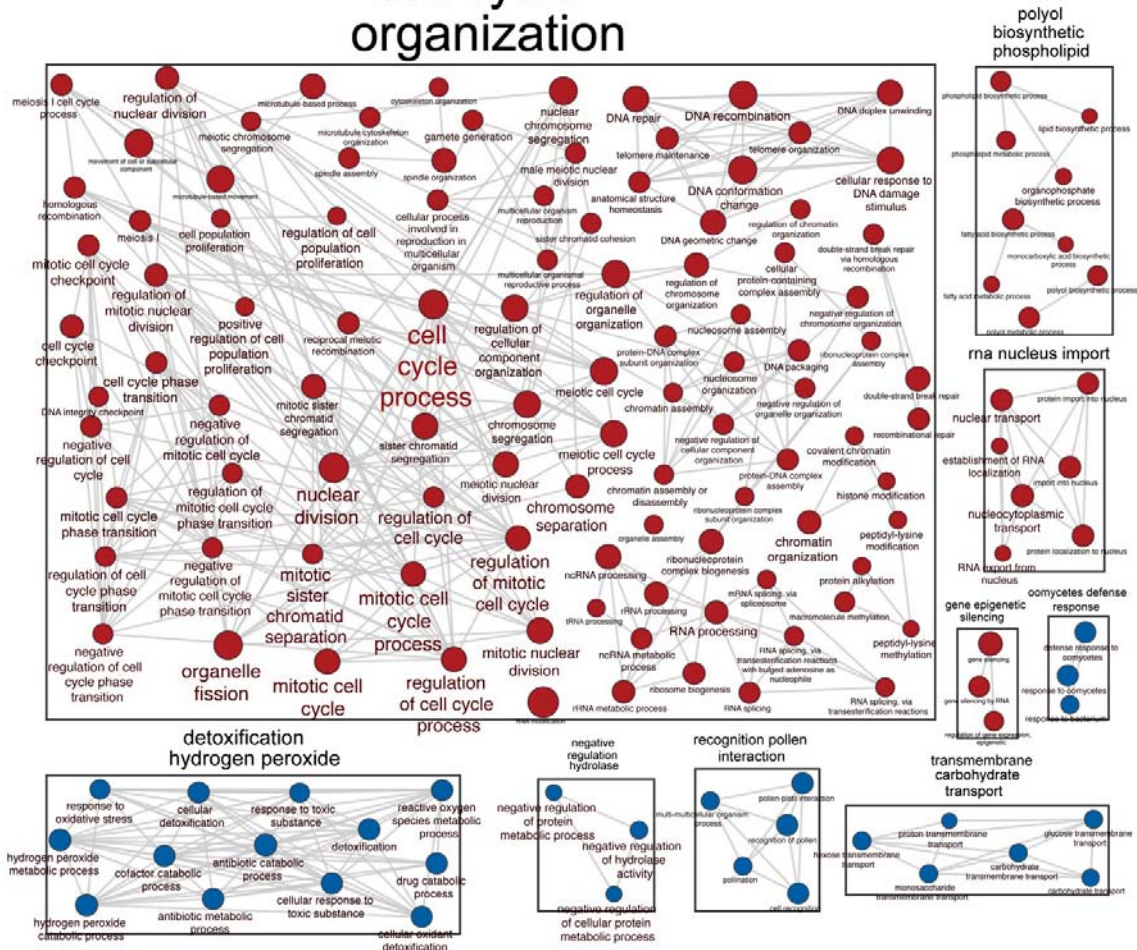


Figura Suplementaria 2. Procesos Biológicos enriquecidos en IE23 comparado con C23. Red de Co-expresión Genética muestra las funciones enriquecidas (nodos) en IE23 (rojo) y C23 (azul). El tamaño del nodo representa el valor de enriquecimiento normalizado (NES; ver Métodos) y el tamaño de la letra de la función representa el grado de correlación entre los nodos contenidos en un Proceso Biológico particular (rectángulos). La significancia mínima en el enriquecimiento de los nodos es de $p < 0.05$ y un coeficiente de correlación entre los nodos de al menos 0.6.

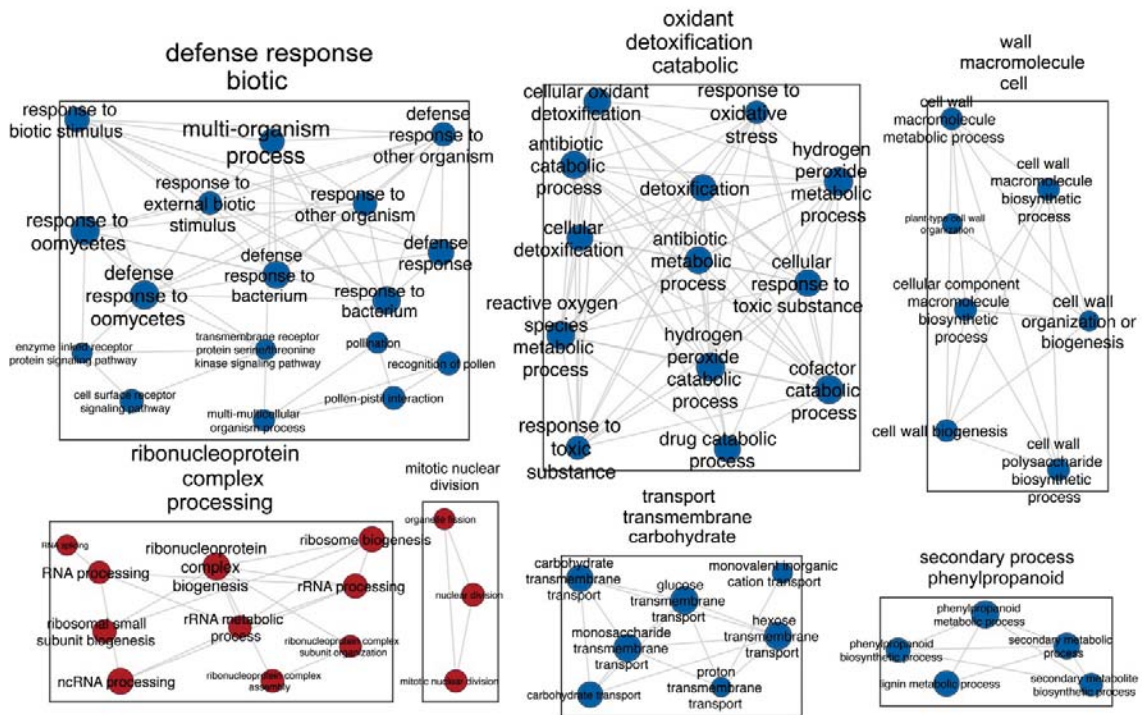


Figura Suplementaria 3. Procesos Biológicos enriquecidos en ME comparado con CM. Red de Co-expresión Genética muestra las funciones enriquecidas (nodos) en ME (rojo) y CM (azul). El tamaño del nodo representa el valor de enriquecimiento normalizado (NES; ver Métodos) y el tamaño de la letra de la función representa el grado de correlación entre los nodos contenidos en un Proceso Biológico particular (rectángulos). La significancia mínima en el enriquecimiento de los nodos es de $p < 0.05$ y un coeficiente de correlación entre los nodos de al menos 0.6.

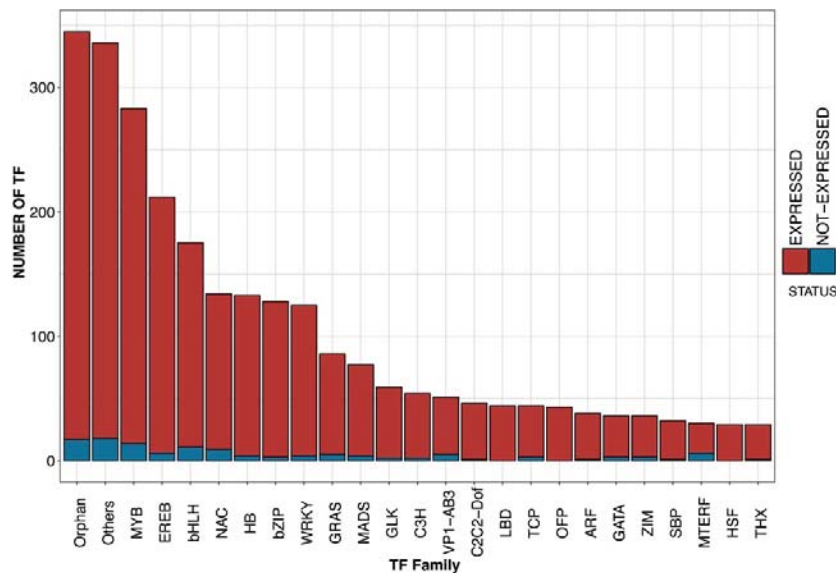


Figura Suplementaria 4. Expresión de TF. Se muestra el número total de TF por cada familia y los miembros de cada familia de TF que se expresan (rojo) en al menos uno de los tejidos analizados.

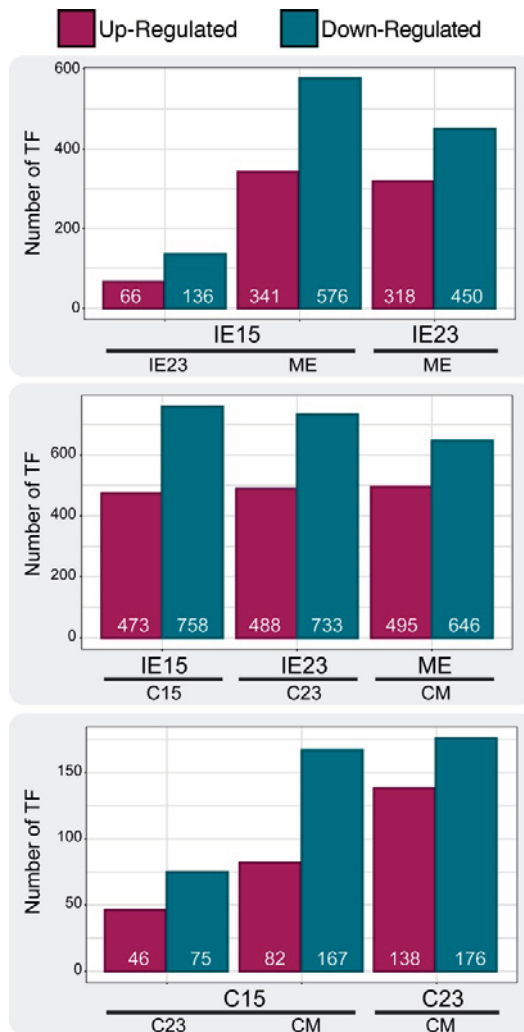


Figura Suplementaria 5. Acumulación Diferencial (DA) de TF. Se muestra el número total de TF que muestran una DA estadísticamente significativa entre las distintas comparaciones de Embriones (Panel superior); durante la SE, comparando los tejidos antes y después de la inducción (Panel Central) y entre los distintos tipos de cultivos de callos (Panel inferior).

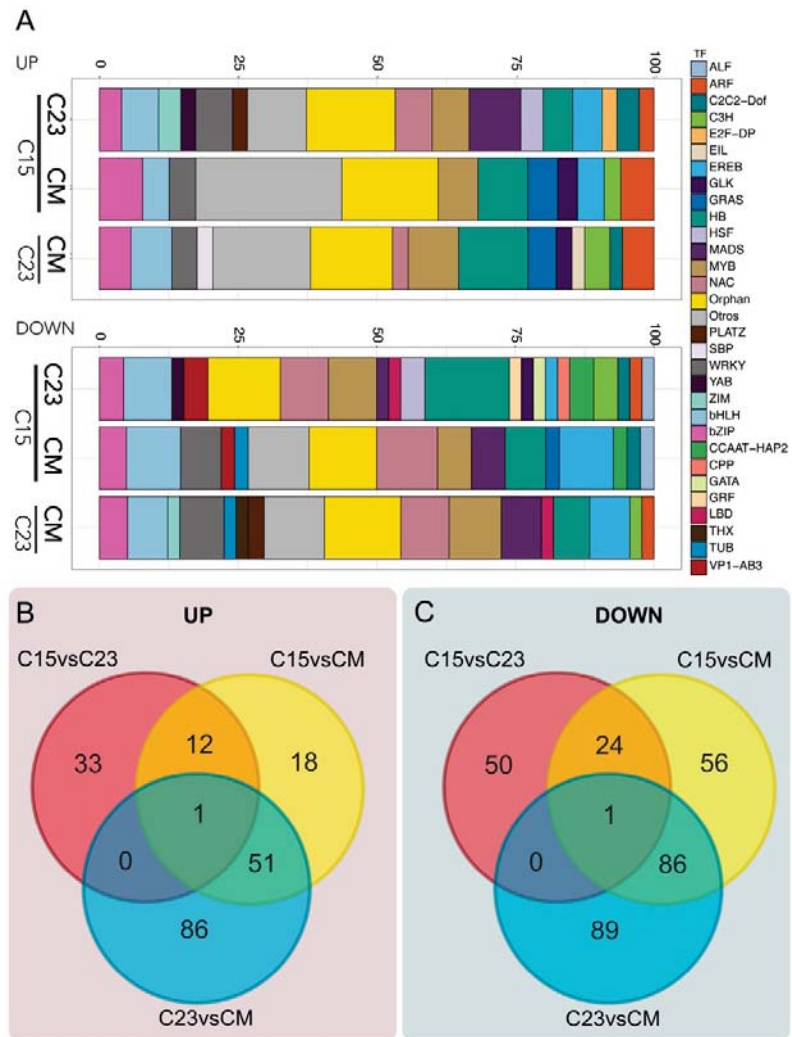


Figura Suplementaria 6. Acumulación Diferencial (DA) de Factores Transcripcionales (TF) entre los distintos cultivos de Callos de maíz. A: Distribución porcentual de TF con DA a la alta (A, panel superior) y a la baja (A, panel inferior), clasificados como familias de TF. B y C: Diagrama de Venn que muestra el número total de TF con DA estadísticamente significativa a la alta (B) y a la baja (C), entre las distintas comparaciones de cultivos de callos.

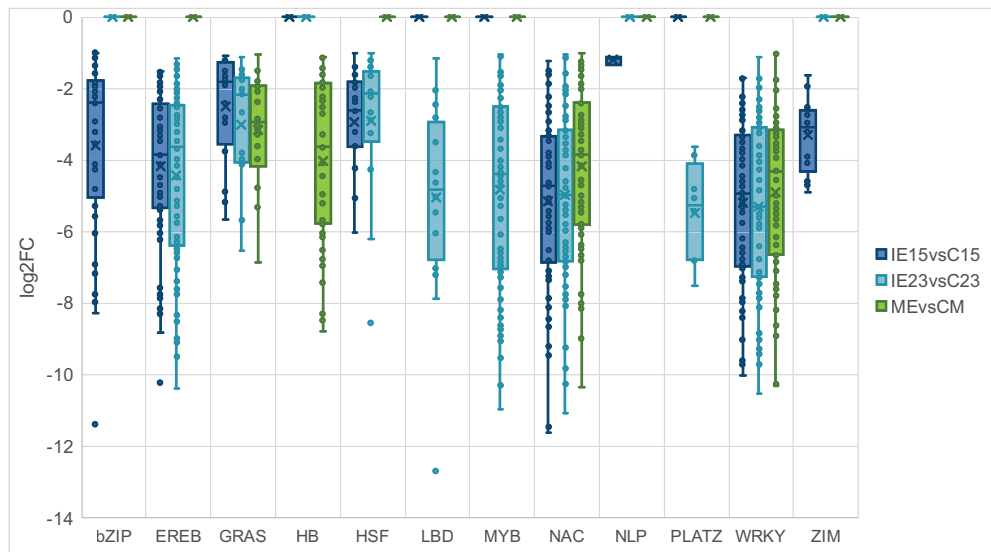


Figura Suplementaria 7. Familias de TFs con valores significativos de enriquecimiento funcional en los callos durante la Inducción de SE (comparaciones embriones vs callos). Se muestran los valores de acumulación diferencial de cada miembro de la familia (puntos) y la media en los valores de veces de cambio en la comparación de IE15vsC15 (Azul marino); IE23vsC23 (Azul turquesa) y MEvsCM verde). El Gráfico sólo muestra las familias de TFs con valores significativos ($p < 0.05$) y la media se calcula con los valores individuales de cambio en cada transcrito DA.

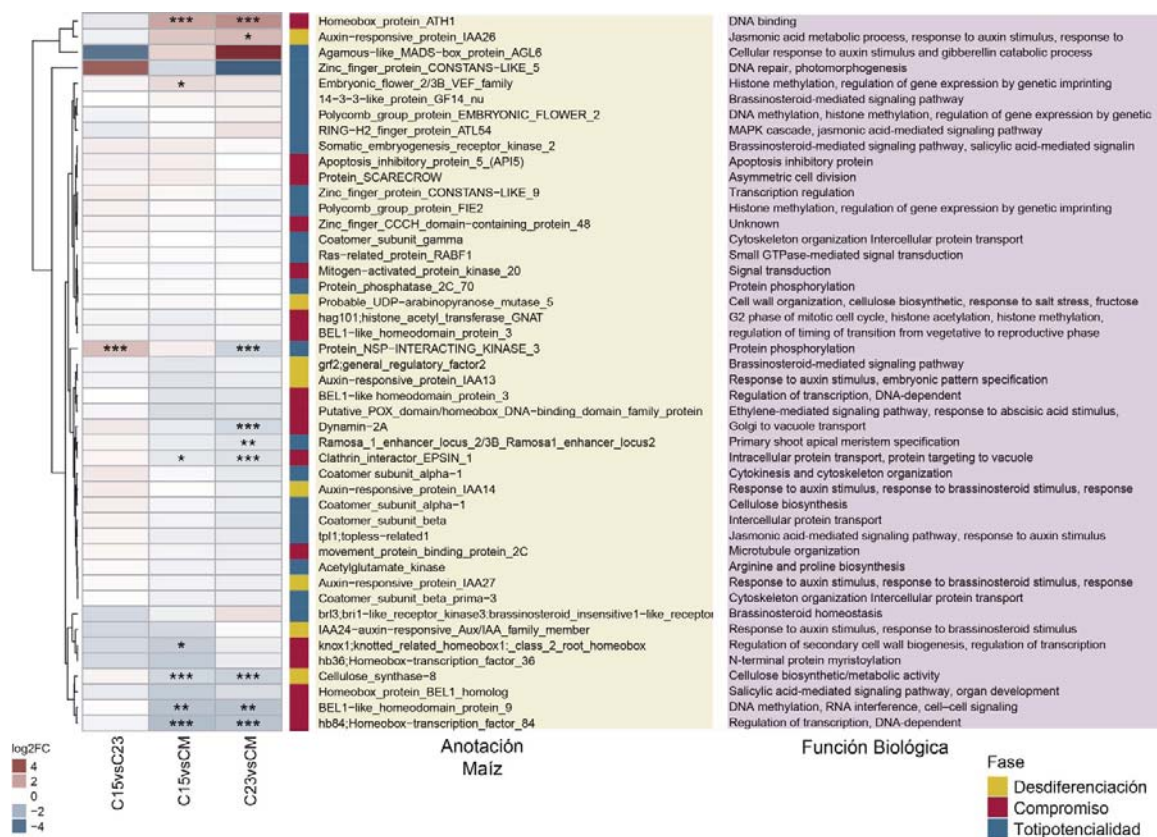
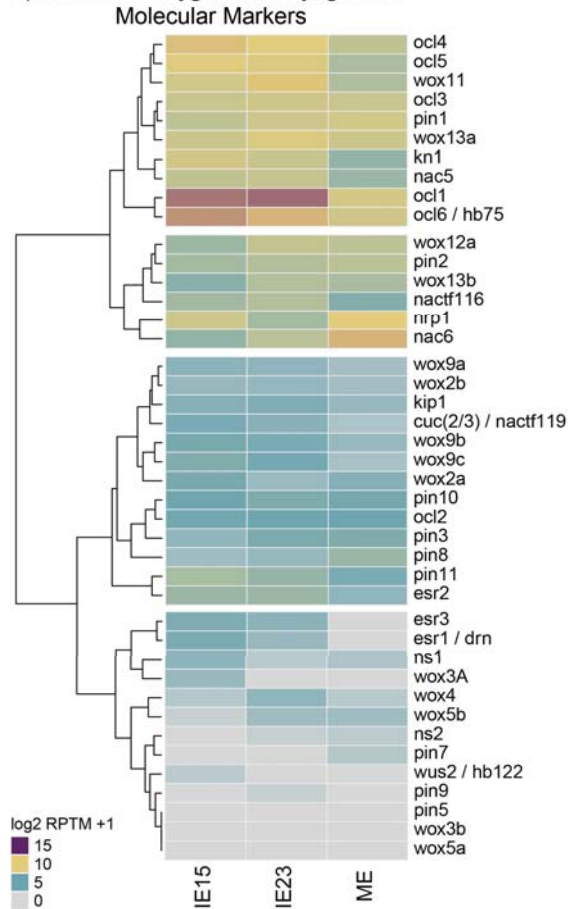


Figura Suplementaria 8. Acumulación Diferencial (DA) de Transcritos identificados en Arabidopsis thaliana como promotores de la Inducción de SE entre los tejidos un mes después de la inducción. A la izquierda se muestra un mapa de calor con los valores de DA en cada comparación (los valores con DA significativa se muestran con asteriscos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). En código de color se muestra la categoría a la cual pertenece el transcrito según la clasificación de Elhiti et al., 2013: Totipotencialidad (azul), Desdiferenciación (amarillo) y Compromiso (rojo). La anotación para los transcritos homólogos en maíz se muestra en el panel amarillo y el transcrito correspondiente en Arabidopsis en el panel turquesa. En el panel lila se muestra el proceso biológico al que está principalmente relacionado el transcrito, utilizando Gene Ontology (GO).

A) Abundance Zygotic Embryogenesis



B) Differential Expression
Zygotic Embryogenesis Molecular Markers

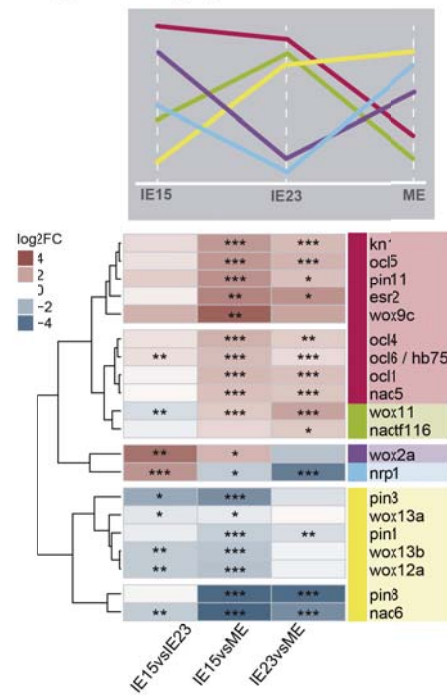


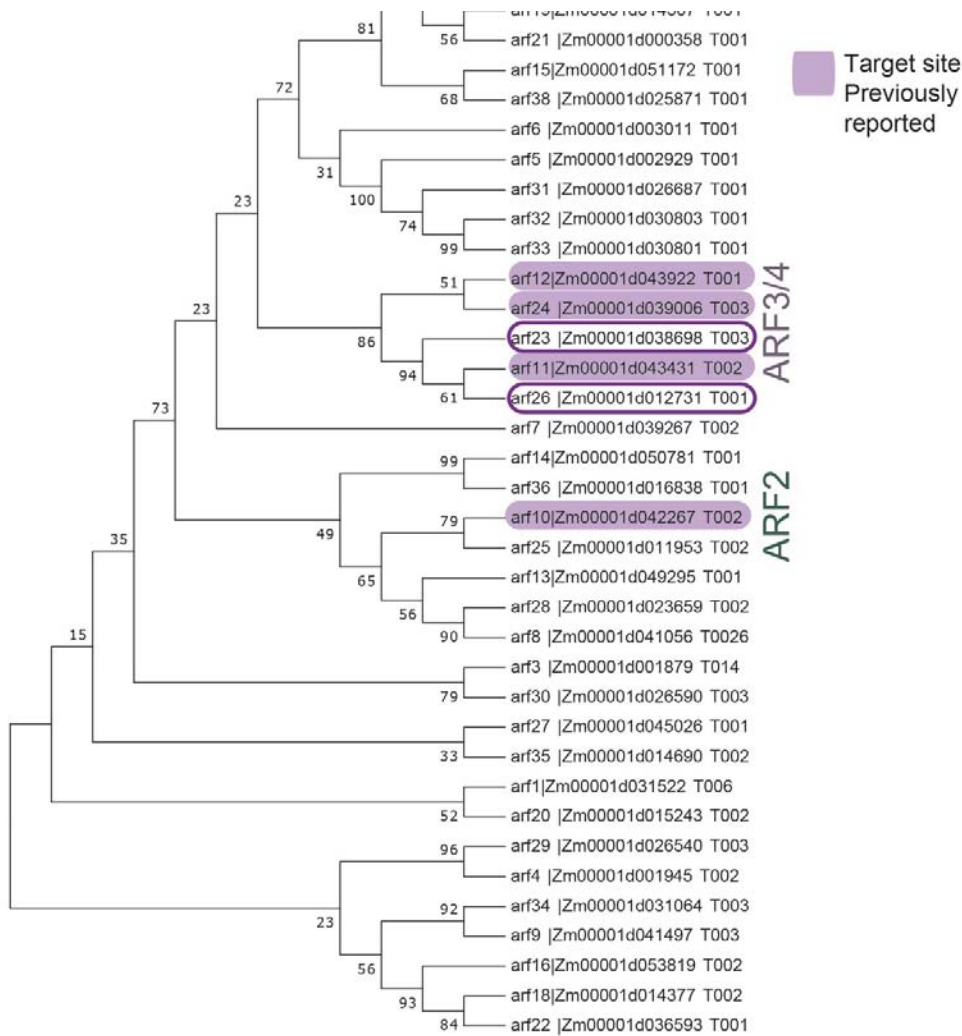
Figura Suplementaria 9. Acumulación Diferencial (DA) de Marcadores de Embriogénesis Cigótica en los Embriones de maíz. A la izquierda se muestra un mapa de calor con los valores de abundancia normalizada en cada tejido. A la derecha (panel inferior) se muestran los valores de DA significativa en las distintas comparaciones. Los valores de DA significativa se muestran con asteriscos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). En la parte derecha (panel superior), se muestra los patrones de expresión de los transcritos DA durante el desarrollo embrionario de maíz VS-535. El código de color representa el grupo de marcadores con el mismo color en el panel de DA.

