



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de la función de miR528 y miR156 en embriogénesis somática de maíz”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Emmanuel Nahum Zambrano Zepeda

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Facultad de Química

Dr. Ulises Yunuén Rosas López

Instituto de Biología

Ciudad Universitaria. CD. MX., Enero, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al financiamiento de los proyectos PAPIIT IN218921, UNAM y PAIP 5000-9118, Facultad de Química, UNAM, que hizo posible la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca otorgada durante la realización del posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, y a la asesoría técnica de la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores. También, al Biol. Andre Zaragoza Gómez por su apoyo en la técnica de biobalística.

Al Dr. Jorge Herrera Díaz del Laboratorio de Proteómica y Biología Molecular de la USAI, Facultad de Química, por el apoyo técnico para la realización de PCR en tiempo real.

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. Por su tutoría durante en el desarrollo de esta tesis, pero sobre todo por su comprensión, enseñanza y ejemplo.

A los miembros de mi comité tutor: La Dra. Sobeida Sánchez Nieto del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química; y el Dr. Ulises Yunuén Rosas López del Instituto de Biología. Por su asesoría, crítica y orientación en el desarrollo de este proyecto.

Al laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por todas las facilidades otorgadas. Especialmente, agradezco a Eduardo, Adrián y Coral, por compartir sus conocimientos sobre las técnicas utilizadas en el proyecto, pero sobre todo por su amistad.

Finalmente, agradezco a mi familia, amigos y compañeros, por su comprensión, apoyo, paciencia y cariño incondicional.

*“Laudato si, mi Signore, per sora nostra madre Terra,
la quale ne sustenta et gouerna,
et produce diuersi fructi con coloriti fior et herba”*

San Francisco de Asís

ÍNDICE

Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Abstract	vii
1. Introducción	1
1.1. Importancia del maíz	1
1.2. Embriogénesis en plantas	2
1.3. Embriogénesis cigótica.....	2
1.4. Embriogénesis somática.....	6
1.5 MicroRNAs (miRNAs)	11
1.5.1. Biogénesis de los miRNAs en plantas.....	12
1.5.2. Función de los miRNAs en plantas.....	14
1.5.3. Papel de los miRNAs en la embriogénesis somática.....	14
1.5.4. Mecanismos de acción de los miRNAs	18
1.6. Secuestradores de miRNAs o Anti-miRNAs	21
1.7. Transformación genética de callo embriogénico de maíz	24
2. Antecedentes	26
3. Justificación	31
4. Hipótesis	32
5. Objetivo general	32
6. Objetivos específicos	32
7. Materiales y métodos	33
7.1 Material biológico.....	33
7.2. Inducción y proliferación de callo embriogénico.....	34
7.3 Diseño de STTM para miR156 y miR528.....	34
7.4. Diseño de cebadores para la clonación de STTM en el vector pOT2-poly-cis	36
7.5. Activación de vectores pOT2-Poly-Cis y pFGC5941-Pacl	38
7.6. Construcción del STTM en el vector pOT2-Poly-Cis por PCR	38
7.7. Subclonación en el vector binario pFGC5941-Pacl.....	40
7.8. Bombardeo de callos embriogénicos de maíz	42

7.9 Selección de callos transformados con glufosinato de amonio (Basta®)	42
7.10. Expresión transitoria	43
7.11. Extracción, purificación y fraccionamiento de RNA de callo embriogénico.....	43
7.12. Síntesis de cDNA	44
7.13. Cuantificación por RT-qPCR de miR528, miR156 y sus transcritos diana	44
7.14. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos transformados con STTM.....	45
7.15. Generación de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos transformados con STTM	45
8. Resultados.....	46
8.1. Construcción de STTM156 y STTM528 en pOT2-Poly-Cis por PCR	46
8.3. Secuenciación de los vectores pOT2-pFGC5941-STTM156 y pOT2-pFGC5941-STTM528	49
8.4. Análisis fenotípico del callo embriogénico de maíz transformado con STTMs mediante biobalística	51
8.5. Análisis molecular del callo embriogénico de maíz transformado con STTMs mediante biobalística	56
8.6. Efecto de los STTM sobre los niveles de miRNAs y transcritos diana en callo embriogénico de maíz.	59
8.7. Cinética de crecimiento de los callos transformados con STTM528 y STTM156	61
8.8. Regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos.....	65
9. Discusión.....	70
10. Conclusiones	76
11. Perspectivas.....	77
12. Referencias.....	78
13. Anexos.....	92

Índice de figuras

Figura 1. Reproducción sexual del maíz	4
Figura 2. Desarrollo del embrión en dicotiledóneas y monocotiledóneas	5
Figura 3. Etapas morfológicas de la embriogénesis somática en angiospermas y gimnospermas	8
Figura 4. Embriogénesis somática y regeneración en planta del maíz	9
Figura 5. Biogénesis y acción de miRNAs en plantas.	13
Figura 6. Papel de los miRNAs en la embriogénesis somática (ES) del maíz (se incluyen principalmente miRNAs de desarrollo y de respuesta a estrés).	15
Figura 7. Reconocimiento de mRNA objetivos por miRNAs en plantas y animales	20
Figura 8. Imitación de RNAm objetivo para miRNAs.	22
Figura 9. Comparación entre la tecnología MIMIC y STTM	23
Figura 10. Regulación por miR528 durante la ES del maíz VS-535.	26
Figura 11. Niveles de acumulación de miR528 y sus mRNA diana en ES del maíz VS-535	27
Figura 12. Participación de miR156 en la regeneración de plantas a partir de callo embriogénico de maíz VS-535	29
Figura 13. Patrones de abundancia de miR156 y su diana objetivo <i>SBP23</i> durante la regeneración de la planta de maíz Tuxpeño VS-535.	29
Figura 14. Supresión de la expresión de <i>csi-miR156</i> en callo embriogénico de cítricos	30
Figura 15. Vectores utilizados para la inducción de STTM528 en plantas	41
Figura 16. Construcción de pOT2-STTM mediante PCR.	46
Figura 17. Electroforesis de la digestión de pOT2-STTM sin origen de replicación	47
Figura 18. Electroforesis de la digestión de pOT2-pFGC5941-STTM con <i>PacI</i>	49
Figura 19. Secuencia consenso de plásmido con STTM156	50
Figura 20. Secuencia consenso de plásmido con STTM528	51
Figura 21. Expresión transitoria de MonoGUS en callos bombardeados	52
Figura 22. Selección de callos en medio N6P con Basta® durante los primeros 15 días	53
Figura 23. Selección de callos en medio N6P con Basta® después de dos meses	54
Figura 24. Selección de callos en medio N6P con Basta® después de tres meses	55
Figura 25. Proliferación de callo en medio N6P sin Basta® después de cinco meses	56
Figura 26. Amplificación del gen Basta® en callo embriogénico	57
Figura 27. Amplificación de la región del STTM en callo transformado	58
Figura 28. Niveles de expresión de miRNAs y mRNAs diana en callo embriogénico	60
Figura 29. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos en medio N6P sin Basta®	63
Figura 30. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos en medio N6P sin Basta®	64

Figura 31. Fenotipos de los distintos tipos de callos durante la cinética de crecimiento	65
Figura 32. Callo embriogénico de maíz STTM156 en medios de regeneración	66
Figura 33. Callo embriogénico de maíz STTM528 en medios de regeneración	67
Figura 34. Callo embriogénico de maíz pFGC5941 (sin STTM) en medios regeneración	68
Figura 35. Callo embriogénico de maíz silvestre (WT) en medios regeneración	69
Figura S1. Recuperación de callos en medio sin BASTA después de cuatro meses	94
Figura S2. Electroforesis de DNA extraído de callo embriogénico de maíz	94
Figura S3. Electroforesis de PCR con oligos de secuenciación (STTM-common-real-F/R)	95
Figura S4. Proliferación de callo en medio N6P después de 6 meses	95
Figura S5. Extracción y fraccionamiento de RNA de callo embriogénico	96
Figura S6. Vector pOT2-poly-cis	97
Figura S7. Vector pFGC5941	97

Índice de tablas

Tabla 1. Cebadores utilizados para la producción de STTM156 y STTM528 usando como plantilla pOT2-Poly-Cis.	37
Tabla 2. Cebadores utilizados para la supresión del origen de replicación en pOT2-STTM.	39
Tabla S1. Lista de oligonucleótidos empleados en la prueba de RT-qPCR.	98
Tabla S2. Formulación del medio N6P empleado para la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz.	98
Tabla S3. Medios de cultivo utilizados en las distintas etapas de la embriogénesis somática.	99
Tabla S4. Ciclos de amplificación de miR528 y miR156 en qRT-PCR.	100
Tabla S5. Ciclos de amplificación de los genes objetivo de miR528 y miR156 en qRT-PCR.	101
Tabla S6. Análisis de Kruskal-Wallis del peso fresco de callos en medios con y sin Basta® en diferentes días después del subcultivo.	102
Tabla S7. Análisis de Kruskal-Wallis con múltiples comparaciones mediante la prueba Games-Howel del peso fresco de callos en medios sin y con Basta®.	103

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AGO1	Proteína Argonauta 1
Bhlh	<i>BASIC HELIX-LOOP-HELIX</i>
CeRNAs	RNAs endógenos competidores
CircRNA	RNAs circulares
2-4-D	2,4-diclorofenoxiacético
DCL1	DICER LIKE 1
EC	Callo embriogénico
EI	Embrión Inmaduro
ES	Embriogénesis somática
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	Enzima β -glucuronidasa
HEN1	ENHANCER 1
HYL1	HYPONASTIC LEAVES 1
IPS	<i>INSENSITIVE TO PHOSPHATE STARVATION</i>
lncRNA	RNAs no codificantes largos
MATE/BIGE1	<i>MULTIDRUGAND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/BIG EMBRYO 1</i>
MIMs	Tecnología de imitación MIMIC
miRNAs	microRNAs (pequeños RNAs)
NEC	Callo no embriogénico
nt	Nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLC1	<i>PLASTOCYANIN-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN 1</i>
Pre-miRNA	Precursor de miRNA
Pri-miRNA	Transcrito primario de miRNA
PV	Callo pFGC5941-vacío
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RAM	Meristemo apical del brote
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
mRNA	RNA mensajero
SAM	Meristemo apical del brote
SBP-LIKE (SPL)	<i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE</i>
SE	Embriogénesis somática
SOD1	<i>SUPEROXIDE DISMUTASE 1a</i>
STTM	STTM SHORT TANDEM TARGET MIMICs
TFs	Factores de transcripción
WOX	Homeobox relacionado con WUS
WT	Tipo Silvestre
WUS	WUSHEL

Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante que regulan la expresión y traducción de mRNAs blanco a través de la complementariedad de secuencias. En plantas, se han convertido en reguladores cruciales tanto para el desarrollo como para la respuesta y adaptación al estrés biótico y abiótico. Particularmente, los miRNAs han surgido como actores clave durante la embriogénesis somática (ES) del maíz, regulando principalmente a factores de transcripción (TFs) relacionados con la respuesta a hormonas y al estrés.

Durante los últimos años, las investigaciones sobre miRNAs en la ES de maíz se han relacionado con su acumulación durante la inducción y proliferación de callos embriogénicos (EC), así como en el proceso de regeneración de plantas. En particular, se han realizado estudios sobre los niveles de acumulación de los miRNAs en relación con sus mRNAs blanco, en las variedades mexicanas de maíz Tuxpeño VS-535 y H-565. Dos miRNAs clave en la ES de maíz son miR528 y miR156, relacionados con la respuesta al estrés y la transición del desarrollo, respectivamente. Por un lado, miR528 se encontró altamente expresado en la fase proliferativa de callos, regulando a sus mRNAs blanco *MATE/BIGE1* (transportador de eflujo, *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/BIG EMBRYO 1*), *bHLH152* (factor transcripcional, *BASIC HELIX-LOOP-HELIX 152*), *SOD1* (*SUPEROXIDE DISMUTASE 1*) y *PLC1* (*PLASTOCYANIN-LIKE PROTEIN 1*), mientras que miR156 aumenta su expresión regulando a la baja al factor transcripcional *SBP23* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN 23*) en las primeras etapas de regeneración de plantas. Sin embargo, la relevancia en la regulación por estos y otros miRNAs aún no es clara.

El objetivo principal de este proyecto fue abordar la función de miR528 y miR156 mediante su secuestro por mímicas con tecnología STTM (SHORT TANDEM TARGET MIMICS), inhabilitándolos para regular a sus mRNAs blanco en callos embriogénicos de maíz Tuxpeño VS-535. Se transformaron callos con STTM528 y STTM156 por biobalística en ocho replicas independientes. Los callos transformados fueron seleccionados en medio con Basta® por tres meses, y los sobrevivientes se proliferaron para evaluar su fenotipo. Se analizó el efecto de las mímicas mediante los niveles de miR528, miR156 y sus respectivos blancos *MATE/BIGE1* y *SPL23*, mediante RT-qPCR. Los resultados indicaron la transformación exitosa de algunos callos con los STTM, aumentado los niveles de los mRNAs blanco, pero sin reducir la abundancia de los miRNAs. Además, se observó menor proliferación de los callos transformados con cada mímica respecto a los transformados con el vector vacío (PV) o no transformados (WT), y diferencias en el proceso de regeneración de plantas a partir de los callos con las mímicas.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate the expression and translation of target mRNAs through sequence complementarity. In plants, they have become crucial regulators for both, development and adaptation response to biotic and abiotic stress. Particularly, miRNAs have emerged as key players during maize somatic embryogenesis (SE), mainly regulating transcription factors (TFs) related to hormone and stress response.

During the last few years, research on miRNAs in maize SE has been related to their accumulation during the induction and proliferation of embryogenic callus (EC), as well as in plant regeneration process. In particular, studies have been conducted on the accumulation levels of miRNAs in relation to their target mRNAs in the Mexican maize varieties Tuxpeño VS-535 and H-565. Two key miRNAs in maize SE are miR528 and miR156, related to stress response and developmental transitions, respectively. MiR528 was found highly expressed in the proliferative phase of callus, regulating target mRNAs MATE/BIGE1 (efflux transporter, MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/BIG EMBRYO 1), bHLH152 (transcription factor, BASIC HELIX-LOOP-HELIX 152), SOD1 (SUPEROXIDE DISMUTASE 1) and PLC1 (PLASTOCYANIN-LIKE PROTEIN 1), while miR156 increases its expression and down-regulating the transcriptional factor SBP23 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN 23) at early stages of plant regeneration. However, the relevance of regulation exerted by these and other miRNAs is still unclear for maize SE.

The main objective of this project was to address the function of miR528 and miR156 using sequestration by the SHORT TANDEM TARGET MIMICS (STTM) technology, disabling them to regulate their target mRNAs in embryogenic callus of VS-535 Tuxpeño maize. Callus were transformed with STTM528 and STTM156 by bioballistics in eight independent replicates. The transformed calli were selected on medium with the herbicide Basta® for three months, and the survivors were proliferated to evaluate their phenotype. The effect of mimics was analyzed by levels of miR528, miR156 and their respective targets MATE/BIGE1 and SBP23 by RT-qPCR. The results indicated successful transformation of some calli with STTMs, increasing the levels of the target mRNAs, but without reducing the abundance of the miRNAs. In addition, less proliferation of calli transformed with each mimic was observed with respect to those transformed with the empty vector (PV) or not transformed (WT), and differences in the process of plant regeneration from calli with mimics.

1. Introducción

1.1. Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays spp. mays*) es un pasto de la familia Gramineae o Poaceae, descendiente de especies silvestres llamadas teocintles (CONABIO 2020b). Por un lado, Kato (1984) señala a *Z. mays spp. Mexicana* como el antecesor del cual se domesticó el maíz, mientras Matsuoka *et al* (2002) sostiene que se deriva de *Z. mays spp. Parviglumis*. El maíz, es una planta C4 con alta actividad fotosintética y una de las plantas alimenticias más productivas, siendo una fuente importante de carbohidratos. Se encuentra adaptada a diferentes condiciones ambientales y sistemas agrícolas debido al desarrollo de líneas modificadas genéticamente y su adaptación a diferentes ecosistemas (García and Serna. 2019; Paliwal *et al.*, 2000). Los cultivos se desarrollan en un amplio rango de altitudes y regímenes de precipitación. Por ello, las razas varían en tamaño y tolerancia a diferentes condiciones ambientales (Santillán *et al.*, 2021).

Hoy en día, el maíz es el cultivo más importante a nivel mundial con respecto a su producción, superando al arroz y al trigo. Es un cereal con alto rendimiento por hectárea, aportando el 30% de las calorías alimentarias a unos 4.600 millones de personas (Nyirenda *et al.*, 2021). Además, posee un alto valor económico por ser la materia prima de diversos productos industriales, servir como alimento para el ganado (Loy and Lundy, 2019) y ser una fuente para el desarrollo de biocombustibles (Kumar and Singh, 2019).

En México, el maíz es uno de los cultivos agrícolas más importantes, desde el punto de vista alimentario, económico, político y social (CONABIO 2020a). Así mismo, México es considerado como el centro de origen del maíz por concentrar la mayor diversidad (60%) del mundo con alrededor de 64 razas cultivadas (Sánchez *et al.*, 2018, Santillán *et al.*, 2021).

Además de su importancia alimentaria y económica, el maíz es uno de los principales modelos experimentales, ya que posee un complejo y diverso genoma, con un alto número de genes conservados en comparación con otras gramíneas. Esta característica lo ha posicionado como pieza central en investigaciones de genética, epigenética y genómica. Sobre todo, para el desarrollo de variedades con mejor

rendimiento y resistentes a condiciones adversas de estrés biótico y abiótico (Andorf *et al.*, 2019; Strable and Scanlon, 2009). Adicionalmente a estas investigaciones, se han generado bases de datos con la finalidad de aumentar la divulgación, colaboración e intercambio sobre expresión de genes, variación de secuencias, variación estructural y elementos transponibles que puedan rastrear fácilmente las diferencias estructurales y funcionales de un locus y sus ortólogos (Woodhouse *et al.*, 2021).

Otra de las habilidades distintivas del maíz es su capacidad de regeneración a través la embriogénesis somática, lo cual ha sido fundamental para el estudio de varios genes implicados en el desarrollo, así como en la conservación del germoplasma y el mejoramiento agrícola (Salvo *et al.*, 2014). Sin embargo, solo algunas variedades de maíz tienen la capacidad de regenerarse mediante esta vía, lo que restringe el uso de mutantes disponibles. En la actualidad, los callos embriogénicos de maíz son el tejido más utilizado en la transformación mediante técnicas biotecnológicas, debido a su alta eficiencia en la regeneración de embriones. Esto con el objetivo de comprender la expresión genética y los perfiles metabólicos que restringen la regeneración en líneas de maíz recalcitrantes a la transformación (Dai.*et al.*, 2022; Yadava *et al.*, 2017).

1.2. Embriogénesis en plantas

La embriogénesis vegetal es un proceso único, ya que no solo puede iniciarse a partir del óvulo fecundado, sino también de células de diferentes órganos e incluso de células somáticas (Mordhorst *et al.*, 1997). La embriogénesis en plantas puede ocurrir de diferentes formas, como la natural por medio de embriogénesis cigótica y diferentes tipos de apomixis, o *in vitro* mediante embriogénesis somática a partir de diversos explantes (Alejandri ,2019).

1.3. Embriogénesis cigótica

En plantas que se reproducen de manera sexual, el desarrollo embrionario representa una fase importante. La fusión de dos gametos haploides, el masculino (polen) y el femenino (óvulo) produce el cigoto, una célula totipotente que, a partir de la

división y especificación en la embriogénesis temprana, establece los principales linajes celulares y tejidos de la planta adulta. En la fase siguiente de morfogénesis se produce el embrión completo, mientras en la embriogénesis tardía, la semilla se prepara para la latencia y su posterior germinación, asegurando la continuación del ciclo de vida de la planta (Armenta-Medina *et al.*, 2020).

La embriogénesis cigótica en angiospermas comienza con la fusión de dos pares de gametos masculinos y femeninos. Durante un proceso de doble fecundación, el óvulo es fecundado por una célula espermática para formar el cigoto diploide que desarrollará un embrión, y la célula central diploide se fusiona con una segunda célula espermática para establecer al endospermo triploide, tejido que proporcionará nutrientes al embrión en desarrollo (Figura 1; Dresselhaus and Jürgens, 2021). Aunque ambas células espermáticas pueden fusionarse con el óvulo, el proceso de doble o múltiple fecundación es extremadamente raro (Grossniklaus, 2017). En general, el embrión diploide tiene un genoma materno y otro paterno, mientras el endospermo triploide tiene dos genomas maternos y un genoma paterno. Ambos se desarrollan dentro de la cubierta de la semilla diploide que deriva del tejido materno diploide, sin sufrir meiosis (Reiser and Fischer, 1993).

La embriogénesis cigótica es un proceso complejo y muy organizado, que se ha estudiado durante largo tiempo mediante histología. Recientemente, estos estudios se han complementado a partir de genética molecular en mutantes de *Arabidopsis thaliana*. La embriogénesis se divide en: 1) embriogénesis *sensu strictu*, donde se desarrolla el cigoto hasta un embrión en fase cotiledonaria (morfogénesis del embrión y del endospermo), 2) la maduración seguida del cambio del control materno al filial y 3) el crecimiento del embrión hasta la formación de semilla y desecación para su posterior germinación (Winkelmann, 2016). La embriogénesis en angiospermas es parcialmente conservada en las primeras etapas del desarrollo, sin embargo, existen diferencias entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, principalmente en las etapas de maduración. La diferencia está en la organización de los planos de división celular y formación de uno o dos cotiledones para la formación posterior del meristemo apical del brote. Esta característica asegurará la germinación de semillas en diferentes ambientes (Armenta-Medina and Gillmor, 2019a; Sreenivasulu and Wobus, 2013).

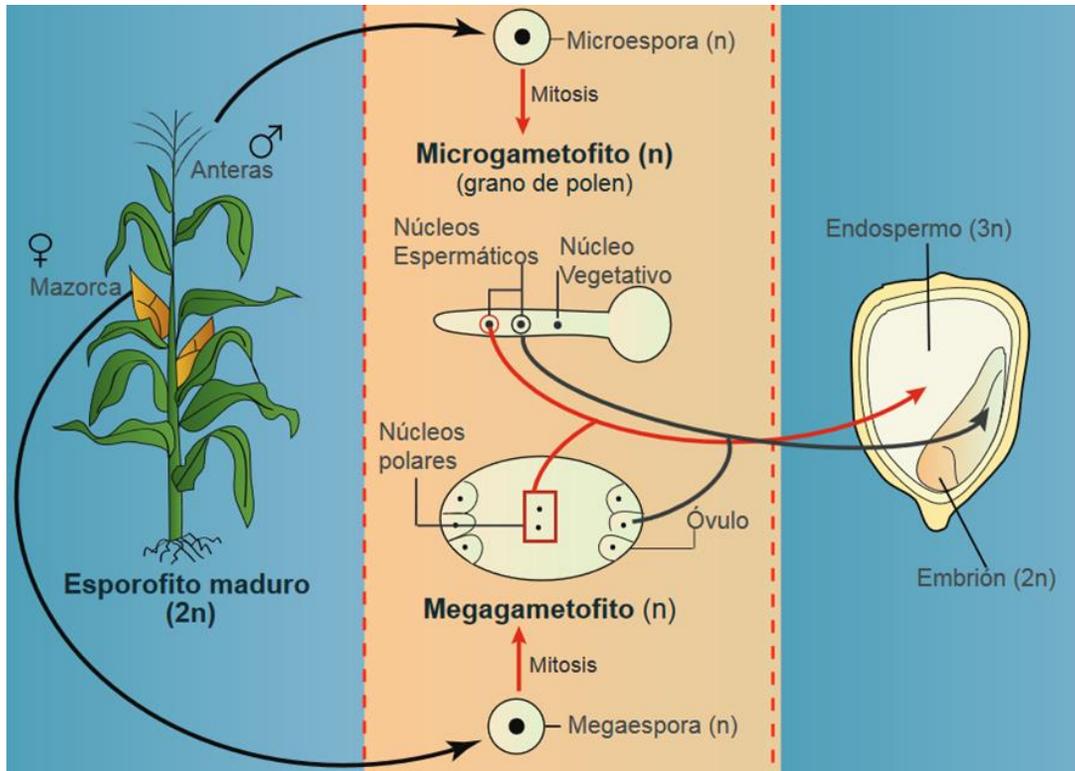
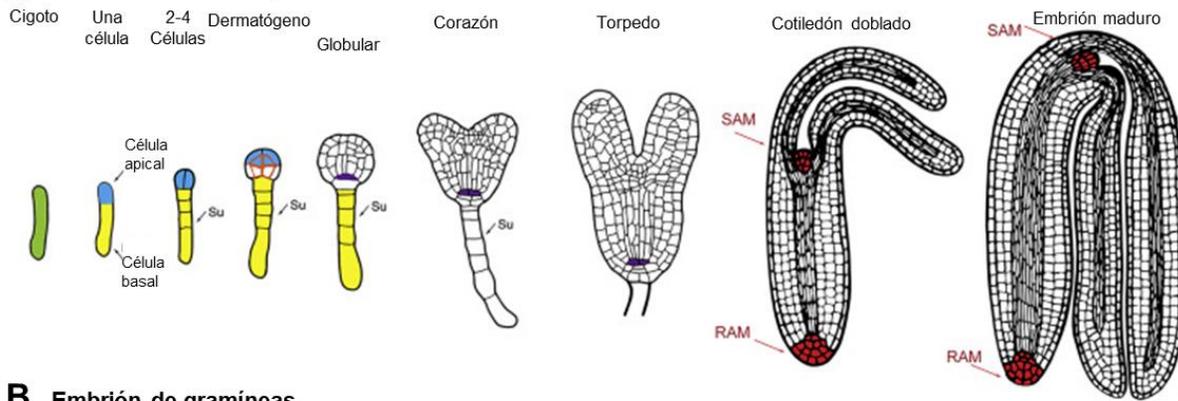


Figura 1. Reproducción sexual del maíz. En el proceso ocurre una doble fertilización, donde en el megagametofito, una célula haploide (óvulo) es fecundada por una célula espermática para generar al embrión. Al mismo tiempo, una célula central diploide es fertilizada por una segunda célula espermática, formando el endospermo triploide que contribuye como reserva nutritiva al desarrollo del embrión (Tomado de Juárez-González, 2015 – modificado a partir de Walbot and Evans, 2003).

Acorde al modelo de embriogénesis cigótica en *Arabidopsis thaliana*, después de la fecundación, ocurre la primera división asimétrica del cigoto, la cual dará forma a una pequeña célula apical, seguida de la generación del embrión y una célula basal grande, de donde se formará el suspensor (Figura 2, parte A). La siguiente fase es la formación del patrón específico dentro del embrión globular. Enseguida, ocurre la transición al estadio cotiledonario con la iniciación del primordio de la raíz y el primordio del brote. Posteriormente, a nivel morfológico comienza la formación de meristemos (Chen *et al.*, 2021; Dodeman *et al.*, 1997). El meristemo apical del brote (SAM, shoot apical meristem) se localiza con eje al embrión, distinguiéndose la presencia de dos cotiledones y el meristemo apical de la raíz (RAM, root apical meristem). Finalmente, el suspensor en dirección al eje basal promueve a nivel fisiológico el crecimiento, acumulación, posición y maduración del embrión, desde la embriogénesis temprana hasta la formación de la semilla (Schwartz *et al.*, 1997).

A Embrión de Arabidopsis



B Embrión de gramíneas

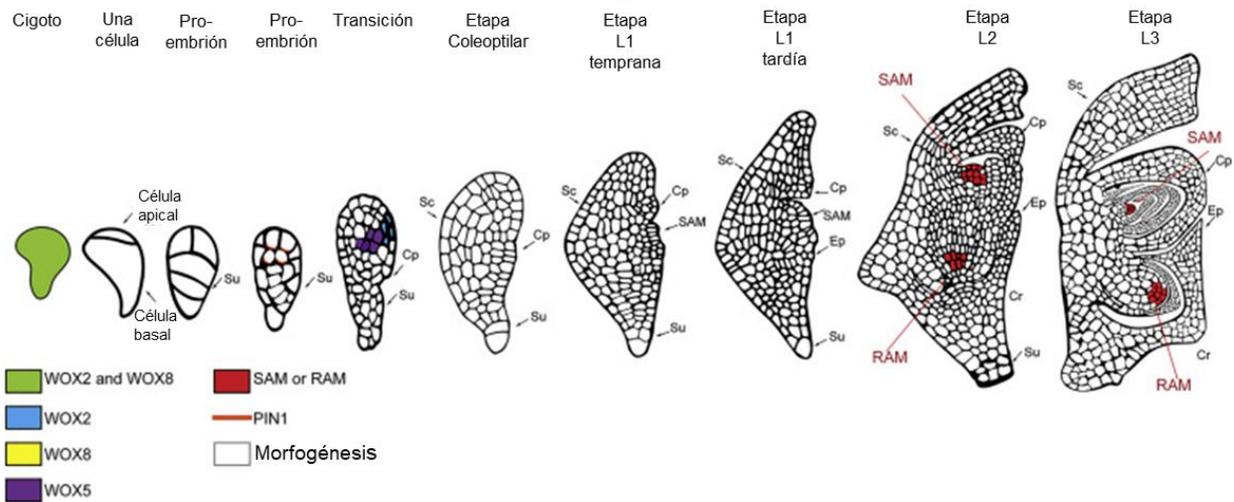


Figura 2. Desarrollo del embrión en dicotiledóneas y monocotiledóneas. (A) Desarrollo del embrión en *Arabidopsis* y **(B)** Desarrollo de embrión en gramíneas. Se ilustra desde la formación del cigoto hasta el estado maduro del desarrollo. Los marcadores de identidad celular son mostrados en diferentes colores (WOX2, WOX8, WOX5) y el transportador de auxina PIN1 en líneas naranjas. Suspensor (Su), coleóptilo (Cp), escutelo (Sc), epiblasto (Ep) y coleorhiza (Cr; Modificado de Armenta-Medina *et al.*, 2020).

El maíz es una de las gramíneas más estudiadas para describir la embriogénesis en plantas monocotiledóneas, debido a su importancia agrícola en el mundo. El proceso se divide en tres fases (Figura 2, parte B). En la primera fase o fase proembrionaria, el cigoto se divide de forma asimétrica después de la fecundación, para dar lugar a una célula apical pequeña y una célula basal grande, de donde se formarán el embrión y el suspensor, respectivamente (Kellogg, 2015; Yi *et al.*, 2019). En la segunda fase o etapa de transición, el proembrión cambia su simetría radial a una simetría bilateral y se forma una capa externa, es decir, el embrión y el suspensor se alargan por medio de división celular. Las células generadas a partir de la zona apical son pequeñas y presentan

citoplasma, mientras las células del suspensor son largas y presentan vacuolas. Posteriormente, se comienzan a distinguir el meristemo apical del brote (SAM) y el meristemo apical de la raíz (RAM) con la pronta formación de una pequeña protuberancia de donde emergerá el coleóptilo, que a su vez dará paso a la formación del escutelo. Las etapas tardías de la embriogénesis de maíz se identifican acorde al número de primordios de las hojas del embrión, las cuales van del 1 al 6 (L1-L6). Finalmente, en la tercera fase o etapa de maduración, una gran cantidad de lípidos son acumulados en el escutelo con la finalidad de conformar la mayor parte del embrión, mientras el suspensor es degradado por muerte celular programada. Aquí, el embrión es deshidratado y entra en dormancia para resistir la desecación hasta su germinación (Nardmann and Werr, 2009; Vernoud *et al.*, 2005).

1.4. Embriogénesis somática

Las plantas son organismos sésiles con un alto potencial regenerativo como respuesta a diferentes factores de estrés biótico y abiótico. El potencial de regeneración las hace capaces de responder a estos factores de estrés, generando cambios a nivel molecular en los perfiles de expresión genética que alteran la función celular (Pierre-Jerome *et al.*, 2018). Las diferencias en el potencial regenerativo son expresadas de diferente forma para diferentes órganos de la planta, revelando la interacción de células y moléculas implicadas en el proceso. También, pone de manifiesto la restricción espacial y temporal del tipo de células (células madre, células progenitoras y células meristemáticas). De esta manera, el desarrollo de diferentes linajes celulares y su posterior diferenciación conduce a una gran plasticidad en la regeneración de plantas (Chowdhury and Ghosh, 2021). La embriogénesis somática (ES) es un ejemplo de la plasticidad de desarrollo celular de plantas en respuesta a estímulos hormonales, ambientales y genéticos.

La ES es un proceso de desarrollo mediante el cual las células somáticas adquieren características de células totipotentes con capacidad embrionaria bajo las condiciones de inducción adecuadas. A continuación, las células pasan por diferentes etapas de cambios morfogénicos y bioquímicos para generar un embrión somático

capaz de generar una planta (Yang and Zhang, 2010). La inducción del embrión somático depende de la naturaleza del explante y puede ser dirigido hacia una de las dos rutas de ES para su desarrollo: directa o indirecta (Figura 3). En el primer tipo de ES, los embriones se desarrollan directamente del explante como resultado de su capacidad embriogénica intrínseca. Por otro lado, la ES indirecta está mediada por la desdiferenciación de las células, activación de la división celular, reprogramación de su fisiología, metabolismo y patrones de expresión génica (Horstman *et al.*, 2017; Sharp *et al.*, 1980). Este proceso involucra la inducción de callo embriogénico (EC), la proliferación de callo, el desarrollo y la maduración del embrión para finalizar con la regeneración de plántulas (Yeung, 1995). La transducción de señales es clave para el proceso, donde participan importantes elementos como las hormonas auxina y citoquinina, los factores de transcripción, los microRNAs (miRNAs), las redes de regulación de genes asociadas (GRN) y la señalización mediante pequeños péptidos, los cuales especifican el destino de la regeneración celular para su diferenciación y posicionamiento (Chowdhury and Ghosh, 2021).

En la ES indirecta, el éxito en la inducción de callos embriogénicos no siempre es fácil y eficiente para la regeneración de plantas, y depende de cada especie. En particular, las condiciones ambientales, factores nutricionales, diferentes concentraciones de auxinas, el tipo de explante y el genotipo de la planta, son determinantes para generar EC (Fehér *et al.*, 2016). Generalmente, la inducción y proliferación de EC ocurre en medios de cultivo suplementados con auxinas de origen sintético (por ejemplo, ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y citoquininas en condiciones de oscuridad. Luego, el desarrollo del embrión somático suele promoverse al retirar las auxinas. Más adelante, en la maduración de los embriones, el medio de cultivo puede ser suplementado con polietilenglicol (PEG) y ácido abscísico (ABA) como agentes de maduración, sin auxina y con exposición a la luz. Al final del proceso, se obtienen embriones somáticos para la regeneración de plántulas. Siendo de esta manera, la estabilidad genética uno de los aspectos más importantes en la ES indirecta (Juarez-Escobar *et al.*, 2021).