Figura Suplementaria 10. Secuencias de tasiARFs reportados en Maíz (Xia *et al.*, 2017)

```

tasiARF3-1a UUCUUGACCUUGCAAGACCUU
tasiARF3-1b UUCUUGACCUUGUAAGACCCA
tasiARF3-2 UUCUUGAUCUUGCAAGACUUU
tasiARF3-3a UUCUUGACCUUGUAAGGCCUC
tasiARF3-3b UUCUUGACCUUGUAAGGCUCUC
tasiARF3-4 UUCUUGACCUUGCAAGACUUU
tasiARF3-5 UUCUUGACCUUGCAAGACUUU
tasiARF3-6 UUCUUGACCUUGCAAGGCCUU
tasiARF3-7 UUCUUGACCUUGUAAGGCCCU
tasiARF3-8a UUCUUGACCUUGCAAGACCUU
tasiARF3-8b UUCUUGACCUUGUAAGACCCA
    
```

Figura Suplementaria 11. Reconstrucción filogenética de ZmARFs. Se muestran los ARFs con sitio blanco para tasiARFs. Se realizó el alineamiento de las secuencias de los genes ARFs utilizando Muscle. La reconstrucción Filogenética se realizó utilizando MEGA7 mediante el método de máxima verosimilitud con 100 réplicas (bootstraps)



Anexos Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Principales procesos Biológicos enriquecidos en las comparaciones entre embriones. Se muestra el valor de Enriquecimiento normalizado (Normalized Enrichment Score (NES)). Todos los valores de Enriquecimientos fueron obtenidos mediante GSEA, basándonos en el protocolo de Reimand *et al.*, 2019.

Comparación	Cluster ID	Cluster	Grado de Conectividad	Coefficiente de Agrupamiento	Principal Nodo en Cluster	Nombre de Nodo	Numero de Genes en el Nodo	Puntaje de Enriquecimiento (ES)	Puntaje de Enriquecimiento Normalizado (NES)	pvalue
Enriquecido en IE15 comparado con IE23	1	Metabolic_Process_DNA	8	8.8E-01	GO:0006259	DNA metabolic process	943	0.5390	2.6540	0
	1	Metabolic_Process_DNA	10	6.4E-01	GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	7027	0.2655	2.1277	0
	2	Cellular_Location	0	0.0E+00	GO:0051641	cellular localization	1132	0.3635	1.8256	0.0046
Enriquecido en IE15 comparado con ME	1	Cell_cycle_phase	45	3.4E-01	GO:0022402	cell cycle process	491	0.5315	3.9225	0
	8	Replication_DNA_dependent	1	0.0E+00	GO:0006260	DNA replication	196	0.5620	3.5238	0
	17	RNA_modification	1	0.0E+00	GO:0009451	RNA modification	459	0.4290	2.9174	0
	14	Mitochondrial_gene_expression	0	0.0E+00	GO:0140053	mitochondrial gene expression	79	0.6135	2.5821	0
	6	Establishment_Organelle_localization	1	0.0E+00	GO:0051656	establishment of organelle localization	109	0.4635	2.3821	0
	4	Positive_regulation_transferase	13	9.6E-01	GO:0031401	positive regulation of protein modification process	120	0.4848	2.3640	0
	10	Cytoplasmic_translation	2	1.0E+00	GO:0002181	cytoplasmic translation	110	0.4217	2.2508	0
	3	Ribonucleotide_metabolic_transferase	18	1.0E+00	GO:0006757	ATP generation from ADP	115	0.4567	2.1914	0
	18	Translational_initiation	2	1.0E+00	GO:0006413	translational initiation	198	0.3546	2.1595	0
	11	DNA_Biosynthetic_process	0	0.0E+00	GO:0071897	DNA biosynthetic process	123	0.4156	2.0773	0
	9	Aerobic_respiration	1	0.0E+00	GO:0009060	aerobic respiration	120	0.3758	2.0509	0
	5	Nucleocytoplasmic_transport_nuclear	12	7.3E-01	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	160	0.3299	2.0110	0
	6	Establishment_Organelle_localization	1	0.0E+00	GO:0051640	organelle localization	187	0.3444	1.9498	0
	16	Protein_localization_mitochondrion	3	1.0E+00	GO:0070585	protein localization to mitochondrion	80	0.4172	1.8958	0
	13	Macromolecule_methylation	5	1.0E+00	GO:0043414	macromolecule methylation	242	0.3214	1.8905	0
	12	Intra_Golgi_vesicle	1	0.0E+00	GO:0006891	intra-Golgi vesicle-mediated transport	83	0.4465	1.8596	0
	3	Ribonucleotide_metabolic_transferase	23	7.6E-01	GO:0050886	nucleobase-containing small molecule metabolic process	524	0.2584	1.7606	0
Enriquecido en ME comparado con IE15	2	Response_toxic_substance	13	3.8E-01	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	44	-0.8090	-2.8305	0
	7	Peptidase_activity_endopeptidase	8	1.0E+00	GO:0010951	negative regulation of endopeptidase activity	83	-0.5847	-1.9954	0
	7	Peptidase_activity_endopeptidase	8	1.0E+00	GO:0052547	regulation of peptidase activity	85	-0.5726	-1.9850	0
	15	Protein_Folding	1	0.0E+00	GO:0006457	protein folding	337	-0.4036	-1.9216	0
	2	Response_toxic_substance	15	2.8E-01	GO:1901700	response to oxygen-containing compound	653	-0.3710	-1.9014	0

Tabla Suplementaria 2. Principales procesos Biológicos enriquecidos en las comparaciones entre embriones y callos. Se muestra el valor de Enriquecimiento normalizado (Normalized Enrichment Score (NES)). Todos los valores de Enriquecimientos fueron obtenidos mediante GSEA, basándonos en el protocolo de Reimand *et al.*, 2019.

Comparación	Cluster ID	Cluster	Grado de Conectividad	Coficiente de Agrupamiento	Principal Nodo en Cluster	Nombre de Nodo	Numero de Genes en el Nodo	Puntaje de Enriquecimiento (ES)	Puntaje de Enriquecimiento Normalizado (NES)	pvalue
Enriquecido en IE15 comparado con C15	1	Cycle_phase_cell	13	5.5E-01	GO:0042254	ribosome biogenesis	487	0.5260	3.7863	0
	1	Cycle_phase_cell	48	3.1E-01	GO:0022402	cell cycle process	491	0.4818	3.3167	0
	2	Localization_nucleus_export	14	6.7E-01	GO:0051169	nuclear transport	160	0.5011	2.6669	0
	12	Fatty_Acid_Process	1	0.0E+00	GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	131	0.4771	2.3938	0
	5	Biosintetic_Phospholipid_Process	2	1.0E+00	GO:0008654	phospholipid biosynthetic process	167	0.4504	2.3778	0
	8	Transesterification_reactions_splicing	4	1.0E+00	GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	257	0.4080	2.3320	0
	8	Transesterification_reactions_splicing	4	1.0E+00	GO:0008380	RNA splicing	305	0.4157	2.2566	0
	17	Cytoplasmic_Translation	0	0.0E+00	GO:0002181	cytoplasmic translation	110	0.4982	2.2539	0
	16	Nucleus_Organization	0	0.0E+00	GO:0006997	nucleus organization	49	0.5382	2.1401	0
	5	Biosintetic_Phospholipid_Process	6	2.7E-01	GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	450	0.3131	2.0270	0
	12	Fatty_Acid_Process	1	0.0E+00	GO:0006631	fatty acid metabolic process	204	0.3291	1.9780	0
	Enriquecido en C15 comparado con IE15	3	Detoxification_hydrogen_catabolic	13	9.7E-01	GO:0017001	antibiotic catabolic process	184	-0.6766	-2.9429
1		Cycle_phase_cell	10	8.2E-01	GO:0002229	defense response to oomycetes	61	-0.6067	-2.1928	0
9		Secondary_Process_Phenylpropanoid	4	1.0E+00	GO:0019748	secondary metabolic process	126	-0.5408	-2.1324	0
4		Cell_wall_polysaccharide	10	8.0E-01	GO:0044036	cell wall macromolecule metabolic process	192	-0.5056	-2.1169	0
7		Monovalent_Transport_Transmembrane	6	8.7E-01	GO:1904659	glucose transmembrane transport	72	-0.5404	-2.0319	0
7		Monovalent_Transport_Transmembrane	6	8.7E-01	GO:0034219	carbohydrate transmembrane transport	101	-0.5150	-1.9875	0
18		Indole_Compound_metabolic	0	0.0E+00	GO:0042430	indole-containing compound metabolic process	52	-0.6288	-1.9508	0
6		Negative_Regulation_Hydrolase	9	1.0E+00	GO:0051346	negative regulation of hydrolase activity	122	-0.4931	-1.8940	0
1		Cycle_phase_cell	18	3.4E-01	GO:0051704	multi-organism process	496	-0.3983	-1.8599	0
4		Cell_wall_polysaccharide	11	6.5E-01	GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	527	-0.3956	-1.8204	0
15		Inorganic_anion_transport	0	0.0E+00	GO:0015698	inorganic anion transport	123	-0.4858	-1.8173	0
10		Hormone_metabolic_Process	3	6.7E-01	GO:0042445	hormone metabolic process	168	-0.4448	-1.7504	0
Enriquecido en IE23 comparado con C23	1	Cell_cycle_organization	2	0.0E+00	GO:0009451	RNA modification	459	0.5311	3.4330	0
	15	Replication_DNA_Dependent	2	1.0E+00	GO:0006260	DNA replication	196	0.5753	3.3791	0
	1	Cell_cycle_organization	48	3.1E-01	GO:0022402	cell cycle process	491	0.4656	3.2468	0
	14	Gene_Epigentic_silencing	2	1.0E+00	GO:0016458	gene silencing	139	0.5545	2.6566	0
	21	DNA_Biosynthetic_Process	0	0.0E+00	GO:0071897	DNA biosynthetic process	123	0.5460	2.5915	0
	3	RNA_Nucleus_Import	14	6.7E-01	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	160	0.4810	2.5065	0
	2	Polyol_Biosynthetic_phospholipid	3	1.0E+00	GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	131	0.4656	2.4062	0
	12	Cellular_Response_reactive	3	1.0E+00	GO:1902170	cellular response to reactive nitrogen species	45	0.5387	2.0300	0
	23	Regulation_DNA_metabolic	0	0.0E+00	GO:0051052	regulation of DNA metabolic process	66	0.4876	1.9875	0
	19	Maintenance_location	0	0.0E+00	GO:0051235	maintenance of location	58	0.4687	1.9191	0
	20	Proteasome_mediated_Ubiquitin	0	0.0E+00	GO:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabol	271	0.3455	1.8458	0
	2	Polyol_Biosynthetic_phospholipid	4	3.2E-01	GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	450	0.2975	1.8140	0
Enriquecido en C23 comparado con IE23	10	Recognition_pollen_interaction	8	1.0E+00	GO:0009875	pollen-pistil interaction	71	-0.6235	-2.3920	0
	8	Oomycetes_defense_response	6	7.3E-01	GO:0002229	defense response to oomycetes	61	-0.6334	-2.3325	0
	5	Detoxification_Hydrogen_Peroxide	12	1.0E+00	GO:0009636	response to toxic substance	358	-0.4755	-2.1865	0
	13	Phenylpropanoid_secondary_process	3	1.0E+00	GO:0019748	secondary metabolic process	126	-0.5144	-2.0699	0
	9	Amino_catabolic_Alpha	4	1.0E+00	GO:0009063	cellular amino acid catabolic process	78	-0.5968	-2.0141	0
	8	Oomycetes_defense_response	5	1.0E+00	GO:0009617	response to bacterium	132	-0.4966	-2.0125	0
	10	Recognition_pollen_interaction	4	1.0E+00	GO:0009856	pollination	104	-0.5043	-2.0024	0
	17	Indole_Compound_metabolic	1	0.0E+00	GO:0042430	indole-containing compound metabolic process	52	-0.6325	-1.9832	0
	7	Cell_Wall_Macromolecule	8	7.5E-01	GO:0044036	cell wall macromolecule metabolic process	192	-0.4522	-1.9025	0
	11	Benzene_Hormone_metabolic	2	1.0E+00	GO:0042537	benzene-containing compound metabolic process	60	-0.5202	-1.9004	0
	16	Inorganic_Anion_transmembrane	1	0.0E+00	GO:0098661	inorganic anion transmembrane transport	60	-0.5908	-1.8191	0
	11	Benzene_Hormone_metabolic	3	6.7E-01	GO:0042445	hormone metabolic process	168	-0.4540	-1.7829	0
4	Negative_Regulation_Hydrolase	14	7.3E-01	GO:0032269	negative regulation of cellular protein metabolic process	228	-0.4340	-1.7803	0	
16	Inorganic_Anion_transmembrane	1	0.0E+00	GO:0015698	inorganic anion transport	123	-0.4866	-1.7775	0	
6	Transmembrane_Carbohydrate_transport	7	3.3E-01	GO:1902600	proton transmembrane transport	320	-0.3780	-1.6892	0	
Enriquecido en ME comparado con CM	3	Ribonucleoprotein_complex_processing	9	6.1E-01	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	621	0.4254	2.3977	0
	13	Response_temperature_stimulus	1	0.0E+00	GO:0009266	response to temperature stimulus	246	0.4142	2.0600	0
	7	Mitotic_Nuclear_division	2	1.0E+00	GO:0000280	nuclear division	256	0.4260	2.0480	0
	8	Chromosome_organization_DNA	2	1.0E+00	GO:0051276	chromosome organization	997	0.3590	1.9806	0
	9	Fruit_development	3	1.0E+00	GO:0010154	fruit development	147	0.5099	1.9118	0
	7	Mitotic_Nuclear_division	2	1.0E+00	GO:0048285	organelle fission	305	0.3607	1.8683	0
Enriquecido en CM comparado con ME	1	Defense_reponse_biotic	13	6.5E-01	GO:0002229	defense response to oomycetes	61	-0.6819	-2.5583	0
	2	Oxidant_detoxification_catabolic	12	1.0E+00	GO:0042743	hydrogen peroxide metabolic process	166	-0.5497	-2.5307	0
	4	Transport_tranmembrane_carbohydrate	6	8.7E-01	GO:1904659	glucose transmembrane transport	72	-0.6583	-2.4508	0
	6	Secondary_process_phenylpropanoid	4	1.0E+00	GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process	72	-0.6553	-2.4267	0
	1	Defense_reponse_biotic	16	5.1E-01	GO:0051704	multi-organism process	496	-0.4282	-2.1796	0
	2	Oxidant_detoxification_catabolic	13	8.6E-01	GO:0009636	response to toxic substance	358	-0.4116	-2.0565	0
	6	Secondary_process_phenylpropanoid	4	1.0E+00	GO:0044550	secondary metabolite biosynthetic process	57	-0.6063	-2.0246	0
	5	Wall_macromolecule_cil	8	1.0E+00	GO:0070589	cellular component macromolecule biosynthetic process	106	-0.5264	-1.9672	0
	10	Hormone_metabolic_process	2	0.0E+00	GO:0042445	hormone metabolic process	168	-0.4746	-1.8764	0
	5	Wall_macromolecule_cil	10	6.7E-01	GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	527	-0.3577	-1.7897	0
	12	Organic_cyclic_compound	0	0.0E+00	GO:1901361	organic cyclic compound catabolic process	314	-0.3962	-1.7501	0
4	Transport_tranmembrane_carbohydrate	6	7.3E-01	GO:1902600	proton transmembrane transport	320	-0.3644	-1.7457	0	
11	Inorganic_anion_transport	0	0.0E+00	GO:0015698	inorganic anion transport	123	-0.4932	-1.7371	0	

Tabla Suplementaria 3. Patrones de acumulación diferencial (DA) en IE15, comparados con IE23 y ME.

	Up Regulated Maize TF								
	IE15 vs IE23			IE15 vs ME			IE15 vs Others Embryos		
	Number TF	ID	ID AGPv4	Number TF	ID	ID AGPv4	Number TF	ID	ID AGPv4
ARR	-	-	-	-	-	-	1	ZmARR8	Zm00001d018380
ALF	-	-	-	2	ZmALF5 ZmALF15	Zm00001d038208 Zm00001d034627	-	-	-
ARF	-	-	-	2	ZmARF15 ZmARF23	Zm00001d051172* Zm00001d038698*	-	-	-
BBR/BPC	-	-	-	1	ZmBBR1	Zm00001d031572	-	-	-
bHLH	-	-	-	6	ZmbHLH73 ZmbHLH91 ZmbHLH94 ZmbHLH127 ZmbHLH162 ZmbHLH165	Zm00001d007768 Zm00001d047017 Zm00001d044272 Zm00001d014814 Zm00001d024679 Zm00001d049870	-	-	-
bZIP	-	-	-	4	ZmbZIP7 ZmbZIP14 ZmbZIP111 ZmbZIP124	Zm00001d020938 Zm00001d015118 Zm00001d030995 Zm00001d047519	-	-	-
C2C2-Dof	-	-	-	1	ZmDOF8	Zm00001d040455	-	-	-
C2H2	-	-	-	1	ZmC2H2	Zm00001d047976	-	-	-
C3H	-	-	-	2	ZmC3H14 ZmC3H20	Zm00001d026587 Zm00001d022427	1	ZmC3H26	Zm00001d036796
CCAAT-HAP5	-	-	-	1	ZmCA5P3	Zm00001d036648	1	ZmCA5P7	Zm00001d046967
CPP	-	-	-	4	ZmCPP3/8 ZmCPP4 ZmCPP6 ZmCPP7	Zm00001d010713 Zm00001d038660 Zm00001d033274 Zm00001d012688	-	-	-
E2F-DP	-	-	-	1	ZmE2F5	Zm00001d004512	1	ZmE2F4	Zm00001d016737
FARL	-	-	-	1	ZmFARL15	Zm00001d026485	-	-	-
GBP	-	-	-	1	ZmGBP12	Zm00001d022266	-	-	-
GRAS	-	-	-	1	ZmGRAS80	Zm00001d051387	-	-	-
GRF	-	-	-	1	ZmGRF8	Zm00001d002429	-	-	-
MTERF	-	-	-	2	ZmMTERF2 ZmMTERF27	Zm00001d031533 Zm00001d010329	1	ZmMTERF14	Zm00001d052081
NLP	-	-	-	1	ZmNLP6	Zm00001d039266	-	-	-
PLATZ	-	-	-	1	ZmPLATZ12	Zm00001d009292	1	ZmPLATZ2	Zm00001d029437
SRS	-	-	-	4	ZmSRS2 ZmSRS3 ZmSRS4 ZmSRS7	Zm00001d006209 Zm00001d053208 Zm00001d014762 Zm00001d021285	-	-	-
WRKY	-	-	-	4	ZmWRKY8 ZmWRKY17 ZmWRKY58 ZmWRKY94	Zm00001d053369 Zm00001d022437 Zm00001d041740 Zm00001d050195	1	ZmWRKY122	Zm00001d050023
EREB	2	ZmEREB11 ZmEREB187	Zm00001d034629* Zm00001d018050	3	ZmEREB64 ZmEREB130 ZmEREB132	Zm00001d019216 Zm00001d027878 Zm00001d050948	1	ZmEREB20	Zm00001d052405
HB	2	ZmHB6 ZmHB94	Zm00001d053151 Zm00001d042920	3	ZmHB83 ZmHB117 ZmHB119	Zm00001d052133 Zm00001d039017 Zm00001d031061	1	ZmHB92	Zm00001d038812
MADS	2	ZmMADS14 ZmMADS52	Zm00001d028217 Zm00001d052648	1	ZmMADS8	Zm00001d048082	2	ZmMADS9 ZmMADS49	Zm00001d002332 Zm00001d006094
LBD	3	ZmLBD5 ZmLBD38 ZmLBD33	Zm00001d034886 Zm00001d010751 Zm00001d038717	-	-	-	-	-	-
MYB	4	ZmMYB31 ZmMYB52 ZmMYBR6 ZmMYBR66	Zm00001d006236 Zm00001d047182 Zm00001d044330 Zm00001d034033	1	ZmMYBR111	Zm00001d026017	1	ZmMYBR106	Zm00001d013265
Orphan	5	ZmOrphan41 ZmOrphan43 ZmOrphan66 ZmOrphan141 ZmOrphan174	Zm00001d026269 Zm00001d029149 Zm00001d046778 Zm00001d002630 Zm00001d016106	6	ZmOrphan47 ZmOrphan92 ZmOrphan169 ZmOrphan239 ZmOrphan284 ZmOrphan353	Zm00001d007068 Zm00001d021949 Zm00001d039163 Zm00001d011364 Zm00001d049684 Zm00001d045098	4	ZmOrphan67 ZmOrphan238 ZmOrphan254 ZmOrphan322	Zm00001d002542 Zm00001d017977 Zm00001d043271 Zm00001d007050
NAC	6	ZmNAC4 ZmNAC30 ZmNAC79 ZmNAC122 ZmNAC128 ZmNAC130	Zm00001d019207 Zm00001d016950 Zm00001d020972 Zm00001d022424 Zm00001d040189 Zm00001d008403	7	ZmNAC59 ZmNAC66 ZmNAC67 ZmNAC101 ZmNAC102 ZmNAC113 ZmNAC120	Zm00001d018038 Zm00001d040318 Zm00001d023669 Zm00001d050960 Zm00001d048059 Zm00001d014405 Zm00001d002945	1	ZmNAC13	Zm00001d017084

* sRNAs TF targets: Zm00001d034629 (zma-miR172); Zm00001d051172 (zma-miR160); Zm00001d038698 (zma-miR171 y tasiARFs);

Tabla Suplementaria 4. Patrones de acumulación diferencial (DA) durante la inducción de callos embriogénicos a partir de IE15.