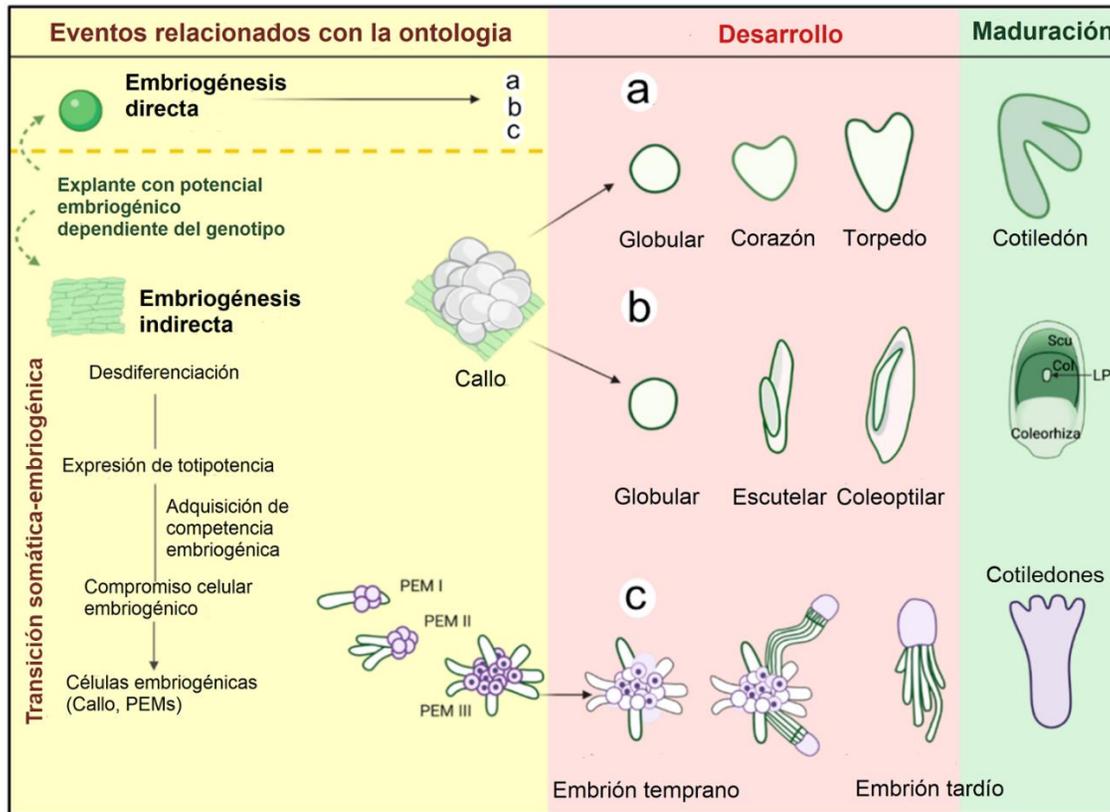


Figura 3. Etapas morfológicas de la embriogénesis somática en angiospermas y gimnospermas. (a) Dicotiledóneas, mostradas para *A. thaliana*; **(b)** monocotiledóneas mostradas para *Z. mays*; **(c)** gimnospermas mostradas para la píce. En b, primordios foliares (LP); en c, masas proembriónicas (PEM) (Modificado de Juárez-Escobar *et al.*, 2021).

En el caso particular de la planta del maíz, el EC es inducido desde la parte abaxial del escutelo de los embriones inmaduros (IE), cosechados en un periodo entre 14 a 18 días después de la polinización (Figura 4). Los EI son los explantes más utilizados para establecer cultivos embriogénicos, ya que a partir de estos tejidos se obtienen callos con alta eficacia de regeneración (Garrocho-Villegas *et al.*, 2012). Sin embargo, en diferentes estudios se ha informado de la selección de otras partes vegetales como el polen (He *et al.*, 2006), ovarios polinizados (Tang *et al.*, 2006) regiones nodales (Sidorov *et al.*, 2006) y meristemos de brotes (Sairam *et al.*, 2003).

En el Laboratorio de Cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, se ha establecido la inducción de callos embriogénicos a partir de diferentes genotipos y explantes de maíz; siendo los embriones inmaduros (15-18 ddp) de las variedades Tuxpeño VS-535 y HS-565 los más viables para el establecimiento de cultivos embriogénicos, capaces de poder regenerar nuevas plantas.

La inducción de callos embriogénicos es mediante el cultivo del explante en medio de cultivo N6I (Medio de Iniciación), suplementado con 2 mg/L de auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Después de una semana, las células proembriogénicas son subcultivadas en medio N6P (Medio de Proliferación) que incluye 0.1 mg/L de cinetina, además de 2 mg/L 2,4-D, lo que promueve la división celular y proliferación de los callos en condiciones de oscuridad. Los callos son subcultivados cada dos semanas, procurando la eliminación de las partes oxidadas. Estos subcultivos pueden mantenerse en proliferación hasta por dos años, y regenerar plantas a partir de la remoción de auxinas, citocininas y la exposición a la luz (Armstrong and Green, 1985; Garrocho-Villegas *et al.*, 2012).

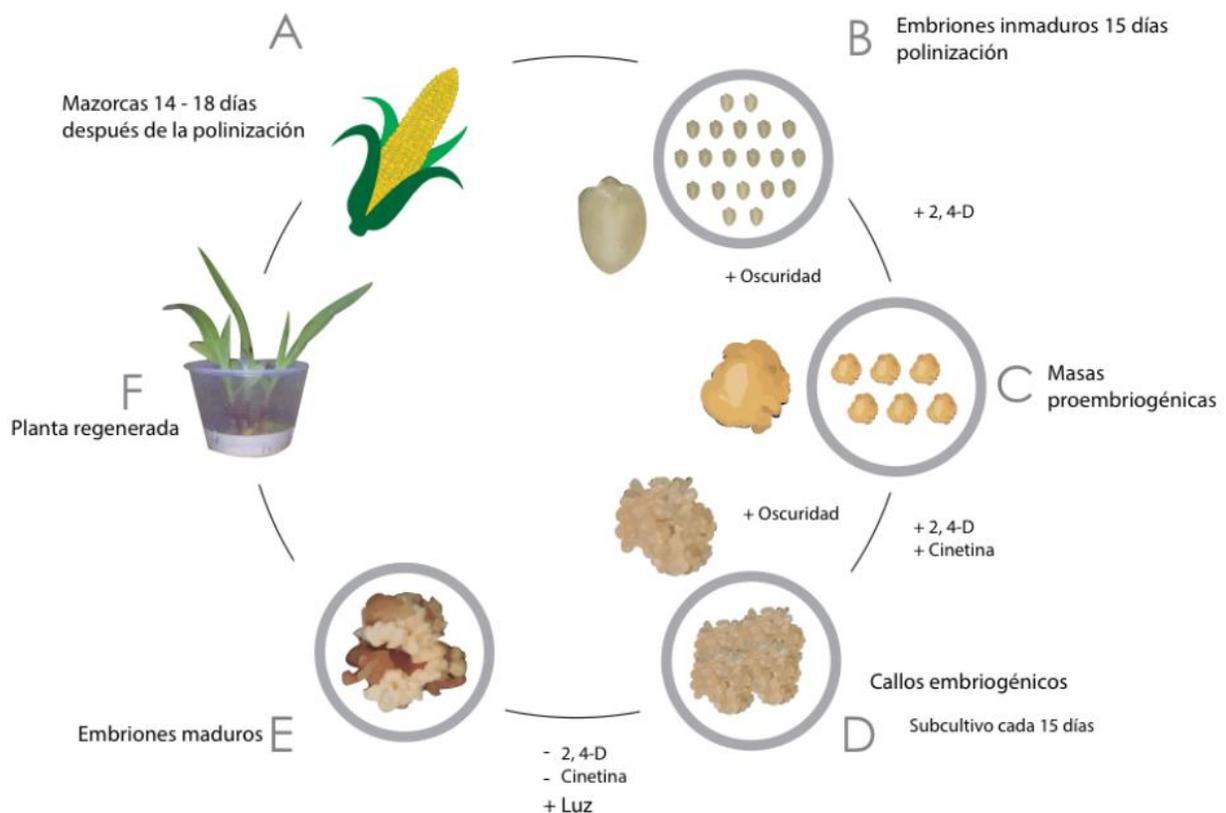


Figura 4. Embriogénesis somática y regeneración en planta del maíz. La inducción de ES y dediferenciación es a partir de embriones inmaduros con estímulos de 2,4-D/oscuridad. Para inducir la proliferación y establecimiento del callo se agrega cinetina al medio con 2,4-D y en oscuridad. La diferenciación de callos a embriones maduros se da mediante la remoción de hormonas y en condiciones de luz. El ciclo termina con la regeneración de las plantas y su reproducción (Tomado de Camacho, 2019- modificado a partir de Jakubekova *et al.*, 2012).

En el maíz, se han descrito distintos tipos de callos en base a su potencial de regeneración: El tipo I, tipo II, callo rizogénico y callo no embriogénico (NEC). La posibilidad de generar cada tipo de callo está relacionada con el programa genético del explante y la respuesta a altas concentraciones de 2,4-D en el paso de inducción (Emons and Kieft, 1995; Garrocho-Villegas *et al.*, 2012; López-Ruiz *et al.*, 2018; 2019b).

Según informes anteriores, el callo tipo I es generado a partir de callo friable (tipo II) derivados de embriones inmaduros (IE), en una etapa de desdiferenciación avanzada. Sus características morfológicas son de aspecto compacto, color blanco y opaco, esto debido al almidón en estructuras escutelares. El callo tipo I no puede proliferar, pero sí transformarse en callo friable con capacidad regenerativa (Emons and Kieft, 1995). El establecimiento de callo tipo I o II está relacionado con la presencia de L-prolina, observando el mantenimiento de callo friable en respuesta a una mayor concentración (Armstrong and Green, 1985).

El callo tipo II, es un agregado de células friables que proliferan y mantienen la capacidad de regenerar plantas durante al menos dos años. Son aglomerados de células indiferenciadas, a veces intercaladas con células vasculares y células meristemáticas en el exterior (Emons and Kieft, 1991). Las células meristemáticas están fuertemente empaquetadas por capas finas que mantienen al citoplasma, vacuolas, gotas de lípidos y partículas de almidón. Así, el agregado de diferentes células se divide para generar nuevas células embriogénicas y células no divididas que se alargan (Fransz and Schel, 1991a, 1994). El callo embriogénico tipo II es el más viable para la regeneración del maíz.

Un tercer tipo de callo fue identificado por Emons *et al.* (1993) durante la regeneración de monocotiledóneas, llamado callo rizogénico. Este callo no embriogénico desarrolla meristemas a partir de una capa celular parenquimatosa dentro del tejido, y se genera cuando se disminuye la cantidad de 2,4-D para solo formar raíces.

Más recientemente, López-Ruiz *et al.* (2018; 2019b) caracterizaron mediante histología a dos tipos de callo no embriogénico en el maíz Tuxpeño VS-535: callo no embriogénico amarillo suave (Y-NEC) y callo no embriogénico compacto blanco (W-NEC); ambos coexistentes durante los subcultivos con callo embriogénico (EC). El Y-NEC tiene aspecto acuoso, es proliferativo durante los subcultivos y está formado por células grandes (200 μm) que le dan una apariencia rugosa. Mientras el W-NEC tiene

una apariencia suave opaca, está formado por células similares a traqueidas y presenta un desarrollo aberrante durante la regeneración de plantas.

Además de su valor biotecnológico, la ES es un sistema de investigación único para estudiar los mecanismos moleculares y factores epigenéticos que dirigen la plasticidad del desarrollo embrionario hacia la regeneración de plantas (Wójcikowska *et al.*, 2020). En los últimos años, los miRNAs se han identificado como moléculas clave en el desarrollo, crecimiento y respuesta a condiciones adversas, regulando los factores de transcripción (TFs), transducción de señales hormonales y la tolerancia de las plantas al estrés biótico y abiótico (Nowak and Gaj, 2016; Siddiqui *et al.*, 2019). En particular, los miRNAs en la ES del maíz son elementos clave de la inducción, desdiferenciación y subcultivo de callos embriogénicos en respuesta a hormonas y condiciones de estrés (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Juárez-González *et al.*, 2019; López-Ruiz *et al.*, 2018).

1.5 MicroRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son una clase de RNAs pequeños (sRNAs) de 20-24 nucleótidos, no codificantes, que tienen un papel clave en la regulación postranscripcional de la expresión génica, el metabolismo y los eventos de desarrollo que mantienen la homeostasis celular (Ergin and Çetinkaya, 2022). Estos transcritos se originan de precursores de RNAs de cadena sencilla con estructura tallo asa (hpRNA) y son procesados por un complejo enzimático hasta una cadena dúplex que contiene el miRNA maduro (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). También existen otros sRNAs generados a partir de RNA de doble cadena (dsRNAs) como los RNAs pequeños interferentes (siRNAs), que a su vez se subdividen en siRNAs secundarios que actúan en trans (tasiRNAs), siRNAs naturales antisentido (nat-siRNAs), siRNA en fase (phasiRNAs) y siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs). En conjunto, estos sRNAs forman parte de los RNAs no codificantes (ncRNAs) distribuidos en una amplia variedad de organismos (Axtell, 2013; Bhogireddy *et al.*, 2021). Entre los sRNAs de plantas, los miRNAs han surgido como importantes reguladores de la ES del maíz, regulando la acumulación y traducción de sus RNAs mensajeros (mRNAs) diana a través de la complementariedad de secuencias (Luján-Soto *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2017).

1.5.1. Biogénesis de los miRNAs en plantas

La biogénesis de los miRNAs es un proceso complejo y altamente regulado que implica varios pasos, desde la transcripción del gen hasta la maduración del miRNA funcional (Figura 5; Li and Yu, 2021). En el primer paso, los miRNAs se transcriben a partir de los genes *MIRNA* (*MIR*) mediante la RNA polimerasa II (Pol II) dependiente de DNA, generando RNAs de cadena sencilla o miRNAs primarios (pri-miRNAs) capaces de formar estructuras de tipo tallo-asa (Armenta-Medina and Gillmor, 2019b; Gao and Wang, 2021). Los pri-miRNAs, siendo productos canónicos de la RNA Pol II, se estabilizan mediante la adición de un Cap de 7-metilguanosa en el extremo 5', y una cola de poliadeninas en el extremo 3' (Wang *et al.*, 2019). El reconocimiento de la secuencia exacta del futuro miRNA y su procesamiento, dependen de las estructuras dentro del pri-miRNA como una región apareada de 15 pb de longitud antes del dúplex miRNA-5p/miRNA3p, la formación de un tallo largo en la región alejada del dúplex y la existencia de una o varias asas terminales (Moro *et al.*, 2018). Después de la transcripción, los pri-miRNAs con estructura tipo tallo-asa son procesados en los cuerpos D (*Dicing bodies*) dentro del núcleo. El procesamiento ocurre mediante dos cortes constitutivos dirigidos por la RNasa tipo III llamada DICER LIKE 1 (DCL1), acompañada por dos cofactores importantes, SERRATE (SE) e HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1). Este proceso permite la generación del pre-miRNA y posteriormente la liberación del dúplex miRNA-5p/miRNA3p, que tiene un saliente de 2 nt en los extremos 3'. La liberación del dúplex puede ser del bucle a la base o de la base al bucle, dependiendo de donde ocurra el primer corte. Para asegurar la estabilidad del dúplex, los extremos 3' salientes son metilados en la ribosa (posición 2'-OH) de los ribonucleótidos por HUA ENHANCER 1 (HEN1; Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Posteriormente, una de las dos hebras del dúplex es seleccionada por ARGONAUTE 1 (AGO1) acorde a la mayor estabilidad termodinámica del extremo 5' de la cadena líder (miRNA-5p) en relación con el extremo 5' de la cadena complementaria (miRNA-3p). En este paso, se unen otras proteínas accesorias para así formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual reconoce a su mRNA diana mediante complementariedad con el miRNA (Axtell and Meyers, 2018). Anteriormente, se creía que el dúplex miRNA-5p/miRNA3p era

transportado del núcleo hacia el citoplasma bajo la acción de HST (Exportina HASTY) y complejos proteicos EXPORTIN-1/CRM. Sin embargo, estudios recientes han demostrado una mayor participación de HST en la promoción de la transcripción del gen *MIR* en lugar de la exportación del dúplex (Cambiagno *et al.*, 2021). Además, otros estudios sugieren que RISC puede ensamblarse tanto en el núcleo como en el citoplasma (Bologna *et al.*, 2018; Dalmadi *et al.*, 2019). En el núcleo, RISC es exportado al citosol por CRM1(EXPO1) /NES, siguiendo un mecanismo dependiente de este complejo proteico (Bologna *et al.*, 2018). Finalmente, AGO1 en el complejo RISC escinde el mRNA diana o reprime su traducción (Gao and Wang, 2021).

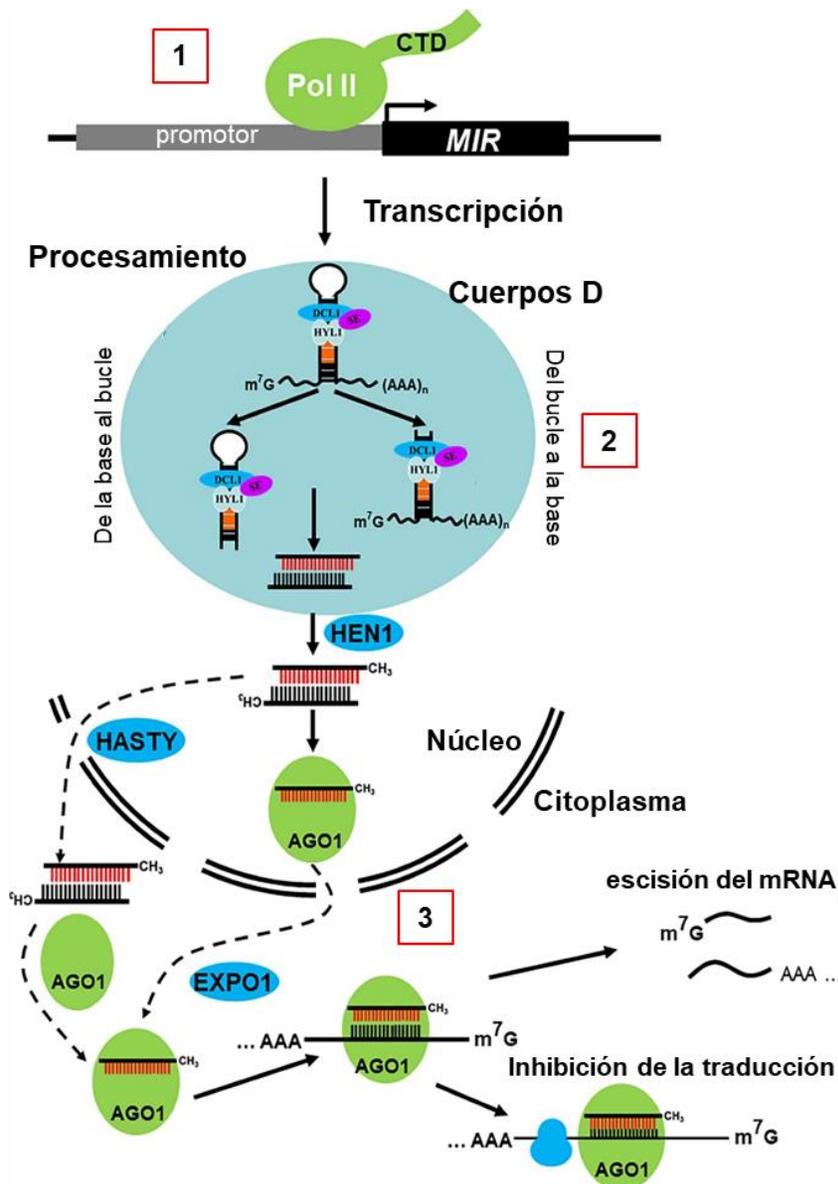


Figura 5. Biogénesis y mecanismo de acción de miRNAs en plantas. (1) El gen *MIRNA* es transcrito a pri-miRNA por la ARN polimerasa II dependiente de DNA. **(2)** El pri-miRNA es procesado a pre-miRNA por acción del complejo DCL1/HYL1/SE en los cuerpos Dicing dentro del núcleo, generando un dúplex de miARN miRNA-5p/miRNA-3p. Los extremos 3' de este dúplex son metilados por HEN1 para mejorar su estabilidad. **(3)** Por último, una de las dos hebras es reconocida por AGO1 y forma el complejo RISC, el cual se dirige hacia mRNA blanco para degradarlo o inhibir su traducción (Modificado de Zhang *et al.*, 2022).

1.5.2. Función de los miRNAs en plantas

Desde su descubrimiento hasta la fecha, los miRNAs se han convertido en actores principales de la regulación en procesos biológicos y metabólicos de plantas, animales y algunos virus (Zhang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Siomi and Siomi, 2010). En plantas, existen familias de miRNAs conservadas en distintas especies, lo cual es indicativo de su origen ancestral y evolutivo. Por consiguiente, algunos miRNAs presentan homología en diferentes especies de plantas, esto a razón de tener blancos similares y funciones conservadas (Gangadhar *et al.*, 2021; Sun, 2012). Sin embargo, la mayoría de miRNAs son específicos para cada especie y las funciones de sus blancos son poco conocidas (Qin *et al.*, 2014). Acorde a las funciones de sus blancos, los miRNAs conservados se distribuyen en tres clases generales: procesos de desarrollo, respuesta y adaptación al estrés, biogénesis y función de RNAs (Asefpour Vakilian, 2020; Mallory and Vaucheret, 2006). De esta manera, el papel de los miRNAs está dado por el mRNA que regulan, dirigida de forma específica a funciones como diferenciación celular, señalización por auxinas, formación de meristemas, especialización de órganos, morfogénesis de hojas y raíces, transiciones de fases embrionaria-vegetativa-reproductiva, entre otras (Choudhary *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2009).

1.5.3. Papel de los miRNAs en la embriogénesis somática

En los últimos años, el rol de los miRNAs en la ES ha sido orientado a la regulación de factores de transcripción (TFs) relacionados con el desarrollo, componentes de las vías de respuesta hormonal y maquinaria de respuesta a estrés durante la transición de células somáticas a células embriogénicas (Jin *et al.*, 2020; Nowak and Gaj, 2016; Szyrajew *et al.*, 2017).

El primer reporte de miRNAs relacionados con la ES fue en callo embriogénico de arroz, seguido por otros cultivos embriogénicos de *Arabidopsis*, algodón, picea, cítricos y maíz (Jin *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2006). Los primeros informes revelaron una particular abundancia de miRNAs durante la transición de células somáticas a células embriogénicas. Particularmente durante la desdiferenciación somática, los niveles de miRNAs relacionados con el desarrollo (miR156, miR159, miR164, miR166 y miR172)

tienden a disminuir, mientras los relacionados con el estrés (miR319, miR396, miR397, miR398 y miR408) aumentan. Otro hallazgo en común fue que los miRNAs relacionados con las auxinas (miR160, miR167, miR169, y miR390) pueden aumentar transitoriamente su acumulación según la etapa de la dediferenciación debido a la (López-Ruiz *et al.*, 2019a). Además de esto, distintos estudios durante la regeneración de plantas de diferentes especies a través de ES, revelaron que los patrones de miR156, miR159, miR164 y miR168 en relación con sus blancos, se oponen en el estado de dediferenciación (Figura 6; Wu *et al.* 2011; Zhang *et al.*, 2012; Lin and Lai 2013; Chávez-Hernández *et al.*, 2015). En síntesis, los patrones de cada miRNA dependen tanto de las condiciones particulares del cultivo *in vitro* como de cada especie.

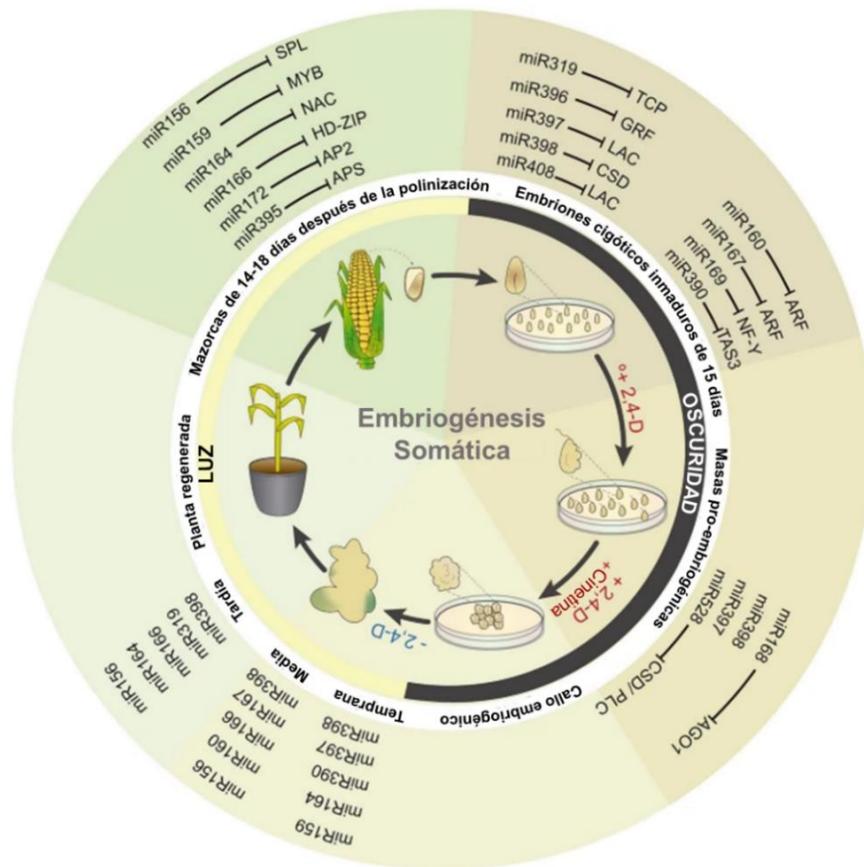


Figura 6. Papel de los miRNAs en la embriogénesis somática (ES) del maíz (se incluyen principalmente miRNAs de desarrollo y de respuesta a estrés). En la parte superior del círculo se muestra la inducción y diferenciación de embriones inmaduros del maíz utilizando 2,4-D/oscuridad. La proliferación de callos embriogénicos se promueve mediante la cinetina, además de 2,4-D. La diferenciación del callo se representa en la parte inferior, que es a partir de la eliminación de fitoreguladores en presencia del fotoperíodo. El ciclo se cierra con regeneración y reproducción de la planta. En cada fase, se muestran los miRNAs con sus funciones de regulación de TFs u otras proteínas en la ES (Modificado de López-Ruiz *et al.*, 2019a).

Recientemente, se ha confirmado la modulación de mensajes que codifican para TFs por la expresión diferencial de los miRNAs. Dichos TFs se han relacionado en su mayoría con procesos de percepción, señalización y biosíntesis de auxinas en cultivos embriogénicos de gimnospermas mono y dicotiledóneas (Jin *et al.*, 2020; Wójcikowska *et al.*, 2020). Algunos ejemplos como miR165/166 están presentes en todos los sistemas de ES. Su principal función es dirigir la polaridad del explante durante la inducción, atenuando a los TFs PHABULOSA/PHAVOLUTA (PHB/PHV) de CLASE III HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP), que a la vez regulan positivamente a LEC2 (Li, *et al.*, 2016; Wójcik *et al.*, 2017). Otro ejemplo es miR167, el cual controla la expresión de factores de respuesta a auxina como ARF6 y ARF8. Adicionalmente, se indicó la presencia de miR160, miR164 y miR390 en un rango del 77-92% en transcriptomas de cultivos embriogénicos. Estos miRNAs modulan la expresión de varios ARFs, los genes CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC1 y CUC2), así como la escisión guiada de TAS3 para la producción de tasiRNAs, respectivamente (Lin *et al.*, 2015; Sanagala and Kumari, 2018; Wójcik *et al.*, 2017). Por último, miR393 expresado en ES de algunas especies de plantas, controla la expresión de los receptores de auxina TIR1 y AFB2, que regulan la homeostasis y sensibilidad a la auxina durante la transición embriogénica (Wójcik and Gaj, 2016).

Las auxinas son las hormonas más estudiadas en plantas por estar involucradas en el crecimiento, división, elongación, diferenciación y reprogramación celular. La auxina de origen natural más común en plantas es el ácido indol-3-acético (IAA), aunque la más utilizada en ES es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) de origen sintético, que simula la acción de auxinas naturales (Nic-Can and Loyola-Vargas, 2016). A diferencia del IAA, la auxina 2,4-D no puede ser degradada por la célula, actuando como factor estresante que induce la reprogramación de reguladores morfogénicos y el redireccionamiento del desarrollo celular, especialmente en altas concentraciones durante la ES (Asghar *et al.*, 2023).

En la ES del maíz, los miRNAs inicialmente estudiados fueron los relacionados con el desarrollo (miR156, miR159, miR164 y miR168) y con el estrés (miR397, miR398, miR408 y miR528) de las variedades VS-535 y H-565 (Chávez-Hernández *et al.*, 2015).

Así mismo, se ha investigado sobre miR156, miR159, miR164, miR168, miR397, miR398, miR408, miR528 y miR319 como reguladores de sus objetivos SBP23, GA-MYB, CUC2, AGO1c, LAC2, SOD9, GR1, SOD1A, y PLC respectivamente, en respuesta al fotoperiodo y depleción de 2,4-D durante la regeneración de plantas (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; López-Ruiz *et al.*, 2019a; López-Ruiz *et al.*, 2019b; Juárez-González *et al.*, 2019). Los resultados de estos trabajos demostraron que la disminución de hormonas influye en la expresión de miRNAs específicos, y no depende del fotoperiodo, pero sus dianas son afectadas adicionalmente por las horas luz/oscuridad.

Varios miRNAs, incluido miR156, desempeñan un papel crucial en la generación y transición del callo embriogénico a embrión somático. MiR156 dirige a los factores de transcripción *Squamosa Promoter Binding Protein-Like* (SPL) y ha sido ampliamente estudiado debido a su conservación. En *Arabidopsis*, se observó un aumento en los genes *MIRNA* y miR156a-h durante la formación de embrión somático (Szyrajew *et al.*, 2017). La expresión de miR156 varía entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. En cítricos, miR156 es más abundante en callos embriogénicos (EC) en comparación con callos no embriogénicos (NEC). Por el contrario, en coco, miR156 muestra una expresión más elevada en NEC que en EC. Un hallazgo en común de estos estudios es la expresión inversa entre SPL y miR156 en EC y NEC (Jin *et al.*, 2020).

Otro estudio importante, fue el realizado por López-Ruiz *et al.* (2019b), donde analizaron la expresión de varios miRNAs en relación con sus mRNAs blancos en EC y NEC de maíz VS-535. Los callos embriogénicos exhibieron niveles más elevados de miRNAs que los callos no embriogénicos. Especialmente, en la inducción del EC se observó una correlación inversa entre miR160 y miR166 con sus blancos, mientras que miR156, miR164 y miR394 mostraron niveles de acumulación similares a sus blancos. Estos niveles de acumulación cambiaron en la aparición de puntos regenerativos, los cuales coincidieron con el establecimiento del SAM. Se encontró que miR156, miR160 y miR166, aumentaron su abundancia en etapas de desdiferenciación posteriores, mientras miR164 y miR394 mantuvieron una abundancia similar a sus blancos.

El primer paso para dilucidar la función de los miRNAs es su identificación. Se han usado diferentes herramientas tanto computacionales como experimentales para tipificar los miRNAs de diferentes especies. Particularmente, se ha encontrado una conservación

evolutiva de miRNAs maduros, desde los musgos hasta las Angiospermas. Algunos de los métodos experimentales más utilizados para detectar a los miRNAs son: la secuenciación de nueva generación, Northern blotting, microarreglos y la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR; Zhang and Wang, 2015). Actualmente, la Stem-Loop RT-qPCR es una de las técnicas más utilizadas para detectar los niveles de expresión de miRNAs. Esta técnica permite cuantificar el nivel de expresión del miRNA ya sea mediante TaqMan® o SYBR® (Smoczynska *et al.*, 2019). Adicionalmente a esto, los análisis experimentales son interpretados con ayuda de sistemas bioinformáticos.

1.5.4. Mecanismos de acción de los miRNAs

Hasta hace algunos años, se conocía poco sobre los mecanismos de regulación por miRNAs; particularmente, en cómo ejercían el silenciamiento génico sobre sus blancos. Ahora se sabe, que es a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA y la represión traduccional (Ameres and Zamore, 2013). Lo cual ocurre de manera similar tanto en plantas como en animales dirigido por el complejo RISC (Kawamata and Tomari, 2010). La represión del gen blanco se ha determinado en gran medida por el grado de complementariedad entre el miRNA y su mRNA diana. En plantas, la alta complementariedad promueve la escisión nucleotídica por AGO, aunque también se ha demostrado inhibición de la traducción, lo que representa también la manera de acción más común de los miRNAs en animales. Hasta el momento, los mecanismos precisos de inhibición traduccional no son claros (Li *et al.*, 2018; Rogers and Chen, 2013).

La complementariedad entre las bases de los miRNAs y sus blancos es clave para entender el modo de acción de los miRNAs (Figuras 7). En animales, el reconocimiento funcional de los mRNAs blanco se realiza a través del apareamiento de bases, que ocurre entre la región semilla del miRNA y los sitios dentro de la región 3' no traducible (3'-UTR) de los mRNA blanco, específicamente en los nucleótidos 2-8 del extremo 5' del miRNA. En casos raros, existe el emparejamiento complementario entre la región 3' del mRNA blanco y el extremo 3' del miRNA (nucleótidos 13-16), presentando un reconocimiento de la región semilla, poco eficaz pero que contribuye a la selección del blanco. (Bartel,

2009; Saliminejad *et al.*, 2019). Aún en estos casos, los nucleótidos 9-12 del miRNA sobresalen, impidiendo la escisión endonucleolítica por parte de AGO (Huntzinger, and Izaurrealde). Adicionalmente, la región 5'-UTR, la secuencia codificante (CDS) y los marcos de lectura abierto (ORF) también pueden funcionar como sitios de reconocimiento, pero con menor frecuencia (Gebert and MacRae, 2019; Nachtigall and Bovolenta, 2022).

A diferencia de los miRNAs en animales, el reconocimiento de los mRNAs blanco por miRNAs en plantas es altamente complementario. Investigaciones recientes han demostrado evidencia acerca de sitios objetivo, localizados principalmente en los marcos de lectura abierto (ORFs), con algunas excepciones en las regiones no traducidas (5'UTR o 3'UTR; Li *et al.*, 2018; Lytle *et al.*, 2007; Schnall-Levin *et al.*, 2010). Además, en contraste con los sitios objetivo de miRNAs en animales, en plantas estos se caracterizan por tener una complementariedad extensiva y normalmente presentan menos de 5 nucleótidos sin apareamiento. La represión de los mRNAs blanco se logra a través del apareamiento de bases en las regiones 5' del miRNA, específicamente en las posiciones 2 a 13, y es esencial para la interacción con el sitio catalítico de proteínas AGO (posiciones 9-12) para finalmente escindir entre los nucleótidos 10 y 11 de los miRNAs (Iwakawa and Tomari, 2015; Liu *et al.*, 2014).

Inicialmente se creía que los miRNAs en animales sólo inhibían la traducción del mRNA blanco sin afectar sus niveles. Sin embargo, investigaciones posteriores han demostrado que los miRNAs también pueden inducir la degradación del mRNA blanco mediante la deadenilación en el extremo 3', seguido por la remoción de 5'-cap que es indispensable para el inicio de la traducción, debido a su interacción con el factor de inicio de la traducción eIF4E. El mRNA sin 5'-cap es degradado por la exonucleasa citoplasmática XRN1. Por otra parte, en plantas la degradación del mRNA es a partir del corte preciso de la secuencia mediada por el dominio PIWI de la proteína AGO. Tras el corte, los dos fragmentos son degradados por la exonucleasa XRN4 o por el exosoma citoplasmático (Huntzinger and Izaurrealde, 2011; Iwakawa and Tomari, 2013; Li *et al.*, 2018).

En los últimos años, ha ocurrido un amplio debate sobre el mecanismo de la represión de la traducción dirigida por miRNAs. En animales, hay evidencia de que la

Dada la relevancia de los miRNAs en la regulación genética de plantas, han surgido como objetos de estudio en la búsqueda de mejoras en cultivos de relevancia agronómica. Las investigaciones se han enfocado en la sobreexpresión de miRNAs, generación de genes diana resistentes a su acción, y líneas mutantes con pérdida de función. Sin embargo, los resultados de estas metodologías pueden ser engañosos, debido a la amplia redundancia de los miRNAs maduros en familias multigénicas con funciones superpuestas. Además, la sobreexpresión del miRNA no evidencia completamente su función, ya que este puede regular la expresión de genes tanto cuando su nivel incrementa, como cuando se reduce. Recientemente, las mímicas de mRNAs blanco han surgido como herramientas eficaces para secuestrar miRNAs maduros y bloquear su actividad (Morea *et al.*, 2016; Othman *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2017).