IE15 vs C15													
	UP Regulated			Down Regulated				UP Regulated			Down Regulated		
	Number TF	ID	ID AGPv4	Number TF	ID	ID AGPv4		Number TF	ID	ID AGPv4	Number TF	ID	ID AGPv4
ALF	2	ZmALF5 ZmALF15	Zm00001d038208 Zm00001d034627	2	ZmALF9 ZmALF17	Zm00001d010834 Zm00001d012979	MTERF	3	ZmMTERF2 ZmMTERF15 ZmMTERF22	Zm00001d041781 Zm00001d013259 Zm00001d032218	1	ZmMTERF1	Zm00001d029242
ARF	1	ZmARF5	Zm00001d002929	1	ZmARF19	Zm00001d014507		3	ZmMYB82 ZmMYB87 ZmMYB122	Zm00001d046518 Zm00001d046519 Zm00001d046517	13	ZmMYB14 ZmMYB30 ZmMYB45 ZmMYB50 ZmMYB59 ZmMYBR17 ZmMYBR52 ZmMYBR55 ZmMYBR58 ZmMYB108 ZmMYB139 ZmMYB149 ZmMYB164	Zm00001d021537 Zm00001d010907 Zm00001d018776 Zm00001d015614 Zm00001d036551 Zm00001d044409 Zm00001d017642 Zm00001d012285 Zm00001d051480 Zm00001d050185 Zm00001d005300 Zm00001d024784 Zm00001d031270
bHLH	2	ZmbHLH46 ZmbHLH144	Zm00001d039272 Zm00001d0004095	7	ZmbHLH3 ZmbHLH11 ZmbHLH19 ZmbHLH27 ZmbHLH32 ZmbHLH100 ZmbHLH156	Zm00001d028297 Zm00001d051569 Zm00001d0098444 Zm00001d033870 Zm00001d042373 Zm00001d025205 Zm00001d017908		5	ZmbZIP18 ZmbZIP34 ZmbZIP61 ZmbZIP115 ZmbZIP126	Zm00001d039065 Zm00001d038189 Zm00001d015743 Zm00001d028372 Zm00001d031272			
bZIP	3	ZmbZIP7 ZmbZIP58 ZmbZIP85	Zm00001d020938 Zm00001d022442 Zm00001d0006027	5	ZmbZIP18 ZmbZIP34 ZmbZIP61 ZmbZIP115 ZmbZIP126	Zm00001d039065 Zm00001d038189 Zm00001d015743 Zm00001d028372 Zm00001d031272							
BZR	-	-	-	1	ZmbZR1	Zm00001d046305							
C2C2-Dof	-	-	-	3	ZmDOF2 ZmDOF37 ZmDOF45	Zm00001d005970 Zm00001d043402 Zm00001d012703	NAC	4	ZmNAC13 ZmNAC101 ZmNAC114 ZmNAC119	Zm00001d017084 Zm00001d050960 Zm00001d031463 Zm00001d035266*	3	ZmNAC35 ZmNAC47 ZmNAC116	Zm00001d006106 Zm00001d008817 Zm00001d037029
C2C2-CO	-	-	-	1	ZmCOL1	Zm00001d045735							
C3H	6	ZmC3H11 ZmC3H14 ZmC3H18 ZmC3H31 ZmC3H43 ZmC3H54	Zm00001d049223 Zm00001d026587 Zm00001d046740 Zm00001d024534 Zm00001d053397 Zm00001d023636	1	ZmC3H38	Zm00001d053682	NLP	1	ZmNLP14	Zm00001d044825			
CCAAT-DR	1	ZmCADR16	Zm00001d019865	-	-	-		9	ZmOrphan22 ZmOrphan108 ZmOrphan115 ZmOrphan133 ZmOrphan165 ZmOrphan238 ZmOrphan254 ZmOrphan267	Zm00001d028615 Zm00001d018235 Zm00001d032637 Zm00001d013094 Zm00001d035776 Zm00001d017977 Zm00001d039192 Zm00001d043271 Zm00001d018887	1	ZmOrphan11 ZmOrphan36 ZmOrphan78 ZmOrphan142 ZmOrphan149 ZmOrphan155 ZmOrphan167 ZmOrphan183 ZmOrphan209 ZmOrphan223 ZmOrphan255 ZmOrphan268 ZmOrphan308 ZmOrphan352	Zm00001d012401 Zm00001d019944 Zm00001d029419 Zm00001d009626 Zm00001d036418 Zm00001d041395 Zm00001d050959 Zm00001d010795 Zm00001d008563 Zm00001d048359 Zm00001d004771 Zm00001d031662 Zm00001d006198 Zm00001d007240
CAMTA	1	ZmCAMTA2	Zm00001d021516	1	ZmCAMTA1	Zm00001d003958	Orphan						
DBP	1	ZmDBP3	Zm00001d045128	-	-	-							
EREB	-	-	-	5	ZmEREB87 ZmEREB100 ZmEREB205 ZmEREB210 ZmEREB212	Zm00001d002761 Zm00001d039446 Zm00001d026271 Zm00001d007033 Zm00001d026448*							
E2F-DP	2	ZmE2F19 ZmE2F4	Zm00001d027709 Zm00001d020939	-	-	-							
FARL	-	-	-	1	ZmFARL14	Zm00001d046441	PLATZ	1	ZmPLATZ2	Zm00001d029437	1	ZmOFF19	Zm00001d044167
GATA	1	ZmGATA6	Zm00001d025953	2	ZmGATA3 ZmGATA13	Zm00001d017409 Zm00001d012757	SBP	1	ZmSBP1	Zm00001d049822*	3	ZmSBP4 ZmSBP20 ZmSBP22	Zm00001d014762 Zm00001d053890 Zm00001d042319*
GBP	2	ZmGBP10 ZmGBP4	Zm00001d037158 Zm00001d044953	-	-	-							
GLK	1	ZmGLK20	Zm00001d017563	1	ZmGLK53	Zm00001d015407	SRS	1	ZmSRS7	Zm00001d021285			
GRAS	-	-	-	4	ZmGRAS16 ZmGRAS20 ZmGRAS38 ZmGRAS67	Zm00001d033166 Zm00001d009646 Zm00001d021946 Zm00001d028603	TCP	4	ZmTCP7 ZmTCP18 ZmTCP29 ZmTCP31	Zm00001d010730 Zm00001d020433 Zm00001d012725 Zm00001d041866	1	ZmTCP30	Zm00001d043368
HB	2	ZmHB92 ZmHB119	Zm00001d038812 Zm00001d031061	5	ZmHB8 ZmHB63 ZmHB88 ZmHB98 ZmHB109	Zm00001d034212 Zm00001d042821 Zm00001d043076 Zm00001d014201 Zm00001d012516	THX	-	-	-	1	ZmTHX1	Zm00001d038994
HSF	-	-	-	2	ZmHSF17 ZmHSF24	Zm00001d033987 Zm00001d032923	VP1-AB3	1	ZmTUB14	Zm00001d023523	1	ZmABI41	Zm00001d023446
LBD	1	ZmLBD25	Zm00001d052317	2	ZmLBD20 ZmLBD43	Zm00001d043036 Zm00001d048401	WRKY	2	ZmWRKY113 ZmWRKY8	Zm00001d013307 Zm00001d053369			
MADS	1	ZmMADS37	Zm00001d037737	1	ZmMADS32	Zm00001d049692	ZHD	1	ZmZHD6	Zm00001d039116			
							ZIM	-	-	-	1	ZmZIM10	Zm00001d014253

* sRNAs TF targets: Zm00001d035266 (zma-miR164); Zm00001d049822 y Zm00001d042319 (zma-miR529); Zm00001d026448 (zma-miR172).

Tabla Suplementaria 5. Patrones de acumulación diferencial (DA) en C15, comparados con otros callos (C23 y CM).

Up Regulated Maize TF									
	C15 vs C23			C15 vs CM			C15 vs Other Calli		
	Number TF	ID	ID AGPv4	Number TF	ID	ID AGPv4	Number TF	ID	ID AGPv4
ABI	1	ZmABI28	Zm00001d004358	-			1	ZmABI41	Zm00001d023446
ALF				1	ZmALF3	Zm00001d022110	1	ZmALF13	Zm00001d042582
ARF	1	ZmARF7	Zm00001d039267	1	ZmARF4	Zm00001d001945			
bHLH	2	ZmbHLH161 ZmbHLH27	Zm00001d018119 Zm00001d033870	2	ZmbHLH117 ZmbHLH166	Zm00001d024783 Zm00001d044216	2	ZmbHLH154 ZmbHLH156	Zm00001d013357 Zm00001d017908
bZIP	2	ZmbZIP61 ZmbZIP90	Zm00001d015743 Zm00001d012294						
C2C2-Dof				1	ZmDOF46	Zm00001d041549	1	ZmDOF11	Zm00001d030727
C2H2				1	ZmC2H26	Zm00001d035514			
C3H	2	ZmC3H38 ZmC3H48	Zm00001d053682 Zm00001d044667	1	ZmC3H30	Zm00001d034710			
CCAAT-HAP2	2	ZmCA2P5 ZmCA2P6	Zm00001d031092* Zm00001d033215*	1	ZmCA2P1	Zm00001d013501			
CPP	1	ZmCPP10	Zm00001d041445						
EREB	1	ZmEREB110	Zm00001d010987*	3	ZmEREB161 ZmEREB184 ZmEREB94	Zm00001d048004 Zm00001d034204 Zm00001d020043			
GATA	1	ZmGATA34	Zm00001d033945						
GLK	1	ZmGLK24	Zm00001d015521						
GRAS				1	ZmGRAS57	Zm00001d035670			
GRF							1	ZmGRF1	Zm00001d033876*
HB	7	ZmHB106 ZmHB133 ZmHB74 ZmHB83 ZmHB87 ZmHSF27 ZmHSF28	Zm00001d047559 Zm00001d048527 Zm00001d040611 Zm00001d052133 Zm00001d046405 Zm00001d022295 Zm00001d046299				2	ZmHB1 ZmHB130	Zm00001d033859 Zm00001d028986
LBD	1	ZmLBD44	Zm00001d023316						
MYB	4	ZmMYB125 ZmMYB128 ZmMYB30 ZmMYB45	Zm00001d032206 Zm00001d040527 Zm00001d010907 Zm00001d018776	1	ZmMYB80	Zm00001d034467			
NAC	2	ZmNAC71 ZmNAC86	Zm00001d003583 Zm00001d045463				2	ZmNAC116 ZmNAC85	Zm00001d037029 Zm00001d025483
Orphan	5	ZmOrphan107 ZmOrphan209 ZmOrphan215 ZmOrphan235 ZmOrphan32	Zm00001d004772 Zm00001d008563 Zm00001d005769 Zm00001d050768 Zm00001d047412	3	ZmOrphan160 ZmOrphan268 ZmOrphan96	Zm00001d013555 Zm00001d031662 Zm00001d030958	1	ZmOrphan240	Zm00001d038861
WRKY				2	ZmWRKY112 ZmWRKY46	Zm00001d026218 Zm00001d017712			
YAB							1	ZmYAB3	Zm00001d018829

* sRNAs TF targets: Zm00001d033876 (zma-miR396); Zm00001d033215 y Zm00001d031092 (zma-miR169); Zm00001d010987 (zma-miR172)

Tabla Suplementaria 6. Familias de TFs con valores significativos de enriquecimiento funcional en los embriones y callos durante la Inducción de SE (comparaciones embriones vs callos). Se muestran los valores de las familias de TFs con valores significativos ($p < 0.05$) y la proporción de miembros en una familia que se encuentran diferencialmente acumulado (DA).

Comparison	UP/DOWN	term_id	p.Val	FDR	adjusted_p_value	negative_log10_of_adjusted_p_value	term_size	query_size	intersection_size	% DE Family TF	effective_do_main_size
IE23vsC23	UP	GRF	9.13E-11	9.13E-11	9.13E-11	1.00E+01	15	190	12	80.00%	2605
IE23vsC23	UP	ZHD	1.10E-06	1.10E-06	1.10E-06	5.96E+00	21	153	10	47.62%	2605
IE23vsC23	UP	YAB	1.27E-06	1.27E-06	1.27E-06	5.90E+00	13	93	7	53.85%	2605
IE23vsC23	UP	OFF	1.13E-05	1.13E-05	1.13E-05	4.95E+00	43	133	12	27.91%	2605
IE23vsC23	UP	ARF	3.62E-05	3.62E-05	3.62E-05	4.44E+00	38	313	16	42.11%	2605
IE23vsC23	UP	HB	2.73E-04	2.73E-04	2.73E-04	3.56E+00	133	340	35	26.32%	2605
IE23vsC23	UP	VP1-AB3	8.61E-04	8.61E-04	8.61E-04	3.06E+00	51	318	17	33.33%	2605
IE23vsC23	UP	CCAAT-HAP2	1.86E-03	1.86E-03	1.86E-03	2.73E+00	16	290	8	50.00%	2605
IE23vsC23	UP	TCP	3.00E-02	3.00E-02	3.00E-02	1.52E+00	44	247	11	25.00%	2605
IE23vsC23	UP	SRS	4.59E-02	4.59E-02	4.59E-02	1.34E+00	9	199	4	44.44%	2605
IEvsC15	UP	ZHD	7.88E-10	7.88E-10	7.88E-10	9.10E+00	21	176	13	61.90%	2605
IEvsC15	UP	GRF	9.47E-09	9.47E-09	9.47E-09	8.02E+00	15	206	11	73.33%	2605
IEvsC15	UP	YAB	8.23E-05	8.23E-05	8.23E-05	4.08E+00	13	26	4	30.77%	2605
IEvsC15	UP	ARF	1.75E-04	1.75E-04	1.75E-04	3.76E+00	38	309	15	39.47%	2605
IEvsC15	UP	VP1-AB3	2.91E-04	2.91E-04	2.91E-04	3.54E+00	51	292	17	33.33%	2605
IEvsC15	UP	OFF	4.35E-04	4.35E-04	4.35E-04	3.36E+00	43	128	10	23.26%	2605
IEvsC15	UP	CCAAT-HAP2	2.73E-03	2.73E-03	2.73E-03	2.56E+00	16	304	8	50.00%	2605
IEvsC15	UP	TCP	3.65E-03	3.65E-03	3.65E-03	2.44E+00	44	130	9	20.45%	2605
IEvsC15	UP	HB	2.15E-02	2.15E-02	2.15E-02	1.67E+00	133	325	29	21.80%	2605
IEvsC15	UP	SRS	2.61E-02	2.61E-02	2.61E-02	1.58E+00	9	169	4	44.44%	2605
MEvsCM	UP	GRF	3.30E-11	3.30E-11	3.30E-11	1.05E+01	15	324	14	93.33%	2605
MEvsCM	UP	ZHD	6.41E-06	6.41E-06	6.41E-06	5.19E+00	21	66	7	33.33%	2605
MEvsCM	UP	OFF	2.34E-04	2.34E-04	2.34E-04	3.63E+00	43	120	10	23.26%	2605
MEvsCM	UP	VP1-AB3	7.32E-04	7.32E-04	7.32E-04	3.14E+00	51	314	17	33.33%	2605
MEvsCM	UP	CCAAT-HAP2	6.96E-03	6.96E-03	6.96E-03	2.16E+00	16	349	8	50.00%	2605
MEvsCM	UP	HSF	9.01E-03	9.01E-03	9.01E-03	2.05E+00	29	339	11	37.93%	2605
MEvsCM	UP	EREB	1.63E-02	1.63E-02	1.63E-02	1.79E+00	212	62	13	6.13%	2605
MEvsCM	UP	YAB	2.12E-02	2.12E-02	2.12E-02	1.67E+00	13	186	5	38.46%	2605
IE23vsC23	DOWN	WRKY	1.66E-16	1.66E-16	1.66E-16	1.58E+01	125	393	58	46.40%	2605
IE23vsC23	DOWN	NAC	4.93E-13	4.93E-13	4.93E-13	1.23E+01	134	325	50	37.31%	2605
IE23vsC23	DOWN	EREB	1.18E-04	1.18E-04	1.18E-04	3.93E+00	212	516	68	32.08%	2605
IE23vsC23	DOWN	PLATZ	9.76E-04	9.76E-04	9.76E-04	3.01E+00	15	282	8	53.33%	2605
IE23vsC23	DOWN	MYB	1.48E-02	1.48E-02	1.48E-02	1.83E+00	283	114	24	8.48%	2605
IE23vsC23	DOWN	HSF	2.17E-02	2.17E-02	2.17E-02	1.66E+00	29	563	14	48.28%	2605
IE23vsC23	DOWN	LBD	5.19E-02	5.19E-02	5.19E-02	1.28E+00	44	221	10	22.73%	2605
IEvsC15	DOWN	NAC	1.81E-11	1.81E-11	1.81E-11	1.07E+01	134	575	66	49.25%	2605
IEvsC15	DOWN	WRKY	1.60E-10	1.60E-10	1.60E-10	9.79E+00	125	570	61	48.80%	2605
IEvsC15	DOWN	HSF	3.72E-04	3.72E-04	3.72E-04	3.43E+00	29	281	12	41.38%	2605
IEvsC15	DOWN	bZIP	4.35E-04	4.35E-04	4.35E-04	3.36E+00	128	161	21	16.41%	2605
IEvsC15	DOWN	GRAS	2.42E-03	2.42E-03	2.42E-03	2.62E+00	86	105	12	13.95%	2605
IEvsC15	DOWN	EREB	1.10E-02	1.10E-02	1.10E-02	1.96E+00	212	470	57	26.89%	2605
IEvsC15	DOWN	ZIM	2.33E-02	2.33E-02	2.33E-02	1.63E+00	36	385	13	36.11%	2605
IEvsC15	DOWN	NLP	5.45E-02	5.45E-02	5.45E-02	1.26E+00	17	45	3	17.65%	2605
MEvsCM	DOWN	WRKY	1.73E-20	1.73E-20	1.73E-20	1.98E+01	125	284	54	43.20%	2605
MEvsCM	DOWN	NAC	1.77E-13	1.77E-13	1.77E-13	1.28E+01	134	379	55	41.04%	2605
MEvsCM	DOWN	HB	5.95E-03	5.95E-03	5.95E-03	2.23E+00	133	454	39	29.32%	2605

Tabla Suplementaria 7. Abundancia desRNAs en las Bibliotecas de sRNA-Seq

Nombre de la Biblioteca	Título	Tecnología	Secuencias Totales	Número de lecturas que mapean en el genoma de referencia	Porcentaje de lecturas que mapean en el genoma de referencia	Número de lecturas únicas mapean en el genoma de referencia	Número de lecturas que mapean en t/r/sn/snoRNA	Máxima longitud de las	Mínima longitud de las	Valor de Normalización	Factor de normalización	Número de lecturas Normalizadas (RPTM)	Número de lecturas únicas Normalizadas (RPTM)	Número de lecturas que mapean en t/r/sn/snoRNA (RPTM)
IE15_1	Embryo 15 DAP_R1	SBS	8200013	5416133	66.1%	2008163	1182254	30	18	10M	0.8200	6605029.8	2448975.4	1441770.9
IE15_2	Embryo 15 DAP_R2	SBS	16997209	11332791	66.7%	4874936	1434330	30	18	10M	1.6997	6667442.3	2868080.3	843862.1
IE23_1	Embryo 23 DAP_R1	SBS	15661871	10196227	65.1%	4617907	897289	30	18	10M	1.5662	6510222.8	2948502.8	572913.0
IE23_2	Embryo 23 DAP_R2	SBS	25943613	14158282	54.6%	6209852	1116891	30	18	10M	2.5944	5457328.6	2393595.7	430507.1
ME_1	Mature_Embryo_R1	SBS	15993391	10457463	65.4%	5136976	647380	30	18	10M	1.5993	6538615.2	3211936.7	404779.7
ME_2	Mature_Embryo_R2	SBS	17439535	11563933	66.3%	5928673	445753	30	18	10M	1.7440	6630872.3	3399559.1	255599.1
C15_1	Calli_15_DAP_R1	SBS	9513325	5737685	60.3%	989484	2161003	30	18	10M	0.9513	6031208.9	1040103.2	2271553.8
C15_2	Calli_15_DAP_R2	SBS	11582669	6884721	59.4%	1078458	2664260	30	18	10M	1.1583	5943984.9	931096.3	2300212.5
C23_1	Calli_23_DAP_R1	SBS	8485927	5081876	59.9%	853003	1800006	30	18	10M	0.8486	5988592.6	1005197.2	2121166.0
C23_2	Calli_23_DAP_R2	SBS	9219597	5620167	61.0%	954043	1607459	30	18	10M	0.9220	6095892.3	1034799.0	1743524.1
CM_1	Calli_Mature_Embryo_R1	SBS	9624341	5898184	61.3%	917940	2122832	30	18	10M	0.9624	6128403.0	953769.2	2205690.8
CM_2	Calli_Mature_Embryo_R2	SBS	7698239	4644283	60.3%	875434	1639453	30	18	10M	0.7698	6032916.1	1137187.3	2129646.8

Tabla Suplementaria 8. Total de Lecturas de sRNAs por longitud.

Total de lecturas de sRNAs por tamaño												
Size	IE15_1	IE15_2	IE23_1	IE23_2	ME_1	ME_2	C15_1	C15_2	C23_1	C23_2	CM_1	CM_2
18	335912	418917	165711	313983	125497	113370	401579	482859	543331	329550	506126	399661
19	332469	422450	192052	335655	156030	148600	369762	453516	473839	297630	433135	342907
20	372758	492190	249120	403864	214706	234056	371846	449272	482767	316131	431009	341848
21	591166	1106433	663390	1035380	806515	960680	630238	717416	876379	745989	792019	648486
22	958071	2250258	1499997	2300244	2078741	2462485	597709	674927	813392	852481	693685	588882
23	409347	837017	845235	1211779	802705	913443	344711	406670	364984	304867	353458	287611
24	1460273	4283469	4993653	6919170	5482707	6275057	848055	944172	754273	1090866	856805	749828
25	192618	295494	295989	366933	175941	160423	226876	272097	208070	174467	214091	167883
26	139688	169913	143707	155575	68741	48419	200161	242915	154024	142086	188177	145150
27	120240	157975	135442	136891	64245	40805	196219	240452	115794	142428	180033	134689
Total de lecturas de sRNAs por tamaño (RPTM)												
Size	IE15_1	IE15_2	IE23_1	IE23_2	ME_1	ME_2	C15_1	C15_2	C23_1	C23_2	CM_1	CM_2
18	683784	401488	180429	238236	125801	99821	959073	988595	1135048	749574	1088785	1049821
19	676776	404874	209109	254680	156408	130841	883086	928519	989876	676971	931766	900741
20	758788	471712	271246	306434	215226	206084	888063	919830	1008527	719052	927193	897959
21	1203381	1060399	722309	785600	808469	845867	1505170	1468822	1830804	1696781	1703802	1703429
22	1950255	2156635	1633219	1745323	2083778	2168189	1427482	1381831	1699221	1939001	1492265	1546862
23	833269	802193	920305	919444	804650	804276	823258	832607	762472	693432	760364	755490
24	2972540	4105253	5437165	5249959	5495992	5525112	2025372	1933077	1575718	2481217	1843171	1969632
25	392094	283200	322277	278412	176367	141251	541838	557085	434670	396832	460556	440991
26	284350	162844	156470	118043	68908	42632	478036	497339	321765	323180	404809	381277
27	244761	151402	147471	103867	64401	35928	468621	492296	241900	323958	387290	353798

Tabla Suplementaria 9. Localización Genómica de los Loci TAS3

ID [1]	Nombre	Id en Genoma AGPv2	Id en Genoma AGPv3	Localización genómica de los loci TAS3 (AGPv4)		
ZmaysTAS3-1	TAS3b	GRMZM2G020468	GRMZM2G020468	Chr9	136742684	136,743,673
ZmaysTAS3-2	TAS3e	GRMZM5G806469	GRMZM5G806469	Chr4	139211271	139211958
ZmaysTAS3-3	TAS3a	GRMZM2G178686	GRMZM2G178686	Chr8	134117964	134118858
ZmaysTAS3-4	TAS3g	GRMZM2G082055	GRMZM2G082055	Chr5	188158933	188159995
ZmaysTAS3-5	TAS3i	GRMZM2G512113	GRMZM2G512113	Chr5	188174610	188175374
ZmaysTAS3-6	TAS3f	GRMZM2G155490	GRMZM2G155490	Chr4	177903920	177904656
ZmaysTAS3-7	TAS3d	GRMZM2G124744	GRMZM2G124744	Chr10	85277935	85279208
ZmaysTAS3-8	TAS3c	GRMZM2G084821	GRMZM2G084821	Chr1	51729487	51730402
ZmaysTAS3-9	TAS3h	GRMZM2G588623	GRMZM2G588623	Chr9	45948753	45948180

Tabla Suplementaria 10. Número de lecturas de los transcritos TAS3 y tasiARFs.