1.6. Secuestradores de miRNAs o Anti-miRNAs

Los miRNAs son importantes reguladores de la expresión genética en la homeostasis celular. Sin embargo, requieren de una regulación cuidadosa para no producir alteraciones a nivel genético. En células animales, los miRNAs pueden ser regulados de manera postranscripcional a través de la competencia entre un mRNA objetivo y un mRNA no objetivo. Las moléculas que los regulan, también llamados esponjas, son transcritos de RNA que albergan sitios de unión complementarios a los miRNAs, y actúan como secuestradores naturales del miRNA para evitar la regulación de este sobre su objetivo. Las esponjas son generadas a partir de pseudogenes transcritos, RNA no codificantes largos (lncRNA), RNA circulares (circRNA) y mRNA no objetivos, que se denominan en conjunto RNAs endógenos competidores (ceRNAs). La regulación natural de miRNAs se ha utilizado para desarrollar esponjas exógenas (artificiales), con el propósito de estudiar las interacciones miRNA-objetivo (Alkan and Akgül, 2022). El primer reporte sobre esponjas artificiales se llevó a cabo en *Drosophila melanogaster* para analizar la pérdida de función de miR-8 (Loya *et al.*, 2008)

Hace algunos años, se descubrió en las plantas un proceso de regulación de miRNA por mimetismo del mRNA blanco, conocido como INSENSITIVE TO

PHOSPHATE STARVATION 1 (*IPS1*). Este gen codifica un RNA no codificante largo que contiene un sitio de unión complementario a miR399, además de tres nucleótidos de desajuste para evitar la escisión del complejo miR399-IPS1 por RISC (Figura 8). Basado en este señuelo natural de *Arabidopsis*, se logró por primera vez la pérdida de función de los miRNAs mediante MIMIC (MIMs; Figura 9; Villar and Rubio, 2019).

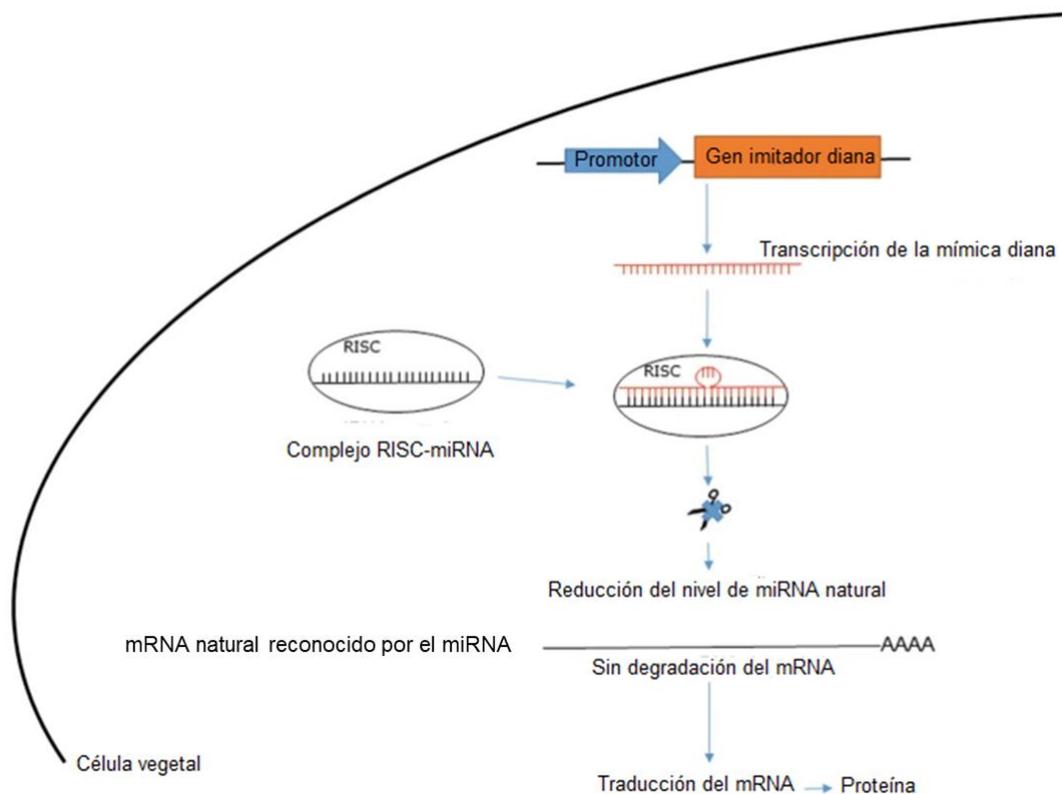


Figura 8. Imitación de mRNA blanco para el secuestro de miRNAs. Los transcritos de imitación de mRNA blanco son similares a los blancos naturales, pero con la presencia de tres nucleótidos en el sitio de corte del miRNA. Esto ocasiona el secuestro del complejo RISC, evitando la degradación y permitiendo la traducción del mRNA (Modificado de Villar and Rubio, 2019).

Se descubrió que *IPS1* podía ser modificado para inhibir otras familias de miRNAs, por lo cual fue la base de la tecnología MIMIC. Sin embargo, en algunos casos MIMIC parecía no tener eficacia, donde su poca expresión no podía inhibir la función del miRNA objetivo. Entonces, fueron desarrollados los STTM (SHORT TANDEM TARGET MIMICs), que son transcritos artificiales cortos (~100 nt) con dos imitadores de mRNA blanco separados por un espaciador de 48-88 nt. Los STTM han demostrado ser eficaces para la inhibición de una amplia familia de miRNAs en plantas (Figura 9; Wong and Millar, 2019).

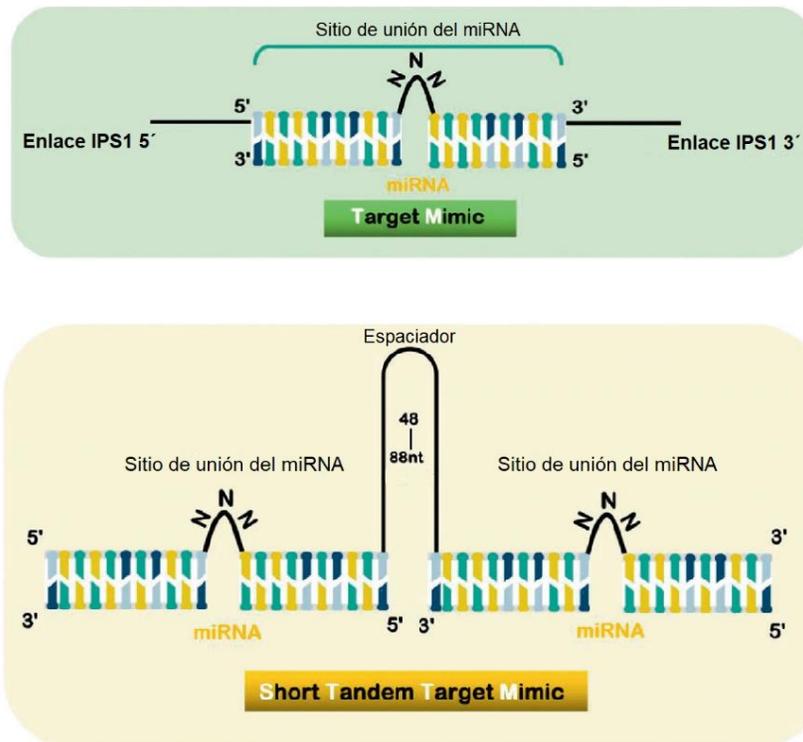


Figura 9. Comparación entre la tecnología MIMIC y STTM. La construcción MIMIC consiste en una imitación destino, mientras que los STTM constan de dos imitaciones destino separadas por un espaciador de 48-88 nt. Los sitios de unión tienen desajustes de tres nucleótidos que sobresalen entre el nucleótido 10 y 11 del miRNA, formando así una protuberancia en la región semilla, lo que evita su degradación (Modificado de Yan *et al.*, 2021).

En maíz, la generación de plantas transgénicas STTM ha permitido encontrar nuevas funciones para distintos miRNAs. Un ejemplo es el secuestro de miR166, que tuvo como respuesta varios cambios morfológicos en hojas, así como el patrón vascular, las estructuras de la epidermis y la arquitectura de la borla, además de una mayor resistencia al estrés abiótico, diferencias en el rendimiento de la semilla, la elevación del nivel de ácido abscísico (ABA) y la reducción del nivel de ácido indol acético (IAA; Li *et al.*, 2020). Otro ejemplo, es el informe de Liu *et al.* (2019), donde el silenciamiento de miR167 o miR482 por STTM causó disminución en el crecimiento de las raíces laterales, y retraso en el crecimiento de la planta, respectivamente. En ambos casos, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de los genes que son el objetivo de miR167 y miR482. En resumen, los resultados antes mencionados proporcionan datos sobre la aplicación de tecnología STTM para la mejora de plantas agrónomicamente importantes, en específico las monocotiledóneas como el maíz.

1.7. Transformación genética de callo embriogénico de maíz

Un método eficiente para la transformación genética del maíz es crucial tanto para la investigación básica como para la aplicada. El bombardeo de micropartículas es un método de transformación directa que permite modificar a plantas como el maíz, recalcitrantes a la transformación por *Agrobacterium*. Es un excelente sistema para lograr la expresión transitoria en tejidos intactos y también permite obtener plantas con expresión estable de genes exógenos. Además, no implica el uso de un patógeno vegetal difícil de eliminar en pasos posteriores (Barampuram and Zhang, 2011; Kausch *et al.*, 2021).

La obtención de callo embriogénico a partir de embriones inmaduros es un modelo importante para la transformación del maíz. Por ello, los primeros trabajos se enfocaron en establecer los mejores sistemas de cultivos, evaluando a la auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) como uno de los mejores reguladores para la inducción de células embriogénicas. Asimismo, se probaron diferentes distancias de bombardeo con micropartículas, encontrando una mejor transformación a una distancia de 13 cm. La entrega del DNA fue mediante el plásmido pBI426, el cual incluye una secuencia codificadora del gen reportero GUS, impulsada por un promotor d35S. El resultado fue la regeneración de plantas a partir de callo embriogénico transformado en un 71%. De esta manera, se lograron establecer las mejores condiciones para la transformación de callo embriogénico de maíz Tuxpeño (Guerrero, 1998).

En experimentos posteriores, se desarrolló un sistema de expresión con el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia, esto mediante las condiciones de inducción, proliferación y transformación de callo antes descritas. La transformación se llevó a cabo por el método de biobalística en un bombardeo simultáneo con los plásmidos pWR-21/pUB1 que contenía el gen de la proteína G y PGHCNS/MARS que contiene el mismo gen, pero, adicionalmente tenía un gen de resistencia a Basta® (*bar*) y el gen GUS que codifica para la enzima de β -glucoronidasa. Los experimentos se llevaron a cabo en 15 líneas de maíz regeneradas a partir de callos transformados, de las cuales 11 mostraron la expresión de la proteína G del virus de la rabia. Además, se eligió la concentración óptima de Basta® (3 mg/L) para la selección de callo embriogénico (Jiménez, 2006).

Más recientemente, se ha reportado la transformación de callo embriogénico del teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*), un ancestro silvestre del maíz. El objetivo fue generar un sistema de estudio genético para investigar sobre el proceso de domesticación del maíz. Se establecieron protocolos para la inducción de callo, utilizando verticilos de plántulas germinadas a partir de semillas maduras, así como para las condiciones de transformación por medio de bombardeo de micropartículas. Usando genes de resistencia a herbicidas como acetolactato sintasa mutante (*A/s*) o resistencia a biolafos (*bar*), o genes reporteros de la proteína roja *tdTomato* y β -glucuronidasa (*GUS*). Se logró una transformación del 4.17% (Zobrist *et al.*, 2021).

Por otro lado, algunos estudios de regeneración de maíz están basados en la germinación de embriones cigóticos, de donde se generan explantes nodales capaces de formar callo embriogénico. Se probaron 22 combinaciones diferentes de auxinas y citocininas, eligiendo los dos mejores medios de cultivo. Las pruebas se hicieron para 28 genotipos de maíz tropical, logrando una mejor inducción de callo embriogénico en cuatro genotipos (BML 6, DHM 117, DMRH 1301 y DMRH 1308) con un porcentaje de regeneración de plántulas de entre 53,6 % y 60,4 %. La transformación de callos embriogénicos derivados de explantes nodales se llevó a cabo con éxito mediante biobalística, mostrando hasta un 5% de transformación (Kumar *et al.*, 2022).

2. Antecedentes

En trabajos previos del laboratorio, se han estudiado algunos miRNAs considerados como reguladores clave en la embriogénesis somática (ES) del maíz. Específicamente, en respuesta al cambio hormonal, fotoperiodo y edad del explante (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Juárez-González., *et al.*, 2019). De manera particular, se analizó a miR528 que es específico de monocotiledóneas, y presentó mayor abundancia entre todos los miRNAs a nivel callo embriogénico (Alejandri-Ramírez, 2019; Chávez-Hernández *et al.*, 2015). Más recientemente, Luján-Soto *et al.* (2021) examinó la acumulación de Zma-miR528 en relación con sus mRNA diana, confirmando el sitio de escisión de todos los blancos evaluados y validándolos como elementos clave en el proceso de ES. Se encontró una correlación inversa entre los transcritos *MATE/BIGE1*, *bHLH* y *SOD1a* en relación a la abundancia de miR528 a nivel de RNA total en todas las etapas. Además, los resultados mostraron una mayor expresión del miRNA en la proliferación de callos embriogénicos (Figura 10). Curiosamente, la acumulación de miR528 es elevada durante la inducción, proliferación y regeneración temprana de plántulas, pero decae significativamente en plantas regeneradas (Figura 11).

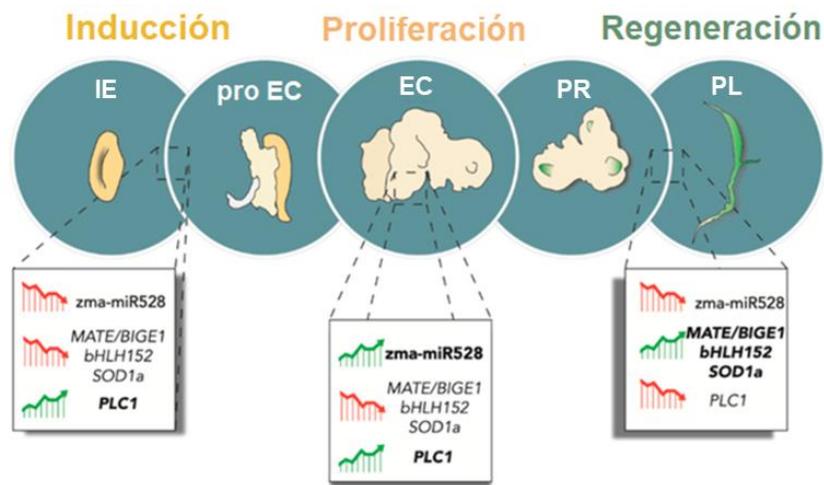


Figura 10. Regulación por miR528 durante la ES del maíz VS-535. Se presenta en los recuadros el patrón de acumulación de miR528 y sus mRNAs diana durante la inducción, proliferación de callos y la regeneración de plántulas. Acumulación ascendente: flecha verde hacia arriba; acumulación descendente: flecha roja hacia abajo. EI: embrión inmaduro (explante); proEC: masa de callo pro embriogénico; EC: callo embriogénico; PR: puntos de regeneración; PL: plántula regenerada (modificado de Luján-Soto *et al.*, 2021).

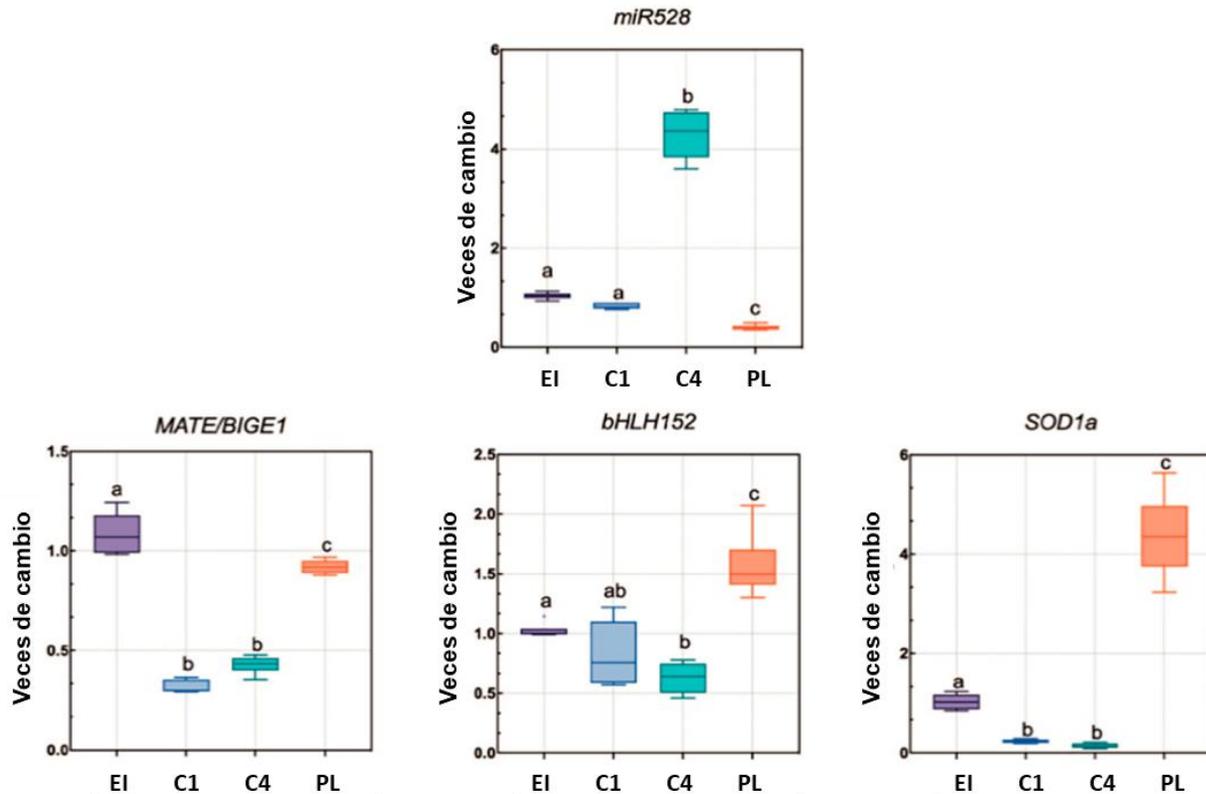


Figura 11. Niveles de acumulación de miR528 y sus mRNA diana en ES del maíz VS-535. Se muestra la correlación inversa entre el miRNA y sus genes objetivo en las diferentes etapas del proceso. Los niveles de expresión se analizaron mediante RT-qPCR en muestras de ARN total. Las veces de cambio representa la abundancia en callo de un mes después de la inducción (C1), callo proliferado después de cuatro meses (C4) y plántulas regeneradas (PL), todo en relación al embrión inmaduro (EI). El análisis de expresión se normalizó mediante ARNs_n U6 y ARNr 18S para el miRNA y sus dianas, respectivamente. Las casillas que no comparten al menos una letra difieren significativamente ($p < 0.005$) entre sí (modificado de Luján-Soto *et al.*, 2021).

En general, *MATE/BIGE1* (efflux transporter, *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/BIG EMBRYO 1*) desempeña una serie de funciones esenciales. Esto incluye su rol como transportador de reguladores que participan en la formación y el tamaño de los órganos laterales y del embrión, además de su función como modulador en la acumulación de auxinas (Suzuki *et al.*, 2015; Upadhyay *et al.*, 2020). Por otra parte, *bHLH 152* (factor transcripcional, *BASIC HELIX-LOOP-HELIX 152*) es un factor de transcripción fundamental para el desarrollo del embrión y la aurícula foliar temprana (Zhang *et al.*, 2018). Mientras que, *SOD1a* (*SUPEROXIDE DISMUTASE 1a*) desempeña un papel crucial en la tolerancia ante el estrés oxidativo, siendo inducida tras la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) para restringir su formación

y facilitar su eliminación (Mauro *et al.*, 2005). También, miR528 mostró una correlación inversa observada con su transcrito objetivo *PLC1* (*PLASTOCYANIN-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN*) en fracciones de polisomas, que no se presentó en las pruebas de ARN total. *PLC1* es una proteína de la superfamilia de la cupredoxina con actividad transportadora de electrones, involucrada en la respuesta al frío (De Rienzo *et al.*, 2000). Si bien miR528 parece regular la expresión de mRNAs cuyos productos ejercen diferentes funciones celulares, su característica común es su relevancia en la respuesta ante el estrés, un factor importante en el proceso de ES del maíz (Luján-Soto *et al.*, 2021).

Otro regulador no menos importante en el desarrollo de las plantas es miR156, el cual presenta una alta conservación en todas las angiospermas. Su principal función es regular a los genes *SBP-LIKE* (SPL; factor transcripcional, *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*) durante la transición vegetativa de la etapa juvenil a la adulta, así como de la etapa vegetativa a la reproductiva (Xu *et al.*, 2016).

En el laboratorio, las primeras investigaciones sobre miR156 se realizaron en callo embriogénico de maíz a lo largo de 24 meses, evidenciando una disminución gradual de su acumulación a medida que el callo envejecía. Su presencia se confirmó mediante Northern Blot junto a otros miRNAs (Dinkova & Alejandri-Ramírez, 2014). Posteriormente, mediante herramientas bioinformáticas se identificó a *SBP23* como posible objetivo de miR156. La expresión de ambos transcritos se evaluó en respuesta al fotoperiodo y el agotamiento hormonal, en la regeneración de plantas para dos variedades de maíz (VS-535 y H-565), mostrando que miR156 aumenta post-depleción hormonal, mientras *SBP23* se regula según el fotoperiodo (Chávez-Hernández *et al.*, 2015).

Investigaciones más recientes realizadas por López-Ruiz *et al.* (2019b), señalaron la importancia de miR156 en el desarrollo temprano de hojas, el meristemo apical del brote (SAM) y las raíces en la regeneración de plantas mediante ES, regulando negativamente a *SBP23* (Figura 12). Los trabajos se realizaron durante la regeneración *in vitro* de plantas del maíz Tuxpeño VS-535. Además, en dicho estudio se evaluaron tres tipos de callos con potencial de regeneración distinta: callo embriogénico (EC), callo no embriogénico blando de color amarillo (Y-NEC) y callo no embriogénico compacto de color blanco (W-NEC). Los EC mostraron niveles de miR156 más altos que los NEC.

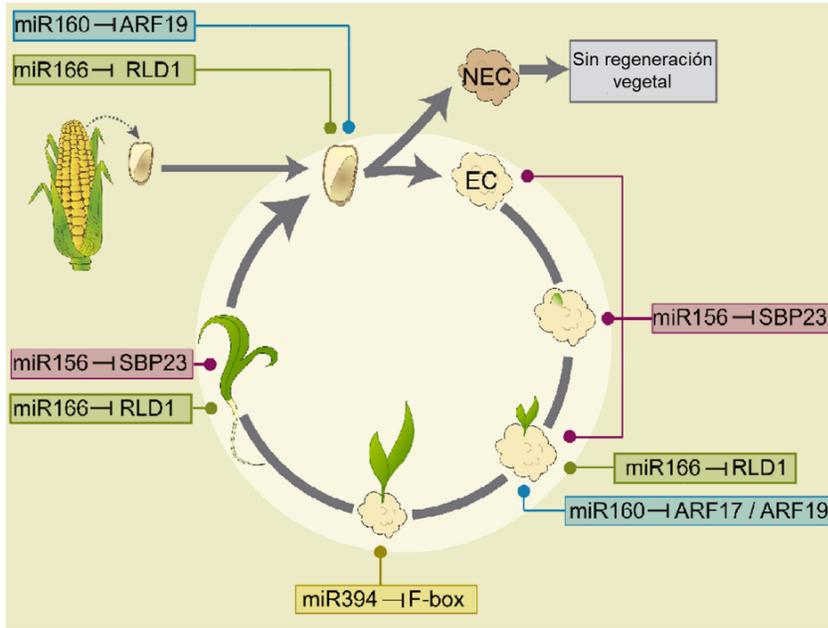


Figura 12. Participación de miR156 en la regeneración de plantas a partir de callo embriogénico de maíz VS-535. Se muestra como varios mRNA diana son regulados por sus respectivos miRNAs en el proceso de regeneración, destacando la regulación negativa de *SBP23* ejercida por miR156. La regulación por miR156 se observa tanto en etapas tempranas de la regeneración como en el establecimiento de hojas y raíz (Modificado de López-Ruiz *et al.*, 2019b).

Durante el proceso de regeneración, miR156 mostró aumentos significativos durante la segunda y la tercera etapa, en ausencia de hormonas externas, destacando una correlación inversa con *SBP23* en la segunda fase (Figura 13). En general, la presencia de miR156 en EC y su aumento en las primeras etapas de regeneración previene la expresión de genes relacionados con la diferenciación y la maduración, durante la división celular activa. Esto principalmente mediante la represión de sus blancos SPL (*SBP* en maíz).

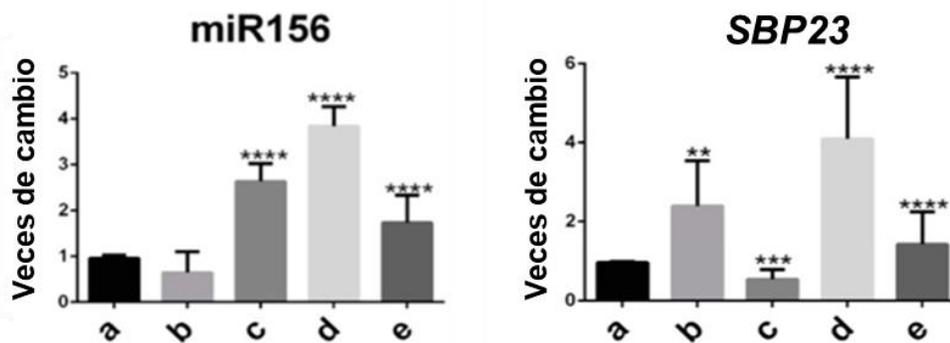


Figura 13. Patrones de abundancia de miR156 y su diana objetivo *SBP23* durante la regeneración de la planta de maíz Tuxpeño VS-535. Los niveles de miRNA y mRNA se analizaron mediante RT-qPCR durante el agotamiento hormonal escalonado y en fotoperiodo para la regeneración de la planta. (a) CE, (b) 1.ª etapa de desarrollo (50% hormonas externas), (c) 2.ª etapa de desarrollo (sin hormonas de aquí en adelante), (d) 3.ª etapa de desarrollo, (e) Plántula. El cambio de veces representa la abundancia en relación con la CE y está normalizado por el control interno del snRNA U6 para los miRNA y el rRNA 18S para los objetivos. Los valores significativos se indican de la siguiente manera: (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ (modificado de López-Ruiz *et al.*, 2019b).

Actualmente, a razón de poder entender la regulación por los miRNA en la embriogénesis somática de plantas, se ha comenzado a aplicar nuevas tecnologías para descifrar su función. Uno de los primeros estudios informó sobre la transformación de callos embriogénicos de cítricos (naranja Valencia o *Citrus.Sinensis*) para la sobreexpresión mimética del objetivo en tándem corto de csi-miR156a (STTM-miR156a o MIM156). El resultado fue la supresión de csi-miR156a que condujo a la regulación positiva de cuatro genes blanco de tipo *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*CsSPL*; Figura 14), provocando cambios en el callo embriogénico como la disminución en el número de amiloplastos y el contenido de almidón. Sorprendentemente, el secuestro de csi-miR156a que regula a los *CsSPLs*, condujo una disminución de csi-miR172, lo que a su vez generó un aumento de sus blancos *CsTOE1.1* y *CsTOE1.2*, conocidos por inhibir genes de biosíntesis de almidón. Esto alteró la acumulación de almidón en las células del callo y el establecimiento de embriones somáticos (Feng *et al.*, 2022).

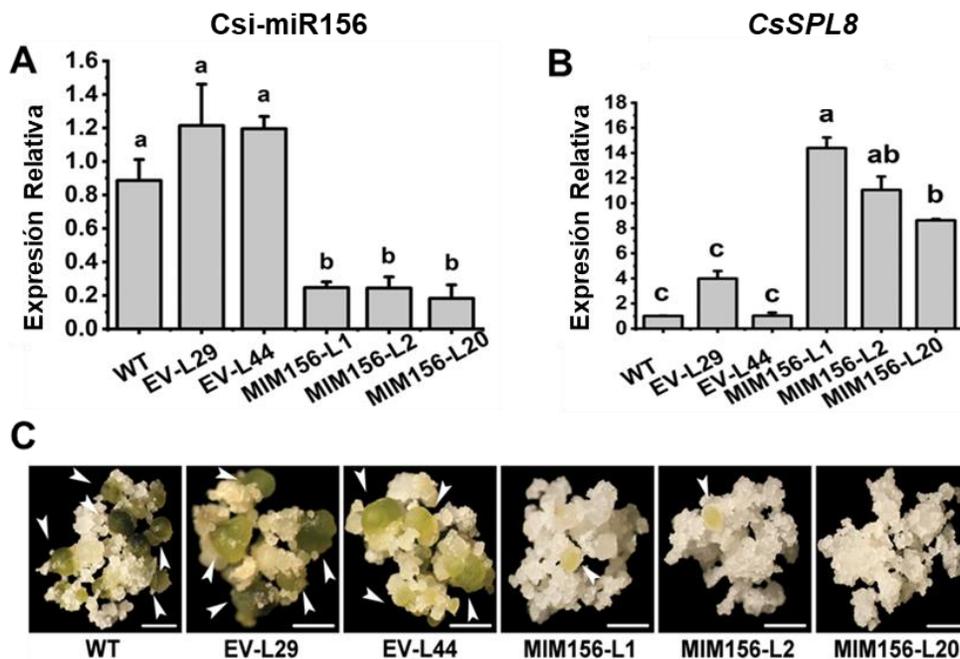


Figura 14. Supresión de la expresión de csi-miR156 en callo embriogénico de cítricos. (A) Nivel de expresión de csi-miR156a maduro en líneas WT (tipo silvestre), EV (vector vacío: EV-L29, L44) y STTM156 (MIM-L1, L2, L20) detectadas mediante qRT-PCR. **(B)** Nivel de expresión del mRNA blanco *CsSPL8*. Las columnas que no comparte al menos una letra minúscula difieren significativamente ($p < 0.01$). **(C)** Embriones somáticos formados a los 75 DDI. Las flechas blancas indican embriones somáticos. (modificado de Feng *et al.*, 2022)

3. Justificación

Los miRNA han emergido como moléculas reguladoras importantes en la embriogénesis somática (ES) en diferentes especies de plantas. En particular, ejercen una regulación negativa sobre factores de transcripción (TFs) que resultan clave en la transición de células somáticas a células embriogénicas y posteriormente a células diferenciadas. Los miRNAs han surgido como objetivos clave para dilucidar la respuesta a diferentes condiciones de desarrollo en la ES. Sin embargo, los estudios de funcionalidad para muchos miRNAs han tenido dificultades, debido a la existencia de varios miembros con funciones similares extendidos por distintas regiones intergénicas.

En la ES del maíz, se han reportado como relevantes a miR156 y miR528, relacionados con el desarrollo y la respuesta al estrés, respectivamente. El análisis sobre la acumulación de miR528 ha revelado su capacidad para regular a múltiples mRNAs blanco. Aún así, faltan estudios funcionales que sustenten los datos ya reportados. En las últimas décadas, se han desarrollado nuevas técnicas para el estudio de la función de los miRNAs. Las mímicas han surgido como tecnología eficiente para el secuestro de miRNAs provocando la pérdida de su función. Hasta el momento, no existe evidencia de construcción de mímicas para miR528 aplicadas al maíz. Mientras que, miR156 se ha probado en construcciones de mímicas para plantas de *Arabidopsis* y arroz con resultados prometedores. Asimismo, la secuencia de miR156 es altamente conservada entre diferentes especies de plantas, por lo que su uso será de gran utilidad como miRNA control, además de ser un regulador crucial en la regeneración de maíz mediante ES.

La tecnología llamada Short Tandem Target Mimic (STTM) puede dirigirse a miRNAs específicos para apagar su función sin afectar a otros miRNAs, y puede representar un paso crucial para comprender la función de estos transcritos. El valor de esta técnica radica en la captura de dos miRNAs iguales o diferentes por unidad de expresión, además de su estabilidad dentro de la célula por la formación de una estructura secundaria entre ambos imitadores del mRNA blanco. Para estudiar la relevancia de la regulación ejercida por miR528 y miR156 en el proceso de ES de maíz, en esta tesis se propuso apagar su función mediante STTM. Una vez optimizada la técnica en callo embriogénico podría usarse para estudiar diferentes miRNAs en la ES.

4. Hipótesis

Inhibir la función de miR528 y miR156 mediante secuestro por STTM en callo embriogénico de maíz, resultará en mayores niveles de sus mRNAs blanco *MATE/BIGE1* y *SBP23*, respectivamente, afectando el fenotipo de los callos.

5. Objetivo general

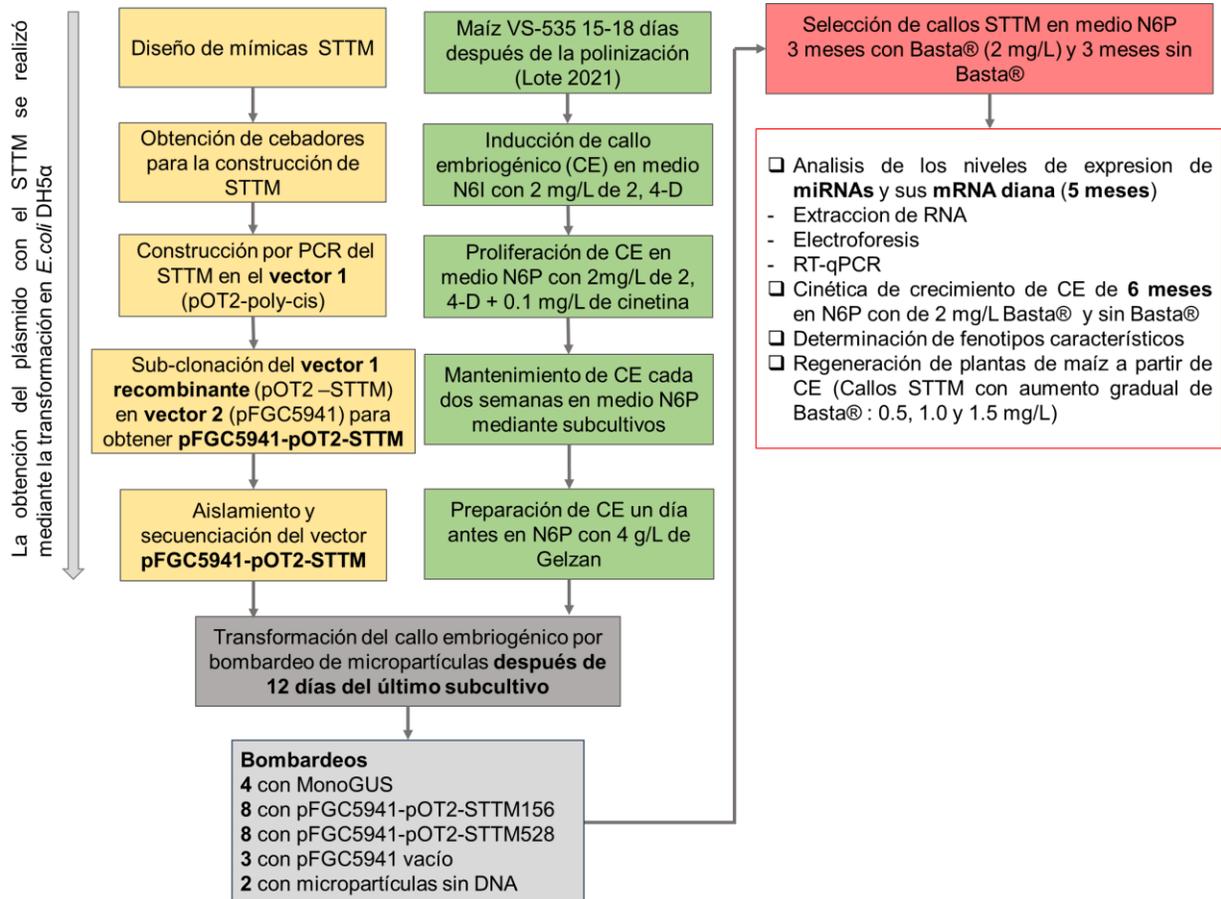
Diseñar, estandarizar y aplicar secuestradores de miR528 y miR156 para analizar el funcionamiento de estos miRNAs en callo embriogénico de maíz.