	Transcrito Precursor de tasiARFs (RPTM)											
	IE15_1	IE15_2	IE23_1	IE23_2	ME_1	ME_2	CE15_1	CE15_2	CE23_1	CE23_2	CM_1	CM_2
TAS3b	4.0163	7.3532	20.4020	8.3519	11.2725	16.5739	11.1801	1.5762	2.5990	1.7410	3.7249	1.3321
TAS3e	0.0000	1.2442	0.7239	0.0000	0.0000	0.6886	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0626	0.0000
TAS3a	60.5393	65.0966	87.2917	136.3241	20.6331	48.6888	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
TAS3g	4.9401	7.6643	2.4531	1.5887	0.0000	0.0000	2.3451	3.7511	0.0000	2.5807	0.0000	0.0000
TAS3i	9.3312	4.5040	1.9705	9.0177	0.2191	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
TAS3f	2.9855	0.0000	1.3405	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7825	0.0000
TAS3d	9.8801	19.0363	72.4258	86.6059	45.9165	80.1776	0.0000	0.0000	0.0000	1.0241	0.0000	0.0000
TAS3c	2.3295	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.8111	6.1826	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
TAS3h	28.5159	36.0943	54.4903	41.2452	0.9958	7.8409	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	Número de lecturas de tasiARFs (RPTM)											
	E15_1	E15_2	E23_1	E23_2	EM_1	EM_2	C15_1	C15_2	C23_1	C23_2	CM_1	CM_2
tasiARF3a-1	9.0	31.0	99.0	105.0	74.0	18.0	0.0	4.0	4.0	37.0	3.0	2.0
tasiARF3a-2	0.0	1.0	4.0	5.0	4.0	6.0	0.0	0.0	3.0	8.0	2.0	0.0
tasiARF3b-1	110.0	69.0	50.0	80.0	151.0	430.0	1178.0	1091.0	1331.0	1372.0	1291.0	1379.0
tasiARF3b-2	0.0	2.0	4.0	2.0	4.0	4.0	23.0	13.0	10.0	72.0	21.0	14.0
tasiARF3c-2	0.0	2.0	4.0	2.0	4.0	4.0	23.0	13.0	10.0	72.0	21.0	14.0
tasiARF3c-1	110.0	69.0	50.0	80.0	151.0	430.0	1178.0	1091.0	1331.0	1372.0	1291.0	1379.0
tasiARF3d	2.0	3.0	7.0	7.0	5.0	7.0	2.0	4.0	0.0	5.0	0.0	10.0
tasiARF3e	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	2.0
tasiARF3f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
tasiARF3g	17.0	19.0	31.0	38.0	25.0	15.0	3.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0
tasiARF3i	17.0	19.0	31.0	38.0	25.0	15.0	3.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0

Tabla Suplementaria 11. Acumulación Diferencial de tasiARFs

Acumulación Diferencial (DA) de tasiARFs (log2FC)									
	IE15vsIE23	IE15vsME	IE23vsME	IE15vsC15	IE23vsC23	MEvsCM	C15vsC23	C15vsCM	C23vsCM
tasiARF3a-1	-2.0272	-1.1994	0.8277	3.8754	3.0606	5.5844	-2.8419	0.5096	3.3515
tasiARF3a-2	-2.2999	-2.5262	-0.2263	1.7263	0.6035	3.2051	-3.4227	-1.0473	2.3753
tasiARF3b-1	0.5773	-1.6243	-2.2016	-2.6558	-3.2393	-0.4339	-0.0061	0.5975	0.6037
tasiARF3b-2	-1.1736	-1.6133	-0.4397	-2.6419	-2.5007	-0.2533	-1.0324	0.7753	1.8078
tasiARF3c-1	0.5773	-1.6243	-2.2016	-2.6558	-3.2393	-0.4339	-0.0061	0.5975	0.6037
tasiARF3c-2	-1.1736	-1.6133	-0.4397	-2.6419	-2.5007	-0.2533	-1.0324	0.7753	1.8078
tasiARF3d	-1.1469	-1.0399	0.1070	0.6046	2.0352	1.8055	0.2837	0.1610	-0.1226
tasiARF3e	0.5962	0.5452	0.0000	0.9318	0.0000	-0.9091	0.0000	-1.2957	-1.3993
tasiARF3g	-0.7463	-0.2058	0.5405	4.0932	3.7034	6.9550	-1.1361	2.6560	3.7921
tasiARF3i	-0.7463	-0.2058	0.5405	4.0932	3.7034	6.9550	-1.1361	2.6560	3.7921
p-adj									
	IE15vsIE23	IE15vsME	IE23vsME	IE15vsC15	IE23vsC23	MEvsCM	C15vsC23	C15vsCM	C23vsCM
tasiARF3a-1	0.1654	0.4115	0.9959	0.0037	0.0157	0.0000	0.1864	1.0000	0.0360
tasiARF3a-2	NA	NA	1.0000	0.4330	0.8574	0.1252	0.4521	0.9649	0.2853
tasiARF3b-1	0.3913	0.0033	0.0002	0.0000	0.0000	0.4765	1.0000	0.7230	0.3138
tasiARF3b-2	NA	0.3877	1.0000	0.0844	0.1035	0.9031	1.0000	0.9368	0.2447
tasiARF3c-1	0.3913	0.0033	0.0002	0.0000	0.0000	0.4765	1.0000	0.7230	0.3138
tasiARF3c-2	NA	0.3877	1.0000	0.0844	0.1035	0.9031	1.0000	0.9368	0.2447
tasiARF3d	NA	NA	1.0000	0.7770	0.3485	0.3751	1.0000	1.0000	0.9505
tasiARF3e	NA	NA	1.0000	NA	1.0000	NA	1.0000	0.9373	NA
tasiARF3g	NA	0.9054	1.0000	0.0050	0.0096	0.0000	1.0000	0.5972	0.0765
tasiARF3i	NA	0.9054	1.0000	0.0050	0.0096	0.0000	1.0000	0.5972	0.0765

Tabla Suplementaria 12. ARFs blanco de tasiARFs

ID AGPv4	Nombre	Secuencia del sitio de reconocimiento de tasiARFs
Zm00001d042267_T002	ARF10 ARF-transcription factor 10	TCGCACTGGCAGGTCGGTGG
Zm00001d039006_T003	ARF24 ARF-transcription factor 24	AAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA AAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA
Zm00001d038698_T003	ARF23 ARF-transcription factor 23	AGGGTCTTGCAAGGTCAAGAA GAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA
Zm00001d043431_T002	ARF11 ARF-transcription factor 11	GAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA AGGGTCTTGCAAGGTCAAGAT
Zm00001d043922_T001	ARF12 ARF-transcription factor 12	AAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA AAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA
Zm00001d012731_T001	ARF26 ARF-transcription factor 26	AGGGTCTTGCAAGGTCAAGAA GAGGTCTTGCAAGGTCAAGAA

OPEN

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

Vasti T. Juárez-González¹, Brenda A. López-Ruiz¹, Patricia Baldrich², Eduardo Luján-Soto¹, Blake C. Meyers^{1,2,3} & Tzvetanka D. Dinkova¹

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

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

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

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

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

precursor (pre-miRNA) in the nucleus and subsequently a small RNA duplex (20 to 22 nt) with a two nucleotide 3' end overhang¹⁵. siRNAs arise from dsRNA precursors that result from the action of RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASES (RDRs), a group of enzymes originally identified in viruses by their role during the viral genome replication¹⁸. Different DCL family members, DCL2, DCL3 or DCL4 in *Arabidopsis thaliana*, process dsRNA¹⁷. While hc-siRNAs are processed by DCL3, secondary siRNAs usually require the action of DCL4. The length of siRNAs (20–24 nt) depends on the particular DCL enzyme used in their production. Both miRNA and siRNA duplexes are stabilized through HUA ENHANCER 1 (HEN1)-dependent methylation at their 3' ends¹⁹. sRNA loading on specific ARGONAUTE (AGO) proteins yields a functional RNA-Induced Silencing Complex (RISC), with AGO specificity further diversifying sRNA roles based on mature size, 3' end nucleotide identity, and the specific silencing mechanism used on targets^{15,19}.

Among the ten different AGO proteins present in Arabidopsis, AtAGO1 loads miRNAs and phasiRNAs, AtAGO10 specifically loads miR165/166, AtAGO7 loads a unique miRNA (miR390) involved in tasiRNA biogenesis from TAS3, AtAGO2 functions in antiviral defense, and the AGO4 clade (AGO4, AGO6, AGO9) functions in silencing of transposons and repeated sequences through a specific RNA-directed DNA methylation mechanism, RdDM^{20,21}. The major AGO clades defined in Arabidopsis have been discovered in other plant species, including rice and maize²⁰. However, the genomes of many plant species encode additional AGO family members.

To link the role of sRNAs with gene regulation of particular developmental processes, mutants for the enzymes required in their biogenesis and function have been characterized^{22,23}. In maize, a few mutants are available for components of tasiRNA and RdDM pathways^{24–26}. However, their genotype is poor for SE induction, and some display sterility²⁷. We have reported the behavior of miRNAs and other sRNAs during maize SE using immature embryos (IE) at 15 days after pollination (DAP) in the highly embryogenic genotype, Tuxpeño VS-535^{12,13}. However, the impact of different zygotic embryo developmental stages on sRNAs patterning during dedifferentiation was not explored. Here we characterized callus induction of three different explants: immature embryos at 15 DAP (IE15), as a standard tissue used for SE induction in VS-535; at 23 DAP (IE23), outside of the usual development window to induce embryogenic callus, and mature embryo (ME), known as non-embryogenic tissue. Contrasting phenotypes were observed between explants, induced calli, and their embryogenic potential. By high-throughput sequencing of the sRNAs and transcripts from each explant/induced callus tissue in duplicated biological samples, we found major changes in the different sRNA populations, depending on the developmental stage of the explant. Although sRNA readjustments during callus induction showed similar overall patterns for all explants, IE15 displayed differential accumulation of specific miRNAs and tasiRNAs, as well as their targets, providing molecular hints as to why this stage is relevant for successful embryogenic callus induction. On the other hand, the abundance of 24 nt hc-siRNAs increased in explants of later developmental stages (IE123 and ME) when compared to the IE15. Since the process of dedifferentiation is accompanied by a substantial reduction of this sRNA class, we propose that the initial levels in the explant might also impact the success of embryogenic callus induction.

Results

The embryogenic potential of induced calli depends on the developmental stage of the maize embryo.

To assess the relationship between the embryo developmental stage and its *in vitro* embryogenic potential, we compared the morphology of IE15, IE23 and ME and to one-month induced callus from each tissue (Fig. 1). IE23 has double the size of IE15 (Fig. 1c vs. 1a), while ME represents a later developmental stage showing onset of desiccation effects according to its yellowing color (Fig. 1e). In addition, while IE15 displayed one or two established leaves² (L1-L2; Fig. 1b), IE23 had four or five leaves (L4-L5; Fig. 1d) and ME showed six-leaf primordia (Fig. 1f). Furthermore, IE23 showed degeneration of the suspensor (marked with “S” in IE15) and the presence of calyptra behind the root apical meristem (RAM; Fig. 1d, lower section). The ME had larger, better-organized scutellum cells indicating full embryo development². Such differences between all embryos were consistent across sections obtained from distinct samples.

Embryogenic callus was readily detected in tissues induced from IE15 during the first days of induction and it showed continuous proliferation. After one month of subculture, these tissues (calli from IE15 embryos, henceforth “C15”) displayed full degeneration of the original explant and mostly consisted of embryogenic and non-embryogenic calli (Fig. 1g,h). The main phenotypic response of IE23 to dedifferentiation (calli from IE23 embryos, henceforth “C23”) included swelling of the embryo scutellum, thickening in the posterior embryo axis and non-friable calli formation on the side of the embryo in contact with the medium (Fig. 1i,j). The ME explant displayed the most contrasting response (calli from ME embryos, henceforth “CM”), characterized by the appearance of a small proportion of non-friable calli and massive root generation through germination (Fig. 1k,l). All tissues showed early vascular organization, represented by procambial and parenchymatic cells (Fig. 1m–o; lower sections), similar to what was observed in early xylem and protoxylem (tracheal elements presence)²⁸. Interestingly, the protoxylem appeared erratic and distributed across the tissues (Fig. 1n, upper section). In contrast to C23 and CM, C15 displayed particular accumulation of small, isodiametric and densely packed cells (Fig. 1m, upper section), common for meristems²⁹.

The embryogenic responses were evaluated according to the average Line Index (LI)⁷, obtained by observation of calli on different embryo batches at one month after induction (Methods and Table S1). Embryogenic responses (LI ≥ 3) were observed only for C15 (LI = 4.3; Fig. 1p). The mean LIs for C23 and CM were 1.9 and 0.8, respectively. Furthermore, the three batches presented significant differences in the LI score according to the Induction Capacity (IC), which calculates the proportion of embryos with embryogenic response in each batch. Seventy-three percent of IE15 generated embryogenic calli, while only 27.1% of IE23 formed this type of callus. No embryogenic response was observed for ME (IC = 0.0%; Fig. 1q). Based on these observations, we confirmed that embryogenic callus formation in the maize VS-535 genotype depends on a narrow zygotic embryo developmental stage. The *in vitro* embryogenic potential sharply drops for 23 DAP embryo, leaf stage four² (L4; Fig. 1d) and is null upon completion of development (L6; Fig. 1f). Further follow-up on callus subculture confirmed

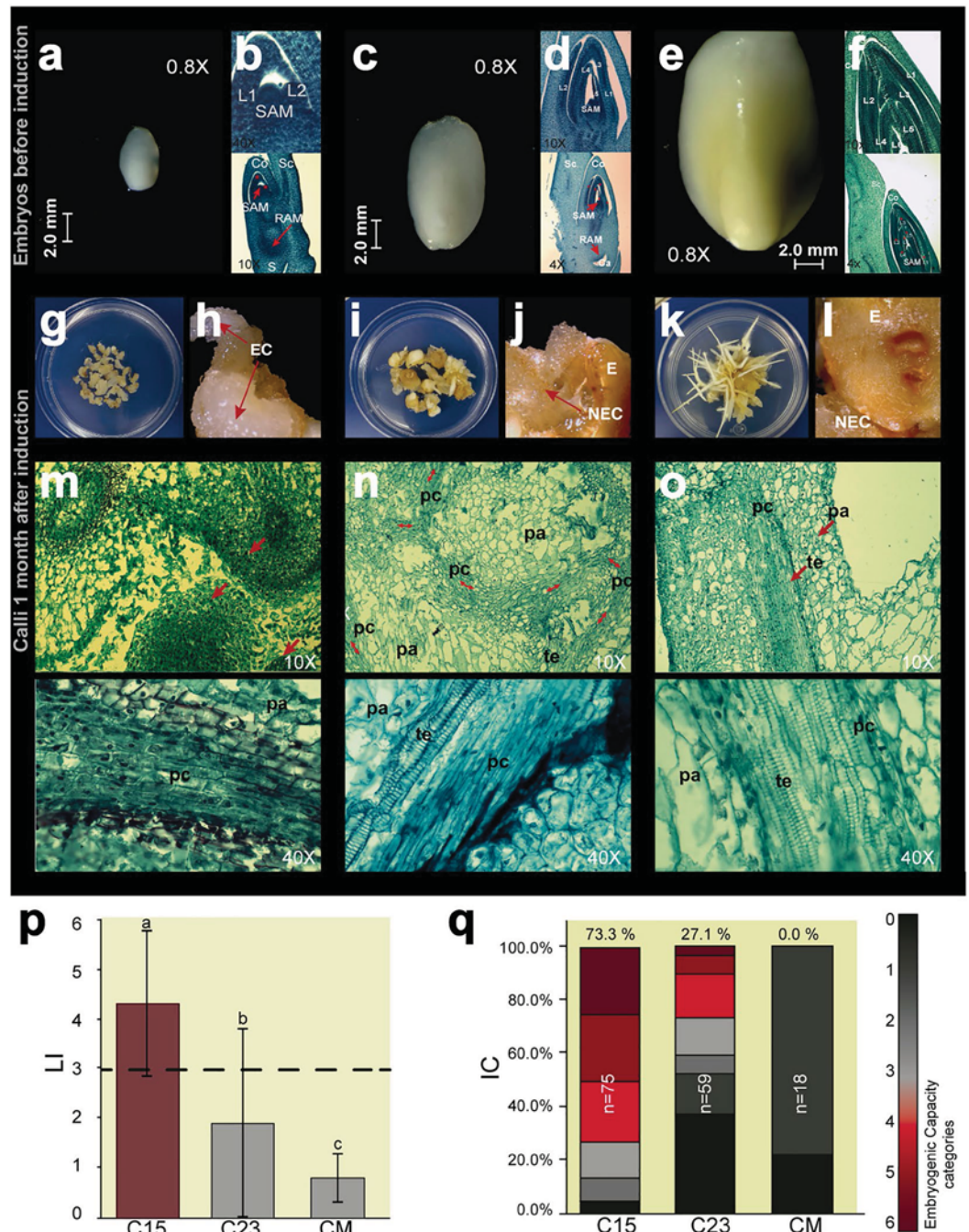


Figure 1. Morphological and histological characterization of callus induction using embryos collected at different developmental stages. (a) Immature Embryo at 15 days after pollination; IE15. (c) Immature Embryo at 23 days after pollination; IE23. (e) Mature Embryo; ME. (b, d, f) Histological analysis of longitudinal sections across IE15, IE23 and ME, respectively. (g, i, k) Callus from IE15, IE23 and ME, respectively, at one month of induction. (h, j, l) Callus morphology from IE15, IE23 and ME, respectively (C15, C23 and CM), observed at one month of induction by stereoscopic microscopy. (m–o) Histological analysis of callus cross-sections from IE15, IE23 and ME, respectively, at one month of induction. (p) Line index (LI) bar plot. The dotted line represents the minimum LI value of an embryogenic batch (q) *In vitro* Capacity (IC) bar plot. Embryogenic categories are designated with the red color palette; grayscale palette represents the non-embryogenic categories. L1–L5: Leaf primordia in the maize embryo; Co: Coleoptile; Sc: Scutellum; SAM: Shoot Apical Meristem; RAM: Root Apical Meristem; S: suspensor; Ca: Calyptra; E: Embryo; EC: Embryogenic Callus; NEC: Non-Embryogenic callus; te: tracheary elements; pc: procambium cells; pa: parenchyma cells.

substantial differences between C15, C23 and CM phenotypes (Fig. S1a) and proliferation rates (Fig. S1b). C23 and CM displayed non-embryogenic tissues with high oxidation levels proliferating at significantly lower rates than C15 since early subcultures. In addition, only C15 was able to regenerate plants (Fig. S1c).

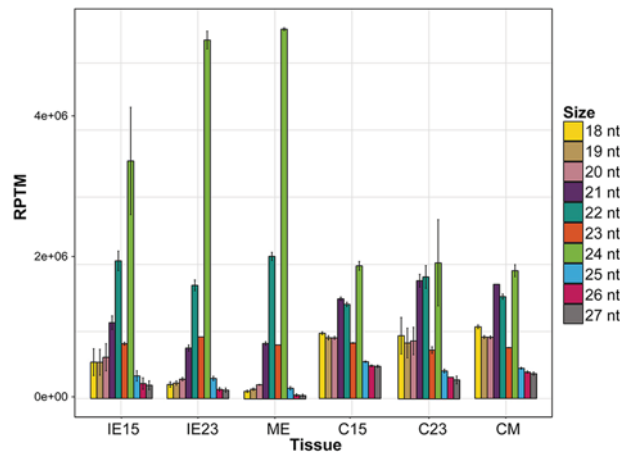


Figure 2. sRNA library size distribution in the different maize embryos and induced callus tissues. Size distribution is shown by normalized genome-matched reads (Reads Per 10 Million, RPTM). Mean values of the two biological replicates with standard deviation were used. IE15: Immature Embryos 15 days after pollination; IE23: Immature Embryos 23 days after pollination; ME: Mature Embryos; C15, C23 and CM: Callus tissues at one month after induction from IE15, IE23, and ME, respectively.

Small RNAs during embryo development and callus induction. To explore how sRNAs could impact the contrasting dedifferentiation response of developmentally distinct zygotic embryos, the six previously characterized tissues (IE15, IE23, ME, C15, C23, and CM) were used for sRNA analysis in two biological replicates. Over 13 million sRNAs (18 to 30 nt) were sequenced per library, of which ~62% (54.6 to 66.7%) matched to the maize B73 genome (Table S2). sRNAs of 21, 22 and 24 nt were the most abundant in all tissues (Table S2; Fig. 2). However, their distribution patterns varied among tissues as follows (Figs 2 and S2): (1) In zygotic embryos, the 24-nt sRNAs were the most abundant population, increasing substantially towards embryo maturation (up to the 55.5% of ME reads), followed by 22- and 21-nt sRNA populations; (2) The 21-nt sRNA proportion was greater in calli than in embryo for all developmental stages; (3) 22 nt abundances were relatively unchanged in all tissues; (4) A noticeable decrease in 24-nt sRNAs was observed upon callus induction for all developmental stages, resulting in similar proportions of 21, 22 and 24 nt sRNAs. Overall, these results support the occurrence of sRNA length readjustment due to the dedifferentiation process, independent of the explant developmental stage or the calli embryogenic potential. However, in spite of the similar sRNA length distribution in all calli tissues, particular sRNA classes and families might differ in their accumulation patterns.

Differential accumulation of miRNAs. Since dedifferentiation in SE involves major reprogramming in response to external *in vitro* stimuli, and miRNAs are essential regulators in developmental and stress responses, we examined miRNA levels in our data. Members of 28 known miRNA families were identified considering all libraries (Table S3). Since miRNAs from the same family showed similar patterns between tissues, with some exceptions, we merged them, combined and normalized (to reads per ten million; RPTM) their abundances for subsequent analyses. Clustering by the RPTM values in different tissues rendered groups with high (339 to 73188 median RPTM) and low (0 to 312 median RPTM) abundances across all samples (Fig. S3; Table S3). For example, the highly abundant miR159, miR167, miR156, miR319 and miR166 families, comprised one of the clusters, whereas the less abundant miR397, miR1432, miR399, miR2118, miR2275 and miR395 were part of a different cluster.

Differential accumulation (DA) of miRNAs was examined through three different comparisons: (i) between embryos, (ii) callus induction between explants, and (iii) between calli. Statistically significant DA miRNAs were found between all embryo developmental stages, with greater differences for IE15 vs ME (Fig. 3a). miR156, miR159, miR162, miR167, miR171 and miR390 showed significantly higher levels in IE15, whereas miR168, miR169, miR393, miR444 and miR529 were preferentially accumulated in the ME and showed no differences between IE15 and IE23. Other miRNAs were characterized by unique patterns: miR395 significantly increased from IE15 to IE23 (2.3-fold change) but then dropped in ME (131-fold decrease compared to IE23); miR398 had a statistically significant increase in accumulation only for IE23. On the other hand, miR408 demonstrated the lowest abundance level in IE15, increased in IE23 and further decreased in ME (1.4-fold change). The miRNAs with lower accumulation in IE15 than IE23 are related to stress responses. Overall, these patterns may reflect the dynamic nature of miRNA levels during embryo development and, most importantly, its potential impact on the explant differential responses to dedifferentiation.

miR164, miR393, miR396, miR827 and miR1432 were highly accumulated in calli obtained from IE15 and IE23, showing significantly lower levels in the corresponding explants (Fig. 3b; bottom cluster). Concomitantly, miR156, miR159, miR166, miR167, miR395 and miR444 were more abundant in the zygotic embryo tissues (Fig. 3b; upper cluster). The difference was significant for all embryo developmental stages only for miR166 and miR395 (Fig. 3b; upper clusters). Besides the observed general responses, some miRNAs had a unique pattern for IE15, the explant with greatest embryogenic potential. Particularly, it was the only explant with significantly higher miR396 and miR399, and lower miR168 levels (Fig. 3b; clusters 3 and 5 from the top). In addition, miR398 and miR529 did not show significant DA during callus induction from IE15, while they were oppositely regulated

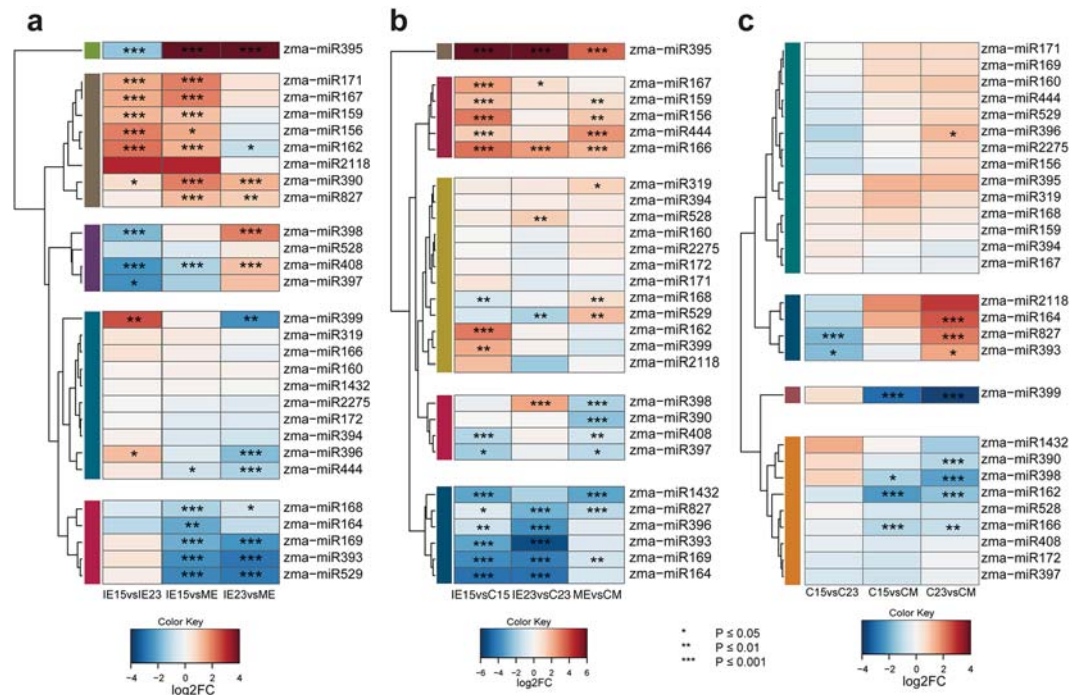


Figure 3. miRNA differential accumulation (DA) during callus induction from maize embryos collected at different developmental stages. (a) DA of miRNAs between zygotic embryo developmental stages (IE15, IE23 and ME). Comparisons were done for IE15 vs. ME and IE23 vs. ME. (b) DA of miRNAs during the induction of Somatic Embryogenesis. Comparisons were done for IE15 vs. C15, IE23 vs. C23 and ME vs. CM. (c) DA of miRNAs in callus tissues obtained from developmentally distinct embryos at one month of induction. Comparisons were done for C15 vs. C23, C15 vs. CM and C23 vs. CM. Values of DA were expressed as the log₂ Fold Change (log₂FC) and significant values indicated as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

in IE23 and ME inductions. These observations supported that readjustments for some miRNA families during dedifferentiation strongly depend on the explant developmental stage. Moreover, the starting miRNA level in the explant might have influenced their target regulation during callus induction. For example, miR156, miR166 and miR167 were significantly more abundant in the IE15 explant (Fig. 3a). While their abundance decreased in the induced callus for all explants (Fig. 3b), the final level of mRNA targets could partially depend on the miRNA initial amount.

Surprisingly, despite the contrasting morphological and embryogenic features between calli (Fig. 1g–q), significant differences in miRNA abundance were observed mostly for CM when compared to either C15 or C23. It displayed significantly higher levels of miR162, miR166, miR398 and miR399 than C15 and C23, and showed significantly lower levels of miR164, miR390, and miR396 than C23 (Fig. 3c). In addition, miR393 and miR827 showed significantly lower levels in C15 compared to C23 - a distinctive feature between these two calli types. A few miRNA families with known roles in developmental processes, miR162, miR166 and miR393, distinguished C15 and CM calli. Such differences might translate into amplified effects on several targets and their corresponding downstream activities. Furthermore, other sRNA populations might additionally impact the fate of the callus.

miRNA target regulation in dedifferentiation, by explant developmental stage. miRNA regulation is exerted through the control of particular target abundances or translation. RNA-seq data was generated from the same samples used for sRNA analysis, and with these data, we inspected either predicted or experimentally confirmed miRNA targets (Figs S4–S6). As expected, significantly different abundances were found for several miRNA targets during the zygotic embryo development (Fig. S4). *SQUAMOSA BINDING PROTEIN ZmSBP2*, 3, 18 and 27 (miR156 targets), *b-HELIX-LOOP-HELIX ZmHLLH137* (miR162 target), *AUXIN RESPONSE FACTORS ZmARF16*, 18 and 30 (miR167 targets) were all up regulated at later developmental stages, inversely mirroring the miRNA accumulation (Fig. 3). On the other hand, *ZmSBP6*, targeted by miR529, as well as transcripts encoding histone-lysine N-methyltransferase member (*SUVH9*), *ZmSBP1* and *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1)*, targeted by miR393, showed significantly lower levels in the mature embryo (Fig. S3). The abundance of these targets negatively correlates with the higher miR393 and miR529 levels in the mature embryo (Fig. 3a).

Important differences in the *ZmSBP* family were also observed during dedifferentiation (Fig. S5). Significantly up-regulated transcripts were detected in C15 induction (*ZmSBP18*, 20, 22 and 29), whereas down-regulated SBP isoforms (*ZmSBP2*, 3, 8, 30, 32 and the a transcript orthologous to Arabidopsis *SPL18*) were more numerous during CM induction. On the other hand, *CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (ZmCUC2)*, miR164 target, significantly

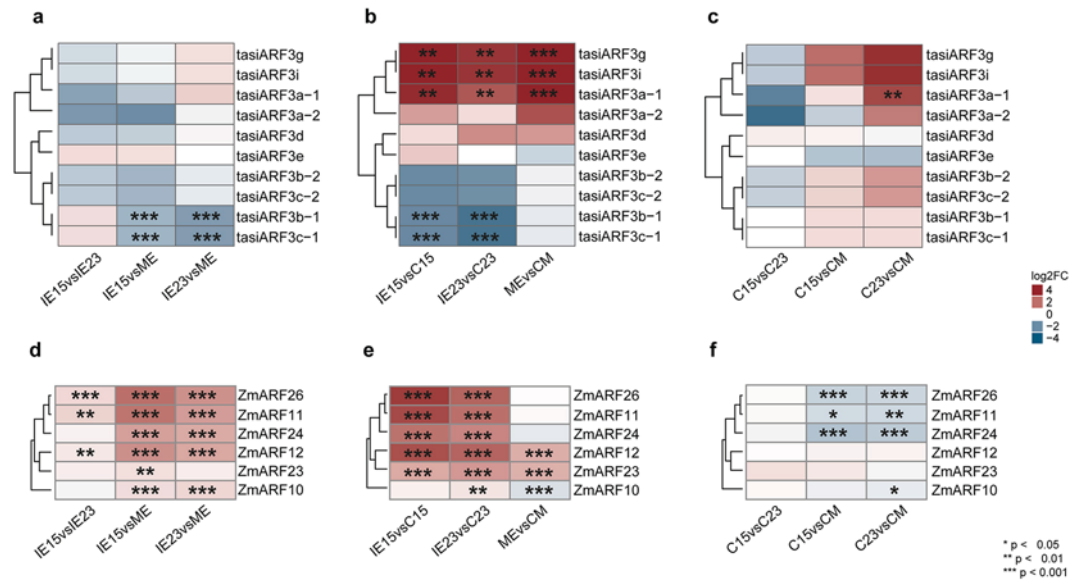


Figure 4. Regulation mediated by tasiARFs pathway during maize callus induction. **(a)** Differential accumulation (DA) of tasiARFs between zygotic embryos developmental stages (IE15, IE23 and ME). Comparisons were done for IE15 vs. IE23, IE15 vs. ME and IE23 vs. ME. **(b)** DA of tasiARFs during the induction of Somatic Embryogenesis. Comparisons were done for IE15 vs. C15, IE23 vs. C23 and ME vs. CM. **(c)** DA of tasiARFs in callus tissues obtained from developmentally distinct embryos at one month of induction. Comparisons were done for C15 vs. C23, C15 vs. CM and C23 vs. CM. **(d–f)** DA of Auxin Response Factors (ARFs) targets of tasiARFs. Comparisons were done as described for **(a–c)**, respectively. Values of DA were expressed as the log₂ Fold Change (log₂FC) and significant values indicated as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

decreased in C15, but not in C23 or CM callus induction. A set of *ZmARFs* targeted by miR167 showed differential patterns in C15 and C23 induction, such as *ZmARF22* (up-regulated for C15, but not for C23) and *ZmARF18* (down-regulated for C23, but not for C15). Other *ZmARFs* targeted by miR167 did not show a negative correlation with the miRNA during callus induction, suggesting additional levels of transcript abundance regulation or translational inhibition, rather than cleavage promoted by the miRNA.

Many targets of stress-related miRNAs showed an inverse pattern relative to their cognate miRNAs in calli, regardless of the developmental stage of the explant. For example, a group of *GROWTH REGULATORY FACTOR (GRF)* genes targeted by miR396, decreased in callus tissues. On the other hand, levels increased for transcripts of sulfate transporters and other sulfate metabolism-related proteins, targets of miR395. Curiously, in spite of the lack of significance in miRNA DA between C15 and C23, several miRNA targets showed significant DA in these tissues (Fig. S6). These included *ZmNAC113* (miR164 target) and *ZmGRF6* (miR396 target), more abundant in C23, as well as *Zm00001d025268* orthologous to *AUXIN SIGNALING F-BOX 3 (AFB3)* and target of miR393, which was more abundant in C15. Hence, although the overall de-differentiation process implies similar miRNA readjustments for all explants, differential target accumulation patterns upon callus induction might result from both miRNA levels and transcriptional regulation of their target transcripts.

Differential accumulation of tasiRNAs. Plant *TAS3* tasiRNAs function to regulate auxin responses during development; these so-called tasiARFs target members of the ARF transcription factor family³⁰. Since callus induction occurs in response to high exogenous auxin levels, tasiRNAs may well function during the SE process³¹. In maize, nine *TAS3* loci (*TAS3a-i*) have been identified³². Eight of them produce mature tasiARFs that target transcripts of the ARF3 family (Table S4). The *TAS3a-c* loci produce two tasiARFs (1 and 2) each, yielding a total of eleven mature maize tasiARFs. However, tasiARF3b-1, tasiARF3b-2 and tasiARF3g are identical in sequence to tasiARF3c-1, tasiARF3c-2 and tasiARF3i, respectively, and were not differentiated in our analysis.

The nine *TAS3* precursors were detected in IE15 and presented higher levels, except for *TAS3a*, *TAS3b*, *TAS3d* and *TAS3h*, which were more abundant in IE23 (Fig. S7a). *TAS3a*, *TAS3e*, *TAS3h*, and *TAS3i* precursors were only detected in zygotic embryos. Moreover, the *TAS3c* precursor exclusively appeared in IE15 and C15. All tasiARFs except tasiARF3f were detected in at least one tissue. Their overall abundance was higher in callus (Table S4). Particularly, tasiARF3b/c were the most abundant (Fig. S7b). They also showed significantly lower levels in IE15 and IE23, compared to ME (Fig. 4a). Two contrasting patterns of tasiARF abundances were observed during dedifferentiation. Mature tasiARF3a, tasiARF3d, tasiARF3g and tasiARF3i were more abundant in embryo tissues, while tasiARF3b/c were more abundant in calli (Fig. 4b). tasiARF up-regulation during dedifferentiation was statistically significant only for C15 and C23. Between the calli induced from different embryo explants statistically significant DA was observed for tasiARF3a-1 between C23 and CM (Fig. 4c).

To evaluate tasiARF-mediated regulation, we analyzed the sequences of 36 *ARF* genes reported for maize. Prior reports indicated five *ARFs* are targeted by tasiARFs^{30,32}. Our analysis of the remaining 32 sequences identified an

additional *ARF* possibly targeted by tasiARFs (*ZmARF10*). Based on the RNA-seq data, all TAS3-targeted *ARF* genes showed significant DA between the embryo developmental stages, particularly when compared to ME. The *ARF* patterns of accumulation inversely correlated with tasiARF3b/c abundances, showing higher accumulation in IE15 compared to IE23 and ME (Fig. 4d). During dedifferentiation, *ZmARF11*, *ZmARF24* and *ZmARF26* transcripts were significantly reduced in C15 and C23, but not in CM (Fig. 4e). In addition, *ZmARF10* displayed up-regulation in CM. Consistent with these patterns, calli produced from IE15 and IE23 showed significantly lower levels of *ARF*-encoding transcripts (Fig. 4f), suggesting efficient regulation mediated by tasiARF3b/c particularly for these types of calli. In addition to tasiARF-regulated *ZmARF* family members, other *ARFs* were significantly decreased or increased during callus induction (Fig. S8). This is in agreement with a report on *Arabidopsis* SE, showing contrasting patterns for different *ARF* family members³³.

Validation of miRNA, tasiARF and target accumulation patterns by RT-qPCR. To confirm the differential accumulation of miR156, miR160, miR164, miR166, miR390 and tasiARFb in maize embryos and induced calli, we used RT-qPCR and compared their patterns with the levels of some of their targets (Fig. 5). Most sRNAs showed similar abundances or trends to the high-throughput sequencing data, except miR390 (Fig. 5c). miR156, miR160 and miR166 displayed higher levels in the IE15 sample than in IE23 or ME (Fig. 5a). Upon callus induction, miR160 remained high for C15 and C23, but not for CM, miR164 increased in all calli, miR390 showed particularly high levels for C15 and miR166 abundance increased only for CM. Negative correlation was observed for miR160, miR164 and miR390 targets in C15 and C23, albeit differential patterns existed for targets of the same miRNA (miR160 and miR390). On the other hand, miR156 and miR166 reduction during callus induction was also accompanied by target decrease, except for CM, suggesting additional levels of regulation for these targets.

miR390 is required for the tasiARF biogenesis pathway for appropriate processing of TAS3 precursors. This miRNA was more abundant in C15 than in other calli correlating with higher levels of tasiARFb1c1 (Fig. 5b). The TAS3b precursor accumulated in IE23 compared to the other explants correlating with low levels of miR390 and the tasiARF. Curiously, we were able to detect the TAS3g precursor but not the corresponding tasiARF (Table S4) suggesting some selectivity for processing by miR390-guided RISC. In addition, *ZmARF24* and *ZmARF11* showed strong negative correlation with tasiARFb accumulation upon callus induction (C15 and C23), consistent with the high-throughput sequencing data (Fig. 4).

sRNAs mapped to transposable elements. The abundances of siRNAs matched to TEs and repeat regions in the maize genome were normalized according to the copy number of each TE superfamily (Table S5). Size analysis indicated that both 22- and 24-nt species were the most abundant for all tissues (Fig. S9). The 24-nt hc-siRNAs from all TEs sharply decreased in the induced callus, as compared to the corresponding embryo explant, whereas the 22-nt species decreased to a lesser extent (Fig. S9). Although the biogenesis of 22-mers mapping to TEs and repeats in maize is not well described²⁴, we grouped them together with 24-nt hc-siRNAs, since they have a comparable genome distribution. LTR Class I retrotransposons (Copia, Gypsy and RLX-Unknown-LTR) accounted for more than 60% of the mapped sRNAs in all the tissues, followed by Helitron Class II DNA transposons (Figs 6 and S9). The proportion of hc-siRNAs from other TE superfamilies varied during callus induction. While the Copia-derived hc-siRNAs were reduced in the callus, hc-siRNAs from Gypsy and RLX-Unknown-LTRs were increased.

One intriguing change upon dedifferentiation was a reduction in 23/24-nt, but not in 21/22-nt sRNA abundances. Significant DA was found to greater extent between IE15 and IE23 than between IE23 and ME (Fig. 7). For example, in IE15, the 21- or 22-nt Class I Retrotransposon-mapped sRNAs were up-regulated, while the 23- or 24-nt sRNAs were down-regulated. Upon dedifferentiation (embryo vs. callus), 24-nt hc-siRNAs derived from Gypsy and LTR-unknown TE showed opposite patterns for IE15 and IE23. Comparable behavior was found for the Helitron-mapped sRNAs, representing the second most abundant order of TEs (Fig. S10). sRNAs mapping to Copia TEs were more abundant in embryo tissues, except for the 21-nt class. Significant DA was even observed when comparing the calli derived from IE15 and IE23 (Fig. 7c). In particular, Copia, Gypsy and Unknown-LTR TEs, as well as Helitron-derived 23 and 24 nt sRNAs were increased in C15 compared to C23, while Copia-derived 21–22 nt species were decreased. Although a reliable interpretation of such changes is not possible at this moment due to limited work on hc-siRNA pathways in maize, they may impact the regulation of SE.

Discussion

Our findings support a role of differential sRNA (miRNA, tasiRNA and hc-siRNA)-mediated regulation during maize callus induction depending on the explant developmental stage. Previous studies demonstrated that sRNA abundances change during maize zygotic embryo development and upon callus induction from 15 DAP immature embryos^{11,13,34}. However, the impact of sRNA-target balance present in the explants, during dedifferentiation and in the induced callus was not explored. Zygotic embryos at 23 DAP strongly decreased in the callus embryogenic potential and mature embryos were unable to properly establish dedifferentiation under the 2,4-D stimulus. Similarities were observed between C15 and C23, including the presence of procambial and parenchymatic cells, possibly as a response to the auxin and cytokinin stimuli³⁵. The abundant presence of tracheal elements suggests they have a role in water transport across tissues, whereas the parenchymatic cells could function as supporting tissue. Nevertheless, IE23 generated mostly non-embryogenic callus and showed low proliferation rates accompanied by higher oxidation. Such strikingly different phenotypes reflect the inability to achieve the genetic reprogramming required for embryogenic competence in the explant.

Consistent with the embryo distinct morphological features, the accumulation of many development-related miRNAs^{36,37} decreased at stages beyond 15 DAP, whereas stress- and nutrient transport-related miRNAs³⁸ significantly increased. In addition, dedifferentiation from IE15 resulted in more significant miRNA accumulation switches than for the other explants. Calli induced from IE23, displayed increases for most stress-related miRNAs,

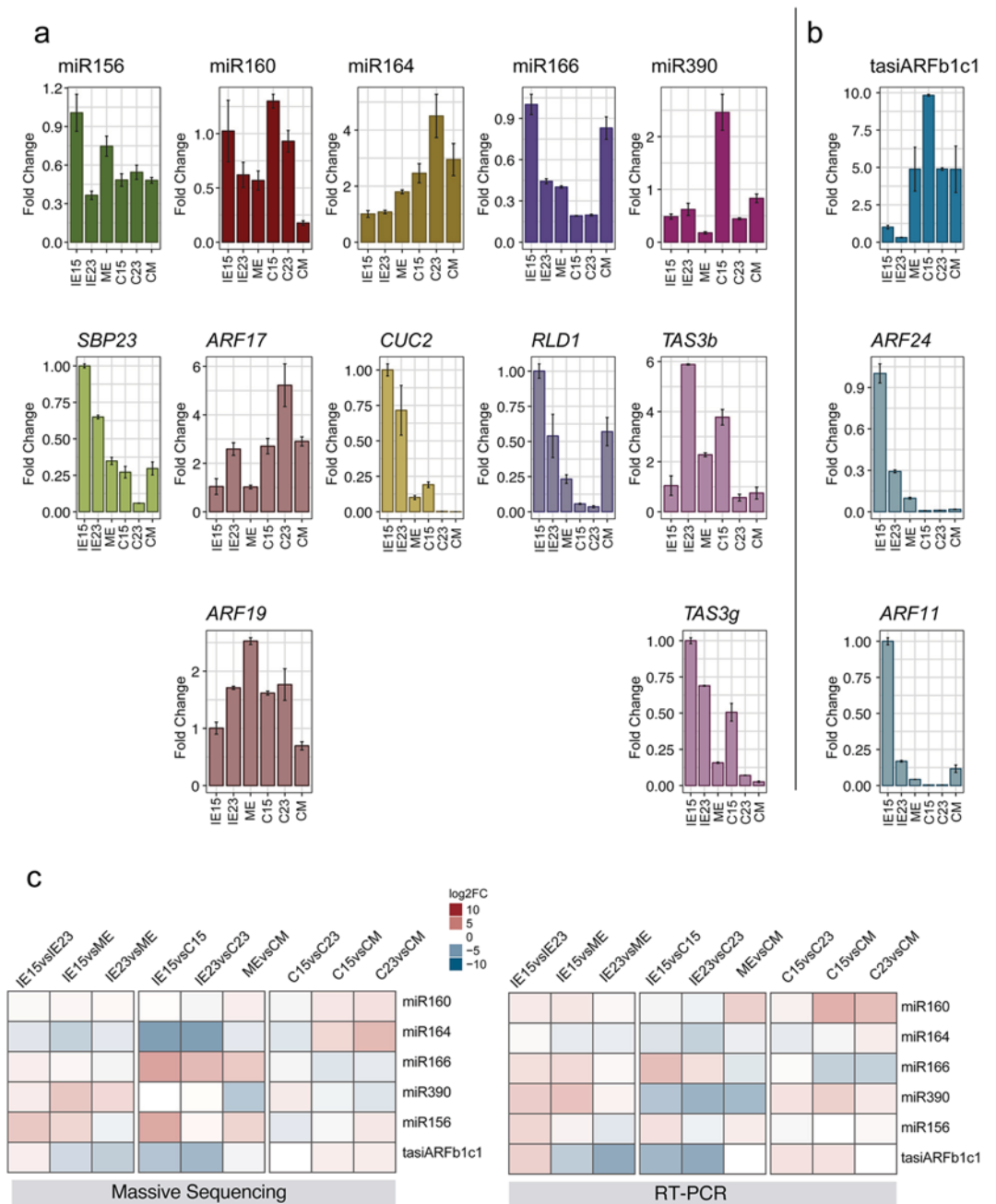


Figure 5. Relative abundances of selected sRNA and their corresponding targets during callus induction from zygotic embryos collected at distinct developmental stages. sRNA and mRNA abundances were analyzed by qRT-PCR in Tuxpeño VS-535 immature embryos (IE15, IE23) and mature embryos (ME) used as explants and the corresponding induced one-month callus tissues (C15, C23, CM). Accumulation of selected sRNAs (upper graphs, 1st row) and their targets (lower graphs, 2nd and 3rd rows) are shown in similar bar color. (a) miRNAs and targets; (b) tasiARF and targets. Fold change represents abundances relative to IE15. sRNAs were normalized by U6 snRNA and targets by 18S rRNA internal controls. (c) Heat maps comparing differential accumulation of selected sRNAs by massive sequencing and qRT-PCR according to the value of log₂FC.

but did not show significant DA for development-related miRNAs, except for miR166. Actually, miR166 and miR395 showed the most striking reduction in calli for all explants and might represent a general response to the de-differentiation stimulus. Similar miRNA patterns observed during dedifferentiation could be interpreted as abundance adjustments dictated by the imposed stress and hormone concentration¹². Ultimately, transcription factors targeted by miRNAs would regulate the precise response to external stimuli^{22,37}. Consistently, significant differences for miRNA targets were evident between calli generated from the distinct explants and might better correlate with their distinct embryogenic potential.