6. Objetivos específicos

- Diseñar y construir secuestradores a partir de mímicas para miR528 y miR156.
- Introducir los secuestradores de miR528 y miR156 en callos embriogénicos de maíz mediante transformación por biobalística.
- Evaluar la eficacia de cada secuestrador mediante los niveles de miRNAs y mRNAs blanco correspondientes.
- Observar la presencia de fenotipos distintivos de los callos transformados debido a la acción de las mímicas.

7. Materiales y métodos

La metodología general para llevar a cabo el objetivo del proyecto se realizó acorde al siguiente esquema de trabajo.



7.1 Material biológico

Todos los experimentos fueron realizados utilizando callo embriogénico (EC) de maíz (*Zea mays* L.), empleando VS-535, una variedad mexicana proveniente de la raza Tuxpeño. Esta variedad sintética (por sus siglas VS) es de interés comercial por su alta productividad, adaptación y resistencia a enfermedades (Juárez-González, 2015).

7.2. Inducción y proliferación de callo embriogénico

La inducción y proliferación de callos embriogénicos se realizó conforme a los protocolos establecidos por (Chávez-Hernández *et al.*, 2015; Juárez-González *et al.*, 2019; López-Ruiz *et al.*, 2019; Luján-Soto *et al.*, 2021). Los embriones inmaduros fueron obtenidos a partir de mazorca de 15-18 días después de la polinización. Las mazorcas fueron desinfectadas para extraer los embriones con ayuda de material estéril dentro de una campana de flujo laminar. Los embriones se colocaron en medio de inducción N6I con 2 mg L⁻¹ de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Ver Anexos Tabla S2) por dos semanas. Cada 2 semanas, los callos se subcultivaron en medio N6P fresco adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.1 mg L⁻¹ de cinetina y 0.3mg L⁻¹ de benciladenina para la proliferación de EC (BA, Ver Anexos Tabla S2 y S3). El EC utilizado fue del lote 2021 de 14 meses de edad, de donde se tomaron muestras para la transformación por biobalística (Ver punto 8.1).

7.3 Diseño de STTM para miR156 y miR528

Para el diseño de los STTM, la clonación de estos en el vector pOT2-poly-cis, así como la subclonación en pFGC5941, se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos por Tang *et al.* (2012) y Teotia and Tang (2017) con algunas modificaciones.

En maíz, se han reportado doce genes miembros de la familia miR156: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k y l, y dos genes para miR528: a y b. Las secuencias del miRNA maduro a partir de estos genes fueron obtenidas de la base de datos miRBase (<https://www.mirbase.org/>; versión 22.1):

zma-miR156a 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156b 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156c 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156d 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156e 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156f 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156g 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156h 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156i 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'
zma-miR156j 5' UGACAGAAGAGAGAGAGAGCACACA 3'

zma-miR156k 5' UGACAGAAGAGAGCGAGCAC 3'
zma-miR156l 5' UGACAGAAGAGAGUGAGCAC 3'

zma-miR528a 5' UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG 3'
zma-miR528b 5' UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG 3'

En el caso de miR156, la mayoría de sus miembros presentan 20 nt iguales, con excepción de zma-miR156j y zma-miR156k, los cuales difieren en el nucleótido catorce. Además de estas diferencias, zma-miR156j presenta una adenina adicional al final de la secuencia en el extremo 3'. Las diferencias en estos nucleótidos no resultan críticas, ya que se localizan fuera de la región semilla, donde fueron insertados tres nucleótidos no complementarios para formar un bucle que evitará la escisión del miRNA. Alternativamente, un sitio de unión para miR156 puede dirigirse a la secuencia derivada de los once miembros y el otro al miRNA derivado de zma-miR156j o k, lo cual no fue necesario debido a la alta similitud entre las secuencias. Para el diseño del STTM de miR156 se utilizó la secuencia idéntica en 10 miembros de esta familia, es decir zma-miR156a, b, c, d, e, f, g, h, i, y l. En el caso de miR528, los dos miembros de la familia son iguales y el STTM estará dirigido contra el miR528 producido a partir de los genes a y b. Las secuencias para el sitio de unión de miR156 y miR528 en el STTM deben ser complementarias a ellas. Por lo cual, las secuencias quedan de la siguiente manera:

Anti-miR156: 5'-GUGCUCACUCUCUUCUGUCA-3'
Anti-miR528: 5'-CUCCUCUGCAUGCCCCUCCA-3'

Para hacer que los sitios de unión del STTM sean resistentes a la escisión por parte de miR156 y miR528, se introdujo una protuberancia de tres nucleótidos en la región de escisión por Argonauta, entre las posiciones complementarias 10 y 11 de los miR156 y miR528 maduros. Se utilizó CUA como desapareamiento, ya que corresponde a la mímica de miR399 en el IPS1 de *Arabidopsis* (señuelo natural; Wong and Millar, 2019). Tras añadir CUA como protuberancia para evitar el apareamiento perfecto con el miRNA y su escisión, las secuencias de unión serían las siguientes:

Anti-miR156: 5'-GUGCUCACUCcuaUCUUCUGUCA-3'
Anti-miR528: 5'-CUCCUCUGCAUcuaGCCCCUCCA-3'

Las secuencias de RNA se convirtieron a ADN por duplicado, siendo estas 5'-GTGCTCACTCctaTCTTCTGTCA-3' y 5'-CTCCTCTGCATctaGCCCCTTCCA-3'. Los duplicados de cada secuencia fueron separados por un espaciador de 48 nt que contiene un sitio de restricción SwaI (ATTTAAAT) en el centro, formando los fragmentos STTM que se muestran a continuación.

Construcción STTM-miR156

5'-GTGCTCACTCctaTCTTCTGTCAgttggtggtggtatggtctaATTTAAATatggtctaaagaagaagaatGTGCTCACTCctaTCTTCTGTCA-3'

Construcción STTM-miR528

5'-CTCCTCTGCATctaGCCCCTTCCAgttggtggtggtatggtctaATTTAAATatggtctaaagaagaagaatCTCCTCTGCATctaGCCCCTTCCA-3'

7.4. Diseño de cebadores para la clonación de STTM en el vector pOT2-poly-cis

Los STTM diseñados incluyeron en su región 5' a 25 nucleótidos correspondientes al extremo 3' del promotor fuerte del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), seguidos del sitio de corte para HindIII. En el extremo 3', se incluyeron a 25 nucleótidos correspondientes al extremo 5' del terminador viral T-35S precedidos por el sitio de corte para EcoRI, tal como se ilustra a continuación. De esta manera el tamaño correspondiente al STTM es de 144 pb para miR156 y 146 pb para miR528.

STTM-miR156 final

5'-catttgagaggacagcccAAGCTTGTGCTCACTCctaTCTTCTGTCAgttggtggtggtatggtctaATTTAAATatggtctaaagaagaagaagaatGTGCTCACTCctaTCTTCTGTCAGAATTCggtacgctgaaatcaccag-3'

STTM-miR528 final

5'-catttgagaggacagcccAAGCTTCTCCTCTGCATctaGCCCCTTCCAgttggtggtggtatggtctaATTTAAATatggtctaaagaagaagaagaatCTCCTCTGCATctaGCCCCTTCCAAGATTCggtacgctgaaatcaccag-3'

7.5. Activación de vectores pOT2-Poly-Cis y pFGC5941-Pacl

Los plásmidos pOT2-Poly-Cis y pFGC5941-Pacl (Anexos Figuras S6 y S7) fueron adquiridos a través de Addgene. A su llegada se resuspendieron según las indicaciones del proveedor para transformar células competentes de *E.coli* DH5 α . A partir de las bacterias transformadas, los plásmidos fueron aislados y se cuantificaron por NanoDrop. Adicionalmente, fueron caracterizados mediante digestión enzimática y electroforesis. Los procedimientos utilizados fueron a partir de protocolos ya estandarizados del laboratorio.

7.6. Construcción del STTM en el vector pOT2-Poly-Cis por PCR

Inicialmente, se realizó la clonación del STTM en el vector pOT2-poly-cis, seguido de una subclonación posterior en el vector pFGC5941. El procedimiento de clonación se describe a continuación.

1. Empleando el plásmido pOT2-Poly-cis como molde junto con los cebadores del STTM (STTM528-F/R y STTM156-F/R), se amplificaron las secuencias pOT2-STTM528 y pOT2-STTM156, respectivamente. (Figura 15a). Las condiciones de amplificación se ajustaron para la enzima KAPA Taq Ready mix (Biosystems). La mezcla de reacción fue preparada en un volumen total de 25 μ L, conteniendo 1X de KAPA; 0.5 μ L de cada nucleótido (10 μ M) y 1 μ L de DNA plasmídico (entre 10-100 ng/ μ L). En seguida, la mezcla fue sometida al siguiente programa de termociclador: 95 $^{\circ}$ C, 3 min; [95 $^{\circ}$ C, 30s; 56 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1min 30s (30 ciclos)]; 72 $^{\circ}$ C, 7 min.
2. Transcurrido el tiempo de amplificación, el producto de PCR (~3200 bp) fue verificado en gel de agarosa al 0.8% para su posterior purificación por columna (Promega), de este modo se eliminaron la Taq DNA polimerasa, los cebadores y las sales según el protocolo del fabricante.
3. El producto de PCR fue digerido con Swal en un volumen final de 50 μ L de reacción a 25 $^{\circ}$ C durante 4h. La mezcla de reacción contenía 15 μ L de DNA (pOT2-

STTM528 = 208 ng/μL y pOT2-STTM156 = 124.2 ng/μL); 5 μL de Buffer (10X); y un 1 μL de enzima (10 U/ μL). A continuación, la enzima Swal se inactivó a 70 °C durante 10 min y se pasó de nuevo por la columna Promega.

4. Se tomaron 15 μL del producto digerido para la reacción de ligación con 1 μL de ADN ligasa T4 y 10X de NEB Buffer 3 en un volumen final de 50 μL. La reacción se mantuvo a 16 °C durante una noche para obtener el plásmido ligado pOT2-STTM (Figura 15b).
5. El plásmido pOT2-STTM fue transformado en una cepa químicamente competente (*Escherichia coli* DH5α) mediante choque térmico a 42 °C. Las células transformadas se seleccionaron a partir de placas de agar LB suplementado con 30 μg/ml de cloranfenicol.
6. El plásmido recuperado de las células transformadas, se amplificó por PCR en una reacción de 25 μl, utilizando cebadores Ori-Pacl-F/R (Tabla 2) con las siguientes condiciones de termociclador: 95 °C, 3 min; [95 °C, 30s; 60 °C, 30s; 72 °C, 1min 30s (30 ciclos)]; 72 °C, 7 min. Tras esta PCR se eliminó el "Origen de replicación" del vector pOT2-STTM, dando lugar a un producto de 2846 pb que tiene sitios Pacl en ambos extremos (Figura 15b; flecha inferior).
7. El producto de PCR se digirió con Swal para comprobar la presencia de la secuencia correspondiente, formando dos productos: uno de ~1 kb y otro de aproximadamente ~2 kb. Debido a que el vector original pOT2 Poly-Cis carece del sitio de restricción Swal, no puede ser digerido. En consecuencia, se genera un producto de aproximadamente 3 kb.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la supresión del origen de replicación en pOT2-STTM.

Oligo	Secuencia
Ori-Pacl-F	5'-CCCTTAATTAAGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCG-3'
Ori-Pacl-R	5'-TCCCTTAATTAAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAG3-3'

7.7. Subclonación en el vector binario pFGC5941-Pacl

En el proceso anterior (punto 7.6), la reacción de PCR con cebadores Ori-Pacl-F/R, eliminó el “origen de la replicación” del plásmido recombinante pOT2-STTM. La secuencia amplificada contiene el promotor CaMV d35S junto con el STTM, el terminador 35S y el marcador de selección CamR, que se subclonó en el vector binario pFGC5941 mediante el sitio Pacl único (Figura 15c). El procedimiento se describe a continuación.

1. Se mezclaron 20 μ L del producto de la PCR (amplificación con Ori-Pacl-F/R o casete 2x35S-STTM-CamR-Pacl) con 500 ng del vector pFGC5941. A continuación, la mezcla fue digerida con 1 μ L de la enzima Pacl y 10X de NEB Buffer 1 en 50 μ L de volumen final de reacción y se incubó durante 4 h a 37 °C. En seguida, la enzima Pacl fue inactivada a 65 °C durante 20 min.
2. La mezcla de reacción se purificó mediante columna (Promega) para obtener el plásmido y el producto de PCR digeridos. De esta mezcla se tomaron 26 μ L para preparar un volumen de reacción de 30 μ L, añadiendo 1 μ L de DNA ligasa T4 y 3 μ L de buffer de ligación 10X. La mezcla de reacción se incubó a 16 °C durante la noche.
3. El producto de ligación se transformó en la cepa de *E.coli* DH5 α y se sembraron en placa de agar LB con kanamicina (50 mg/mL) y Cloranfenicol (30 mg/mL) para examinar las colonias recombinantes pFGC5941-pOT2-STTM. La resistencia a kanamicina proviene del vector pFGC5941-Pacl y cloranfenicol proviene del producto de PCR pOT2-STTM sin el origen de replicación. La posibilidad de obtener falsos positivos en las colonias se elimina mediante la doble selección.
4. Los plásmidos recombinantes fueron aislados de colonias positivas y se digirieron con la enzima Pacl. La construcción correcta produjo dos bandas de ADN en el gel de agarosa (una de unos ~8,6 kb y la otra de unos ~2,8 kb).
5. Se verificó mediante la secuenciación del ADN, la construcción exitosa de los plásmidos pFGC5941-pOT2-STTM156 y pFGC5941-pOT2-STTM528, utilizando los cebadores STTM-common-real-F (**5'-catttggagaggacagcccaag-3'**) y STTM-

common-real-R (5'-ctggtgatttcagcgtaccgaa-3'). La secuenciación fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

- Se realizó la purificación de los plásmidos secuenciados mediante el protocolo del Kit Miniprep de Promega. Esto debido a los requerimientos de una alta concentración y buena calidad del DNA necesarios para la transformación.

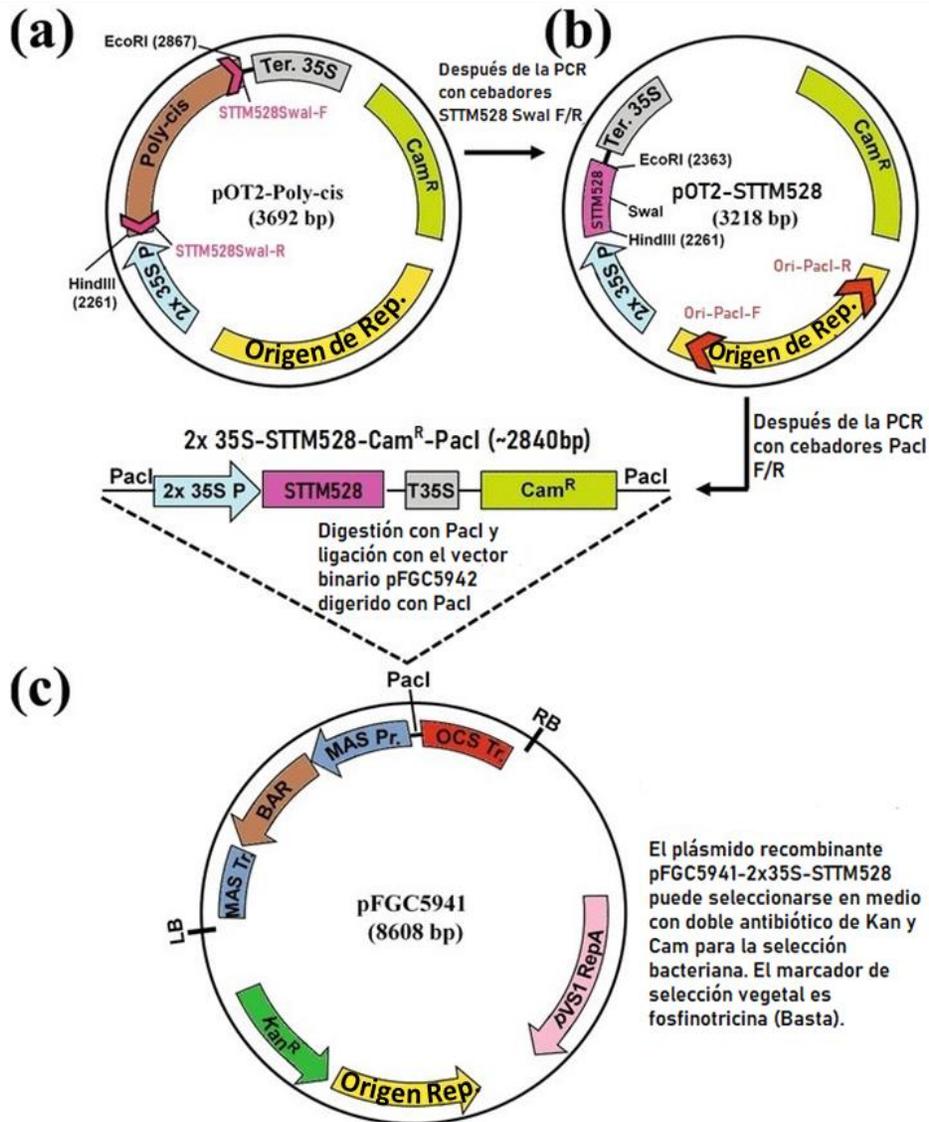


Figura 15. Vectores utilizados para la inducción de STTM528 en plantas. (a) Vector pOT2-poly-cis con sitios de unión de cebadores STTM528Swal-F/R en terminador 2x 35S y promotor, respectivamente. **(b)** vector pOT2 con el sitio Poly-Cis sustituido por la construcción STTM528 (en rosa) y cebadores Ori-Pacl-del-F/R para eliminar el origen de replicación y crear el sitio Pacl. **(c)** vector pFGC5941 con sitio de restricción Pacl para la subclonación del casete 2x 35S-STTM528-Cam^R-Pacl de ~2840bp (Modificado de Teotia and Tang, 2017).

7.8. Bombardeo de callos embriogénicos de maíz

La preparación de partículas de tungsteno y la adsorción del DNA plasmídico a las micropartículas, se realizó de acuerdo con protocolos establecidos por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Química de la UNAM.

En los primeros ensayos, se realizaron cuatro bombardeos con el plásmido MonoGUS, el cual incluye una doble copia del promotor 35S, gen reportero GUS, marcador de selección a penicilina y terminador de nopalina (Nos). Con esta prueba se estandarizó el protocolo mediante la actividad β -glucoronidasa. En el caso de los plásmidos pOT2-pFGC5941-STTM156 y pOT2-pFGC5941-STTM528 se hicieron ocho bombardeos para cada uno. También, se incluyeron controles negativos de tres bombardeos con pFGC5941 (plásmido sin STTM, pero con resistencia a Basta®), y tres bombardeos con micropartículas sin plásmido. Para el bombardeo se tomaron callos embriogénicos de 12 días después del subcultivo y fueron colocados un día antes en cajas Petri de 50 mm x 17 mm con 15 mL de medio de proliferación N6P (ver Anexos Tabla S2). Se colocó 1 g de callo embriogénico en 1 cm de diámetro por 3 mm de espesor en el centro de la caja Petri. Se tomaron 6 μ l de las balas (0.4 μ m) recubiertas con DNA plasmídico y se colocaron en el centro del filtro del bombardeo (ver detalles en Anexos). El bombardeo fue realizado a una presión de helio de 120 psi, una distancia de 13 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de 20-22 in de Hg. Las cajas Petri con los callos bombardeados fueron sellados e incubados a temperatura controlada de $25\pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz ($29 \mu\text{em/s}^2$) y 8 horas oscuridad.

7.9 Selección de callos transformados con glufosinato de amonio (Basta®)

Los callos bombardeados permanecieron en medio de proliferación N6P (ver Anexos Tabla S2) durante una semana para su recuperación. Una vez transcurrido este periodo, fueron colocados en medio N6P + 2mg L^{-1} de Basta® para la selección de células transformadas. Los callos se subcultivaron en medio nuevo cada dos semanas y se mantuvieron en incubación a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h

luz ($29 \mu\text{em/s}^2$) y 8 h oscuridad. Los subcultivos en medio N6P con 2 mg L^{-1} de Basta® se llevaron a cabo durante 3 meses.

7.10. Expresión transitoria

Dos y siete días después del bombardeo se tomaron algunas fracciones de callo bombardeado con MonoGUS así como el control negativo (callo bombardeado solo con balas), para realizar la prueba de expresión transitoria por el método histoquímico de la actividad de β -glucoronidasa (Cervera, 2005).

La expresión transitoria se llevó a cabo de la siguiente forma: en condiciones de esterilidad se colocaron fracciones de callos bombardeados en una placa de pocillos múltiples. Enseguida, se añadió un volumen generoso de la solución X-gluc (ver preparación en Anexos) según el tamaño de la muestra, y se infiltró durante 5 min para mejorar la penetración del sustrato. Se cubrió la placa con Parafilm para evitar la evaporación durante la incubación. Después, la placa se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en un máximo de 18 h. Al término del tiempo, la placa fue destapada y se eliminó cuidadosamente la solución de sustrato con una micropipeta. Por último, la muestra fue lavada tres veces con Tris-HCl $0,1 \text{ M}$, pH 7,0, y secada para observarla en el microscopio estereoscópico.

7.11. Extracción, purificación y fraccionamiento de RNA de callo embriogénico

Las muestras de tejido se pulverizaron en morteros estériles con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se transfirió rápidamente a microtubos estériles de 1.5 mL y se agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, los tubos se centrifugaron a $12,000g$ durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se recuperó sin tocar la interfaz y se transfirió a tubos nuevos de 1.5 mL. Se añadieron $200 \mu\text{L}$ de CHCl_3 y se agitaron vigorosamente usando vortex. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos y luego se centrifugaron a $12,000 \text{ g}$ durante 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a nuevos tubos y se añadieron $500 \mu\text{L}$ de isopropanol frío. La mezcla se agitó lentamente por inversión

y se incubó durante 15 minutos a -20°C. Después, los tubos se centrifugaron a 12,000 g durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pellets de RNA con 1 mL de etanol al 75%. Luego, los tubos se centrifugaron a 7,500 g durante 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación. Los pellets se secaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y el RNA se resuspendió en 50 µL de H₂O DEPC. Cada muestra se trató con Dnasa I (Zymo Research) durante 15 minutos a 37°C para eliminar rastros de DNA genómico. Se purificaron y fraccionaron las muestras en RNA largos (>200 nt) y pequeños (<200 nt) utilizando el kit comercial RNA Clean and Concentrator (Zymo Reserch) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.12. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA a partir de RNA pequeños, se realizó usando el sistema *Improm-II Reverse Transcription system* (promega) y el stem-loop de dos sRNAs: miR156 (López-Ruiz *et al.*, 2019b), miR528 (Luján-Soto *et al.*, 2021) y el gen de referencia U6 en la misma mezcla de reacción. El cDNA se sintetizó a partir de 250 ng de RNAs pequeños para cada línea de callo transformado, callo con pFGC5941 vacío y callo no transformado (WT). El método empleado fue el de síntesis Multiplex de cDNA para miRNAs por RT-stem-loop con reacción de pulsada (Kramer, 2011). Por otro lado, la síntesis de cDNA de RNAs largos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) usando oligo d(T) con el sistema *Improm-II Reverse Transcription system* (Promega). El cDNA se sintetizó a partir de 1000 ng de RNAs largos para cada muestra de tejido antes mencionado.

7.13. Cuantificación por RT-qPCR de miR528, miR156 y sus transcritos diana

Las reacciones de qPCR se realizaron usando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher) en un termociclador 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). La determinación de los miRNAs maduros fue a partir de 250 ng de cDNA proveniente de RNAs pequeños, mientras la medición de los transcritos diana se llevó a cabo utilizando 250 ng de cDNA proveniente de RNAs largos. La acumulación

de cada transcrito se reportó como expresión relativa usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como normalizador a *U6 snRNA* para los miRNAs maduros o *RAPTOR* y *18S rRNA* para mRNAs blanco. Los resultados obtenidos para cada callo transformado con los STTM, se analizaron utilizando un ANOVA unidireccional con una prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey en GraphPad Prism para determinar su significancia.

7.14. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos transformados con STTM

La evaluación se llevó a cabo mediante dos ensayos distintos. En el primero, se colocaron 0.5 gramos de callo embriogénico en medio N6P con 2 mg L^{-1} de Basta®, mientras en el segundo, los callos se subcultivaron en medio N6P sin Basta®. Las pruebas de crecimiento se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Jiménez (2006). Se analizaron dos muestras de callos transformados con el STTM, un callo transformado con el vector vacío (PV) y callo no transformado (WT), con tres réplicas técnicas para cada muestra. Los datos se analizaron mediante Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de Games-Howell en SPSS Statistics para determinar su significancia.

7.15. Generación de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos transformados con STTM

Para lograr la regeneración de plantas a partir de callos mutantes, se utilizó el procedimiento detallado por López-Ruiz *et al.* (2019b) con algunas modificaciones. El proceso consistió en tres cambios de medios de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad. En el primer subcultivo, se utilizó medio N6P con 0.5 mg L^{-1} de Basta® y 2,4-D reducido a la mitad (1 mg L^{-1}). Después de tres semanas, los callos fueron subcultivados en medio N6P con 1 mg L^{-1} de Basta® y sin 2,4-D (segundo cambio). Para el tercer cambio, las estructuras regenerativas se subcultivaron 2 veces en medio MS (Murashige & Skoog; Tabla S3) con 1.5 mg L^{-1} y 2 mg L^{-1} de Basta®, respectivamente. Los subcultivos en MS se hicieron cada tres semanas hasta formar plántulas completas. En el caso de regeneración a partir de callo silvestre, se realizó de la misma forma antes mencionada, pero sin adición de Basta®. La etapa de regeneración se llevó a cabo en 6 muestras biológicas distintas con tres repeticiones cada una.

8. Resultados

8.1. Construcción de STTM156 y STTM528 en pOT2-Poly-Cis por PCR

El diseño de dos cebadores con la mitad del STTM más 25 nucleótidos complementarios al promotor y terminador 35S del vector pOT2-poly-cis, permitió sustituir el sitio poly-cis por el STTM mediante PCR (Figura 16). El fragmento de amplificación del vector resultante (pOT2-STTM) debe ser de ~3218. En los carriles 1 y 2 del panel A y en los carriles 1, 2 y 3 del panel B se muestra la amplificación de STTM156 y STTM528, respectivamente. Los resultados de amplificación fueron comparados con el DNA plasmídico lineal de pTO2-poly-cis (~3692 bp), el cual es ligeramente más grande por la presencia del sitio poly-cis en lugar del STTM (carril 4 en A y carril 5 en B).

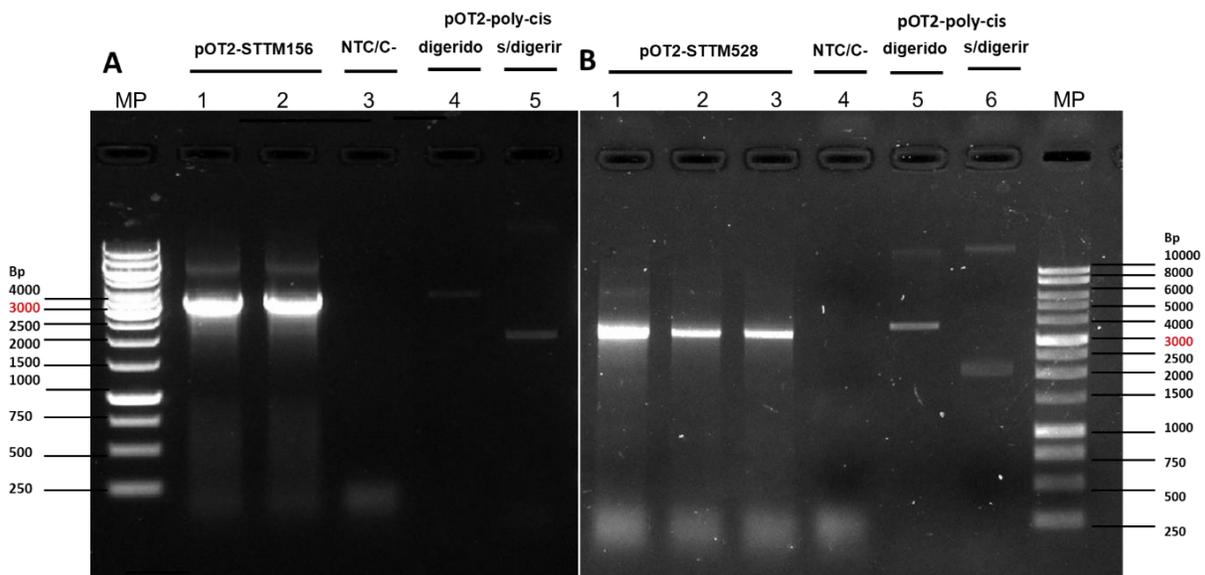


Figura 16. Construcción de pOT2-STTM mediante PCR. (A) pOT2-STTM156: carriles 1, 2) amplificación de STTM156 (10 ng/ μ L de DNA plasmídico); 3) control negativo; 4) plásmido pOT2-poly-cis digerido con enzima KpnI; y 5) plásmido pOT2-poly-cis sin digerir. (MP) Marcador utilizado GeneRuler 1Kb Ladder Thermo Fisher. **(B)** pOT2-STTM528: carriles 1, 2 y 3) amplificación de STTM528 (100 ng/ μ L de DNA plasmídico); 4) control negativo; 5) plásmido pOT2-poly-cis digerido con enzima KpnI; y 6) plásmido pOT2-poly-cis sin digerir. (MP) Marcador utilizado 1Kb DNA Ladder Promega.

En el siguiente paso, el producto de pOT2-STTM fue digerido con la enzima *Swa*I y ligado con DNA ligasa T4 para obtener el plásmido en forma circularizada. El plásmido resultante se transfirió a células competentes de *E. coli* DH5 α para su replicación. Las

colonias de *E. coli* con el plásmido pOT2-STTM seleccionadas mediante cloranfenicol, se sometieron a PCR con oligos Ori-PacI-F/R para eliminar el origen de replicación. El producto de PCR que contenía al plásmido sin el origen de restricción (forma lineal), se digirió con la enzima *SwaI* para asegurar la presencia del STTM (Figura 17).

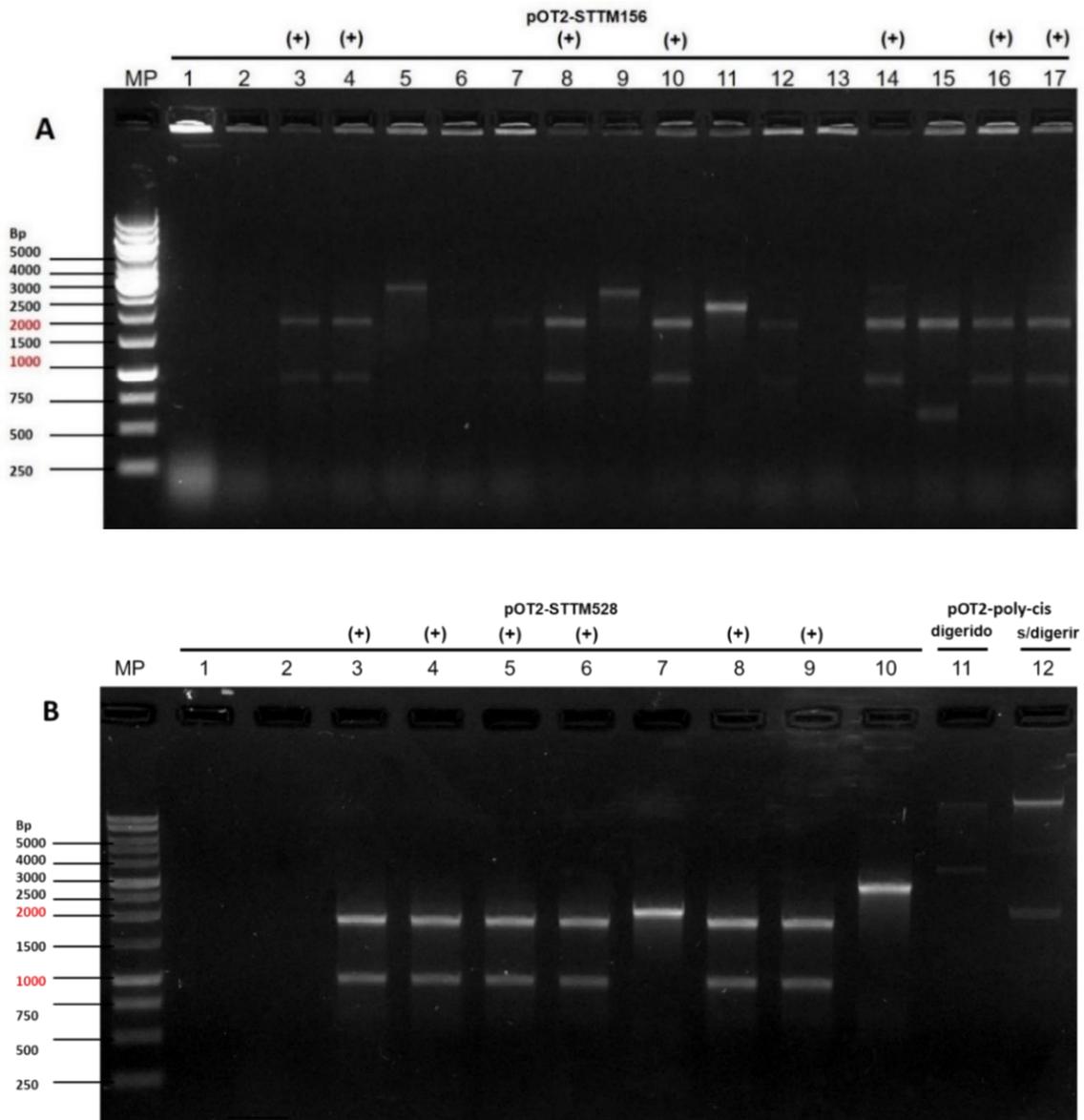


Figura 17. Electroforesis de la digestión de pOT2-STTM sin origen de replicación. (A) pOT2-STTM156 sin origen de replicación (Producto de PCR con oligos PacI), digerido con *SwaI*: carriles con signo (+) digestión exitosa. (MP) Marcador utilizado GeneRuler 1Kb Ladder Thermo Fisher. **(B)** pOT2-STTM528 sin origen de replicación (Producto de PCR con oligos PacI), digerido con *SwaI*: carriles con signo (+) presentaron digestión exitosa; 11) plásmido pOT2-poly-cis digerido con la enzima *KpnI*; 12) plásmidos pOT2-poly-cis sin digerir. (MP) Marcador utilizado 1Kb DNA Ladder Promega.

La presencia del sitio de restricción *SwaI* en el espaciador del STTM y no en el plásmido, permitió seleccionar aquellas muestras de PCR que contenían el plásmido con la mímica mediante su digestión en dos fragmentos. El producto de amplificación de pOT2-STTM sin el origen de replicación debe tener un tamaño de ~3000bp. Al digerir esta secuencia con la enzima *SwaI* se generaron dos fragmentos de ~1000 y ~2000 bp. En la figura 17A, los carriles 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 y 17 muestran la digestión con la enzima *SwaI*, pero solo los productos de PCR 3, 4, 8, 10, 14, 16 y 17 indican una digestión clara debido a la cantidad de DNA. Las bandas de los carriles 5 y 9 muestran la presencia del plásmido molde donde se generó la mímica, es decir, pOT2-Poly-Cis sin el sitio de replicación. En los carriles 1, 2 y 13 no hubo digestión por falta de fragmentos amplificados, esto debido al exceso de material orgánico celular. Por otra parte, en el panel B, los carriles 3,4, 5, 6, 8 y 9 muestran la digestión de pOT2-STTM528 sin el origen de replicación, formando dos fragmentos del tamaño antes mencionado. Adicionalmente, se incluyó el plásmido molde en su forma lineal (carril 11), mostrando un mayor tamaño que pOT2-poly-cis sin origen de replicación. Las pruebas de digestión con la enzima *SwaI* del producto de PCR con oligos *PacI*, confirmaron la clonación del STTM en el primer vector.