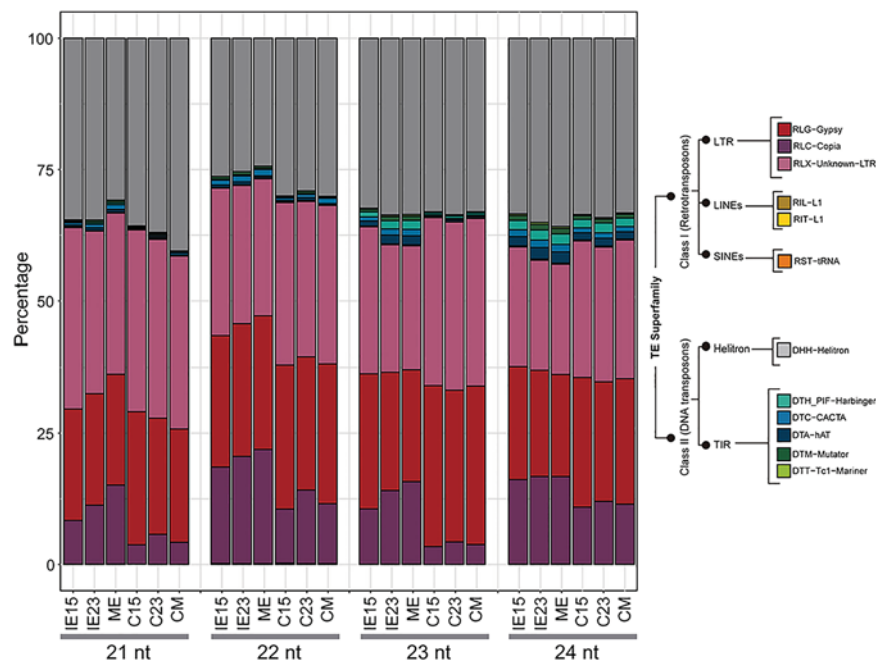


Figure 6. hc-siRNAs distribution in the different tissues. Relative abundance of normalized reads (represented as a proportion of total mapped reads) that mapped to major Transposable Element (TE) Superfamilies. **IE15:** Immature Embryos 15 days after pollination (DAP); **IE23:** Immature Embryos 23 DAP; **ME:** Mature Embryos; **C15, C23** and **CM:** Tissues one month after induction of Somatic Embryogenesis (SE) obtained from IE15, IE23, and ME, respectively.

tasiARFs were recently studied in *Dimocarpus longan* plant regeneration through SE³¹ and, in a previous analysis, we detected a transient increase for this sRNA group during VS-535 dedifferentiation¹³. In maize, all tasiARFs are derived from TAS3 precursors³⁰. We observed that precursor abundances decreased upon dedifferentiation, whereas tasiARF3b/c significantly increased, consistent with either more efficient precursor processing or stabilization of these tasiARFs. Importantly, miR390 levels correlated with the processing of the *TAS3b* precursor and the accumulation of tasiARFb/c during callus induction from IE15, suggesting specifically guided tasiRNA biogenesis within the process. The tasiARF stimulation and corresponding *ARF* down-regulation were particularly evident for calli with higher embryogenic potential (C15 and C23). This tasiARF-mediated regulation in callus induction nicely correlates with the observed decrease of miR166, a downstream ARF-regulated target³².

In 2011, Rubio-Somoza and Weigel³⁹ described miRNA- and tasiRNA-mediated regulation by particular nodes operating for proper developmental programs and environmental responses in the model plant *Arabidopsis thaliana*. In addition, a recent review described the relevance of miRNA nodes function in economically relevant crops, such as rice and maize³⁸. Taking this into account, we analyzed the operational status of some of these nodes and their intersection with the cellular processes taking place during dedifferentiation in maize SE (Fig. 8). Based on our data, miR156, miR166 and tasiARFs likely function somehow differently in IE15 to regulate the developmental switch taking place during dedifferentiation, as well as the acquisition of cellular totipotency (Fig. 8a). miR156 regulates several SBP transcripts known to modulate developmental responses during zygotic and somatic embryo development^{22,23,40}. C15 presented higher levels of *ZmSBP20* and *ZmSBP22*, in addition to *ZmSBP18* and *ZmSBP19* increased for all calli, representing more targets with negative correlation to miR156 levels during dedifferentiation. miR156 and miR166 appear connected in the same pathway to achieve regenerative responses in *Arabidopsis thaliana* SAM⁴¹. On the other hand, tasiARF-mediated regulation in response to auxin results in *HD-ZipIII/RLD1* transcription factor regulation of shape - not only morphogenetic patterns, but also totipotent cell niches during *in vitro* regenerative responses^{41,42}. Dedifferentiation from ME did not show a significant increase of tasiARFs as compared to IE15 and IE23, possibly contributing to its non-embryogenic fate. It is important to highlight that some HD-ZIPIII transcription factors such as *ZHD25*, *ZHD58*, *ZHD119* and *ZHD133* displayed differential accumulation patterns for calli induced from the different explants. This could be relevant for the ultimate dedifferentiation status achieved by the tissue.

In a different miRNA node (Fig. 8b), miR164 and miR396 both impact the regulation of cell proliferation³⁹. Interestingly, these miRNAs increase during callus induction from IE15 and C15 accompanied by significant *CUC2* down-regulation. This could reflect the initial miR164 and *CUC2* levels found in the embryo explant, since it is known that this transcript has very restricted timing and cell type expression patterns during the zygotic embryo development⁴³. Overall, during callus induction, the miR164/miR396 node might act as negative input on cell proliferation during dedifferentiation. This would be a premise for further successful proliferation of callus tissues⁵, which was impaired for explants different from IE15. Finally, the miR167/miR393 node (Fig. 8c) functions in plant auxin signaling, particularly, but not exclusively, for root auxin perception and transduction³⁹. Supporting the high relevance of this hormone signaling in SE, we found a significant increase in miR393 and

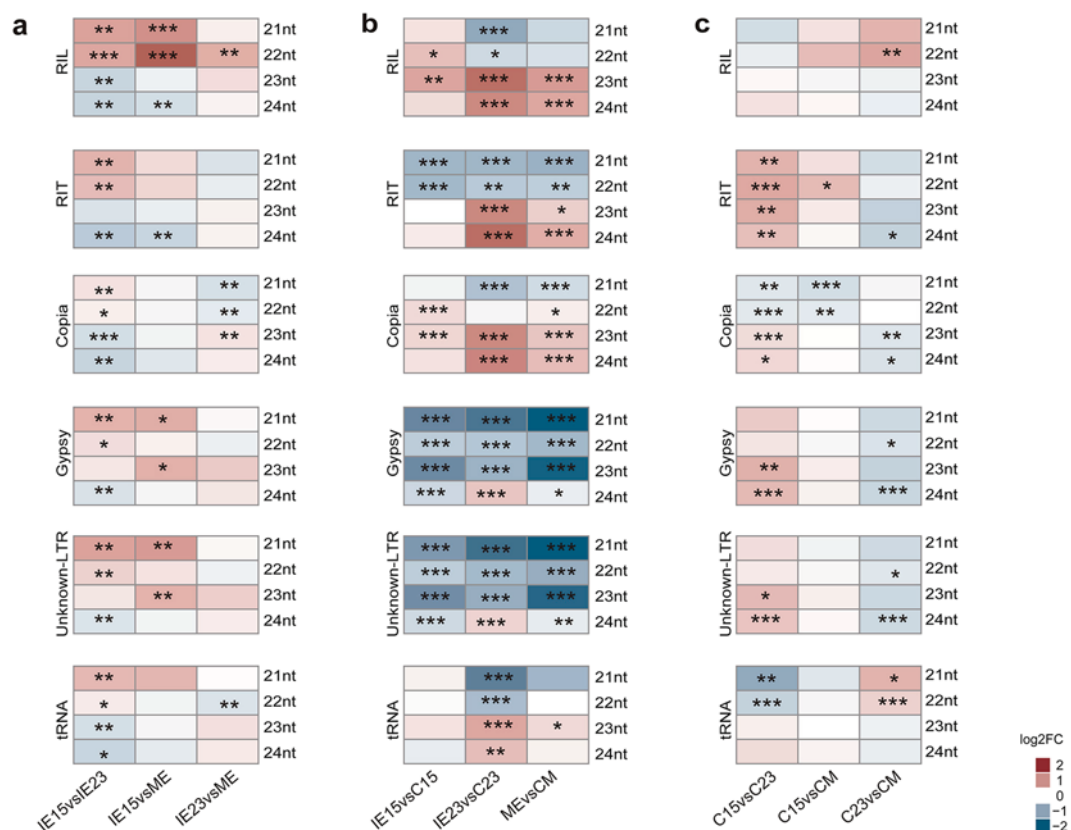


Figure 7. Differential accumulation (DA) of retrotransposon-matched hc-siRNAs during callus induction from maize embryos collected at different developmental stages. **(a)** DA of retrotransposon mapped hc-siRNAs between zygotic embryos developmental stages (IE15, IE23 and ME). Comparisons were done for IE15 vs. IE23, IE15 vs. ME and IE23 vs. ME. **(b)** DA of retrotransposon mapped hc-siRNAs during the induction of Somatic Embryogenesis. Comparisons were done for IE15 vs. C15, IE23 vs. C23 and ME vs. CM. **(c)** DA of retrotransposon mapped hc-siRNAs in callus tissues obtained from developmentally distinct embryos at one month of induction. Comparisons were done for C15 vs. C23, C15 vs. CM and C23 vs. CM. Values of DA were expressed as the log₂ Fold Change (log₂FC) and significant values indicated as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

decrease in miR167 during dedifferentiation from IE15 and IE23. However, while *Zm00001d025268* (*AFB3* in Arabidopsis) targeted by miR393 decreased in all calli, an increase in *ZmARF22* (*ARF6* in Arabidopsis) targeted by miR167 was not observed for C23. Additionally, several ARF family members simultaneously decreased in C23. According to their role in auxin perception and transduction pathways¹⁴, we could infer that in the early induced calli, the excess of exogenous auxin (2,4-D) causes a decrease in auxin perception, but an increase in the pathway of signal transduction, which probably facilitates the appropriate reprogramming according to the stimulus. Particularly for this node, there were important differences for callus induction from IE23 and ME explants. This could explain in part the strikingly different phenotype of calli generated from ME, such as the massive root growth observed for these tissues.

hc-siRNAs comprise the least-explored sRNA group in the process of plant SE. However, their contribution to DNA methylation, histone modifications and chromatin remodeling might have great impact on genetic reprogramming under high hormone concentrations and stress conditions⁵. We previously evidenced shifts in different size classes of hc-siRNAs for VS-535 maize embryogenic calli induced from 15 DAP immature embryos¹³. Here we confirmed that the reduction in 23/24-nt hc-siRNA abundances characterizes all induced calli, regardless of the embryo explant developmental stage. However, the reduction was more significant for calli induced from IE23 and ME explants, and consequently, the calli induced from IE15 displayed significantly higher levels of these hc-siRNAs. Strikingly, major differences were found between C15 and C23 for hc-siRNAs mapping to both Class I retrotransposon and Class II DNA TEs, contrary to what was observed for miRNAs and tasiARFs. Such differences raise the possibility of differential TE regulation in C23, which might additionally contribute to its poor embryogenic potential or ability to respond to the stress imposed during dedifferentiation.

Overall, we have shown that several sRNA regulatory nodes operate differentially in 15 DAP maize immature embryos as compared to later developmental stages. According to their role in mRNA target regulation, we propose that they are particularly relevant for the required explant plasticity during dedifferentiation, further achievement of embryogenic potential and proliferation, as well as the proper management of auxin signaling and stress responses.

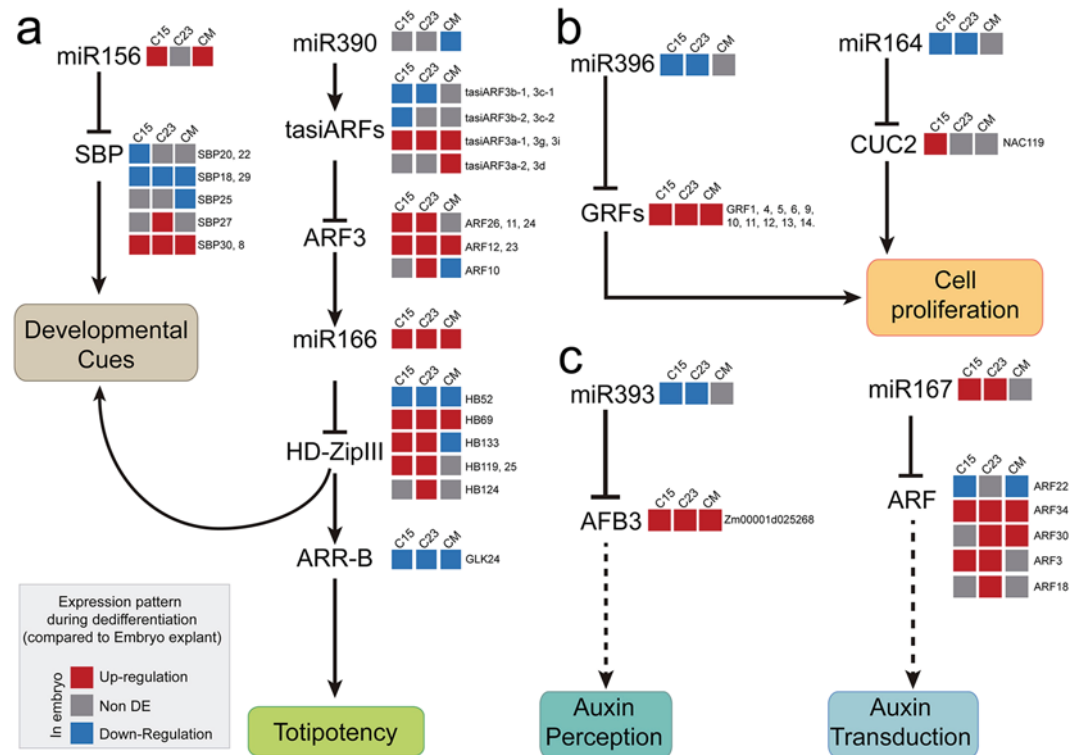


Figure 8. Model for miRNA- and tasiARF-mediated regulation during maize callus induction. **(a)** miRNA and tasiARF nodes shaping developmental transitions and cell totipotency maintenance. **(b)** miRNA nodes impacting cell proliferation. **(c)** miRNA nodes for auxin signaling. The cellular processes affected by miRNA and tasiARF regulation are depicted according to studies developed mainly in *Arabidopsis thaliana* and maize^{39,64}. Arrows indicate positive and T-shape negative regulation. The broken arrows represent suggestive or speculative relationships for maize. The expression pattern of sRNAs and their targets during C15, C23 and CM induction is based on the results provided by this work and is represented colored squares as explained in the box. Gene name designations close to the squares refer to different maize transcripts corresponding to the same family in the model (*ZmSBP20*, 22), whereas those within the pathways are referenced to *Arabidopsis thaliana* orthologous genes (i.e. *AFB3*).

Material and Methods

Plant material and pollinations. All experiments were performed with the Mexican cultivar VS-535, the Tuxpeño landrace of maize (*Zea mays* L.). Plants were grown in a 30 kg sack with a commercial soil mixture (Sunshine) in a greenhouse at daylight and temperatures between 25–30 °C. Plants were watered three times a week. Flowering began at approximately four months of growth and ears were pollinated manually⁴⁵. Immature embryos were collected at 15 and 23 DAP, IE15 and IE23 respectively, from the middle part of the ears, taking care to select similar sizes for each stage. Mature embryos (ME) were collected at 45 days after pollination. Collected embryos were divided in different batches for induction of somatic embryogenesis, morphological characterization, and RNA extractions.

Callus induction from zygotic embryos. Callus induction was performed in the dark on N6 initiation medium⁴⁶ including 2 mg L⁻¹ of 2,4-D⁴⁷. Induction of callus masses occurred after two weeks. The induced embryos were subcultured, after removing dead parts of the initial explant, on N6 maintenance medium, which included 2 mg L⁻¹ of 2,4-D and 0.1 mg L⁻¹ of kinetin. After two additional weeks (one month after induction), the status of induced callus was registered, and the tissue was sampled for morphological characterization (15–20 embryos and 20–25 callus portions induced from independent embryos, for each developmental stage) and RNA extractions (one gram per replicate for each embryo and callus developmental stage separated in 0.2 g pools for independent RNA extractions). The tissues obtained from IE15, IE23 and ME at one month of induction of SE were named as a C15, C23 and CM, respectively.

Evaluation of embryogenic potential. The evaluation of callus embryogenic potential was performed according to the method reported by Gonzalez *et al.*⁷ at one month after induction. The Line Index (LI) was determined according to the callus phenotype as follows: 0 = without response; 1 = massive root formation; 2 = watery callus; 3 = compact, organogenic callus; 4 = low embryogenic structures; 5 = friable, low embryogenic structures; 6 = friable, highly embryogenic structures (embryogenic callus type II). Categories between 0 and 3 are non-embryogenic responses, whereas those between 4 and 6 are embryogenic responses. An explant with average LI above 3 was considered as “embryogenic”. The Induction Capacity (IC) was calculated by measuring

the callus frequency in each category at one month after callus induction. Statistical analysis was performed in XLSTAT 2017 for the analysis of variance (ANOVA), and using Tukey's test for group comparisons (Table S1).

Histological analysis. Embryos and callus tissues were fixed, sectioned and stained as reported previously⁴⁸. Embryo sections were performed by 12 μm longitudinal cuts and stained using the Safranin O/Fast Green Stain technique.

RNA extraction and processing. Two biological replicates were used for each embryo and callus sample. RNA was isolated and fractionated by size using the Quick-RNATM MiniPrep system (Zymo Research). This method allowed simultaneous separation of large (>200 nt) and small (17 to 200 nt) from each sample⁴⁷. The quality of each RNA fraction was tested by 1% agarose-gel electrophoresis, as well as with the Agilent 2100 Bioanalyzer. The RNA Integrity Number (RIN) for large RNAs ranged between 6.7 and 9.4 for all samples. For RT-qPCR validation experiments reverse transcription (RT) was performed using either an oligo (dT) primer (large RNAs) or stem-loop primer (miRNA and tasiARF) and the ImProm-IITM reverse transcription system (Promega, USA) as described⁴⁷. Primer sequences used in this work are available in Supplementary methods. Reactions of qPCR were performed in triplicate with Maxima SYBR Green/ROX Master mix (ThermoFischer) in a 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Abundances were expressed as "fold change" using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method⁴⁹, considering the IE15 sample as reference and rRNA 18S or U6 snRNA as internal housekeeping controls, for large and small RNAs respectively.

Library sequencing and processing. Twelve sRNA and RNA-seq libraries (IE15, IE23, ME, C15, C23, CM; explained in Results), each with two biological replicates, were constructed using the small RNA (17–200 nt) and the large RNA (>200 nt) fractions, respectively. Sequencing was performed with Illumina NextSeq-2000 analyzer for sRNAs using single-end reads, and Illumina HiSeq 2000 analyzer for RNA using paired-end reads. Sequencing and library construction were performed by Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (UUSMD, UNAM-IBT, Mexico). RNA and sRNAs reads were first trimmed to remove adapters and filtered for quality above PHRED score 20 using Trimmomatic 0.36⁵⁰. Quality visualization was performed using Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

sRNA and RNA-seq read mapping and analysis. Filtered RNA-seq and sRNA reads were mapped with Bowtie2⁵¹ against the maize B73 Reference Genome (AGPv4.37) obtained from Gramene⁵² (ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/release-56/fasta/zea_mays/dna/). The paired-end format with default parameters (allowing a maximum of two mismatches) was used for RNA-seq reads and the single-end format with -n assigned as "1" to allow one mismatch for sRNA reads (Table S2). Sequences mapping to tRNA, rRNA, snRNA, and snoRNA loci were not included in sRNA analyses. Alignment BAM final files were converted to Fastq files with bamtofastq from Bedtools v2.26.0 toolset⁵³. To control the read length (18 to 27 nt) and to generate tag-count files (i.e. sequence plus abundance) we used a published preprocessing script⁵⁴. Reads in each library were adjusted to Reads Per Ten Million (RPTM). Details about miRNA, tasiRNA and hcsiRNA sequence identification are available in Supplementary methods. Transcript abundance quantification was performed using RSEM v1.2.31⁵⁵ and the genomic features of maize genome (AGPv4.37) were retrieved from Ensembl gtf and gff3 files⁵⁶.

miRNA target identification. Prediction was performed using two bioinformatics platforms: (1) the Target Prediction tool from the Next-Gen Sequence Database⁵⁷ using standard parameters; (2) the psRNATarget online platform⁵⁸ using the V2 Schema. Besides these tools, we used public PARE libraries from different maize tissues, available from the Next-Gen Sequence Database (GEO Accession numbers: GSM1262608, GSM1262609, GSM1262610, GSM1262611, GSM1262612, SRX300975, SRX300976, SRX300977, SRX300978) to obtain experimentally validated miRNA targets by the tool comPARE (PARE Validated miRNA Targets)⁵⁷.

Differential accumulation analysis. Differential accumulation analyses were performed using the R programming language⁵⁹ following the standard protocol from the DESeq2 package⁶⁰, with the p-adj values for the log₂FC significance (p-adj < 0.05). All graphs were developed using the R packages gplot⁶¹, ggplot2⁶² and ComplexHeatmap⁶³.

Data Availability

The sRNA and RNA-seq data sets generated in this study were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) under the accession number GSE120438.

References

- Ronchi, V. N. & Giorgetti, L. The cell's commitment to Somatic Embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I* (ed. Bajaj, Y. P. S.) 3–19 (Springer, 1995).
- Nardmann, J. & Werr, W. Patterning of the Maize Embryo and the Perspective of Evolutionary Developmental Biology. In *Handbook of Maize: Its Biology* (eds Bennetzen, J. L. & Hake, S. C.) 105–119 (Springer, 2009).
- Sparks, E., Wachsmann, G. & Benfey, P. N. Spatiotemporal signaling in plant development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 631–44 (2013).
- Monnier, M. Culture of Zygotic Embryos. In *In Vitro Embryogenesis in Plants* (ed. Thorpe, T. A.) 117–153 (Springer, 1995).
- Elhiti, M., Stasolla, C. & Wang, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev Biol.-Plant* **49**, 631–642 (2013).
- Jakubeková, M., Pretová, A. & Obert, B. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **1**, 478–487 (2011).
- González, G. A. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electr. J. Biotech.* **15**, 9–9 (2012).
- Zhang, J. *et al.* Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* **236**, 647–657 (2012).

9. Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K. & Zhang, X. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* **64**, 1521–1536 (2013).
10. Szyrajew, K. *et al.* MicroRNAs Are Intensively Regulated during Induction of Somatic Embryogenesis in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **8**, 18 (2017).
11. Shen, Y. *et al.* Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **441**, 425–430 (2013).
12. Chávez-Hernández, E. C., Alejandri-Ramírez, N. D., Juárez-González, V. T. & Dinkova, T. D. Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* **6**, 555 (2015).
13. Alejandri-Ramírez, N. D., Chávez-Hernández, E. C., Contreras-Guerra, J. L., Reyes, J. L. & Dinkova, T. D. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Phys. Biochem.* **122**, 78–89 (2018).
14. Parent, J. S., Martínez de Alba, A. E. & Vaucheret, H. The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Front. Plant Sci.* **3**, 179 (2012).
15. Bologna, N. G. & Voinnet, O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Ann. Rev. Plant Biol.* **65**, 473–503 (2014).
16. Axtell, M. J. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **64**, 137–59 (2013).
17. Borges, F. & Martienssen, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 727–741 (2015).
18. Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D. & Ma, H. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* **447**, 29–39 (2009).
19. Chen, X. Small RNAs and their roles in plant development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 21–44 (2009).
20. Zhang, H., Xia, R., Meyers, B. C. & Walbot, V. Evolution, function, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**, 84–90 (2015).
21. Fang, X. & Qi, Y. RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *Plant Cell* **28**, 272–285 (2016).
22. Nodine, M. D. & Bartel, D. P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Dev.* **24**, 2678–2692 (2010).
23. Seefried, W. F., Willmann, M. R., Clausen, R. L. & Jenik, P. D. Global regulation of embryonic patterning in Arabidopsis by microRNAs. *Plant Phys.* **165**, 670–687 (2014).
24. Nobuta, K. *et al.* Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the *mop1-1* mutant. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **105**, 14958–14963 (2008).
25. Douglas, R. N. *et al.* ragged seedling2 encodes an ARGONAUTE7-like protein required for mediolateral expansion, but not dorsoventrality, of maize leaves. *Plant Cell* **22**, 1441–1451 (2010).
26. Petsch, K. *et al.* Novel DICER-LIKE1 siRNAs bypass the requirement for DICER-LIKE4 in maize development. *Plant Cell* **27**, 2163–2177 (2015).
27. Thompson, B. E. *et al.* The dicer-like1 homolog fuzzy tassel is required for the regulation of meristem determinacy in the inflorescence and vegetative growth in maize. *Plant Cell* **26**, 4702–4717 (2014).
28. Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L. & Bitonti, M. B. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanism. *J. Exp. Bot.* **63**, 695–709 (2012).
29. Evert, R. F. Meristems and differentiation. In *Esau's Plant Anatomy* (ed. Evert, R. F.) 103–131 (Wiley & Sons Inc., 2006).
30. Dotto, M. C. *et al.* Genome-wide analysis of leafbladeless1-regulated and phased small RNAs underscores the importance of the TAS3 ta-siRNA pathway to maize development. *PLoS Genet.* **10**, e1004826 (2014).
31. Lin, Y. *et al.* MicroRNA390-directed TAS3 cleavage leads to the production of tasiRNA-ARF3/4 during Somatic Embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Front. Plant Sci.* **6**, 1119 (2015).
32. Xia, R., Xu, J. & Meyers, B. C. The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants. *Plant Cell* **29**, 1232–1247 (2017).
33. Wójcikowska, B. & Gaj, M. D. Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* **36**, 843–858 (2017).
34. Ge, F. *et al.* Endogenous small interfering RNAs associated with maize embryonic callus formation. *PLoS ONE* **12**, e0180567 (2017).
35. Scarpella, E. & Meijer, A. H. Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. *New Phytol.* **164**, 209–242 (2004).
36. Li, D. *et al.* Genome-wide identification and characterization of microRNAs in developing grains of *Zea mays* L. *Plos One* **11**, e0153168 (2016).
37. Wu, F. Y. *et al.* Comparison of miRNAs and their targets in seed development between two maize inbred lines by high-throughput sequencing and degradome analysis. *Plos One* **11**, e0159810 (2016).
38. Tang, J. & Chu, C. MicroRNAs in crop improvement: fine-tuners for complex traits. *Nature Plants* **3**, 17077 (2017).
39. Rubio-Somoza, I. & Weigel, D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Sci.* **16**, 258–264 (2011).
40. Long, J. M. *et al.* miR156-SPL modules regulate induction of somatic embryogenesis in citrus callus. *J. Exp. Bot.* **69**, 2979–2993 (2018).
41. Zhang, T. Q. *et al.* An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell* **27**, 349–360 (2015).
42. Zhang, T. Q. *et al.* A two-step model for *de novo* activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *Plant Cell* **29**, 1073–1087 (2017).
43. Fan, K. *et al.* Molecular evolution and expansion analysis of the NAC transcription factor in *Zea mays*. *Plos One* **9**, e111837 (2014).
44. Gutierrez, L. *et al.* Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* **21**, 3119–3132 (2009).
45. Sheridan, W. Maize for Biological Research. *Plant Molecular Biology Association, University of North Dakota USA* (North Dakota University Press, 1982).
46. Armstrong, C. L. & Green, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**, 207–214 (1985).
47. López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Chávez-Hernández, E. C. & Dinkova, T. D. MicroRNA expression and regulation during maize Somatic Embryogenesis. In *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology* (eds Loyola-Vargas, V. M. & Ochoa-Alejo, N.) 397–410 (Humana Press, 2018).
48. Sandoval-Zapotitla, E. *et al.* Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. *Cuadernos del Instituto de Biología UNAM*, **38** (2005).
49. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
50. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
51. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**, 357–359 (2012).
52. Tello-Ruiz, M. K. *et al.* Gramene 2018: Unifying comparative genomics and pathway resources for plant research. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1181–D1189 (2018).

53. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841–842 (2010).
54. Mathioni, S. M., Kakrana, A. & Meyers, B. C. Characterization of plant small RNAs by next generation sequencing. *Curr. Protocols Plant Biol.* **2**, 39–63 (2017).
55. Li, B. & Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
56. Aken, B. L. *et al.* The Ensembl gene annotation system. Database (Oxford). <https://doi.org/10.1093/database/baw093/2630475> (2016).
57. Nakano, M. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res.* **34**, D731–D735 (2006).
58. Dai, X. & Zhao, P. X. PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. *Nucl. Acids Res.* **39**, 155–159 (2011).
59. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, <https://www.r-project.org/> (2015).
60. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 550 (2014).
61. Warnes, A. G. R. *et al.* gplots: Various R programming tools for plotting data, <https://rdrr.io/cran/gplots/> (2009).
62. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. (Springer-Verlag, 2016).
63. Gu, Z., Eils, R. & Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**, 2847–2849 (2016).
64. Meng, W. *et al.* Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS is critical to the specification of shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL. *Plant Cell* **29**, 1357–1372 (2017).

Acknowledgements

This work was supported by Grants to TDD: PAPIIT IN211215 and IN214118, PAIP 5000–9118, CONACYT 238439 and to BCM: US NSF award 1754097 from the Plant Genome Research Program. We deeply appreciate the technical support and advices from M.Sc. Ma. Teresa de J. Olivera-Flores and Aracely Arandal Martínez (Departamento de Bioquímica), Dr. Karina Jiménez Durán and Jorge Herrera Díaz (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria) at Facultad de Química, UNAM and Dr. Estela Sandoval Zapotitla (Laboratorio de Anatomía Vegetal, Jardín Botánico, UNAM).

Author Contributions

V.T.J.G. and T.D.D. designed the research; V.T.J.G., B.A.L.R. and E.L.S. performed the research; V.T.J.G. and P.B. collected and analyzed the data; V.T.J.G., P.B., B.C.M. and T.D.D. interpreted the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50962-y>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Information

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

Vasti T. Juárez-González¹, Brenda A. López-Ruiz¹, Patricia Baldrich², Eduardo Luján-Soto¹, Blake C. Meyers^{2,3}, Tzvetanka D. Dinkova^{1*}

Affiliations:

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX, México

² Donald Danforth Plant Science Center, 975 North Warson Road, St. Louis, MO 63132, USA

³ Division of Plant Sciences, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211, USA

Corresponding author:

Tzvetanka D. Dinkova

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

04510 CDMX

cesy@unam.mx

Tel: + 52 55 56225277

Supplementary Figures

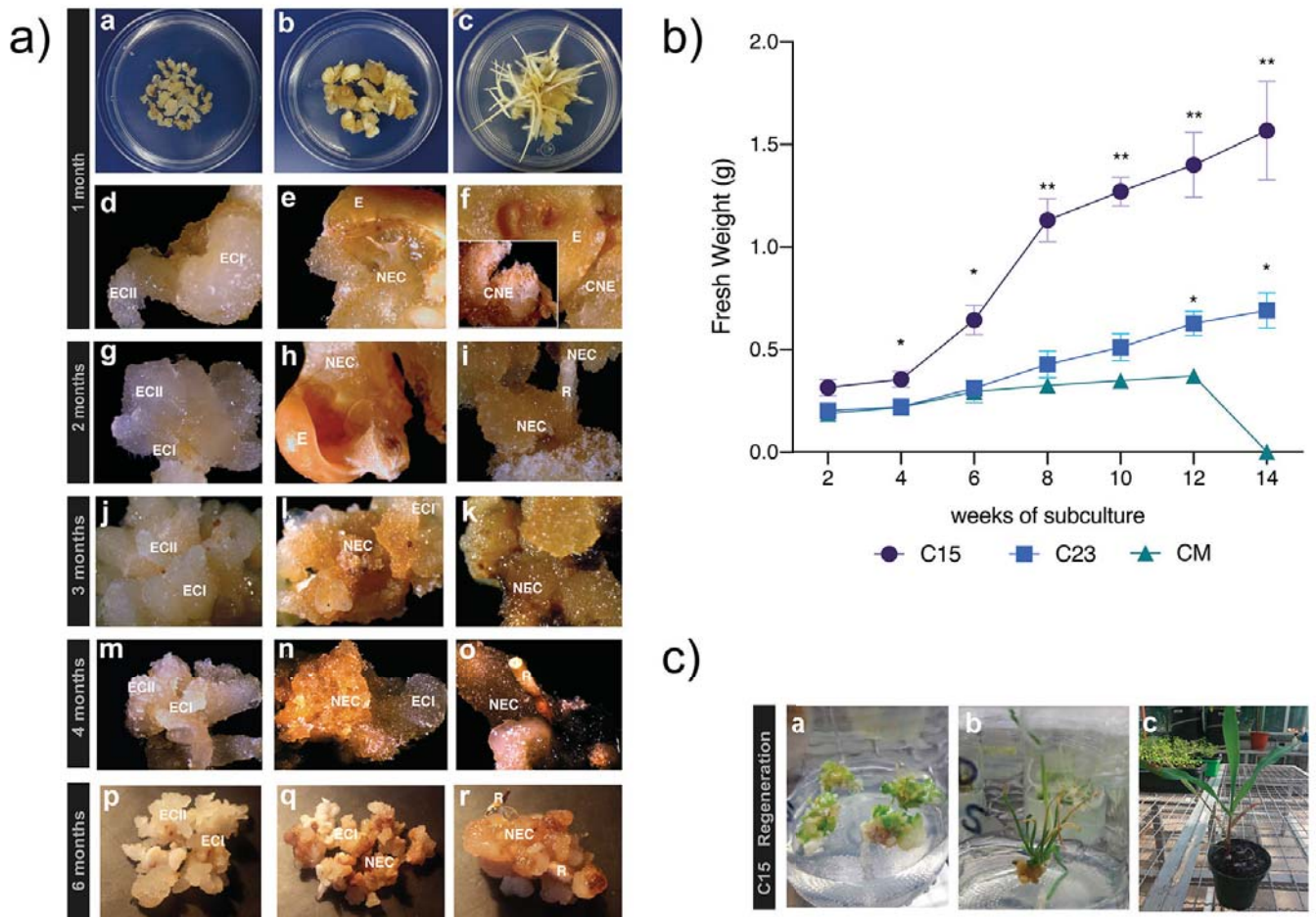


Fig. S1 Differential phenotypes of calli induced from maize VS-535 IE15, IE23 and ME. a) Follow-up at different subculture times (1-6 months) for C15 (left panels), C23 (middle panels) and CM (right panels). ECI: embryogenic callus type I; ECII: embryogenic callus type II; NEC: non-embryogenic callus; R: root. **b)** Growth profiles of C15, C23 and CM for 14 weeks upon induction. For each time point, fresh weight was measured in three different samples of callus. The mean was plotted with bars indicating SEM. Data were analyzed using a Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$. **c)** Plant regeneration from C15 at one year of subculture. a: 2 weeks on light and hormone depletion; b: 2 weeks on light hormone depletion + 2 weeks on MS medium; c: 2 weeks on light hormone depletion + 2 weeks on MS medium + 4 weeks on soil. C23 were not able to regenerate plants and CM were dead tissues upon 4-6 months of subculture.

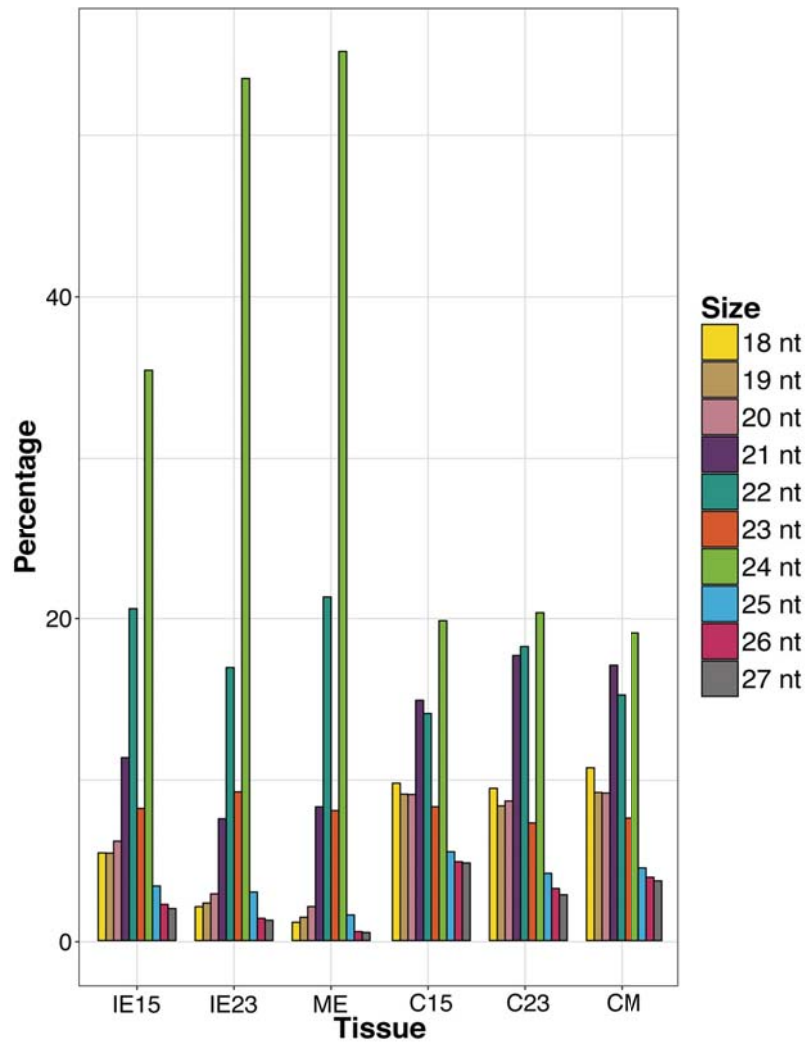


Fig. S2 sRNA library size distribution in the different maize embryos and induced callus tissues. Size distribution is shown by percentage of normalized reads per 10 million (RPTM) for each sRNA size from the total (18-27 nt). Mean values of the two biological replicates were used. IE15: Immature Embryos 15 days after pollination; IE23: Immature Embryos 23 days after pollination; ME: Mature Embryos; C15, C23 and CM: Callus tissues at one month after induction from IE15, IE23, and ME, respectively.

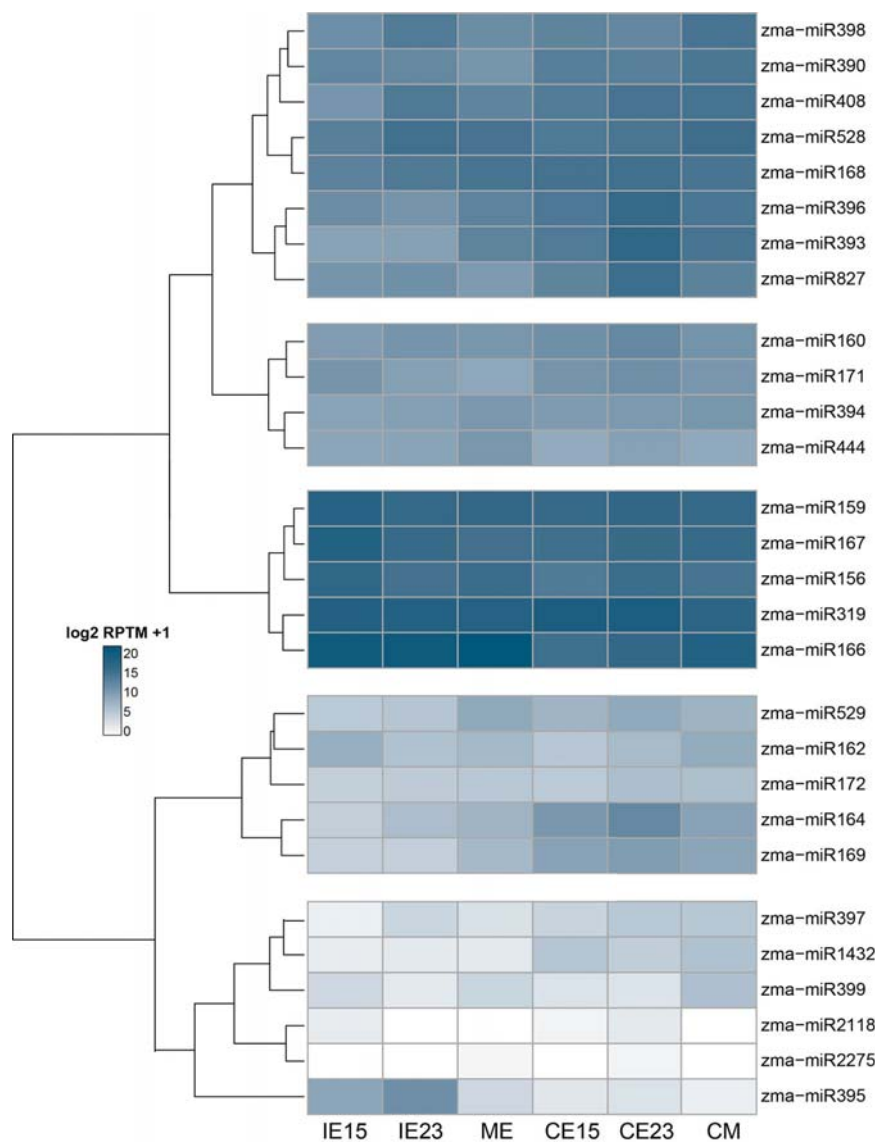


Fig. S3 Clustering of miRNA families by normalized abundance. Expression values are shown as a log₂ normalized abundance (Reads per ten million; RPTM). Immature Embryo at 15 days after pollination; IE15. Immature Embryo at 23 days after pollination; IE23. Mature Embryo; ME. Callus from IE15, IE23 and ME at one month of induction (C15, C23, and CM, respectively).

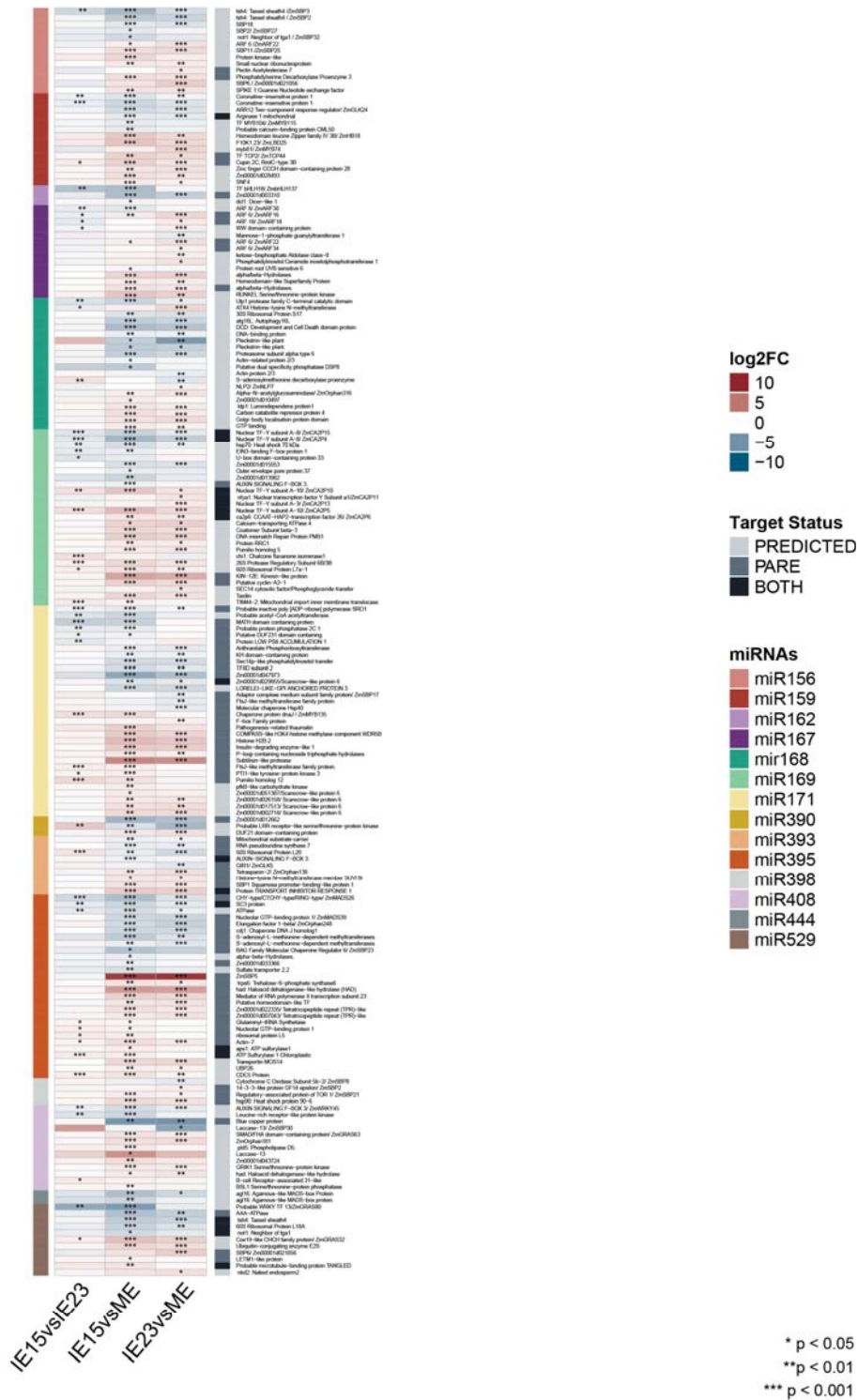


Fig. S4 Differential accumulation of miRNA targets during Zygotic Embryo development. Comparisons were done for IE15 vs. IE23, IE15 vs. ME and IE23 vs. ME. Values of DE were expressed as the log₂ Fold Change (log₂FC) and significant values indicated as follows: (*) p<0.05; (**) p<0.01; (***) p<0.001. Targets of each miRNA are designated with the left multiple color bar. The status of each target was referred to as identified by bioinformatics tools "Predicted", experimentally proved "PARE" or both methods "Both" according to the right grayscale bar.

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

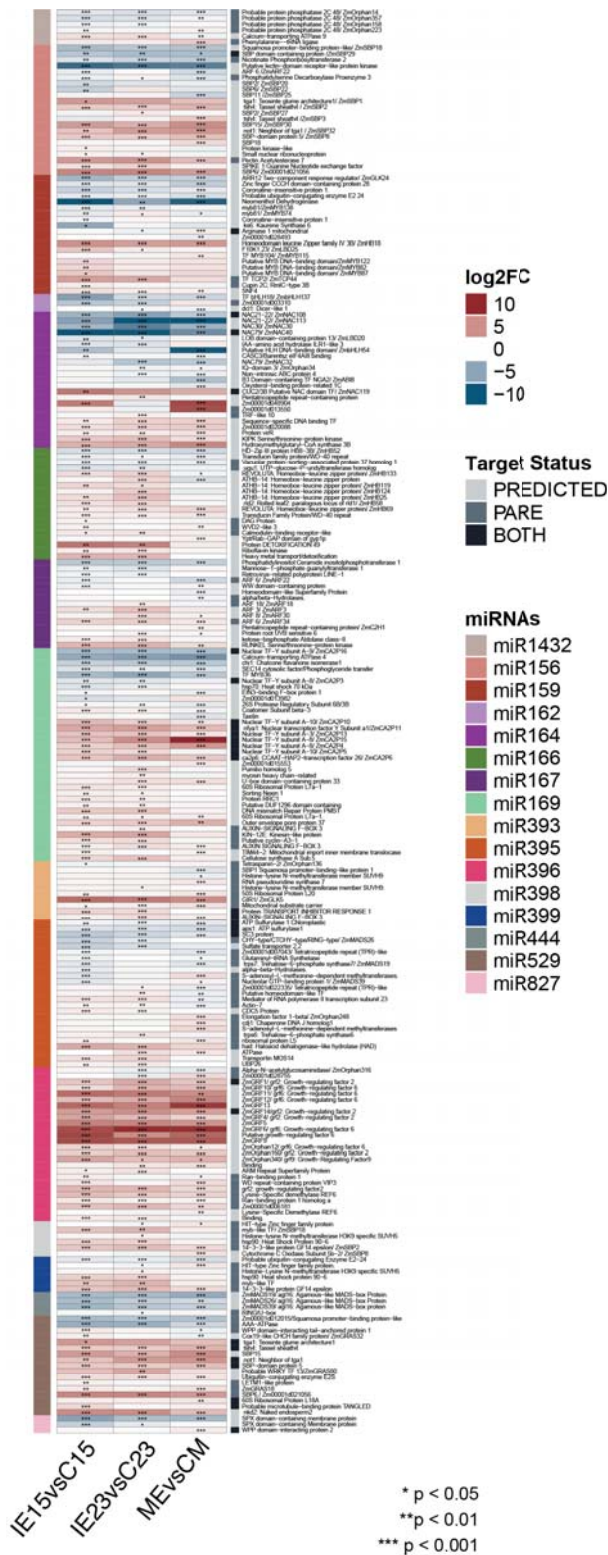


Fig. S5 Differential accumulation of miRNA targets during callus induction. Comparisons were done for IE15 vs. C15, IE23 vs. C23 and ME vs. CM. Values of DE were expressed as the log2 Fold Change (log2FC) and significant values indicated as follows: (*) p<0.05; (**) p<0.01; (***) p<0.001. Targets of each miRNA are designated with the left multiple color bar. The status of each target was referred to as identified by bioinformatics tools "Predicted", experimentally proved "PARE" or both methods "Both" according to the right grayscale bar.