En el paso anterior, el volumen de la reacción de PCR con oligos *PacI* fue de 25 μ L, ocupando 5 μ L para la digestión con *SwaI* y 20 μ L para la subclonación. El PCR sin digerir de las muestras 4, 10 y 17 de la figura 17A y las muestras 3, 4, y 5 de la figura 17B fueron subclonadas en el vector PFGC5941. El producto de PCR fue mezclado junto con el vector PFGC5941 y digerido con la enzima *PacI*. La enzima de restricción fue inactivada y el producto fue circularizado con T4 ligasa para formar pOT2-pFGC5941-STTM156 y pOT2-pFGC5941-STTM528, respectivamente. Los plásmidos resultantes se transformaron en *E. coli* DH5 α para su propagación y selección en medio con cloranfenicol y kanamicina. Después de la selección, los plásmidos fueron digeridos con *PacI*, donde se formaron dos fragmentos de ~2840 (inserto) y ~8608 bp (vector binario). Los resultados se indican en los carriles del 1 al 5 de la figura 18A, así como en los carriles del 1 al 5 de la figura 18B, confirmando la construcción exitosa mediante la formación de dos fragmentos con el tamaño antes mencionado. También, se incluyeron los plásmidos pFGC5941 y pOT2-pFGC5941-STTM528 en su forma lineal como controles en el carril 6 y 9 de la figura 24A.

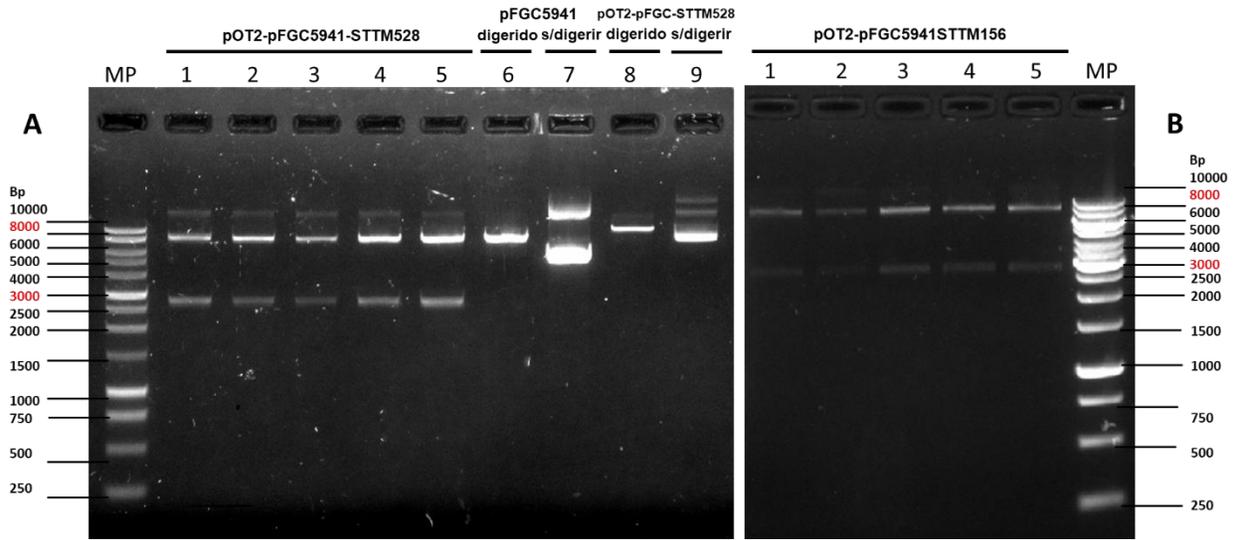


Figura 18. Electroforesis de la digestión de pOT2-pFGC5941-STTM con Pacl. (A) pFGC5941-STTM528 digerido con enzima Pacl: carriles 1-5) digestión exitosa; car 6) plásmido pFGC5941 digerido con enzima Pacl; 7) plásmido pFGC5941 sin digerir; 8) vector recombinante pOT2-pFGC5941-STTM digerido con Swal; y carril 9) pOT2-pFGC5941-STTM sin digerir (MP) Marcador utilizado 1Kb DNA Ladder Promega. (B) pOT2-pFGC5941-STTM156 digerido con enzima Pacl: carriles 1-5) digestión exitosa. (MP) Marcador utilizado GeneRuler 1Kb Ladder Thermo Fisher.

8.3. Secuenciación de los vectores pOT2-pFGC5941-STTM156 y pOT2-pFGC5941-STTM528

Una vez confirmada la construcción de pOT2-pFGC5941-STTM156 y pOT2-pFGC5941-STTM528, los plásmidos de tres colonias fueron purificados y secuenciados. El resultado fue analizado en el programa BioEdit 7.2 para revisar que no hubieran mutaciones como consecuencia de la construcción por PCR y la expresión en bacterias. Aunque hubo algunos cambios en la secuencia, ninguno de estos afectó el promotor 35S, caja TATA, STTM o el terminador que son esenciales para la expresión de la mímica en la célula objetivo. Para el análisis, la secuencia poly-cis fue sustituida por el STTM156 y el STTM258 en pOT2-poly-cis, esto con ayuda del programa SnapGene. En el siguiente paso, las secuencias analizadas en BioEdit fueron alineadas para formar un consenso entre los productos directo y reverso de la secuenciación. El consenso se alineó con la secuencia *in silico* de SnapGene para cada STTM. El alineamiento de cada consenso con la secuencia *in silico* se realizó en la página Clustal Omega<Multiple Sequence

Alignment<EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> consultada al día 08 de octubre del 2022). Al término del análisis se escogió el plásmido de la clona con menos cambios e inserción correcta del STTM (Figuras 19 y 20) para transformar callos embriogénicos de maíz.

>STTM156_Colonia4

TCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGG
TGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGGAAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCC
GACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTT
CCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG
CACAATCCCGCCCCTACTCCAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTAT
TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATTTTCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTACC
TGTCACCTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCG
ATAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
ATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGA
CCCTTCCTCTATAATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACAGCCCAGCTTGTGCTCAC
TCctaTCTTCTGTCAGTTGTTGTTGTTATGGTCTAATTTAAATATGGTCTAAAGAAGAAGAATG
TGCTCACTCctaTCTTCTGTCAGAATTCGGTACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAATC
TATCTCTCTCTATTTTCTCCATAAATAATGTGTGAGTAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGG
TTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTG
TAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTACTAAAATCCAGA
TCTCCTAAAGTCCCTATAGATCTTTGTCGTGAATATAAACCAGACACGAGACGACTAACCTG
GAGCCCAGACGCCGTTTGAAGCTAGAAGTACCGCTTAGGCAGGAGGCCGTTAGGGAAAA
GATGCTAAGGCAGGGTTGGTTACGTTGACTCCCCGTAGGTTTGGTTTAAATATGATGAAG
TGGACGGAAGGAAGGAGGAAGACAAGGAAGGATAAGGTTGCAGGCCCTGTGCAAGGTAA
GAAGATGGAAATTTGATAGAGGTACGCTACTATACTTATACTATACTGCTAAGGGAATGATTG
TATTTATACCCTATACCCCCTAATAACCCCTTATCAATTTAAGAAATAATCCGCATAAGCCCC
CGCTTAAAAATTGGTATCAGAGCCATGAATAGGTCTATGACCAAAACTCA

Figura 19. Secuencia consenso de plásmido con STTM156. En azul = STTM156, amarillo= promotor CaMv 35S, verde= terminador, minúsculas en rojo= nucleótidos cambiados en secuenciación y mayúsculas en rojo= caja TATA.

>STTM528_Colonia11

CTCCTCGGATTCCATiGCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTaGAAAAGGAAG
GTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGgaAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCC
GACAGTGGTCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGaAAAAGAAGACGTTC
CaACCACGTCTTCAAAGAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA
CAATCCCaCCCCTACTCCAAAATGTCAAAGATACaGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGA
GACTTTTCAACAAAGGGTAATTTTCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTAICTGTC
ACiTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATiGCGATAAA
GGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCC
ACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGACATCTCCACTGACgTAAGGGATGACGCACAAiCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCC
TCTATAAAGGAAGTTCATTTcATTTGGAGAGGACAGCCCAAGCTTCTCCTCTGCATctaGCC
CCTTCCAGTTGTTGTTGTTATGGTCTAATTTAAATATGGTCTAAAGAAGAAGAATCTCCTCT
GCATctaGCCCCCTCCAGAATTCGGTACGCTGAAATCACCAAGTCTCTCTCTACAAATCTATCT
CTCTCTATTTTCTCCATAAATAATGTGTGAGTAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTTCTT
ATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGtATGTATTTGTATiTGTA AAAAT
ACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCTCCT
AAAGTCCCTATAGATCTTTGTCGTGAATATAAACCAGACACGAGACGACTAaACCTGGAGC
CCAGACGCCGTTCGAAGCTAGAAGTACCGCTTAGGCAGGAGGCCGTTAGGGAAAAGATGC
TAAGGCAGGGTTGGTTACGTTGACTCCCCCGTAGGTTTGGTTTAAATATGATGAAGTGGAC
GGAAGGAAGGAGGAAGACAAGGAAGGATAAGGTTGCAGGCCCTGTGCAAGGTAAGAAGA
TGGAATTTGATAGAGGTACGCTACTATACTTATACTATACGCTAAGGGAATGcTTGTATTTA
TACCCTATACCCCCTAATAACCCCTTATCAATTTAAGAAATAATCCGCATAAGCCCCCGCTT
AAAATTGGTATCAGAGCCATGAATAGGTCTATGACCAAAACTCA

Figura 20. Secuencia consenso de plásmido con STTM528. En azul = STTM528, amarillo= promotor CaMv 35S, verde= terminador, minúsculas en rojo= nucleótidos cambiados en secuenciación y mayúsculas en rojo= caja TATA.

8.4. Análisis fenotípico del callo embriogénico de maíz transformado con STTMs mediante biobalística

En las pruebas iniciales, los bombardeos se hicieron con el plásmido MonoGUS, usado como control positivo para visualizar la transformación del callo embriogénico (Figura 21). Este plásmido contiene un sistema de expresión transitoria del gen reportero

GUS a diferencia de los vectores con STTM156 y STTM528, los cuales contienen genes de resistencia a Basta®. El bombardeo con MonoGUS se hizo en cuatro réplicas con muestra de callo, de las cuales, todas presentaron la actividad de β -glucuronidasa a las 48 h (figura 21 b-e, flechas azules). A este tiempo, se observaron puntos de color índigo en el lugar de impacto de la bala. Al cabo de siete días, se realizó nuevamente la prueba histoquímica, observando una mayor expresión del gen GUS (figura 21 g-j). Según Kleint *et al.* (1993), la mayoría de las células que expresan β -glucuronidasa contienen una partícula dentro del núcleo, a diferencia de las células con una partícula en el citoplasma, las cuales raramente expresan el gen. La detección de β -glucuronidasa después de 48 h, indica la inserción de DNA extraño de manera transitoria, mientras la detección a los siete días, indica la integración estable del transgén al DNA cromosómico, mostrando una mayor expresión durante la propagación celular (Márquez-Escobar *et al.*, 2018). En este caso, la proliferación de callo embriogénico.

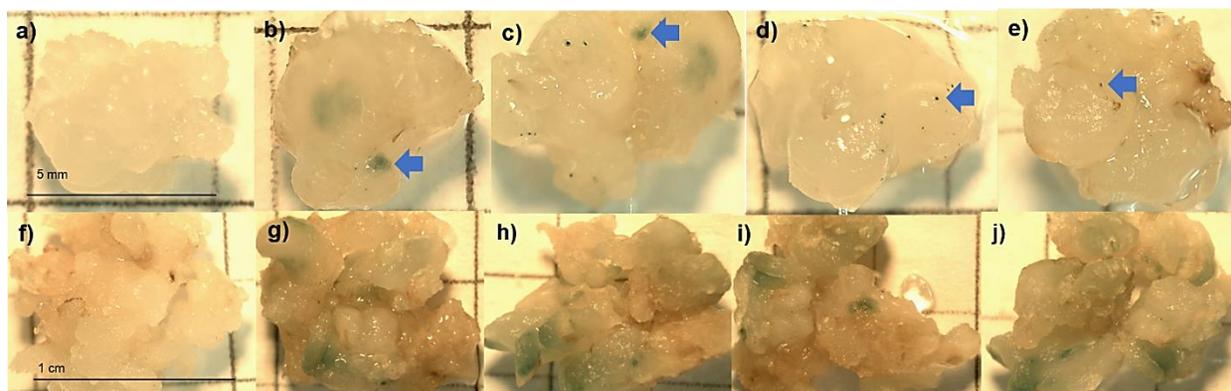


Figura 21. Expresión transitoria de MonoGUS en callos embriogénicos bombardeados. (a y f) Callos bombardeados con micropartículas sin plásmidos (N=1). **(b-e)** Prueba histoquímica de callos bombardeados a las 48 h (N=4). Los puntos azules señalados con flechas muestran el impacto de la bala. **(g-j)** Muestras de callo transformado a los 7 días del bombardeo (N=4). La coloración azul indica de la expresión estable de GUS en la proliferación de callo embriogénico.

Al mismo tiempo, el bombardeo de partículas se realizó con los plásmidos recombinantes que contienen a los STTM (pFGC5941-pOT2-STTM528 y pFGC5941-pOT2-STTM156). El bombardeo de callos embriogénicos se realizó en ocho repeticiones para cada plásmido. Adicionalmente, se incluyeron dos bombardeos con el plásmido pFGC5941 vacío (PV; sin el STTM), pero con resistencia a Basta® (control negativo).

Durante el proceso de selección, también se incluyó callo no transformado para monitorear su evolución en medios con Basta®. En teoría, se esperaba que este fuera susceptible al herbicida (Figura 22).

Los callos bombardeados se mantuvieron en cajas Petri con medio N6P durante una semana en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo. Pasado este tiempo (días de recuperación), los callos fueron puestos en medio con Basta® para su selección. Durante los primeros 15 días de subcultivo, algunas partes del tejido comenzaron a oxidarse (flechas amarillas en la Figura 22), deteriorándose gradualmente hasta su completa necrosis (flechas rojas en la figura 22). En contraste, otras zonas del mismo tejido mostraron una notable resistencia y comenzaron a proliferar. La resistencia se evidenció en callos transformados con STTM156, STTM528 y pFGC5941- vacío (Figura 22 a-c), en comparación con los callos no transformados. Estos últimos mostraron una oxidación uniforme del tejido durante los primeros 15 días del subcultivo (Figura 22d).

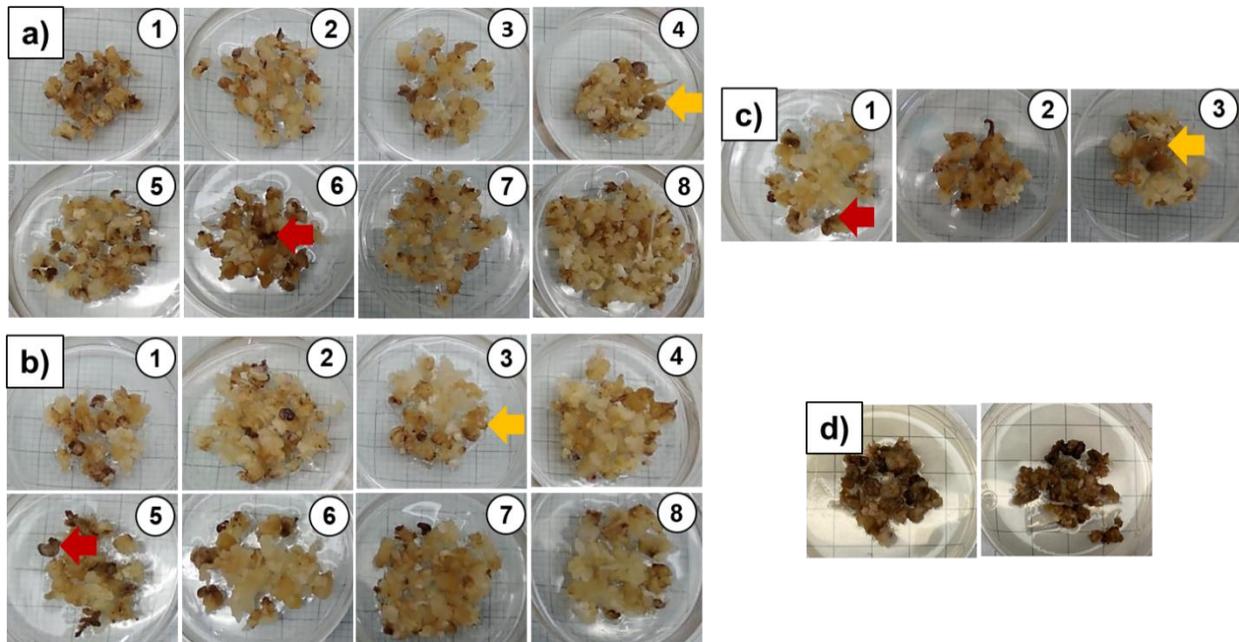


Figura 22. Selección de callos en medio N6P con Basta® durante los primeros 15 días. (a) Callos transformados con STTM156 (N=8); **(b)** transformados con STTM528 (N=8); **(c)** transformado con plásmido vacío pFGC5941 (PV; N=3); **(d)** sin transformar en medio con Basta® (bombardeados con micropartículas sin plásmido; N=2). Las flechas de color amarillo apuntan al tejido oxidado, mientras las flechas de color rojo señalan al tejido necrótico.

Posteriormente, los callos fueron subcultivados cada 15 días en medios con Basta®, con el propósito de seleccionar las partes friables (células transformadas) e ir eliminando las partes oxidadas (células no transformadas). Durante los dos primeros meses, se observó una resistencia notable al herbicida por parte de los callos transformados (Figura 23a-c), mientras los callos no transformados murieron totalmente, presentando una necrosis severa y ausencia de proliferación (Figura 23d).

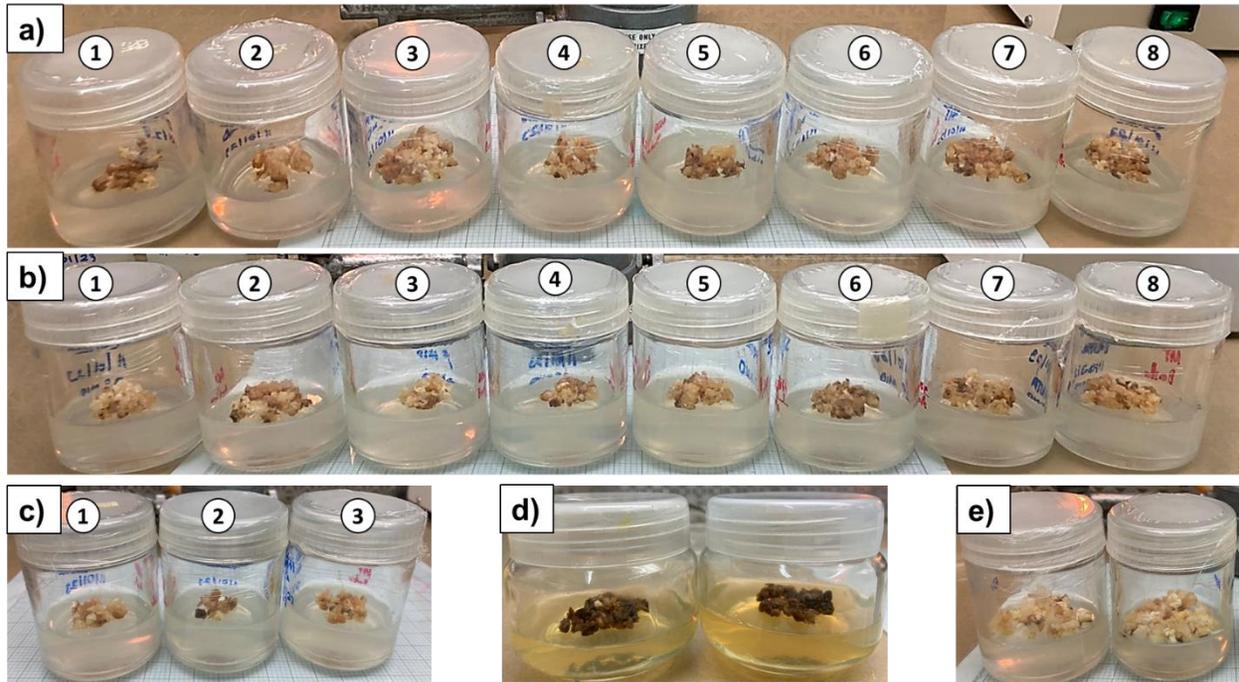


Figura 23. Selección de callos en medio N6P con Basta® después de dos meses. (a) Callos transformados con STTM156 (N=8); **(b)** transformado con STTM528 (N=8); **(c)** transformado con plásmido vacío pFGC5941 (PV; N=3); **(d)** sin transformar en medio con Basta® (N=2) y **(e)** no transformados en medio sin Basta® (N=2).

Después de tres meses de subcultivo, la proliferación de callos transformados comenzó a disminuir, observándose oxidación en gran parte del tejido (Figura 24 a-c). La disminución de células, aún las resistentes al herbicida, pudo deberse a la oxidación y muerte de células no transformadas, a la acción de los STTM, o incluso a un doble estrés, ocasionado por la exposición a Basta® y el secuestro de miRNAs. Estos callos fueron subcultivados en medio sin Basta® para recuperar el mayor número de tejido (ver Anexos Figura S1).

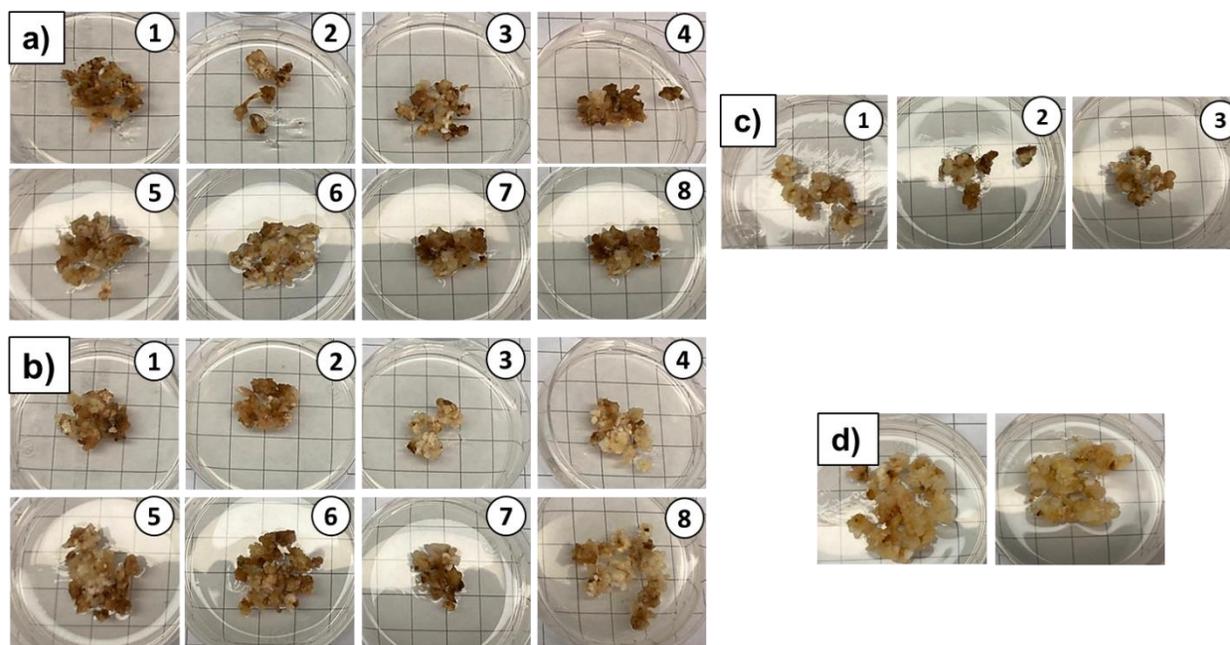


Figura 24. Selección de callos en medio N6P con Basta® después de tres meses. (a) Callos transformados con STTM156 (N=8); **(b)** transformados con STTM528 (N=8); **(c)** transformados con plásmido vacío pFGC5941 (PV; N=3) y **(d)** no transformado en medio sin Basta® (WT; N=2).

Luego de cinco meses de subcultivo (2 en medio N6P sin Basta®), el tejido dañado comenzó a disminuir, observándose mayor número de células friables y un número reducido de células oxidadas (Figura 25). Sin embargo, la proliferación de callos que contenían alguno de los STTM, fue menor en comparación con los callos PV o WT (Figura 25c). Otro dato relevante, fue la similar proliferación entre el callo PV y el callo WT. Es importante mencionar que debido al notorio incremento en la proliferación de estos callos, se optó por trasladarlos a frascos de mayor tamaño. Los resultados obtenidos indican la posible captura de miRNAs por los STTM, teniendo en cuenta la manifestación distintiva del desarrollo fenotípico durante los subcultivos.

A partir de estos callos se tomaron muestras de 0.2 g para la extracción de DNA, con el objetivo de comprobar la presencia del sistema de expresión que contiene a los secuestradores. Las muestras de tejido fueron colectadas en nitrógeno líquido para su transporte y eventual procesamiento.

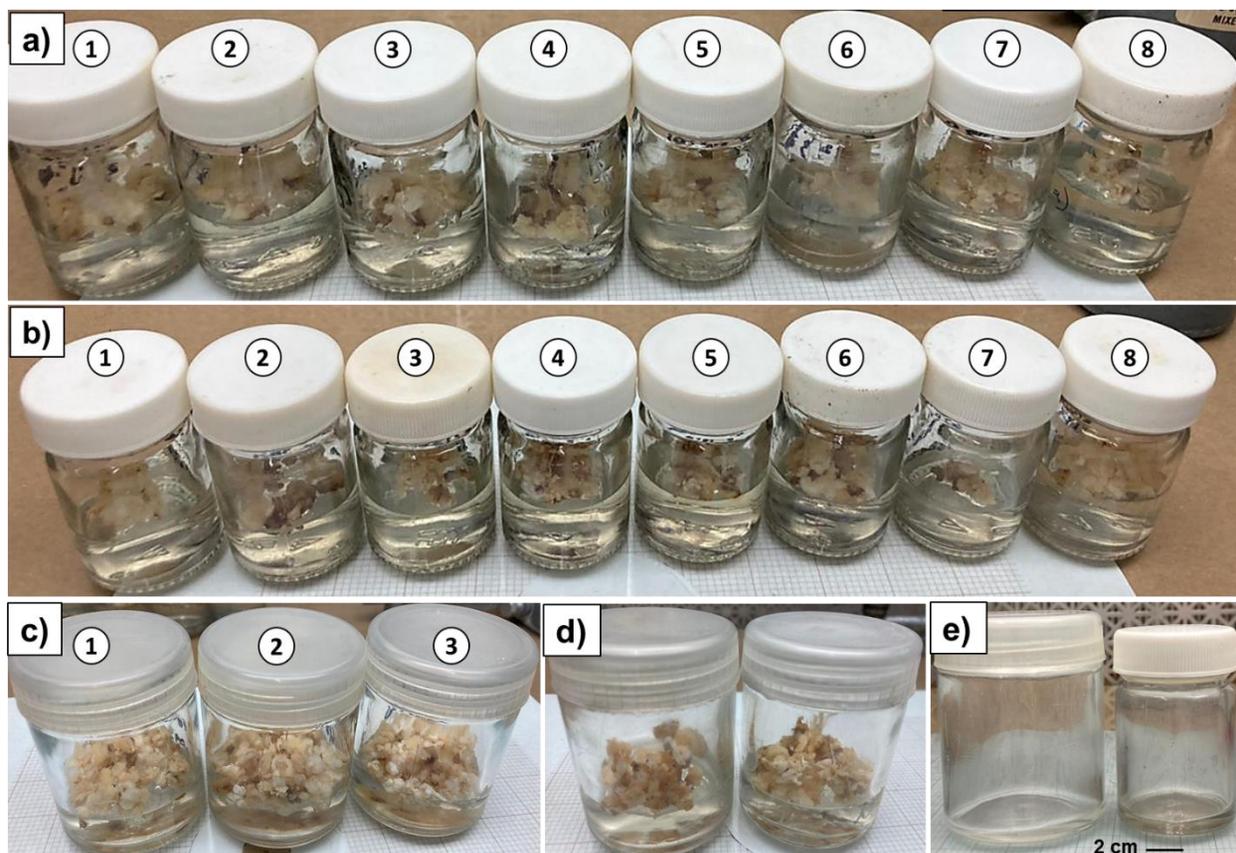


Figura 25. Proliferación de callo en medio N6P sin Basta® después de cinco meses. (a) Callos transformados con STTM156 (N=8); **(b)** transformados con STTM528 (N=8); **(c)** transformado con plásmido vacío pFGC5941 (PV; N=3) y **(d)** no transformado (WT; N=2). Los frascos de a y b son la mitad de tamaño en comparación con los frascos de c y d. **(e)** Comparación del tamaño de los frascos.

8.5. Análisis molecular del callo embriogénico de maíz transformado con STTMs mediante biobalística

La obtención del DNA de callo embriogénico (5 meses después del bombardeo) se llevó a cabo mediante el método CTAB (ver Anexo Figura S2). Luego, a partir del DNA extraído se realizó una PCR para localizar el gen de resistencia a Basta® (*bar*). No obstante, el resultado no fue el esperado al no lograr amplificar la región buscada. Esto pudo ser debido a la ausencia del transgén o a la incapacidad de los cebadores para alinearse al sitio blanco. Para verificar esto último, el DNA se sometió a una digestión con la enzima *EcoRI* para ser fragmentado. Esta medida se basó en trabajos previos del laboratorio, donde se informó de la alta metilación del DNA en callo embriogénico de

maíz VS-535, además del superenrollamiento que presenta el DNA genómico. Hecho lo anterior se logró amplificar el gen de resistencia a Basta® de un tamaño de 310 pb aproximadamente (electroforesis de la figura 26 A y B).

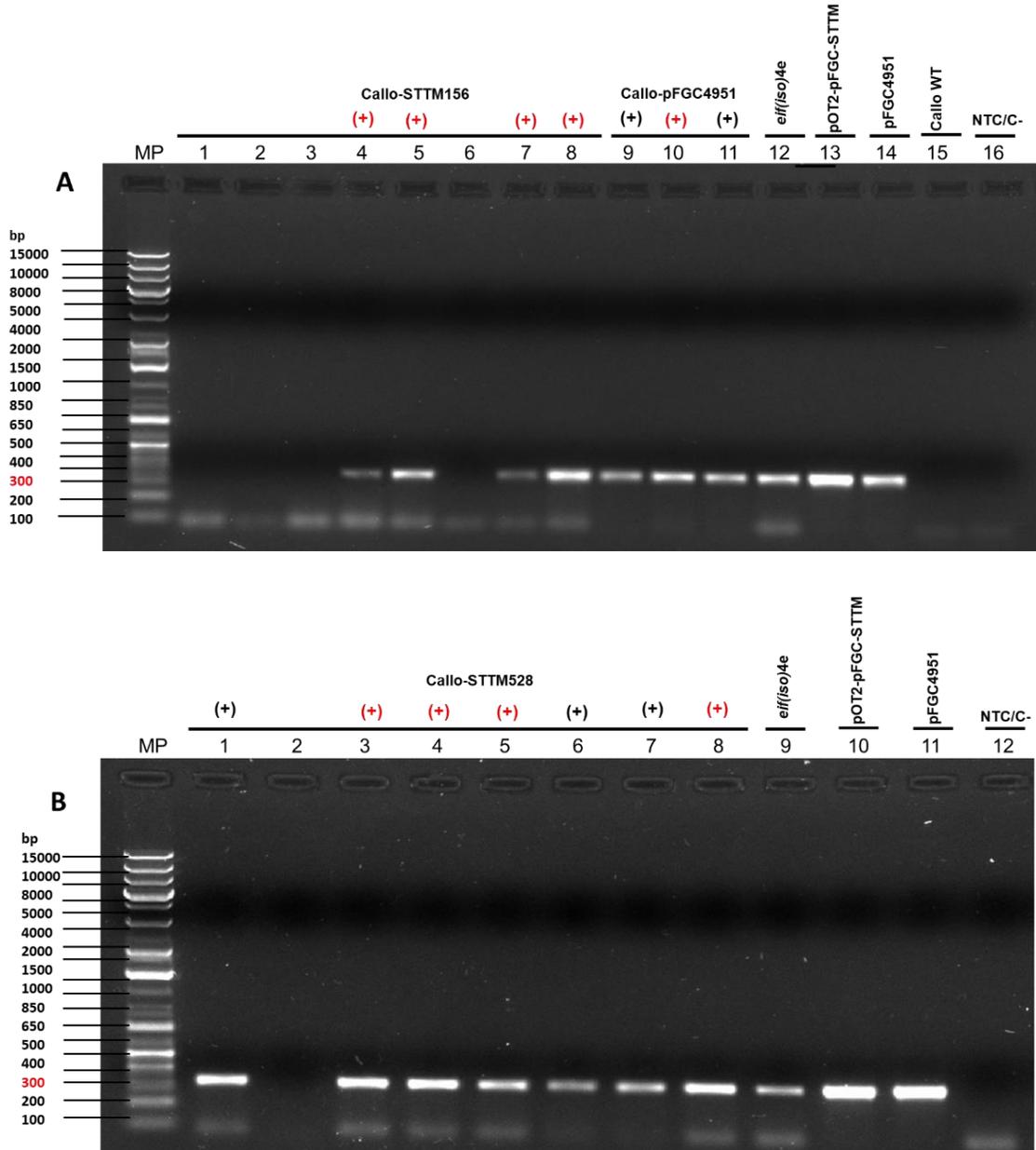


Figura 26. Amplificación del gen de resistencia a Basta® (*bar*) en callo embriogénico. (A) Callo transformado con STTM156: carriles 1-8) callos STTM156; 9-11) callos pFGC5941-vacío (PV); 12) *eif(iso)4e* (línea mutante de *A. thaliana* con resistencia a Basta® usada como control); 13) plásmido recombinante pOT2-pFGC5941-STTM156; 14) plásmido PV; 15) callo no transformado (WT); y 16) control negativo (NTC/C-). **(B)** Callo transformado con STTM528: carriles 1-8) callo STTM528; 9) *eif(iso)4e*; 10) vector recombinante pOT2-pFGC5941-STTM528; 11) vector pFGC5941; y 12) control negativo (NTC/C-). Signo (+) indica los callos utilizados en análisis posteriores. Marcador utilizado GeneRuler Plus 1Kb Ladder Thermo Fisher.

Cuatro grupos de callos STTM156 dieron positivo a la prueba de PCR (Figura 26A: 4,5,7 y 8), mientras siete fueron positivos para los STTM528 (Figura 26B:1 y 3-8). Es importante destacar que los fenotipos fueron similares entre callos positivos y negativos en la prueba de PCR. Esto podría deberse a la presencia de una mezcla heterogénea de células transformadas y no transformadas en los grupos de callos.

En el siguiente paso, se amplificaron las mímicas con los oligos STTM-common-real-F/R, los cuales reconocen el promotor y terminador 35S que flanquean al STTM (ver Anexos Figura S3). Las muestras sometidas al análisis fueron aquellas que exhibieron una amplificación positiva del gen de resistencia a Basta® (Figura 27A y B: muestras con signo (+) en negro y rojo). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de los STTM en callos transformados mediante la amplificación de una banda de 150 pb, indicadas en las muestras de los carriles del 1 al 11 que fueron comparadas con la muestra 13 (vector recombinante con STTM) y muestra 14 (vector con el sitio poly- cis de 650 pb aprox. en lugar del STTM).

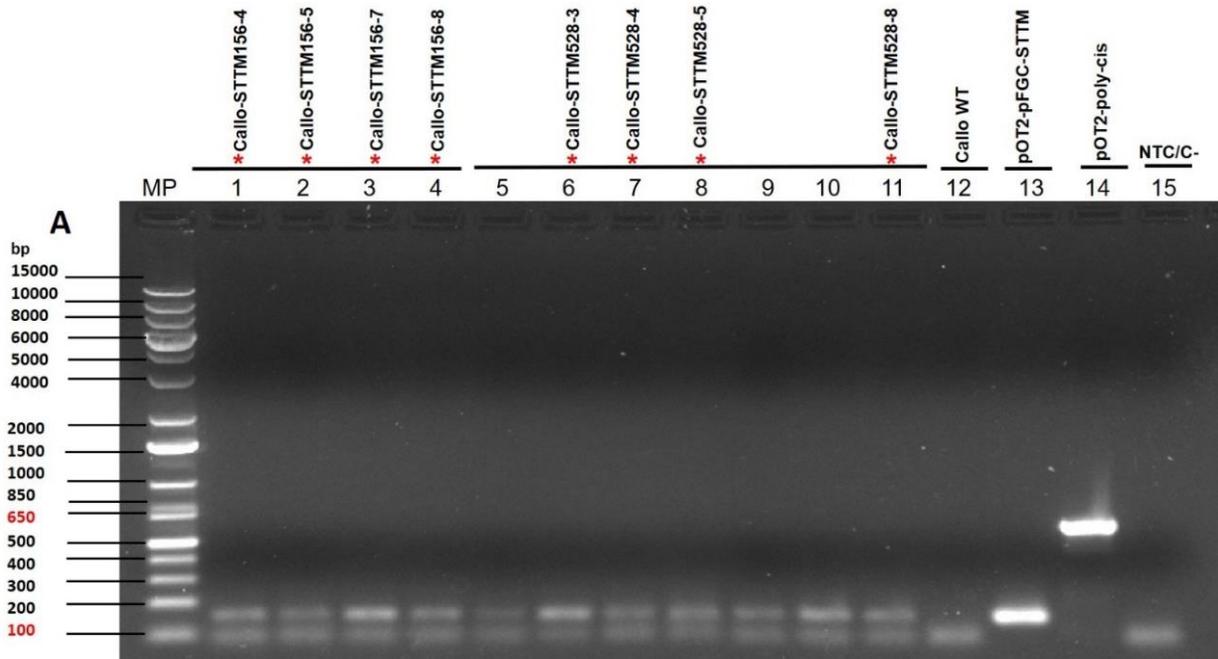


Figura 27. Amplificación de la región del STTM en callo transformado. Carriles 1-4) callos STTM156; 5-11) callos STTM528; 12) callo silvestre (WT); 13) plásmido recombinante con STTM; 14) plásmido pOT2-poly-cis y carril 15) control negativo (NTC/C-). Muestras con signo (*) fueron seleccionadas para extracción de RNA, las mismas con signo (+) en figura 33A y B. Marcador utilizado GeneRuler Plus 1Kb Ladder Thermo Fisher.

8.6. Efecto de los STTM sobre los niveles de miRNAs y transcritos diana en callo embriogénico de maíz.

Para determinar si los STTM diseñados podrían secuestrar a miR528 y miR156 en callos transformados, se analizaron los patrones de acumulación mediante RT-qPCR tanto de los miRNAs como de sus blancos *MATE/BIGE1* y *SBP23*, respectivamente. La cuantificación de los transcritos se llevó a cabo utilizando muestras de RNAs fraccionadas de los callos positivos a la transformación (ver Anexo Figura S5). Específicamente, los grupos 4, 5, 7 y 8 para STTM156, grupos 3, 4, 5 y 8 para STTM528 y grupo 2 para pFGC5941-vacío (PV), además del callo silvestre (WT; Figura 32, marcados con signo (+) en rojo).

Acorde a reportes en la literatura, se esperaría que la abundancia de los miRNAs disminuya en presencia de los STTM, aunque la función principal de los señuelos es secuestrar a los miRNAs y no degradarlos. No obstante, esta tendencia no se observó en los resultados obtenidos, mostrando una mayor acumulación de miR156 y miR528 en algunos de los callos STTM con respecto al callo control o PV (Figura 28, a y b). Cabe señalar que en los resultados de RT-qPCR se detectó un aumento significativo en el valor de umbral del ciclo, o CT (por sus siglas en inglés “Cycle threshold”) para el gen normalizador (*U6* snRNA) en algunos callos STTM, en comparación con los callos PV. Además, los valores de CT entre los callos PV y los callos WT fueron similares (consultar Tabla S4), a pesar de haber sometido a los callos PV a las mismas condiciones de transformación y selección que los callos STTM. Esto indica que la expresión del *U6* snRNA en los callos STTM fue afectada por alguna causa, pero se descartan problemas en la técnica de cuantificación empleada.

Para evaluar los perfiles de acumulación de *SBP23* y *MATE/BIGE1* se probaron dos genes de control interno, *RAPTOR* y *18S rRNA*. Se identificaron variaciones en los valores de CT para *18S rRNA*, pero no para *RAPTOR* en los callos STTM (consultar Tabla S5), razón por lo cual se eligió a *RAPTOR* como gen normalizador. Teóricamente, los mRNAs blanco deben estar mayormente acumulados en callos STTM en comparación con los callos PV, debido al secuestro de los miRNAs por los STTM. Los niveles de expresión de *MATE/BIGE1* exhibieron una abundancia significativamente

mayor en todas las muestras de callos examinadas, mientras *SBP23* mostró un aumento significativo solo en una de cuatro muestras analizadas (Figura 28, c y d).

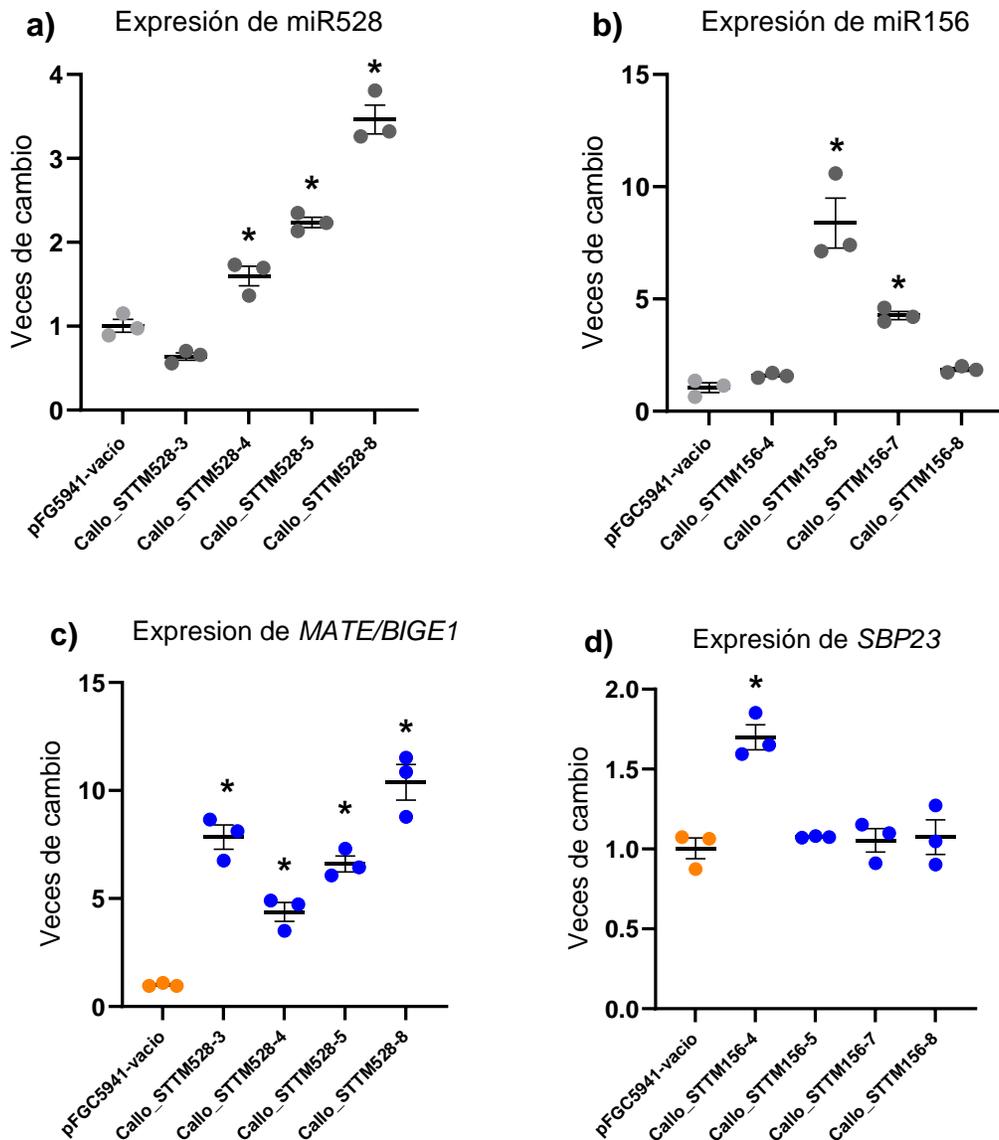


Figura 28. Niveles de expresión de miRNAs y mRNAs diana en callo embriogénico. (a) Se muestran los niveles de acumulación de miR528 en diferentes callos transformados con STTM528; (b) acumulación de miR156 en callos STTM156; (c) acumulación del mRNA blanco *MATE/BIGE1* de miR528; (d) acumulación del mRNA blanco *SBP23* de miR156. Las veces de cambio representan la abundancia en relación con el callo pFGC5941 vacío (PV) y normalizada mediante el control interno *U6* snRNA o *RAPTOR* para miRNAs y mRNAs blanco, respectivamente. Los resultados se obtuvieron de cuatro grupos de callo independientes ($n=4$) con tres réplicas técnicas para cada una ($n=12$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el método ANOVA de una dirección con múltiples comparaciones mediante la prueba de post hoc de Tukey. En todos los casos, (*) representa que los niveles de acumulación tanto para miRNAs como para mRNAs blanco en callos STTM, son significativamente diferentes al callo pFGC5941 vacío ($p<0.05$).

En plantas, comúnmente se observa una correlación inversa entre los niveles del miRNA y su blanco. En particular, se esperaba que la abundancia de los miRNAs disminuyera y sus blancos aumentaran. Sin embargo, esta correlación no se observó debido a los problemas en la cuantificación de los miRNAs, posiblemente relacionadas con la inestabilidad del gen de referencia *U6 snRNA*. Los resultados en las gráficas a y b de la figura 28, revelan un aumento en la abundancia de los miRNAs cuando se esperaba una disminución. Esta tendencia se evidenció para tres de los callos STTM528 (muestras 4,5 y 8) y en dos de los callos STTM156 (muestras 5 y 7). En contraste, la muestra 3 de los callos STTM528 y la muestras 4 y 8 de los callos STTM156 no mostraron cambios significativos, lo cual coincide con un valor similar para CT del gen normalizador de estas muestras, en comparación con el callo PV. Curiosamente, incluso en la ausencia del secuestro de los miRNAs, o la presencia de células no transformadas en los callos STTM, los niveles de miRNAs en todos los callos con las mímicas se mantendrían similares al control.

Por otro lado, la acumulación de *MATE/BIGE1* y *SBP23* en algunos callos STTM fue mayor en comparación con los callos PV (Figura 28 c y d). Esto sugiere que los STTM pudieran estar secuestrando a los miRNAs y en consecuencia promoviendo una mayor acumulación de sus blancos. Es relevante señalar que el gen normalizador (*RAPTOR*) permaneció estable, manteniendo valores de CT similares. Los cambios significativos de la abundancia se apreciaron para todas las muestras de callos STTM528 analizadas, destacando la muestra 8 con 10.3 veces de cambio para *MATE/BIGE1*, mientras que solo la muestra 4 de los callos STTM156 presentó un cambio significativo para *SBP23* con 2.1 veces de cambio. En particular, las muestras restantes de los callos STTM156 mantuvieron un patrón ligeramente más alto, pero no significativo al callo control.

8.7. Cinética de crecimiento de los callos transformados con STTM528 y STTM156

Debido a la baja proliferación observada en los callos STTM, así como la acumulación de los transcritos blancos *MATE/BIGE1* y *SBP23* en algunas muestras de estos callos, se optó por subcultivarlos en medios con y sin Basta® para evaluar y caracterizar su crecimiento. Para ello, se emplearon callos de 6 meses después del

bombardero (ver Anexos Figura S4). La cinética de proliferación de los callos en los distintos medios se analizó mediante la medición del peso fresco.

Normalmente, al representar gráficamente los datos de crecimiento celular en cultivos *in vitro* a lo largo del tiempo, se genera una curva de crecimiento que muestra distintas etapas: 1) fase de adaptación o *lag*, en la cual las células se ajustan al entorno y empiezan a procesar nutrientes, mostrando actividad metabólica, pero sin duplicarse aún; 2) fase exponencial, donde las células se reproducen rápidamente aprovechando los nutrientes, sin embargo, esto agotará eventualmente los recursos del medio de cultivo; 3) fase estacionaria, en la que los nutrientes comienzan a escasear y las células dejan de reproducirse, manteniendo un crecimiento aparentemente constante; 4) finalmente, una fase de muerte celular, donde la falta de nutrientes lleva a un decremento en la población de células (Campos, 2017).

En las gráficas de la figura 29 (en medio N6P sin Basta®) y 30 (en medio N6P con 2 mg L⁻¹ de Basta®) se observa de manera similar que la proliferación comienza a partir de los dos días para los diferentes tipos de callos. Después de este lapso, se hacen evidentes las discrepancias en el crecimiento de los callos control (PV y WT) en comparación con las líneas STTM. En ambas gráficas, los callos control mantienen una proliferación relativamente exponencial, mientras que los callos STTM presentan un crecimiento más lento pero constante. Inesperadamente, se pueden localizar diferentes fases de crecimiento a lo largo de los 21 días en cada tipo de callo, por lo cual, es difícil calcular la velocidad de crecimiento debido al desfase de tiempos y al número de etapas en cada muestra.

En base a la información previamente expuesta, se optó por realizar un análisis de los pesos en tres tiempos estratégicos (ver estadísticos en Tablas S6 y S7). Cada callo se examinó a los 4, 11 y 21 días. De manera general, no se identificó una etapa de adaptación para la mayoría de los callos. Los cambios significativos se observaron a partir de los primeros 4 días para los callos subcultivados en medio sin Basta®, mientras los callos en medio con el herbicida no presentaron diferencia estadística a este tiempo. Los cambios fueron más notorios a los 11 días y totalmente evidentes a los 21.

Al comparar los pesos de las muestras en medios sin el herbicida después de 4 días, se encontró que la tasa de proliferación del callo silvestre no difería de manera

significativa del callo PV. Sin embargo, tanto el callo silvestre como el callo PV mostraron mayor proliferación en comparación con las líneas STTM. Después de 11 días del subcultivo, el callo PV proliferó menos en comparación con el callo silvestre, aunque esta diferencia desapareció a los 21 días. A lo largo del tiempo, los callos STTM exhibieron una tasa de proliferación menor a los callos WT y PV. En cambio, todos los callos STTM proliferaron de manera similar y no difirieron entre ellos. Estos datos resultan significativos porque de alguna manera los callos STTM presentan una baja proliferación, aún en condiciones sin Basta®. Los fenotipos a cada tiempo se muestran en la figura 31.

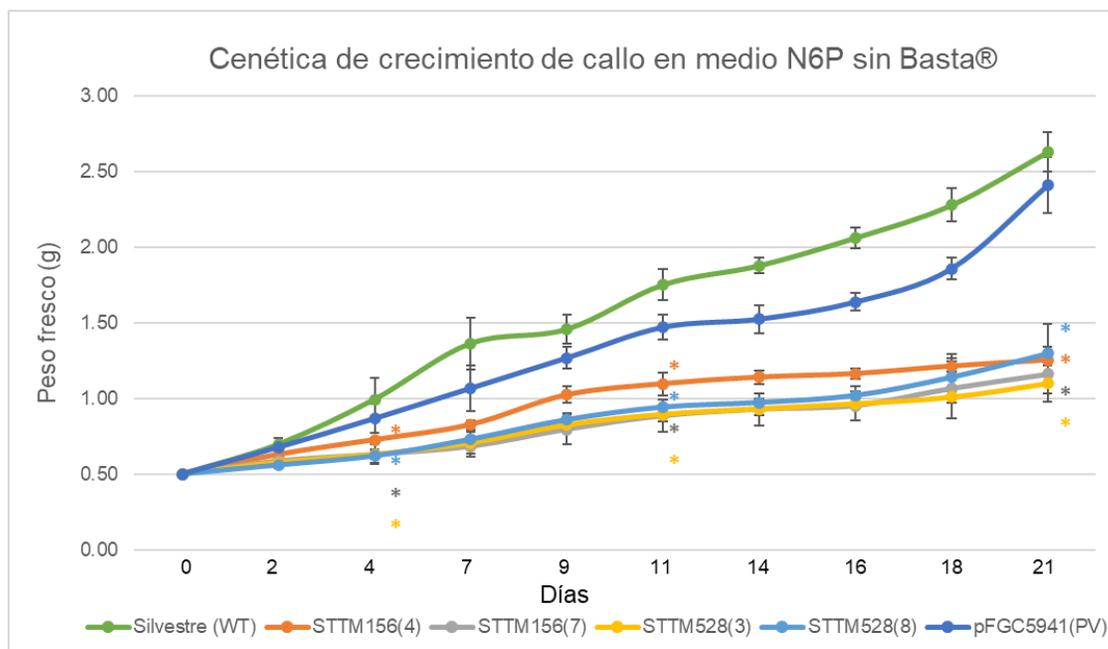


Figura 29. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos en medio N6P sin Basta®. Seguimiento del subcultivo a diferentes tiempos (0-21 días) de los callos STTM156, STTM528, callo sin mímica (PV) y callo silvestre (WT). Los pesos se tomaron en condiciones estériles durante 21 días sin cambiar de medio de cultivo. Después de la obtención de datos, se graficó la media del peso fresco de cada muestra biológica con tres repeticiones, señalando la desviación estándar mediante barras. Los datos fueron analizados utilizando una prueba estadística Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de Games-Howell con múltiples comparaciones. (*) representa que el crecimiento de los callos STTM es significativamente menor al callo WT ($p < 0.05$).

En relación al subcultivo en medios con Basta®, tanto el callo pFGC5941-vacío como el silvestre no presentaron diferencias significativas a los 4 y 11 días, pero si a los 21, donde se notó un descenso significativo en la proliferación de callo silvestre debido al efecto del herbicida. Por otra parte, de manera similar a los subcultivos sin ningún agente inhibitorio, los callos STTM proliferaron menos que los callos PV y WT, mostrando

una diferencia aún mayor con el callo PV. Además, los callos STTM mantuvieron una proliferación uniforme entre ellos, lo cual fue consistente a lo largo de los 21 días. A pesar de que las líneas de callo STTM mantuvieron menor proliferación a lo largo del análisis, no se notó un descenso significativo debido a la resistencia adquirida por parte del vector reservorio de las mímicas.

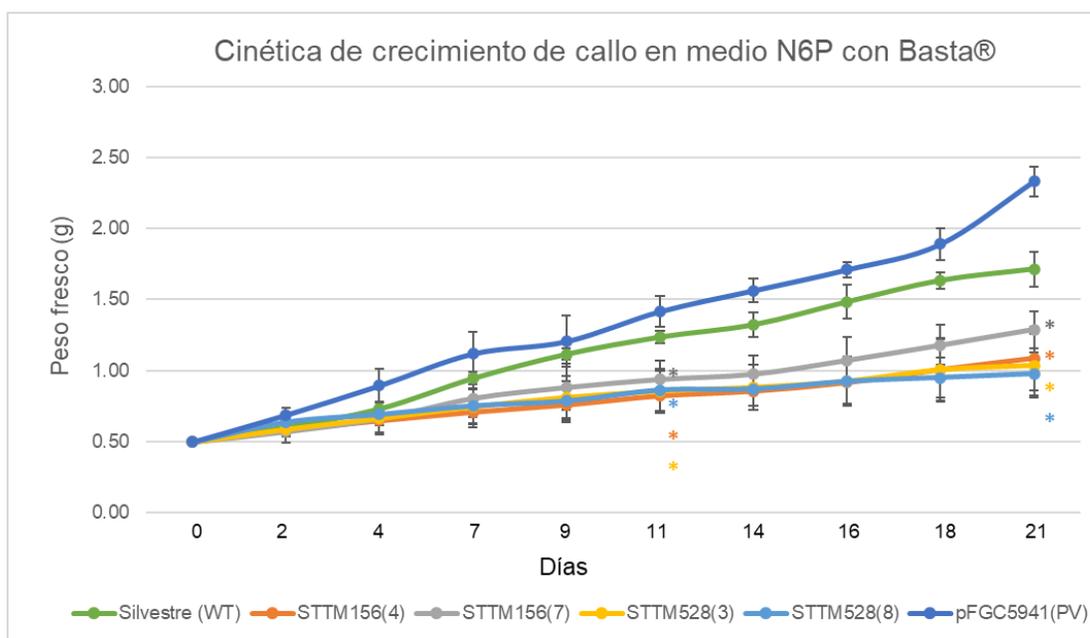


Figura 30. Cinética de crecimiento de callos embriogénicos en medio N6P con Basta®. Seguimiento del subcultivo a diferentes tiempos (0-21 días) de los callos STTM156, STTM528, callo sin mímica (PV) y callo silvestre (WT). Los pesos se tomaron en condiciones estériles durante 21 días sin cambiar de medio. Después de la obtención de datos, se graficó la media del peso fresco de cada muestra biológica con tres repeticiones, señalando la desviación estándar mediante barras. Los datos fueron analizados utilizando una prueba estadística Kruskal-Wallis con una prueba post hoc de Games-Howell con múltiples comparaciones. (*) representa que el crecimiento de los callos STTM es significativamente menor al callo PV ($p < 0.05$).

Aun cuando los callos son un tejido desdiferenciado y desorganizado, estos mantienen una “memoria bioquímica” que influye en sus respuestas diferenciales en función del medio de cultivo y del tipo de callo. Durante la exposición de los distintos grupos de callo STTM a Basta® (Figura 31), se notaron características particulares. El callo STTM156 y PV demostraron resistencia al herbicida sin presentar oxidación aparente en comparación al callo WT. Por otra parte, el callo STTM528 presentó oxidación además de un bajo crecimiento. Las muestras con mayor crecimiento fueron PV y WT en medios con y sin herbicida, respectivamente. En el caso del callo WT en

medios sin Basta®, mostró crecimiento durante las dos primeras semanas, seguido de una oxidación y necrosis gradual en la segunda y tercera semana.

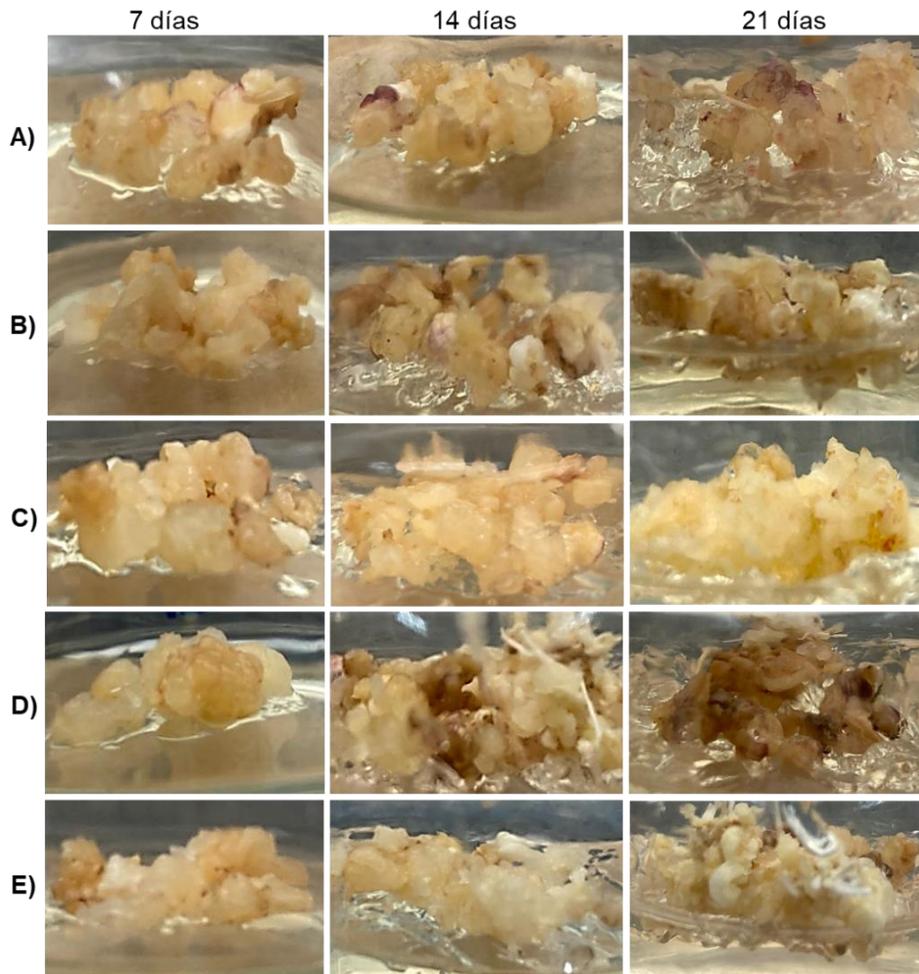


Figura 31. Fenotipos de los distintos tipos de callos durante la cinética de crecimiento. (A) callo STTM 156 en medio N6P con Basta®. Muestra alta resistencia al herbicida, una mínima oxidación, alta friabilidad y la presencia de callo tipo I, II y rizogénico. **(B)** Callo STTM528 en medio con Basta®. Se puede apreciar mayor oxidación del tejido, una apariencia compacta, una menor friabilidad y la presencia de callo tipo I, II y rizogénico en la tercera semana. **(C)** Callo PV en medio con Basta®. Exhibe una oxidación mínima del tejido, una mayor friabilidad sin la formación de raíces. **(D)** Callo WT en medio con Basta®. Se observa oxidación progresiva del tejido en el transcurso del tiempo. **(E)** Callo WT en medio sin Basta®. Muestra una menor oxidación, aspecto friable y la formación de callos de tipo I, II y rizogénico en la última semana.

8.8. Regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos

Para la obtención de plantas de maíz, se llevó a cabo la germinación de embriones somáticos a partir de los callos bombardeados con el STTM528, STTM156, pFGC594-

vacío además del tipo silvestre. Durante el proceso, se redujo la concentración de auxina 2,4-D y cinetina de forma escalonada, manteniendo la misma concentración de los demás componentes y agregando Basta® al medio para los callos transformados, en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Al término de la primera semana, se observaron varios embriones con forma redondeada y de color verde en la superficie del callo (Figuras 32-35). Esto se debe a la disminución de hormonas 2,4-D y la cinetina que evitan la maduración y diferenciación rápida del embrión, así como su germinación. En contraste, estas hormonas provocan el crecimiento y división celular durante la proliferación, respectivamente. (Emmons and Kieft, 1995).

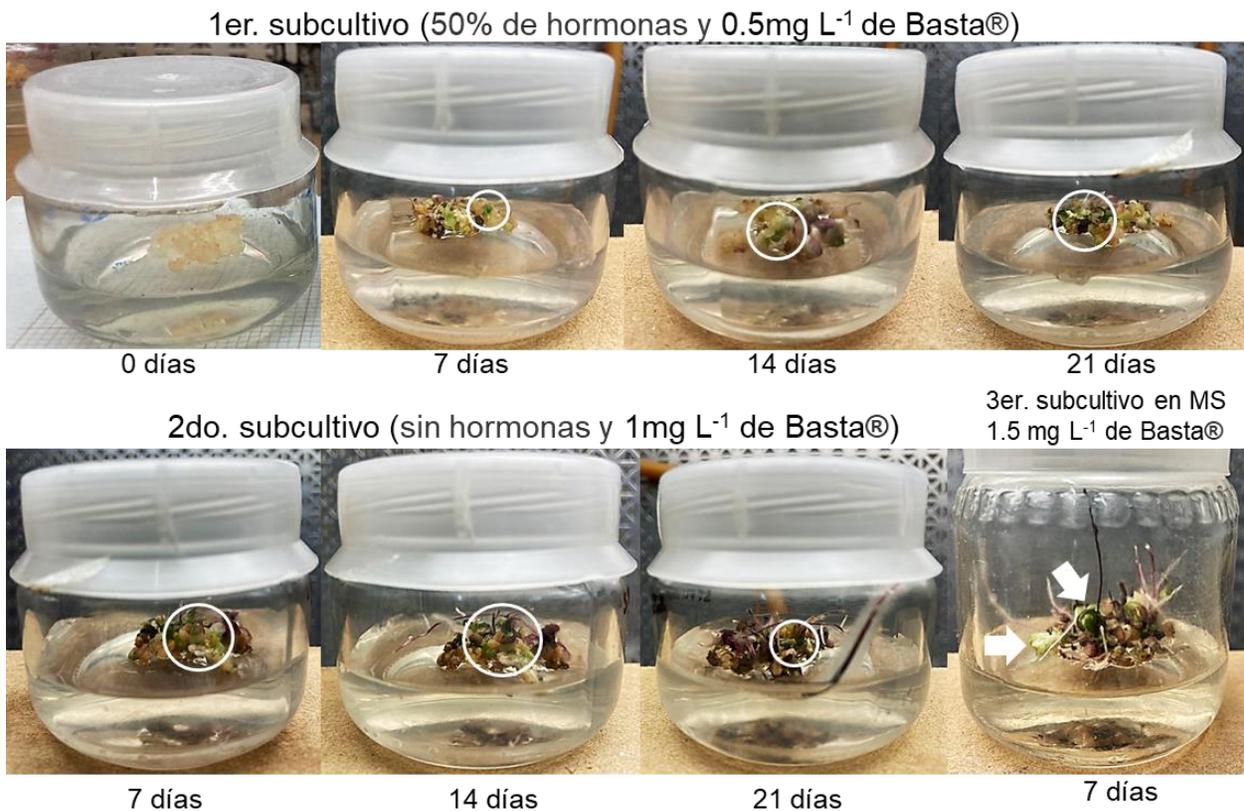


Figura 32. Callo embriogénico de maíz STTM156 en medios de regeneración. En la zona superficial se observan embriones somáticos como puntos regenerativos de color verde, indicados de manera circular durante los diferentes subcultivos. No se observan formas vegetativas en ninguno de los subcultivos, solo puntos regenerativos y la formación de raíces a partir del segundo subcultivo a los 21 días. Durante el tercer subcultivo en medio MS aumenta el número de raíces y se forman protuberancias de color verde, señaladas con flechas.

La primera evidencia visual de regeneración de tejidos, fue la aparición de puntos de color verde en la superficie del callo. Los puntos regenerativos se observaron a partir de la primera semana en medios de cultivo N6P con 50% de hormonas. La respuesta a la depleción hormonal se mostró de manera similar en los distintos callos durante la primera etapa (1er. subcultivo), notando la aparición de nuevos puntos regenerativos al paso de los días. Las diferencias comenzaron en el transcurso de la segunda etapa en medio sin hormonas (2do. Subcultivo), notando la aparición de los primeros brotes en distintos tiempos. Es importante señalar que los callos STTM156 presentaron oxidación durante esta etapa, no generando brotes, pero sí abundantes raíces en el día 21 del segundo subcultivo (Figura 32). En el tercer subcultivo las raíces crecieron y hubo la aparición de protuberancias verdes. Esto es relevante ya que miR156 desempeña un papel crucial en las distintas etapas de regeneración del maíz.

1er. subcultivo (50% de hormonas y 0.5mg L⁻¹ de Basta®)



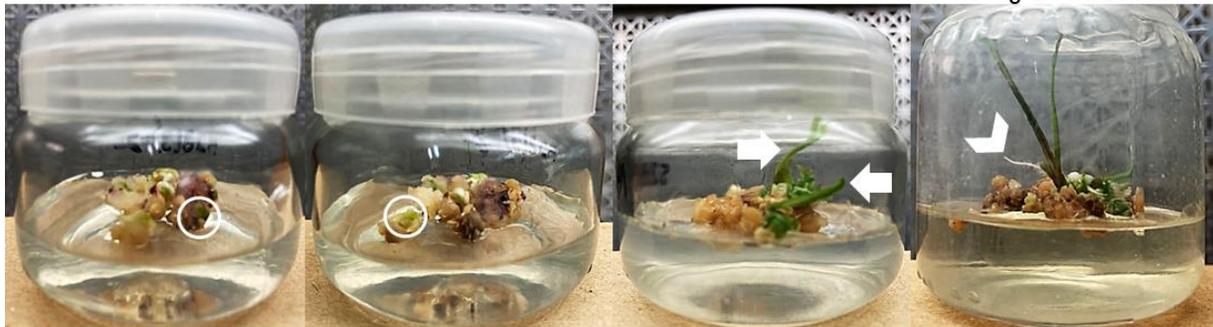
0 días

7 días

14 días

21 días

2do. subcultivo (sin hormonas y 1mg L⁻¹ de Basta®)



7 días

14 días

21 días

7 días

3er. subcultivo en MS
1.5 mg L⁻¹ de Basta®

Figura 33. Callo embriogénico de maíz STTM528 en medios de regeneración. La formación de puntos regenerativos de color verde se aprecia durante los distintos subcultivos, señalados en forma circular. Los primeros brotes se aprecian en el segundo subcultivo a los 21 días con la formación de las primeras formas vegetativas (flechas). La regeneración de plántulas se muestra en el tercer subcultivo en medio MS con el establecimiento de hojas y raíz (punta de flecha).

Tras el primer subcultivo del callo STTM528, se distinguieron los primeros puntos regenerativos al igual que los otros callos (Figura 33). La diferencia se observó en el segundo subcultivo donde aparecieron los primeros brotes (protuberancias semejantes a la punta de una hoja) al día 21 en comparación con callos PV y WT, los cuales formaron brotes una semana antes (día 14). Otro hallazgo importante del callo STTM528 fue la oxidación del tejido que no generó brotes, muy evidente al día 21 del segundo subcultivo. Esta característica se mantuvo durante el tercer subcultivo en medio MS (Murashige & Skoog), sugiriendo daño por el agente selectivo, falta de respuesta adecuada a diferenciación en tejido no embriogénico o respuesta inadecuada al estrés provocado por el retiro de 2,4-D.

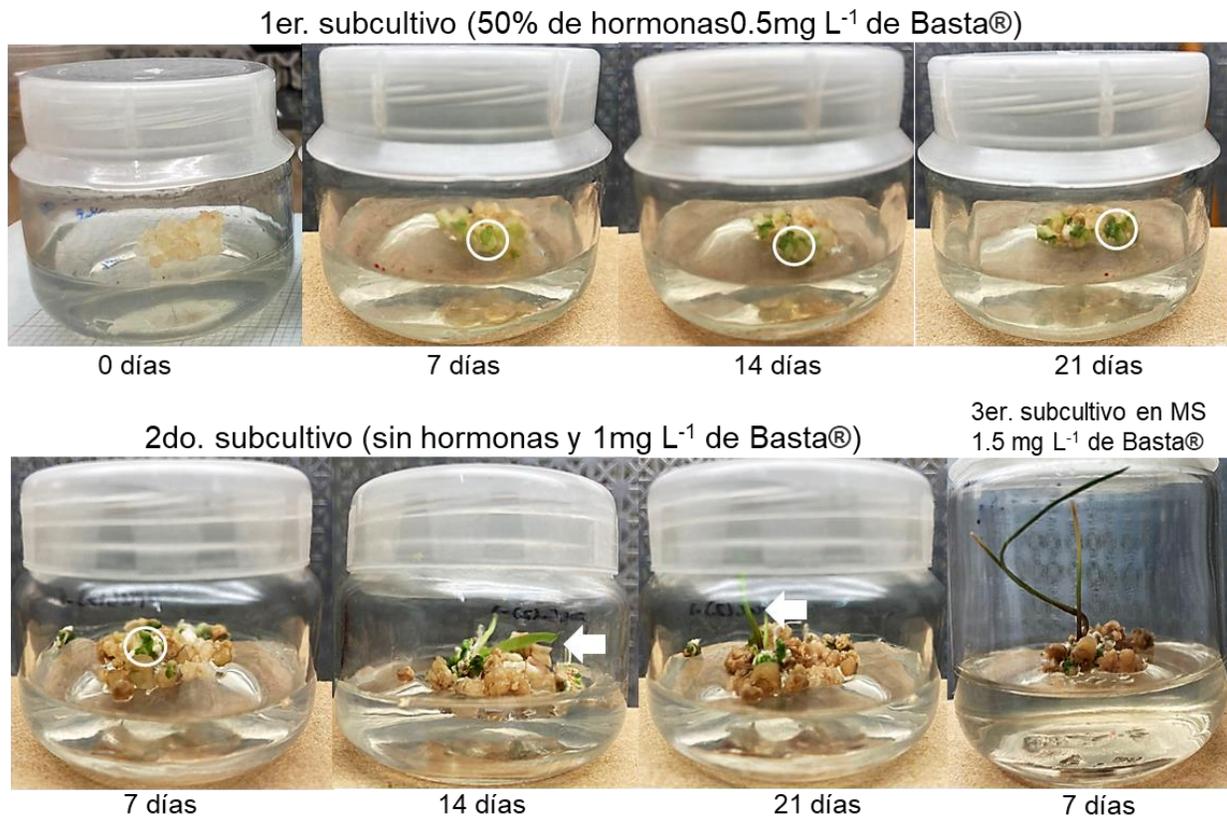


Figura 34. Callo embriogénico de maíz pFGC5941-vacío (PV) en medios de regeneración. La formación de puntos regenerativos de color verde se aprecia durante los distintos subcultivos, señalados en forma circular. Los primeros brotes vegetativos se aprecian en el segundo subcultivo entre los 14 y 21 días con la aparición de las primeras hojas (flechas). La regeneración de plántulas se nota en el tercer subcultivo en medio MS con el establecimiento de hojas, pero no de raíz.