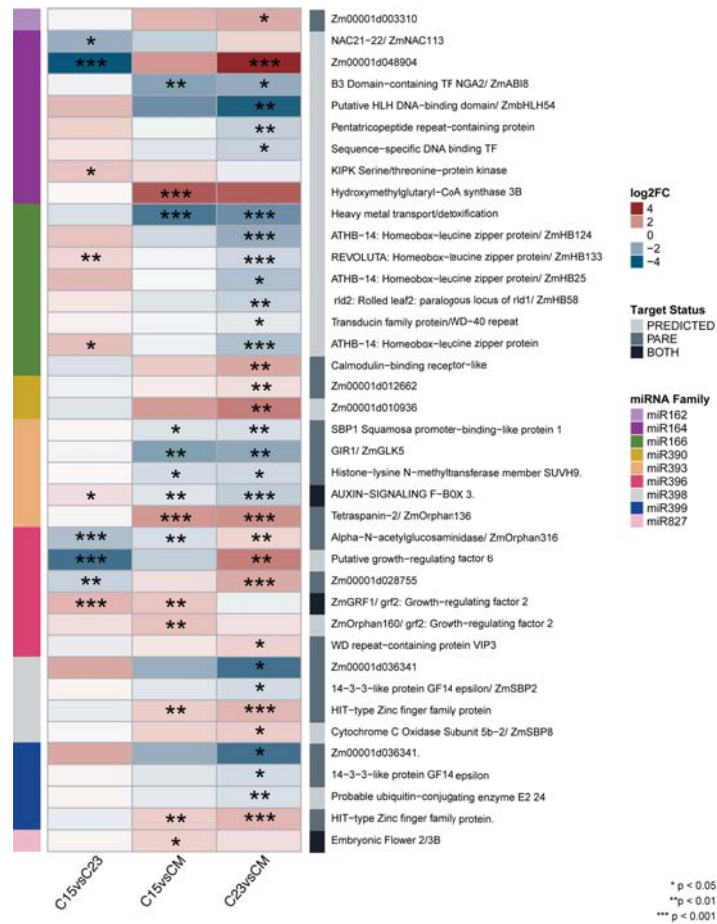


Fig. S6 Differential accumulation of miRNA targets in callus tissues. Comparisons were done at one month of induction from developmentally distinct embryos for C15 vs. C23, C15 vs. CM and C23 vs. CM. Values of DE were expressed as the log2 Fold Change (log2FC) and significant values indicated as follows: (*) p<0.05; (**) p<0.01; (***) p<0.001. Targets of each miRNA are designated with the left multiple color bar. The status of each target was referred to as identified by bioinformatics tools "Predicted", experimentally proved "PARE" or both methods "Both" according to the right grayscale bar.

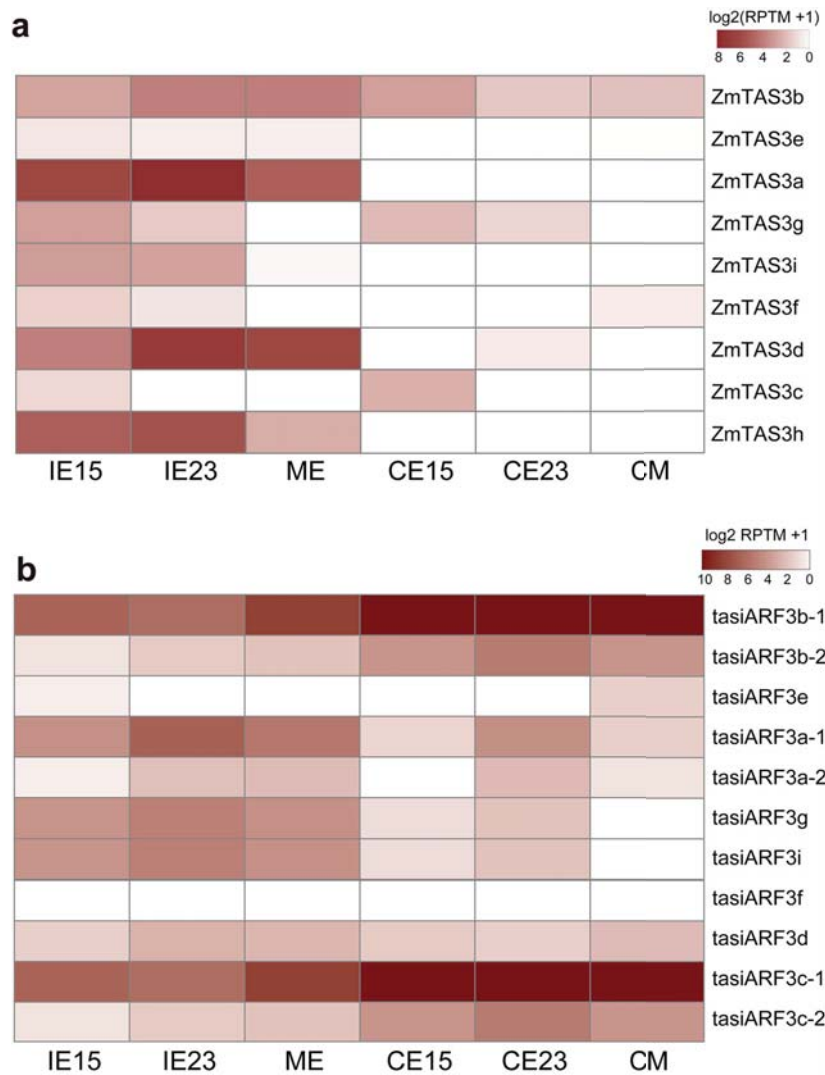


Fig. S7 TAS3 genes and tasiARFs normalized abundance. (a) TAS3 precursor abundances. (b) mature tasiARF abundances. Expression values are shown as a log₂ normalized abundance (Reads per ten million; RPTM). Immature Embryo at 15 days after pollination; IE15. Immature Embryo at 23 days after pollination; IE23. Mature Embryo; ME. Callus from IE15, IE23 and ME at one month of induction (C15, C23, and CM, respectively).

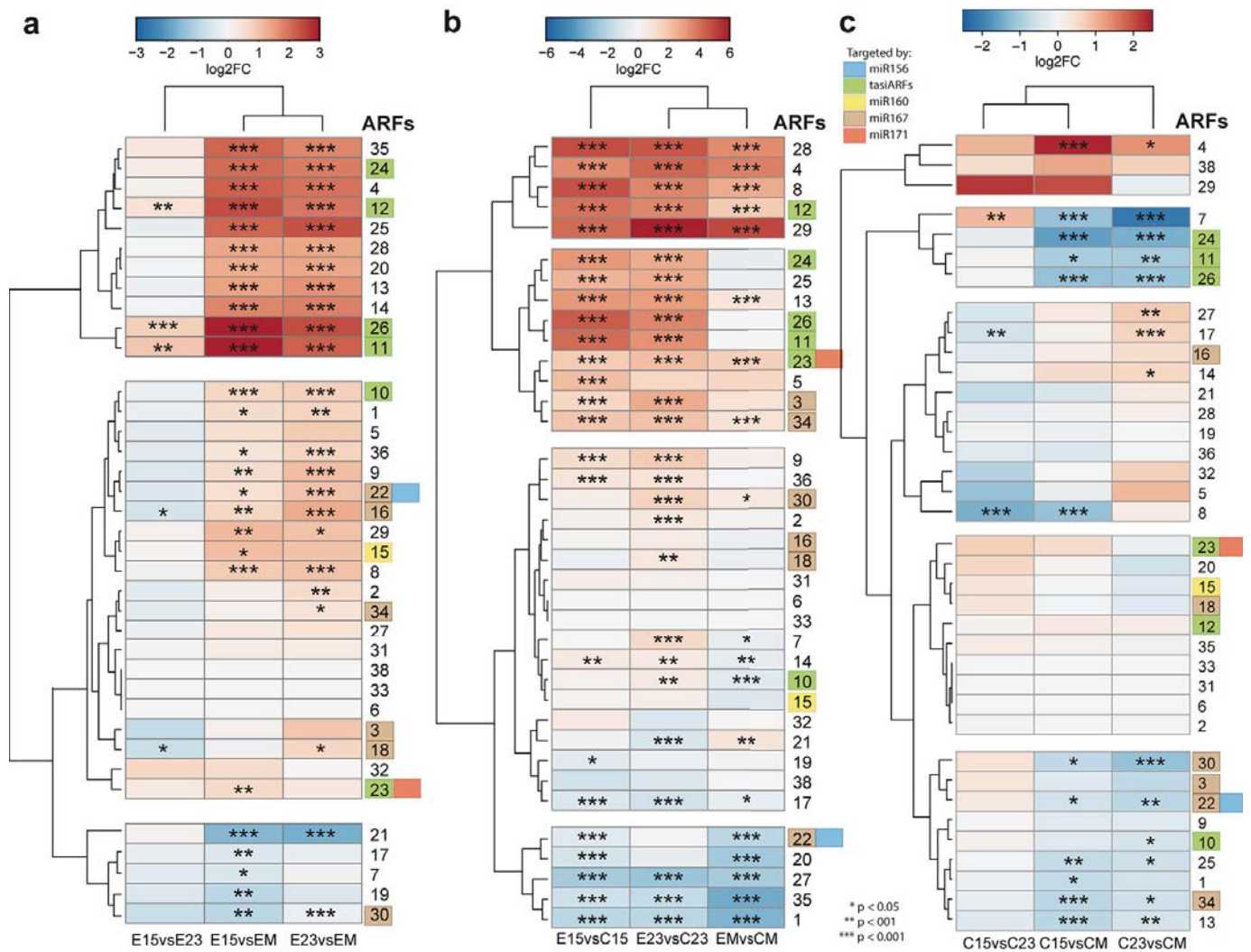


Fig. S8 Maize *AUXIN RESPONSE FACTOR* genes (*ZmARFs*) differential accumulation in callus induction from maize embryos collected at different developmental stages. (a) DE of *ZmARFs* between zygotic embryo developmental stages (IE15, IE23 and ME). Comparisons were done for IE15 vs. IE23, IE15 vs. ME and IE23 vs. ME. (b) DE of *ZmARFs* during the induction of Somatic Embryogenesis. Comparisons were done for IE15 vs. C15, IE23 vs. C23 and ME vs. CM. (c) DE of *ZmARFs* in callus tissues obtained from developmentally distinct embryos at one month of induction. Comparisons were done for C15 vs. C23, C15 vs. CM and C23 vs. CM. Values of DE were expressed as the log₂ Fold Change (log₂FC) and significant values indicated as follows: (*) p<0.05; () p<0.01; (***) p<0.001. Colored squares represent the sRNA targeting particular *ZmARF* as depicted on the figure. The numbers refers to the maize ARF nomenclature.**

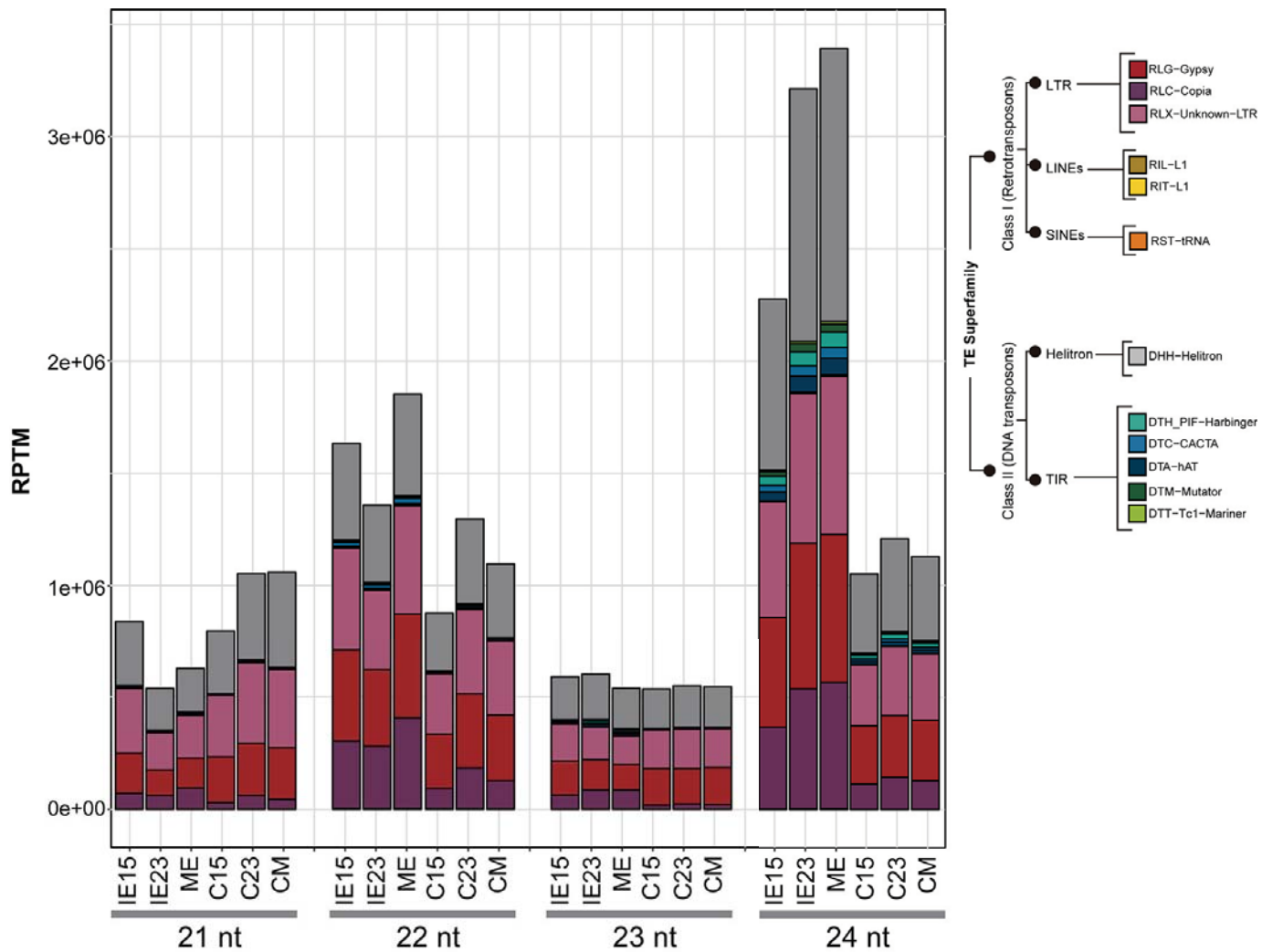


Fig. S9 Distribution of hc-siRNAs along different TEs in all tissues. Abundance of normalized reads (RPTM, Reads per ten million) that matched to major Transposable Element (TE) Superfamilies, separated by sizes (21 to 24 nt). IE15: Immature Embryos 15 days after pollination (DAP); IE23: Immature Embryos 23 DAP; ME: Mature Embryos; C15, C23 and CM: Tissues one month after induction of Somatic Embryogenesis (SE) obtained from IE15, IE23, and ME, respectively.

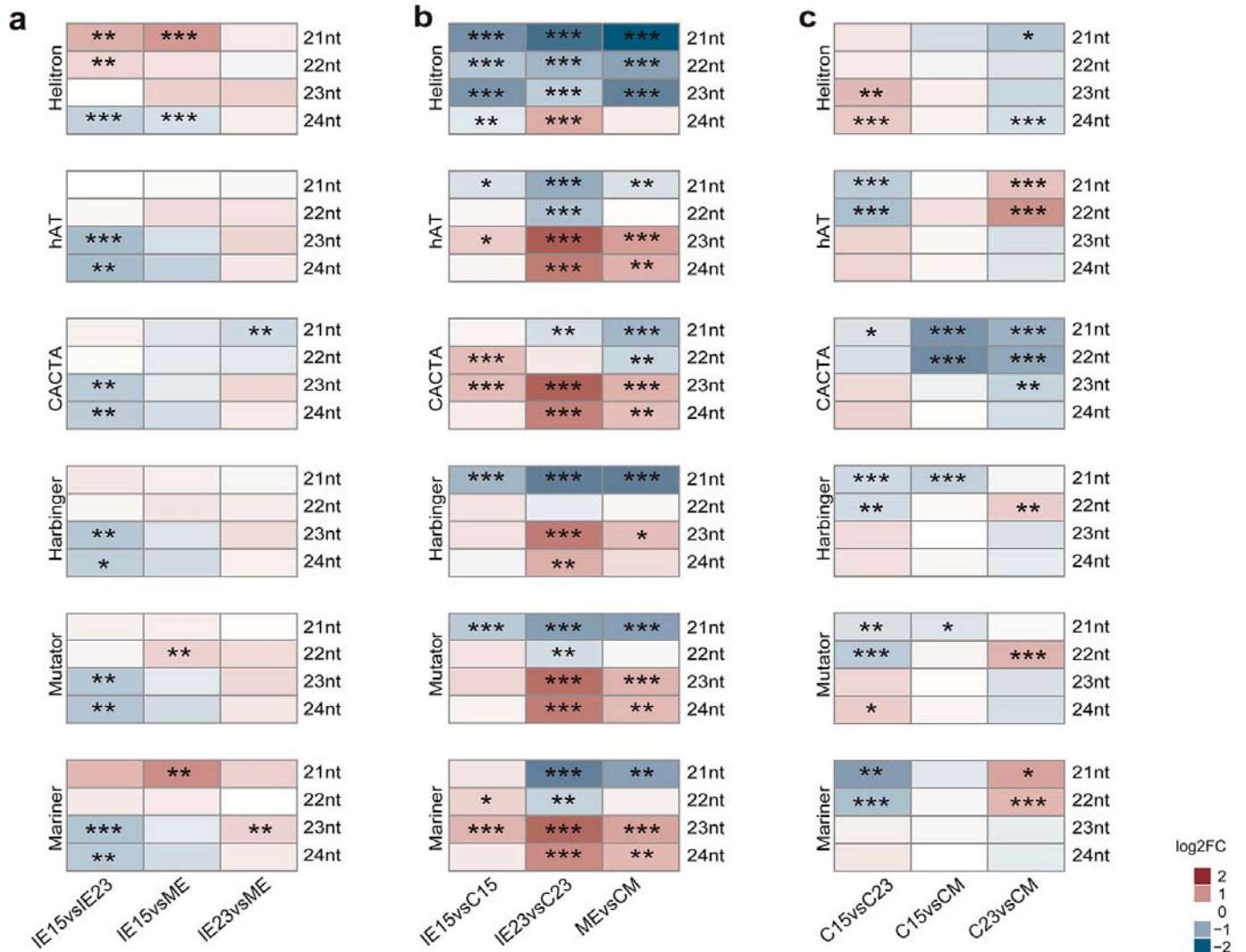


Fig. S10 Differential accumulation of hc-siRNAs mapped to DNA TEs during callus induction from maize embryos collected at different developmental stages. (a) DE between zygotic embryos developmental stages (IE15, IE23 and ME). Comparisons were done for IE15 vs. IE23, IE15 vs. ME and IE23 vs. ME. (b) DE during the induction of Somatic Embryogenesis. Comparisons were done for IE15 vs. C15, IE23 vs. C23 and ME vs. CM. (c) DE in callus tissues obtained from developmentally distinct embryos at one month of induction. Comparisons were done for C15 vs. C23, C15 vs. CM and C23 vs. CM. Values of DE were expressed as the log₂ Fold Change (log₂FC) and significant values indicated as follows: (*) p<0.05; (**) p<0.01; (***) p<0.001.

Supplementary Methods

To identify the canonical miRNA sequences corresponding to the *Zea mays* mature miRNAs from miRBase 22 (Griffiths-Jones, 2010), as well as isomiR sequences (those shifted by +/- 2 nt at the 5' or 3' end) and those not matching to known miRNA sequences, libraries were uploaded to the Meyers lab's "Next-Gen Sequence Database" (Nakano, 2006). This facilitated our analyses by rapidly identifying these miRNAs. The final analysis included the total reads of all miRNA isoforms corresponding to the same miRNA family.

For tasiRNAs, the Phasing Analysis Window (21 nt cycle) from the Next-Gen Sequence Database was used to obtain reads mapping to the nine *TAS3* loci reported in maize (Dotto *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2017). Based on the sequence and the genomic location, the 21 nt sequences were filtered to obtain the total reads of eleven mature tasiARFs sequences (including those shifted by +/- 2 nt at the 5' or 3' end). For siRNAs mapped to transposons, the tag-count files of 21-24 nt were tested against the maize transposable element (TE) sequences, using the transposon annotation gff3 file (B73v4.TE.filtered.gff3) retrieved from the Ensembl maize annotation files (Aken *et al.*, 2016). We separated TE-mapped reads into twelve TE superfamilies from two classes: Retrotransposons (RIL, RIT, Copia, Gypsy, Unknown-LTR, tRNA) and DNA transposons (Helitron, PIF-Harbinger, CACTA, hAT, Mutator, Mariner). Since many reads matched to multiple TE superfamily, we performed a weighted normalization by the number of mapping TE superfamily (Bousios *et al.*, 2017).

Medium Composition for Callus Induction and Proliferation

N6I (Induction Medium)

N6 Salts (Chu *et al.*, 1975); Murashige and Skoog Vitamin Solution (Sigma-Aldrich); 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 2 mg/L); Adenine (10 mg/L); Proline (2.76 g/L); hydrolysed casein (200 mg/L), Sucrose (30 g/L) and Gelzan™ (Sigma-Aldrich; 3.3 g/L).

N6P (Proliferation Medium)

N6 Salts (Chu *et al.*, 1975); Murashige and Skoog Vitamin Solution (Sigma-Aldrich); 2,4-D (2 mg/L); Adenine (10 mg/L); Proline (2.76 g/L); Kinetin (6-furfurylaminopurine; 0.1 mg/mL); hydrolysed casein (200 mg/L), Sucrose (30 g/L) and Gelzan™ (Sigma-Aldrich; 3.3 g/L).

Oligonucleotides used as primers in this study

ID	Orientation	SEQUENCE (5'->3')
U6 snRNA	Primer Stem Loop	GTGCAGGGTCCGAGGTTTTGGACCATTTCTCGAT
	Forward Primer	GGAACGATACAGAGAAGATTAGCA
zma-miR156	Primer Stem Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGTGCTC
	Forward Primer	TGCTCGTGACAGAAGAGAGT
zma-miR160	Primer Stem Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACTGGCAT
	Forward Primer	TTGCCTGGCTCCCTGT
zma-miR164	Primer Stem Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACTGCACG
	Forward Primer	CTACTGGAGAAGCAGGGCA
zma-miR166	Primer Stem Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGGGAAT
	Forward Primer	CGTCGCTCGGACCAGGCTTCA
zma-miR390	Primer Stem Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGGCGCT
	Forward Primer	TCTGCGAAGCTCAGGAGGGAT
tasiARFbD6	Primer Stem Loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACAAAAGT
	Forward Primer	CGGCGCTCTTGACCTTGC
Universal Reverse		GTGCAGGGTCCGAGGTA
SBP23 (GRMZM2G126018_T01)	Forward	ACACCAACGCGATGAATTGG
	Reverse	ACCCTGAAAAACCAGAACGG
ARF17 (GRMZM2G159399_T01)	Forward	TTTCTCGGACATCGCTCCTG
	Reverse	CCTTGATATACGGGGCGTC
ARF19 (AC207656.3_FGT002)	Forward	TCCACTGTACCCGGAGCTT
	Reverse	GCATGCCTGGCTCCCTGTAT
CUC2 (GRMZM2G393433_T01)	Forward	TTCGCTGCACTACATGGTTG
	Reverse	AACGACGACCCAGTCACTTAC
RDL1 (GRMZM2G109987_T01)	Forward	GCGATTGCAGAGGAGACCTT
	Reverse	TGGCCACGATACCAACTGAA
ARF11 (GRMZM2G056120_T01)	Forward	GCACAAAAGTGTTTTTCACATTTT
	Reverse	TGTAAGTTGATCCTTGCTCCAATA
ARF24 (GRMZM2G030710_T01)	Forward	CTTCCCATGTTAATCCAGACTAC
	Reverse	CAGCAGCATTGTCATGAGTTCTAT
Tas3g (GRMZM2G082055)	Forward	ACCTATTCACCACCGCTGTC
	Reverse	TGCGAGAGTGTTCCAAGCTC
Tas3b (GRMZM2G020468)	Forward	CTTGACCTTGTAAGACCCAACCTA
	Reverse	TGTTGTCTCATGCCTCACTCTAT
18S (XM_020546348.1)	Forward	TCCTATTGTTGGCCTTCGG
	Reverse	TCCTTGGCAAATGCTTTCGC