La regeneración de plantas a partir de callo PV fue la más parecida al callo WT, aunque también presentó diferencias como la oxidación de las células, en similitud al callo STTM528 durante el segundo y tercer subcultivo (Figura 34). Además, se notó la formación de estructuras vegetativas características a una hoja después del día 14 en el segundo subcultivo, pero que dio paso a hojas muy delgadas con polaridad curvada a diferencia del tipo WT. Esto sugiere de alguna manera, la alteración como consecuencia de la transformación, aún con un plásmido sin STTM.

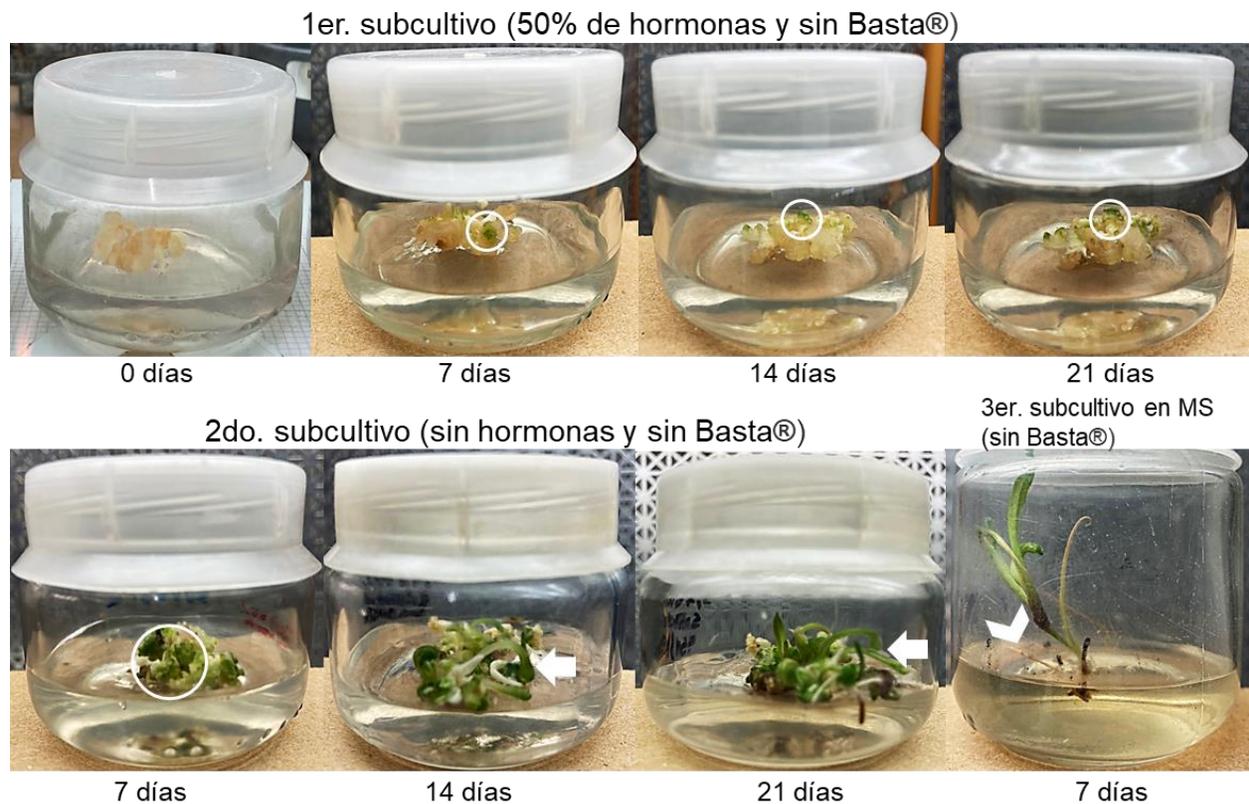


Figura 35. Callo embriogénico de maíz silvestre (WT) en medios de regeneración. La formación de puntos regenerativos de color verde se aprecia durante los distintos subcultivos, señalados en forma circular. Los primeros brotes se aprecian en el segundo subcultivo de 14-21 días con la aparición de las primeras hojas (flechas). La regeneración de plántulas se observa en el tercer subcultivo en medio MS con el establecimiento de hojas y raíz (punta de flecha).

El proceso de obtener plántulas a partir de callo embriogénico silvestre sirvió como comparativo en respuestas a señales de regeneración de los callos transformados (Figura 35). La aparición de los primeros puntos regenerativos comenzó en la primera semana, de forma similar a los callos transformados, pero hubo menos oxidación, además mantuvieron una consistencia menos compacta. En la segunda etapa, los

puntos regenerativos se multiplicaron de manera acelerada en la primera semana y emergieron los primeros brotes a los 14 días después del subcultivo, los cuales comenzaron a establecer las primeras hojas abundantemente. En la tercera etapa, al trasplantar las plántulas en frascos individuales, se observó un crecimiento más rápido que las plántulas regeneradas a partir de callos mutantes. Se notó la formación de hojas y raíces características distintivas.

9. Discusión

Comúnmente, el papel de diversos miRNAs en prácticamente todos los procesos de desarrollo de las plantas, incluida la embriogénesis somática, se ha explorado mediante la comparación de los perfiles de acumulación de miRNA maduros y sus correspondientes blancos (Siddiqui *et al.*, 2019). En maíz, se ha estudiado la expresión tanto de miR156 como de miR528, así como de sus genes blanco durante las diferentes etapas de la embriogénesis somática en la variedad VS-535 (López-Ruiz *et al.*, 2019b; Luján-Soto *et al.*, 2021). Aunque se ha resuelto el mecanismo molecular de estos dos miRNAs, aún no se comprende del todo su función en la regulación de características específicas, como el establecimiento, proliferación y mantenimiento de callo embriogénico, así como su capacidad regenerativa. En base a esto, se diseñaron secuestradores utilizando la tecnología STTM, con el objetivo de silenciar la actividad de miR528 y miR156 en callo embriogénico de maíz, para poder comprender de manera más integral su papel en la regulación de dicho proceso.

El diseño para la construcción de secuestradores de miRNAs puede ser complicado, debido a que la mayoría de los miRNAs pertenecen a una familia con múltiples loci en el genoma, y pueden tener variaciones en su secuencia que afecten la región de resistencia a la escisión por el miRNA maduro (protuberancia de trinucleótidos en la parte central; Tang *et al.*, 2012). Para evitar este problema, se revisaron las secuencias de los distintos miembros de las familias de miR528 y miR156 en maíz, observando mínimas o ninguna diferencia en la secuencia de los diferentes miembros, lo cual ayudó a diseñar de manera óptima los STTM para cada miRNA. Si las secuencias hubieran diferido significativamente, se habrían diseñado STTM capaces de reconocer

dos sitios de unión distintos para silenciar diferentes miembros simultáneamente (Teotia and Tang, 2017).

Debido a las dificultades que aún presentan los protocolos para transformar maíz con *Agrobacterium*, se decidió emplear la biobalística para introducir los vectores recombinantes que contenían los STTM (Barampuram and Zhang, 2011; Kausch *et al.*, 2021). Una vez elegido el método de transformación, las condiciones de bombardeo de callo embriogénico fueron cruciales para una óptima modificación, a razón de obtener una alta densidad de células transformadas. Particularmente, la edad del callo después del subcultivo (12 días) fue un requisito para facilitar la introducción de DNA durante la proliferación celular, aprovechando el estado relajado de la cromatina que hace más fácil el ingreso y recombinación del material genético exógeno (Guerrero, 1988 y Jiménez, 2006).

La selección de callo bombardeado en medios de cultivo con Basta® fue un paso limitante, debido a un descenso significativo en la proliferación de células a los tres meses después del subcultivo. Según datos reportados por Jiménez (2006), la selección continua de callos embriogénicos transgénicos (que contenían vector con resistencia) en medios con 3 mg/L⁻¹ de Basta®, fue efectiva para la inhibición del crecimiento de células no transformadas o tipo silvestre, sin afectar de manera significativa a las células transformadas. A pesar de esto, se observó una marcada disminución en la densidad de células de callo tanto para las líneas STTM528 como STTM156, al punto de perder completamente las muestras, incluso cuando el vector contenía la expresión de resistencia a Basta® y se había optado por una menor concentración de este (2 mgL⁻¹). Los callos fueron subcultivados en medio sin herbicida para recuperar la mayor cantidad de tejido, y de esta manera poder analizarlos tanto a nivel fenotípico como molecular. Al confirmar la presencia del gen de resistencia a Basta®, junto con la presencia de los STTM, se respaldó la hipótesis de una posible afectación en la proliferación de callos por el secuestro de los miRNAs.

La cuantificación de los miRNAs y sus blancos es una prueba indispensable para evaluar la eficacia de las mímicas. En general, cuando los miRNAs son secuestrados, se espera una disminución en su abundancia, en tanto que sus genes diana, al no estar regulados por los miRNAs, deberían acumularse a niveles más altos (Li *et al.*, 2020; Liu

et al., 2019; Zhang *et al.*, 2017). Sin embargo, los STTM están diseñados para secuestrar y no para degradar a los miRNAs, lo cual supone la presencia de los miRNAs durante el análisis para su detección. Aun así, estudios más recientes en callo embriogénico de cítricos, sustentan la disminución de miRNAs y el aumento de sus blancos por acción de los secuestradores (Feng *et al.*, 2022). Inesperadamente, la acumulación de miR528 y miR156 no disminuyó en los callos STTM. De hecho, se observó una acumulación significativa de estos miRNAs en algunos callos STTM. Por otro lado, la cuantificación de los transcritos blanco, evidencio un aumento significativo de *MATE/BIGE1* en todas las muestras de callo STTM528 analizadas, mientras que el aumento de *SBP23* se observó solo en una de las muestras de callo STTM156. En conjunto, los resultados sugieren un posible efecto en la expresión de *MATE/BIGE1* y *SBP23* en los callos STTM, independientemente de si los niveles de miRNAs disminuyen o no. Específicamente, miR528 ha sido reportado como altamente abundante en la proliferación de callos embriogénicos de maíz, regulando a distintos genes (Juárez-González, 2015; Luján-Soto *et al.*, 2021). Esto pudiera explicar la causa de no detectar una disminución en sus niveles de acumulación de miR528. Respecto a miR156, es posible que los STTM tengan poca eficacia para secuestrar los doce grupos de esta familia de miRNAs.

Los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, revelaron la inestabilidad del gen de referencia *U6 snRNA*, particularmente en algunas muestras de callos STTM, donde los miRNAs tuvieron una acumulación significativa. En contraste, en los callos STTM donde no se observó este problema, la acumulación de los miRNAs se mantuvo similar al callo control (PV), lo cual evidencia que los STTM no son la causa de la inestabilidad de *U6*. También, se emplearon *18S rRNA* y *RAPTOR* como genes normalizadores de los transcritos *MATE/BIGE1* y *SBP23*. La expresión de *18S rRNA* mostró inestabilidad incluso en los callos control, mientras *RAPTOR* se mantuvo estable, permitiendo un análisis preciso de la expresión de los genes blanco. Acorde a la literatura, *18S* presenta un nivel de expresión poco estable en distintas condiciones de desarrollo y estrés, siendo no recomendable como gen normalizador (Decima., *et al* 2017; Manoli *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2020). En cuanto a *U6*, no se hallaron reportes sobre su inestabilidad a efecto de algún herbicida u otros factores, además no se detectaron problemas en su uso como gen normalizador en investigaciones sobre el secuestro de miRNAs por mímicas en

distintas plantas, incluso en aquellas que fueron sometidas a selección con herbicida (Li *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2018). Por otra parte, *RAPTOR* (Regulatory-Associated Protein of TOR) es un gen que codifica una proteína sumamente importante en la señalización de TOR (cinasa; TARGET OF RAPAMYCIN) en plantas. Su función es crucial para mantener el equilibrio de procesos biológicos esenciales en la vida de las plantas, como el desarrollo, crecimiento, disponibilidad de nutrientes y respuesta al estrés (Salem *et al.*, 2018). Por lo tanto, su estabilidad es de suma importancia para el equilibrio de los diferentes procesos. Además, la regulación reportada sobre su actividad es a nivel post-traducciona.

Para dilucidar un posible efecto de los STTM en callo embriogénico de maíz, independientemente de la selección en medios con Basta®, se examinó la proliferación de callo transformado con los STTM. Los resultados revelaron que todas las líneas de callo STTM presentaban una proliferación significativamente menor en comparación con los callos control (PV y WT), tanto en medios con Basta® como en medios sin este. La mayor diferencia se observó en el día 21 después del subcultivo. Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio, fue la proliferación similar entre los callos STTM528 y STTM156 en ambos tratamientos. Teóricamente, miR528 regula varios genes importantes en la proliferación de callo, a diferencia de miR156 que participa en etapas posteriores a la proliferación (López-Ruiz *et al.*, 2019b; Luján-Soto *et al.*, 2021). Por esta razón, la disminución en el crecimiento de las líneas STTM528 es un efecto esperado, pero no así para los callos STTM156. Esto plantea interrogantes sobre el mecanismo subyacente que afecta la proliferación de callo STTM156 en las condiciones antes descritas.

En *Arabidopsis*, los módulos miR156-*SPL* y miR172-*TOE1* se coordinan para regular la transición de fase y el tiempo de floración, donde *SPL* se une al promotor *MIR172* para activar la expresión de miR172 (Wu *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2020). En maíz, se han reunido pruebas de la interacción entre miR156 y miR172 en el control de los cambios de fase vegetativa y reproductiva de una forma conservada (Wei *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2011). Además, en cítricos se ha revelado que el módulo de expresión *csi-miR172d-csTOE* se ve afectado al bloquear la actividad de *csi-miR156a-CsSPL* por un secuestrador STTM. El secuestro de *csi-miR156* regula negativamente a *csi-miR172*; a

su vez *csi-miR172* regula a sus genes diana *CsTOE1.1* y *CsTOE1.1*, que reprimen la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de almidón, alterando la acumulación de este polisacárido en las células de CE y regulando el proceso de embriogénesis somática en cítricos (Feng *et al.*, 2022). La regulación conservada de estos dos miRNAs en diferentes especies vegetales, demuestra una interacción coordinada que valdría la pena estudiar para saber si de alguna manera pudiera estar relacionado con la proliferación de callo embriogénico en maíz. Otra interrogante en cuestión es la interacción entre los módulos reguladores de *miR528* y *miR156*. Estudios recientes en arroz identificaron una alta afinidad de *SPL9* a motivos específicos dentro de la región promotora de *miR528*, activando su expresión en condiciones *in vivo*, lo cual a través de la regulación de la expresión de *AO* mediada por *miR528*, orquesta la respuesta antiviral contra la infección por RVS (virus de la raya del arroz; Yao *et al.*, 2019). En este contexto, sería oportuno evaluar la expresión de *miR528* en callo STTM156 y *miR156* en callo STTM528.

Con relación a *miR528*, se informó sobre la identificación de dos sitios de unión de factores de transcripción conservados, asociados con las redes de respuesta a nitrato y auxina. Estos factores controlan la expresión de *zma-MIR528a*, en consecuencia, también de pre-*miR528a* y *miR528* maduro, regulándolos de manera positiva en presencia exógena de nitrato y auxina durante la imbibición, germinación y establecimiento de plántulas de maíz (Luján-Soto *et al.*, 2022). Adicionalmente, en callos embriogénicos bien establecidos durante la ES, *miR528* regula la abundancia de mRNAs diana involucrados en el estrés oxidativo y la acumulación de auxinas (Chávez-Hernández *et al.*, 2015). En base a estos datos y a los resultados obtenidos durante la cinética de crecimiento del callo STTM528, se puede asociar la oxidación del tejido y la disminución de la proliferación al secuestro de *miR528*. Si bien, las células transformadas tienen resistencia a Basta®, que evita la acumulación de un exceso de amoníaco y como consecuencia el estrés oxidativo, al bloquear la actividad de *miR528* se contribuye a la oxidación por la alta concentración de auxinas y fuentes de nitrógeno en los medios de cultivo. A saber, el glufosinato de amonio inhibe la actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS), responsable de convertir el glutamato y el amonio en glutamina, así como de metabolizar el nitrógeno inorgánico en compuestos orgánicos. La inhibición de la GS

conduce a una acumulación rápida de amoníaco, generando un desequilibrio en el sistema antioxidante, que desencadena estrés oxidativo seguido de la muerte celular (Silva *et al.*, 2016; Takano and Dayan, 2020). La existencia del gen de la *fosfinotricina acetiltransferasa*, también conocido como gen *bar*, en los callos STTM convierten al glufosinato a un compuesto no fitotóxico evitando la oxidación. En este caso, al tener un mayor número de células transformadas en los callos STTM156 y PV, se observó una mínima oxidación, pero no así del callo STTM528, debido a dos posibles razones, el bloqueo de miR528 o la presencia de células no transformadas.

Aunque se sugiere la interacción entre los diferentes miRNAs y sus módulos de regulación como causa de la baja proliferación en los callos STTM, es importante considerar que esta reducción pudo ser causada por un factor adicional. Esto debido a la poca proliferación de los callos STTM156-7 donde no hubo la acumulación de *SBP23*. Una posible explicación de este resultado podría ser la interrupción o mutación de un gen crucial para la proliferación, lo cual es frecuente en la transformación por biobalística, donde la inserción del transgén se da de manera múltiple y aleatoria, provocando anomalías en su propia expresión o en la expresión de otros genes (Matzke *et al.*, 2002; Shou *et al.*, 2004).

Finalmente, los resultados de la regeneración de plantas a partir de las líneas de callo STTM, mostraron efectos diferentes en comparación a los callos control, especialmente con el callo silvestre (López-Ruiz *et al.*, 2019b). En términos generales, la exposición a Basta® influyó en la respuesta de los callos transformados de manera significativa. Esta influencia se pudo originar por diferentes razones. En primer lugar, debido a la presencia de células no transformadas, resultado de los problemas en la selección con herbicida. En segundo lugar, la existencia de señuelos que secuestran a miR156 y miR528, no permitiendo realizar su función. Por último, la presencia de células no embriogénicas, característica inherente del callo embriogénico de maíz. En resumen, estos datos son de suma importancia, ya que destacan las diferencias entre los distintos tipos de callos, particularmente la regeneración a partir de callos STTM156, donde no hubo la regeneración de plantas, pero sí un desarrollo abundante de raíces. Esto último, en relación a la importancia de miR156 en la regeneración de plantas a partir de callo embriogénico.

10. Conclusiones

- Se logró la construcción exitosa de secuestradores utilizando tecnología STTM para suprimir a miR156 y miR528. La clave de esta tecnología radicó en el diseño de cebadores que contienen la mitad de la secuencia objetivo en cada uno de ellos. La generación de los STTM fue posible gracias a la aplicación de protocolos ya estandarizados en el laboratorio, como la transformación de células competentes, aislamiento y purificación de plásmidos, digestión con enzimas de restricción, cultivo de bacterias, electroforesis y PCR.
- Se logró introducir con éxito secuestradores de miR528 y miR156 en callos embriogénicos mediante la transformación por biobalística. Un aspecto crucial en el bombardeo fue la aplicación de condiciones específicas y estandarizadas, basadas en trabajos previos sobre callo embriogénico de maíz. Se confirmó la transformación de callo embriogénico mediante la amplificación del gen de resistencia a Basta®. Además, se detectó la presencia de los STTM utilizando cebadores que reconocen tanto al promotor como el terminador 35S, responsables de la expresión de los STTM dentro del callo.
- No se observó una disminución de miR528 y miR156 en callos STTM528 y STTM156, pero sí una acumulación significativa de sus transcritos diana *MATE/BIGE1* y *SPL23*, respectivamente.
- La cinética de crecimiento de los diferentes grupos de callos embriogénicos, reveló una disminución significativa en la proliferación tanto de callos STTM528 como de los STTM156. La baja proliferación de los callos STTM se observó tanto en medio N6P con Basta® como en medio sin este.
- Durante el proceso de regeneración de plantas de maíz a partir de callos embriogénicos, se observaron diferencias entre los callos STTM y los callos control. Uno de los hallazgos más significativos se observó en el callo STTM156, el cual solo regeneró abundantes raíces, evidenciando un posible secuestro de miR156, debido a la importancia de este miRNA en la regeneración de plantas.

11. Perspectivas

- Establecer un método de selección adecuado para callo embriogénico, con el objetivo de obtener únicamente callo transformado. Esto facilitará una cuantificación más precisa tanto de los niveles de miRNAs como de sus mRNAs blanco.
- Explorar un sistema de transformación alternativo que permita una mejor inserción de DNA exógeno, con el propósito de mejorar la expresión génica con el mínimo daño posible en el callo embriogénico.
- Cuantificar otros transcritos blanco de miR528 en callos STTM para corroborar la capacidad multifuncional de este miRNA en la regulación de distintos blancos, durante la proliferación de callo embriogénico de maíz. Asimismo, cuantificar los distintos blancos para explorar si el fenotipo se debe a la acción de uno o varios genes.
- Realizar estudios más detallados durante la proliferación de callo embriogénico mediante pruebas histológicas para caracterizar los distintos tipos celulares presentes en callos STTM.
- Seguimiento de las plantas regeneradas a partir de callos STTM528 para investigar el impacto del silenciamiento de miR528 a nivel molecular y fenotípico.
- Cuantificar miR528 en callos STTM156 y miR156 en callos STTM528, así como de sus genes blanco con la finalidad de investigar si existe alguna interacción entre los módulos de estos dos miRNAs y sus blancos.

12. Referencias

- Alejandri-Ramírez R.N.D.** (2019). Regulación de la expresión génica mediada por RNAs pequeños en callos embriogénicos de maíz. [Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2020/marzo/0801445/Index.html>
- Alkan, A. H., & Akgül, B.** (2022). Endogenous miRNA sponges. In *miRNomics* (pp. 91-104). Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_5
- Dinkova, T.D., & Alejandri- Ramirez, N.D.** (2014). MicroRNA expression and regulation during plant somatic embryogenesis. *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants*, 111-123. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07971-4_7
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D.** (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(8), 475-488. <https://doi.org/10.1038/nrm3611>
- Andorf, C., Beavis, W.D., Hufford, M., Smith, S., Suza, P. W., Wang, K., Woodhouse, M., Yu, J., & Lübberstedt T.** (2019). Technological advances in maize breeding: past, present and future. *Theoretical and applied genetics*, 132(3), 817-849. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03306-3>
- Armenta-Medina, A., & Gillmor, C. S.** (2019a). Genetic, molecular and parent-of-origin regulation of early embryogenesis in flowering plants. *Current topics in developmental biology*, 131, 497-543. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.008>
- Armenta-Medina, A., & Gillmor, C. S.** (2019b). An introduction to methods for discovery and functional analysis of MicroRNAs in plants. *Plant MicroRNAs: Methods and Protocols*, 1-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_1
- Armenta-Medina, A., Gillmor, C. S., Gao, P., Mora-Macias, J., Kochian, L. V., Xiang, D., & Datla, R.** (2020). Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops. *Plant Communications*, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100136>
- Armstrong, C. L., & Green, C. E.** (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 164, 207-214. <https://doi.org/10.1007/BF00396083>
- Asefpour Vakilian, K.** (2020). Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses. *Scientific Reports*, 10(1), 3041. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59981-6>
- Asghar, S., Ghori, N., Hyat, F., Li, Y., & Chen, C.** (2023). Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion. *Plant Growth Regulation*, 99(3), 413-428. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00923-9>

- Axtell, M. J.** (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology*, 64, 137-159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>
- Axtell, M. J., & Meyers, B. C.** (2018). Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the era of big data. *The Plant Cell*, 30(2), 272-284. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00851>
- Barampuram, S., & Zhang, Z. J.** (2011). Recent advances in plant transformation. *Plant chromosome engineering*, 1-35. https://doi.org/10.1007/1007/978-1-61737-957-4_1
- Bartel, D. P.** (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- Bhogireddy, S., Mangrauthia, S. K., Kumar, R., Pandey, A. K., Singh, S., Jain, A., & Kudapa, H.** (2021). Regulatory non-coding RNAs: A new frontier in regulation of plant biology. *Functional & Integrative Genomics*, 21, 313-330. <https://doi.org/10.1007/s10142-021-00787-8>
- Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Peraro, M. D., & Voinnet, O.** (2018). Nucleo-cytosolic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant microRNA pathway. *Molecular Cell*, 69(4), 709-719. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.007>
- Cambiagno, D. A., Giudicatti, A. J., Arce, A. L., Gagliardi, D., Li, L., Yuan, W., Lundberg, S. D., Weigel, D., & Manavella, P. A.** (2021). HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Molecular plant*, 14(3), 426-439. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.019>
- Camacho, H.A.G.** (2019). Establecimiento de un sistema *in vitro* para evaluar la regulación traduccional por microRNA (miRNA) en callos embriogénicos del maíz. [Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2019/mayo/0788672/Index.html>
- Campos Q.S.** (2017). Evaluación de la producción de paclitaxel en cultivos celulares de *Taxus globosa* (Schltdl) elicitados con metil jasmonato y ácido salicílico. [Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2017/mayo/0759084/Index.html>
- Cervera, M.** (2005). Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. In *Transgenic plants: Methods and protocols* (pp. 203-213). <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:203>
- Chávez-Hernández, E. C., Alejandri-Ramírez, N. D., Juárez-González, V. T., & Dinkova, T. D.** (2015). Maize miRNA and target regulation in response to hormone depletion and light exposure during somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00555>
- Chen, C., Liu, Y., & Xia, R.** (2019). Jack of many trades: The multifaceted role of miR528 in monocots. *Molecular Plant*, 12(8), 1044-1046. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.007>

- Chen, H., Miao, Y., Wang, K., & Bayer, M.** (2021). Zygotic embryogenesis in flowering plants. *Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, Apiaceae, Brassicaceae, Solanaceae*, 73-88. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_4
- Choudhary, A., Kumar, A., Kaur, H., & Kaur, N.** (2021). MiRNA: the taskmaster of plant world. *Biologia*, 76, 1551-1567. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00720>
- Chowdhury, S., & Ghosh, S.** (2021). Plant Stem Cell Biology. In *Stem Cells* (pp. 253-266). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1638-9_11
- CONABIO. Base de datos "Maíces"**. (10 de noviembre de 2020a). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. Cd. de México. México. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices>
- CONABIO. Base de datos "Teocintles"**. (10 de noviembre de 2020b). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. Cd. de México. México. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/teocintles>
- Dai, L., Han, S., Zhang, Y., & Hao, D.** (2022). Genetic architecture of embryogenic callus induction in maize from the perspective of population genomics. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(2), 345-359. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02284-7>
- Dalmadi, Á., Gyula, P., Bálint, J., Szittya, G., & Havelda, Z.** (2019). AGO-unbound cytosolic pool of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading. *Nucleic acids research*, 47(18), 9803-9817. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz690>
- Decima Oneto, C. A., Bossio, A. E., Faccio, P. D., Beznec, A., Blumwald, E., & Lewi, D. M.** (2017). Validation of housekeeping genes for qPCR in maize during water deficit stress conditions at flowering time.
- De Rienzo, F., Gabdoulline, R. R., Menziani, M. C., & Wade, R. C.** (2000). Blue copper proteins: a comparative analysis of their molecular interaction properties. *Protein Science*, 9(8), 1439-1454. <https://doi.org/10.1110/ps.9.81439>
- Dodeman, V. L., Ducreux, G., & Kreis, M.** (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(8), 1493-1509. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.8.1493>
- Dresselhaus, T., & Jürgens, G.** (2021). Comparative Embryogenesis in Angiosperms: Activation and Patterning of Embryonic Cell Lineages. *Annual Review of Plant Biology*, 72. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-082520-094112>
- Emons, A. M. C., & Kieft, H.** (1991). Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture with somatic embryos attached to callus cells. *Plant cell reports*, 10, 485-488. <https://doi.org/10.1007/BF00234578>
- Emons, A. M. C., & Kieft, H.** (1995). Somatic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II* (pp. 24-39). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78643-3_3

- Emons, A. M. C., Samallo-Droppers, A., & Van der Toorn, C.** (1993). The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. *Journal of plant physiology*, 142(5), 597-604. [https://doi.org/ 10.1016/S0176-1617\(11\)80405-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80405-0)
- Ergin, K., & Çetinkaya, R.** (2022). Regulation of microRNAs. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, 1-32. [https://doi.org/ 10.1007/978-1-0716-1170-8_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_1)
- Fehér, A., Bernula, D., & Gémes, K.** (2016). The many ways of somatic embryo initiation. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, 23-37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_3
- Feng, M. Q., Lu, M. D., Long, J. M., Yin, Z. P., Jiang, N., Wang, P. B., Guo, W. W., & Wu, X. M.** (2022). miR156 regulates somatic embryogenesis by modulating starch accumulation in citrus. *Journal of Experimental Botany*, 73(18), 6170-6185. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac248>
- Fransz, P. F., & Schel, J.** (1991). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Canadian journal of botany*, 69(1), 26-33. <https://doi.org/10.1139/b91-005>
- Fransz, P. F., & Schel, J. H. N.** (1994). Ultrastructural studies on callus development and somatic embryogenesis in *Zea mays* L. In *Maize* (pp. 50-65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57968-4_4
- Gangadhar, B. H., Venkidasamy, B., Samynathan, R., Saranya, B., Chung, I. M., & Thiruvengadam, M.** (2021). Overview of miRNA biogenesis and applications in plants. *Biologia*, 76(8), 2309-2327. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00763-4>.
- Gao, Z., Nie, J., and Wang, H.** (2021). MicroRNA biogenesis in plant. *Plant Growth Regulation*, 93(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00654-9>
- García-Lara, S., & Serna-Saldivar, S. O.** (2019). Corn history and culture. *Corn*, 1-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00001-2>
- Garrocho-Villegas, V., de Jesús-Olivera, M. T., & Quintanar, E. S.** (2012). Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. *Plant cell culture protocols*, 173-182. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_14
- Gebert, L. F., & MacRae, I. J.** (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(1), 21-37. [https://doi.org/ 10.1038/s41580-018-0045-7](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7)
- Grossniklaus, U.** (2017). Polyspermy produces tri-parental seeds in maize. *Current Biology*, 27(24), R1300-R1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.059>
- Guerrero, A. O.** (1998). Transformación de células de maíz (*Zea mays* raza tuxpeña) por medio del bombardeo de partículas. [Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma México]. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/pdbis/263845/Index.html>

- He, G., Zhang, J., Li, K., Xiong, Z., Chen, M., Chang, J., Wang, Y., Yang, G., & Barbabás, B.** (2006). An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 86, 15-25
- He, S., Yang, Z., Skogerbo, G., Ren, F., Cui, H., Zhao, H., Chen, R., & Zhao, Y.** (2008). The properties and functions of virus encoded microRNA, siRNA, and other small noncoding RNAs. *Critical reviews in microbiology*, 34(3-4), 175-188. <https://doi.org/10.1080/10408410802482008>
- Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K.** (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4(4), 201-216. <https://doi.org/10.1002/reg2.91>
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E.** (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99-110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y.** (2015). The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in cell biology*, 25(11), 651-665. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y.** (2013). Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Molecular cell*, 52(4), 591-601. <https://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.033>
- Jiménez, V. M. J.** (2006). Transformación Genética de Callos Embriogénicos de Maíz (*Zea mays* L.) con el gen de la Glicoproteína G del Virus de la Rabia. [Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/pdbis/263845/Index.html>
- Jin, L., Yarra, R., Zhou, L., Zhao, Z., & Cao, H.** (2020). miRNAs as key regulators via targeting the phytohormone signaling pathways during somatic embryogenesis of plants. *3 Biotech*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02487-9>
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B.** (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>.
- Juarez-Escobar, J., Bojórquez-Velázquez, E., Elizalde-Contreras, J. M., Guerrero-Analco, J. A., Loyola-Vargas, V. M., Mata-Rosas, M., & Ruiz-May, E.** (2021). Current Proteomic and Metabolomic Knowledge of Zygotic and Somatic Embryogenesis in Plants. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11807. <https://doi.org/10.3390/ijms222111807>
- Juárez-González, V. T.** (2015). Análisis de la expresión de enzimas de la vía de biogénesis de RNAs pequeños (sRNAs) durante la embriogénesis somática de maíz. [Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2015/octubre/0736311/Index.html>

- Juárez-González, V. T., López-Ruiz, B. A., Baldrich, P., Luján-Soto, E., Meyers, B. C., & Dinkova, T. D.** (2019). The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. *Scientific reports*, *9*(1), 14511. <https://doi.org/10.1038/s41598-01950962-y>
- Kato, Y.** (1984). Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evolutionary biology*, *17*, 219-253. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.55.383>
- Kausch, A. P., Wang, K., Kaeppler, H. F., & Gordon-Kamm, W.** (2021). Maize transformation: history, progress, and perspectives. *Molecular Breeding*, *41*(6), 1-36. <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01225-0>
- Kawamata, T., & Tomari, Y.** (2010). Making risc. *Trends in biochemical sciences*, *35*(7), 368-376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
- Kellogg, E.A.** (2015). Embryology. In: Flowering Plants. Monocots. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 13. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15332-2_4.
- Klein, T. M., & Fitzpatrick-Mcelligott, S.** (1993). Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Current Opinion in Biotechnology*, *4*(5), 583-590. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90081-7)
- Kramer, M. F.** (2011). **Stem-loop RT-qPCR for miRNAs.** *Current protocols in molecular biology*, *95*(1), 15-10. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>
- Kumar, D., & Singh, V.** (2019). Bioethanol production from corn. In *Corn* (pp. 615-631). AACC International Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00022-X>
- Kumar, K., Jha, A. K., Kumar, B., Karjagi, C. G., Abhishek, A., Gambhir, G., Aggarwal, C., Tyagi, A., Sharma, P., Pandey, P., & Rakshit, S.** (2022). Development of an efficient and reproducible in vitro regeneration and transformation protocol for tropical maize (*Zea mays* L.) using mature seed-derived nodal explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *148*(3), 557-571. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02207-y>
- Li, M., & Yu, B.** (2021). Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA biology*, *18*(12), 2087-2096. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1899491>
- Li, N., Yang, T., Guo, Z., Wang, Q., Chai, M., Wu, M., Li, X., Li, W., Li, G., Tang, J., Tang, G., & Zhang, Z.** (2020). Maize microRNA166 inactivation confers plant development and abiotic stress resistance. *International journal of molecular sciences*, *21*(24), 9506. <https://doi.org/10.3390/ijms21249506>
- Li, Z. X., Li, S. G., Zhang, L. F., Han, S. Y., Li, W. F., Xu, H. Y., Yang, W. H., Liu, Y. L., Fan Y. R., & Qi, L. W.** (2016). Over-expression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *127*, 461-473. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0305-8>

- Li, Z., Xu, R., & Li, N.** (2018). MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutrition and metabolism*, 15(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0305-8>.
- 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, 1119. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01119>
- Lin, Y., & Lai, Z.** (2013). Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS One*, 8(4), e60337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060337>
- Liu, Q., Wang, F., & Axtell, M. J.** (2014). Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. *The Plant Cell*, 26(2), 741-753. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120972>
- Liu, X., Liu, S., Wang, R., Chen, X., Fan, Z., Wu, B., & Zhou, T.** (2019). Analyses of MiRNA functions in maize using a newly developed ZMBJ-CMV-2bN81-STTM vector. *Frontiers in plant science*, 10, 1277. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01277>
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Chávez-Hernández, E. C., & Dinkova, T. D.** (2018). MicroRNA expression and regulation during maize somatic embryogenesis. *Plant cell culture protocols*, 397-410. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_28
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Luján-Soto, E., & Dinkova, T. D.** (2019a). The role of small RNAs in plant somatic embryogenesis. *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants*, 311-338. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14760-0_12
- López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Sandoval-Zapotitla, E., & Dinkova, T. D.** (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(9), 2079. <https://doi.org/10.3390/ijms20092079>
- Loya, C. M., Lu, C. S., Van Vector, D., & Fulga, T. A.** (2009). Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms. *Nature methods*, 6(12), 897-903. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1402>
- Loy, D. D., & Lundy, E. L.** (2019). Nutritional properties and feeding value of corn and its coproducts. In *Corn* (pp. 633-659). AACC International Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00023-1>
- Lujan-Soto, E., Aguirre de la Cruz, P. I., Juarez-Gonzalez, V. T., Reyes, J. L., Sanchez, M. D. L. P., & Dinkova, T. D.** (2022). Transcriptional Regulation of zma-MIR528a by Action of Nitrate and Auxin in Maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15718
- Luján-Soto, E., Juárez-González, V. T., Reyes, J. L., & Dinkova, T. D.** (2021). MicroRNA Zma-miR528 Versatile Regulation on Target mRNAs during Maize Somatic Embryogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5310. <https://doi.org/10.3390/ijms22105310>

- Luna V, S., Figueroa M, J., Baltazar M, B., Gomez L, R., Townsend, R., & Schoper, J. B.** (2001). Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science*, 41(5), 1551-1557
- Lytle, J. R., Yario, T. A., & Steitz, J. A.** (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9667-9672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104>
- Mallory, A. C., & Vaucheret, H.** (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics*, 38(Suppl 6), S31-S36. <https://doi.org/10.1038/ng1791>
- Márquez-Escobar, V. A., González-Ortega, O., & Rosales-Mendoza, S.** (2018). Plant transformation strategies. *Prospects of plant-based vaccines in veterinary medicine*, 23-42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90137-4_2
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez G, J., Buckler, E., & Doebley, J.** (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6080-6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Matzke, MA, Aufsatz, W., Kanno, T., Mette, MF y Matzke, AJ** (2002). Silenciamiento de genes dependiente de homología y defensa del huésped en plantas. *Avances en genética* , 46 , 235-275. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(02\)46009-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(02)46009-9)
- Mauro, S., Van Eycken, F., Challou, N., Lucas, P., & L'Oiseau, M.** (2005). Characterization of new maize chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoforms by high resolution native two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Identification of chilling responsive chloroplastic superoxide dismutase isoforms. *Physiologia Plantarum*, 124(3), 323-335. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00499.x>
- Mordhorst, A. P., Toonen, M. A., de Vries, S. C., & Meinke, D.** (1997). Plant embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(6), 535-576. <https://doi.org/10.1080/07352689701959>
- Moro, B., Chorostecki, U., Arikiti, S., Suarez, I. P., Höbartner, C., Rasia, R. M., Meyers, B. C., & Palatnik, J. F.** (2018). Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic acids research*, 46(20), 10709-10723.
- Nachtigall, P. G., & Bovolenta, L. A.** (2022). Computational detection of microRNA targets. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, 187-209. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_10
- Nardmann, J., & Werr, W.** (2009). Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. In *Handbook of maize: Its biology* (pp. 105-119). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_6
- Nic-Can, G. I., & Loyola-Vargas, V. M.** (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, 171-182. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_10

- Nowak, K., & Gaj, M. D.** (2016). Transcription factors in the regulation of somatic embryogenesis. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*, 53-79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_5
- Nyirenda, H., Mwangomba, W., & Nyirenda, E. M.** (2021). Delving into possible missing links for attainment of food security in Central Malawi: farmers' perceptions and long-term dynamics in maize (*Zea mays* L.) production. *Heliyon*, 7(5), e07130. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07130>
- Ortiz Morea, E. G., Marques da Silva, E., Targino Valente, G., Barrera Rojas, C. H., Vincentz, M., & Siveira Nogueira, F. T.** (2016). Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biology*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0716-5>
- Othman, S. M. I. S., Mustaffa, A. F., Che-Othman, M. H., Samad, A. F. A., Goh, H. H., Zainal, Z., & Ismail, I.** (2023). Overview of Repressive miRNA Regulation by Short Tandem Target Mimic (STTM): Applications and Impact on Plant Biology. *Plants*, 12(3), 669. <https://doi.org/10.3390/plants12030669>
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., & Violic, A. D.** (2000). *Tropical maize: improvement and production*. Food and Agriculture Organization (FAO)
- Peng, T., Qiao, M., Liu, H., Teotia, S., Zhang, Z., Zhao, Y., Wang, B. Zhao, D., Shi, L., Zhang, C., Le, B., Rogers, K., Gunasekara, C., Duar, H., Gu, Y., Tiar, L., Nie, J., Qi, J., Meng, F ... & Tang, G.** (2018). A resource for inactivation of microRNAs using short tandem target mimic technology in model and crop plants. *Molecular plant*, 11(11), 1400-1417. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.09.003>
- Pierre-Jerome, E., Drapek, C., & Benfey, P. N.** (2018). Regulation of division and differentiation of plant stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*, 34, 289-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062459>
- Qin, Z., Li, C., Mao, L., & Wu, L.** (2014). Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. *Frontiers in plant science*, 5, 586. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00586>
- Reiser, L., & Fischer, R. L.** (1993). The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell*, 5(10), 1291. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1291>
- Rodriguez, R. L., & Denhardt, D. T. (Eds.).** (2014). *Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworth-Heinemann, pp. 517-539
- Rogers, K., & Chen, X.** (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7), 2383-2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113.113159>
- Sairam, R. V., Parani, M., Franklin, G., Lifeng, Z., Smith, B., MacDougall, J., Wilber, C., Sheikhi, H., Kashikar, N., Meeker, K., Al-Abed, D., Berry, K., Vierling, R & Goldman, S. L.** (2003). Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*, 46(2), 323-329. <https://doi.org/10.1139/g02-120>

- Salem, M. A., Li, Y., Bajdzienko, K., Fisahn, J., Watanabe, M., Hoefgen, R., Schöttler, M. A., & Giavalisco, P.** (2018). RAPTOR controls developmental growth transitions by altering the hormonal and metabolic balance. *Plant Physiology*, *177*(2), 565-593. <https://doi.org/10.1104/p.01711>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H.** (2019). An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*, *234*(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Salvo, S. A., Hirsch, C. N., Buell, C. R., Kaeppler, S. M., & Kaeppler, H. F.** (2014). Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. *PloS one*, *9*(10), e111407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111407>
- Sanagala, R., & Kumari, R.** (2018). Expression analysis of miRNA 164c during rice regeneration in different Indica rice genotypes. *J. Pure Appl. Microbiol*, *12*, 2159-2165. <http://dx.doi.org/10.22207/jpam.17.4.54>
- Sánchez González, J. D. J., Ruiz Corral, J. A., García, G. M., Ojeda, G. R., Larios, L. D. C., Holland, J. B., Medrano, M. R., & García, R. G. E.** (2018). Ecogeography of teosinte. *PLoS One*, *13*(2), e0192676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192676>
- Santillán-Fernández, A., Salinas-Moreno, Y., Valdez-Lazalde, J. R., Bautista-Ortega, J., & Pereira-Lorenzo, S.** (2021). Spatial Delimitation of Genetic Diversity of Native Maize and Its Relationship with Ethnic Groups in Mexico. *Agronomy*, *11*(4), 672. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040672>
- Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Perrimon, N., & Berger, B.** (2010). Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3' UTRs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(36), 15751-15756. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006172105>
- Schwartz, B. W., Vernon, D. M., & Meinke, D. W.** (1997). Development of the suspensor: differentiation, communication, and programmed cell death during plant embryogenesis. In *Cellular and molecular biology of plant seed development* (pp. 53-72). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8909-3_2
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S., & Maraffa, S. B.** (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural reviews*, *2*, 268-310. <https://doi.org/10.1002/9781118060759.ch6>
- Siddiqui, Z. H., Abbas, Z. K., Ansari, M. W., & Khan, M. N.** (2019). The role of miRNA in somatic embryogenesis. *Genomics*, *111*(5), 1026-1033. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.11.022>
- Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P., & Duncan, D.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant cell reports*, *25*, 320-328. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0058-5>

- Silva, I. P. D. F., Carbonari, C. A., Velini, E. D., Silva Jr, J. F., Tropaldi, L., & Gomes, G. L. G. C.** (2016). Velocidad de absorción del glufosinato y sus efectos en malezas y algodón. *Agrociencia*, *50*(2), 239-249. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000200239&lng=es&tlng=es.
- Siomi, H., & Siomi, M. C.** (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell*, *38*(3), 323-332. [10.1016/j.molcel.2010.03.013](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.013)
- Smoczynska, A., Segal, P., Stepień, A., Knop, K., Jarmolowski, A., Pacak, A., & Szweykowska-Kulinska, Z.** (2019). miRNA detection by stem-loop RT-qPCR in studying microRNA biogenesis and microRNA responsiveness to abiotic stresses. *Plant MicroRNAs: Methods and Protocols*, 131-150. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_10
- Shou, H., Frame, B. R., Whitham, S. A., & Wang, K.** (2004). Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation. *Molecular Breeding*, *13*, 201-208. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000018767.64586.53>
- Sreenivasulu, N., & Wobus, U.** (2013). Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annual review of plant biology*, *64*, 189-217. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120215>
- Strable, J., & Scanlon, M. J.** (2009). Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold spring harbor protocols*, *2009*(10), pdb-emo132. [doi:10.1101/pdb.emo132](https://doi.org/10.1101/pdb.emo132). PMID: 20147033
- Su, X., Lu, L., Li, Y., Zhen, C., Hu, G., Jiang, K., Yan, Y., Xu, Y., Wang, G., Shi, M., Chen, X., & Zhang, B.** (2020). Reference gene selection for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) expression analysis in *Galium aparine* L. *PLoS One*, *15*(2), e0226668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226668>
- Sun, G.** (2012). MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant molecular biology*, *80*, 17-36. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9817-6>
- Sun, Q., Liu, X., Yang, J., Liu, W., Du, Q., Wang, H., Fu, C., & Li, W. X.** (2018). MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Molecular plant*, *11*(6), 806-814. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.013>
- Suzuki, M., Sato, Y., Wu, S., Kang, B. H., & McCarty, D. R.** (2015). Conserved functions of the MATE transporter BIG EMBRYO1 in regulation of lateral organ size and initiation rate. *The Plant Cell*, *27*(8), 2288-2300. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00290>
- Szyrajew, K., Bielewicz, D., Dolata, J., Wójcik, A. M., Nowak, K., Szczygieł-Sommer, A., Kulinska-Szweykowska, Z., Jarmolowski, A., & Gaj, M. D.** (2017). MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00018>.
- Takano, H. K., & Dayan, F. E.** (2020). Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Management Science*, *76*(12), 3911-3925. <https://doi.org/10.1002/ps.5965>

- Tang, F., Tao, Y., Zhao, T., & Wang, G.** (2006). In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). *Plant cell, tissue and organ culture*, 84, 233-237. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9017-7>
- Tang, G., Yan, J., Gu, Y., Qiao, M., Fan, R., Mao, Y., & Tang, X.** (2012). Construction of short tandem target mimic (STTM) to block the functions of plant and animal microRNAs. *Methods*, 58(2), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.10.006>
- Teotia, S., & Tang, G.** (2017). Silencing of stress-regulated miRNAs in plants by short tandem target mimic (STTM) approach. *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*, 337-348. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7136-7_22
- Upadhyay, N., Kar, D., & Datta, S.** (2020). A multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter modulates auxin levels in root to regulate root development and promotes aluminium tolerance. *Plant, cell & environment*, 43(3), 745-759. <https://doi.org/10.1111/pce.13658>
- Vernoud, V., Hajduch, M., Khaled, A., Depège, N., & Rogowsky, M. P.** (2005). Maize embryogenesis. *Maydica*, 50(3/4), 469
- Villar-Martin, L. M., & Rubio-Somoza, I.** (2019). Mimicry technology: a versatile tool for small RNA suppression. In *Plant MicroRNAs* (pp. 239-245). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-1939-9042-9_18
- Walbot, V., & Evans, M. M.** (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 369-379. <https://doi.org/10.1038/nrg1064>
- Wang, C., Ma, H., Zhu, W., Zhang, J., Zhao, X., & Li, X.** (2021). Seedling-derived leaf and root tip as alternative explants for callus induction and plant regeneration in maize. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1570-1581. <https://doi.org/10.1111/ppl.13347>
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G.** (2019). Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in plant science*, 10, 360.
- Wei, H., Zhao, Y., Xie, Y., & Wang, H.** (2018). Exploiting SPL genes to improve maize plant architecture tailored for high-density planting. *Journal of experimental botany*, 69(20), 4675-4688. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery258>
- Winkelmann, T.** (2016). Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 25-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2
- Wójcik, A. M., & Gaj, M. D.** (2016). miR393 contributes to the embryogenic transition induced in vitro in *Arabidopsis* via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta*, 244, 231-243. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2505-7>
- Wójcik, A. M., Nodine, M. D., & Gaj, M. D.** (2017). miR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2024. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02024>

- Wójcikowska, B., Wójcik, A. M., & Gaj, M. D.** (2020). Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2307. <https://doi.org/10.3390/ijms21072307>
- Wong, G., and Millar, A. A.** (2019). The use of microRNA decoy technologies to inhibit miRNA function in Arabidopsis. In *Plant MicroRNAs* (pp. 227-238). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_17
- Woodhouse, M. R., Cannon, E. K., Portwood, J. L., Harper, L. C., Gardiner, J. M., Schaeffer, M. L., & Andorf, C. M.** (2021). A pan-genomic approach to genome databases using maize as a model system. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03173-5>
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S.** (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *cell*, 138(4), 750-759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>
- Xie, Y., Zhou, Q., Zhao, Y., Li, Q., Liu, Y., Ma, M., ... & Wang, H.** (2020). FHY3 and FAR1 integrate light signals with the miR156-SPL module-mediated aging pathway to regulate Arabidopsis flowering. *Molecular Plant*, 13(3), 483-498. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.01.013>
- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., & Poethig, R. S.** (2016). Developmental functions of miR156-regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in Arabidopsis thaliana. *PLoS genetics*, 12(8), e1006263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>
- Xu, Z., Zhong, S., Li, X., Li, W., Rothstein, S. J., Zhang, S., Bi, Y., & Xie, C.** (2011). Genome-wide identification of microRNAs in response to low nitrate availability in maize leaves and roots. *PloS one*, 6(11), e28009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028009>
- Yan, J., Li, J., & Zou, H.** (2021). Target Mimic and Short Tandem Target Mimic Technologies for Deciphering Functions of miRNAs in Plants. In *RNA-Based Technologies for Functional Genomics in Plants* (pp. 43-52). Springer, Cham. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-64994-4_3
- Yang, X., & Zhang, X.** (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57
- Yang, X., Dong, W., Ren, W., Zhao, Q., Wu, F., & He, Y.** (2021). Cytoplasmic HYL1 modulates miRNA-mediated translational repression. *The Plant Cell*, 33(6), 1980-1996. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab090>
- Yeung, E. C.** (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. *In vitro embryogenesis in plants*, 205-247. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_6
- Yi, F., Gu, W., Chen, J., Song, N., Gao, X., Zhang, X., & Lai, J.** (2019). High temporal-resolution transcriptome landscape of early maize seed development. *The Plant Cell*, 31(5), 974-992. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00961>

- Yao, S., Yang, Z., Yang, R., Huang, Y., Guo, G., Kong, X., Lan, Y., Zhou, T., Wang, W., Cao, X., Wu, J., & Li, Y.** (2019). Transcriptional regulation of miR528 by OsSPL9 orchestrates antiviral response in rice. *Molecular plant*, *12*(8), 1114-1122. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.04.010>
- Yu, Y., Jia, T., & Chen, X.** (2017). The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytologist*, *216*(4), 1002-1017. <https://doi.org/10.1111/nph.14834>
- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D., & Izaurralde, E.** (2013). GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *The EMBO journal*, *32*(7), 1052-1065. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.44>
- Zhang, B., & Wang, Q.** (2015). MicroRNA-based biotechnology for plant improvement. *Journal of cellular physiology*, *230*(1), 1-15
- Zhang, B., Pan, X., & Anderson, T. A.** (2006). Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS letters*, *580*(15), 3753-3762
- Zhang, B., Wang, Q., & Pan, X.** (2007). MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *Journal of cellular physiology*, *210*(2), 279-289. <https://doi.org/10.1002/jcp.20869>
- Zhang, H., Zhang, J., Yan, J., Gou, F., Mao, Y., Tang, G., & Zhu, J. K.** (2017). Short tandem target mimic rice lines uncover functions of miRNAs in regulating important agronomic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(20), 5277-5282. <https://doi.org/10.1038/ng2079>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1643-9>
- Zhang, L., Chia, J. M., Kumari, S., Stein, J. C., Liu, Z., Narechania, A., Maher, A. C., Guill, K., McMullen, D. M., & Ware, D.** (2009). A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS genetics*, *5*(11), e1000716. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000716>
- Zhang, L., Xiang, Y., Chen, S., Shi, M., Jiang, X., He, Z., & Gao, S.** (2022). Mechanisms of microRNA biogenesis and stability control in plants. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 844149. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.844149>
- Zhang, T., Lv, W., Zhang, H., Ma, L., Li, P., Ge, L., & Li, G.** (2018). Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize. *BMC plant biology*, *18*, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1441-z>
- Zhang, Z., Teotia, S., Tang, J., & Tang, G.** (2019). Perspectives on microRNAs and phased small interfering RNAs in maize (*Zea mays* L.): functions and big impact on agronomic traits enhancement. *Plants*, *8*(6), 170. <https://doi.org/10.3390/plants8060170>
- Zobrist, J. D., Martin-Ortigosa, S., Lee, K., Azanu, M. K., Ji, Q., & Wang, K.** (2021). Transformation of Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) via Biolistic Bombardment of Seedling-Derived Callus Tissues. *Frontiers in plant science*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.773419>

13. Anexos

Preparación de las micropartículas de tungsteno

1. Se pesaron 30 mg de micropartículas de tungsteno en un tubo de 1.5 mL
2. Después se añadió un mL de etanol al 70%
3. Posteriormente la mezcla se agito en vortex por 5 min y se incubo por 15 min a temperatura ambiente.
4. Luego de la incubación, la mezcla fue centrifugada a 12,000 rpm por 10 segundos, descarnado el sobrenadante (etanol al 70%) y conservando las micropartículas en el tubo.
5. Las micropartículas se lavaron tres veces con 1 mL de agua estéril, agitándolas en vortex durante 5 segundos y centrifugándolas a 12,000 rpm de 5 a 8 segundos. El agua se descartó, conservando únicamente las micropartículas.
6. Finalmente, se adicionaron 500 μ L de glicerol al 50% a las micropartículas, permitiendo una concentración de 30 mg/mL. Esta suspensión puede ser almacenada a -20 °C durante dos semanas.

Adsorción del DNA a las micropartículas

1. La suspensión (glicerol con micropartículas) se agito por 5 min en vortex antes de su uso.
2. En tubos eppendorf se colocaron 50 μ L de la suspensión de micropartículas de tungsteno (3 mg), dando vortex continuo para maximizar la uniformidad de muestreo.
3. Se adicionaron 5 μ L de DNA [1 μ g/ μ L], 50 μ L de CaCl₂ [2.5 M] y 20 μ L de espermidina [0.1 M] a la suspensión. Entre cada adición se agito con vortex durante 3 segundos para homogenizar.
4. Para fijar los componentes a las micropartículas, la mezcla se agito suavemente durante 1 minuto a baja velocidad en un vortex. Posteriormente, se mantuvo la agitación regular hasta antes del lavado, con el objetivo de prolongar el tiempo de unión del DNA con las balas.

5. Se procedió a lavar las micropartículas con el DNA justo antes de distribuir las en el filtro de bombardeo (macrocarrier holder) para el disparo. En el primer paso, las micropartículas con el DNA se centrifugaron a 12,000 rpm durante 60 segundos, retirando y desechando el sobrenadante. Luego, se añadieron 140 μ L de etanol al 70% a las balas, agitándolas suavemente hasta obtener una mezcla homogénea. Esta mezcla fue centrifugada a 12,000 rpm por 30 segundos para precipitar las balas, tras lo cual se retiró el sobrenadante. En el tercer paso, se añadieron 140 μ L de etanol absoluto, agitando nuevamente hasta la homogeneidad. Las balas fueron precipitadas mediante centrifugación a 12,000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Finalmente, las micropartículas con el material genético se resuspendieron en 48 μ L de etanol absoluto. Esta suspensión se utilizó para 6 disparos.
6. Se aplicaron 6 μ L de balas recubiertas con DNA sobre el macrocarrier, distribuyéndolas perfectamente en el centro con ayuda de una micropipeta. Se permitió transcurrir de 10 a 15 minutos para que el etanol se evaporara antes de proceder al disparo.

Preparación de la solución de sustrato X-Gluc

1. Se prepararon las soluciones stock: tampón Tris-HCl 1 M a pH 7.0, NaCl 5 M, tampón Tris-HCl 0.1 M a pH 7.0, Tritón X-100 al 1%, ferricianuro de potasio 5 mM, pH 7.0 y ferrocianuro de potasio 5 mM, pH 7.0.
2. A partir de las soluciones stock, se preparó la solución sustrato X-Gluc con las siguientes concentraciones: 100 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 0.01% de Tritón X-100, 0.5 mM de ferricianuro de potasio, 0.5 mM de ferrocianuro de potasio y 2 mM de X-gluc (polvo; para 10 mL de la mezcla de reactivos, se disolvieron 10.41 mg de X-Gluc en 0.4 mL de N, N -dimetilformamida [DMF] antes de mezclar con los otros componentes).

Figuras suplementarias

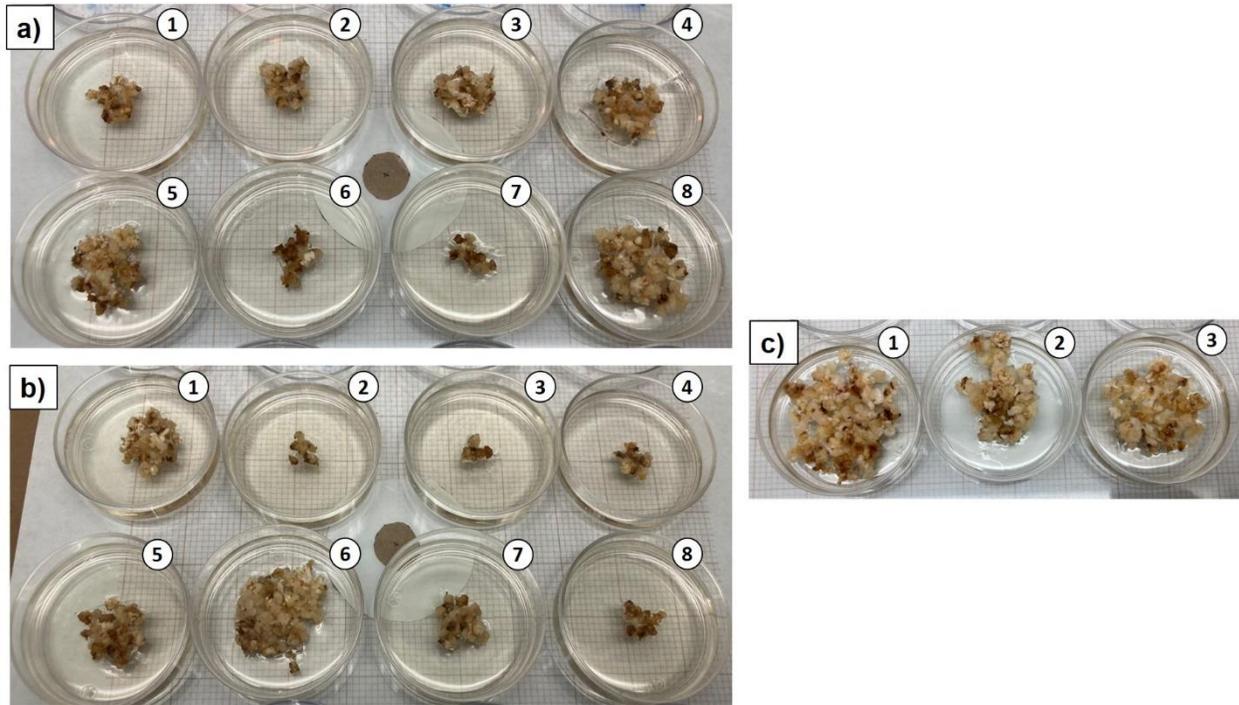


Figura S1. Recuperación de callos en medio sin BASTA después de cuatro meses. (a) callos transformados con STTM156; callos transformados con STTM528; **(c)** callos transformados con plásmido vacío pFGC5941.

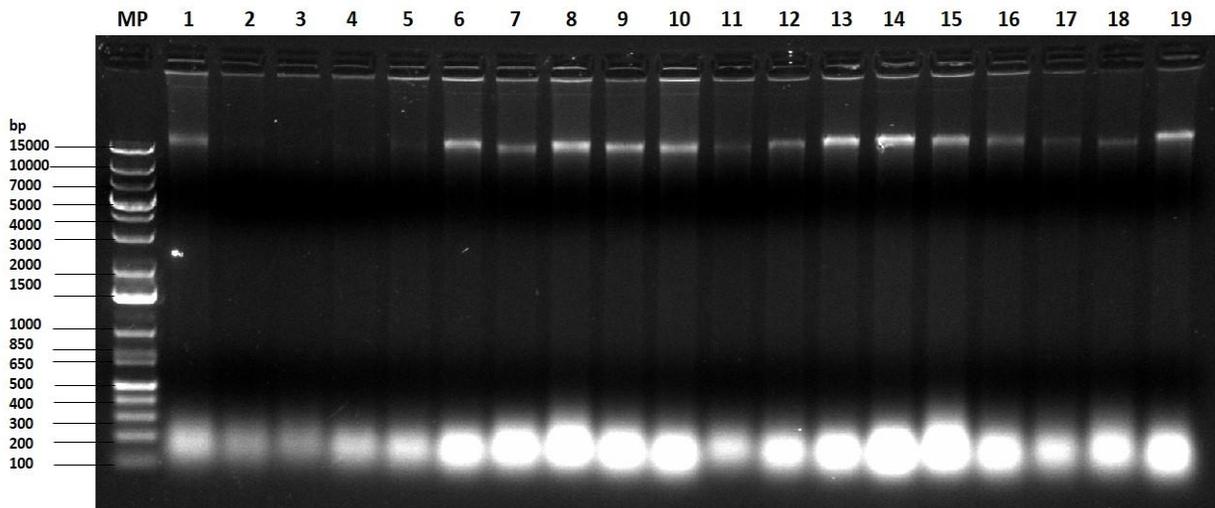


Figura S2. Electroforesis del DNA extraído de callo embriogénico de maíz.: Carriles 1-8) callos STTM156; 9-16) callos STTM528; 17 y 18 callos pFGC5941-vacío; 19) callo silvestre (WT).

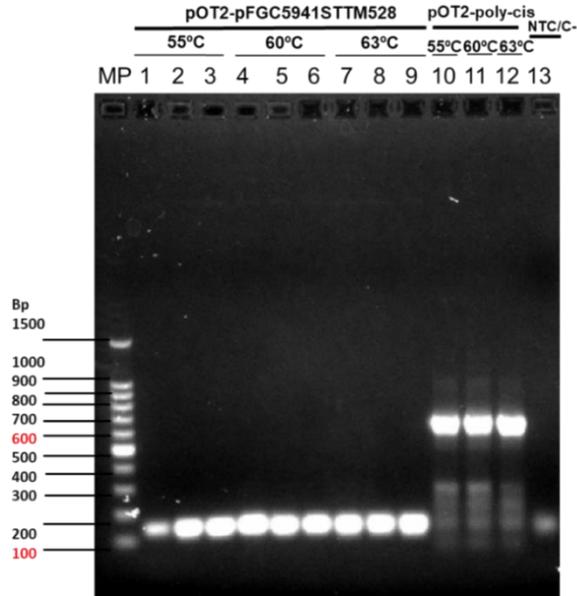


Figura S3. Electroforesis de PCR con oligos de secuenciación (STTM-common-real-F/R). Otra manera de confirmar la presencia del STTM dentro del vector binario, es mediante una PCR con los oligos diseñados para la secuenciación. La amplificación fue estandarizada a diferentes temperaturas en el templado y se calculó el tamaño del fragmento con ayuda del programa SnapGen 6.1.2. El fragmento con el sitio poly-cis debe medir ~650 bp en comparación con el fragmento STTM de un tamaño de ~150 bp, siendo que el STTM sustituye al sitio poly-cis. Carriles 1-9) pOT2-pFGC5941-STTM156; carriles 10-12) pOT2-poly-cis; carril 13) control negativo. (MP) Marcadore utilizado 100 bp y 1Kb DNA Ladder Promega.

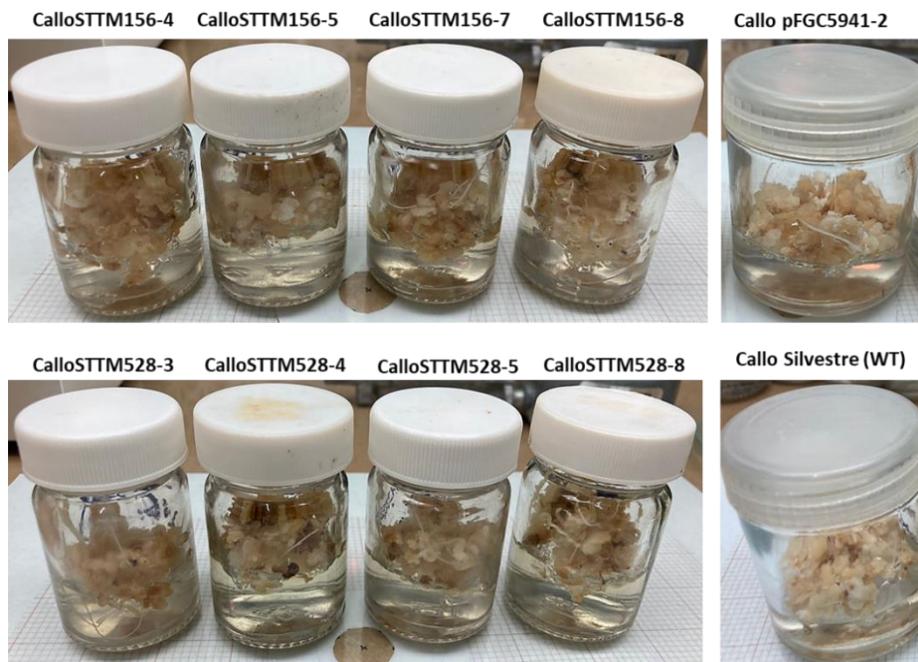


Figura S4. Proliferación de callo en medio N6P después de 6 meses. Callos utilizados en las pruebas de cinética de crecimiento y pruebas de regeneración.

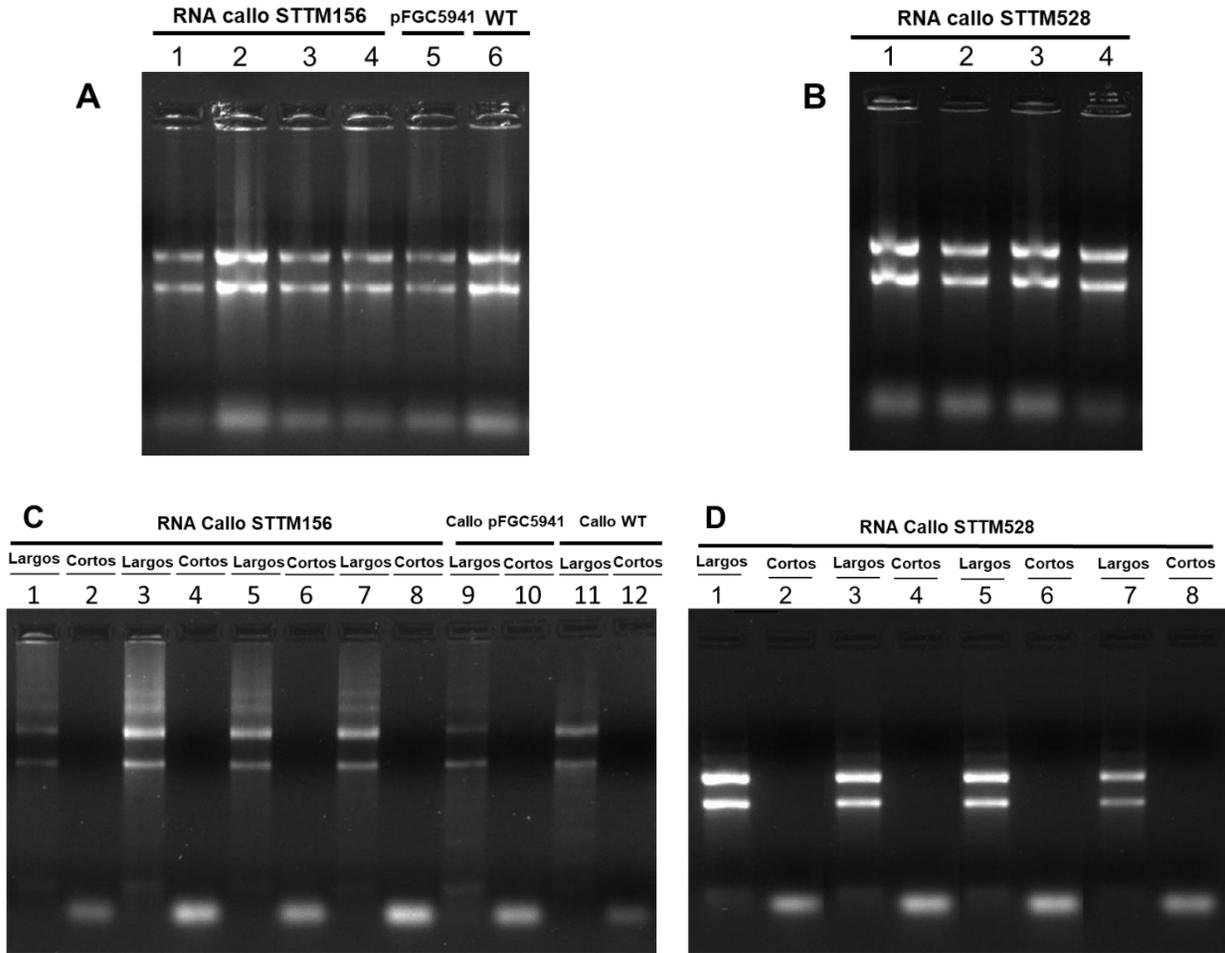


Figura S5. Extracción y fraccionamiento de RNA de callo embriogénico. (A) muestra 1-4) callo STTM156; 5) callo pFGC5941-vacío; y 6) callo no transformado (WT). (B) muestras 1-4) STTM528. (C) muestras 1, 3, 5 y 7) RNAs largos de callos STTM156; 9) callos pFGC5941-vacío (PV); 11) callo no transformado (WT); muestras 2, 4, 6, 8) RNAs cortos de callos STTM156, 10) callo pFGC5941 sin STTM; y 12) callo sin transformar. (D) muestras 1, 3, 5 y 7) RNAs de callos STTM528; y muestras 2, 4, 6 y 8) RNAs pequeños de callos STTM528.

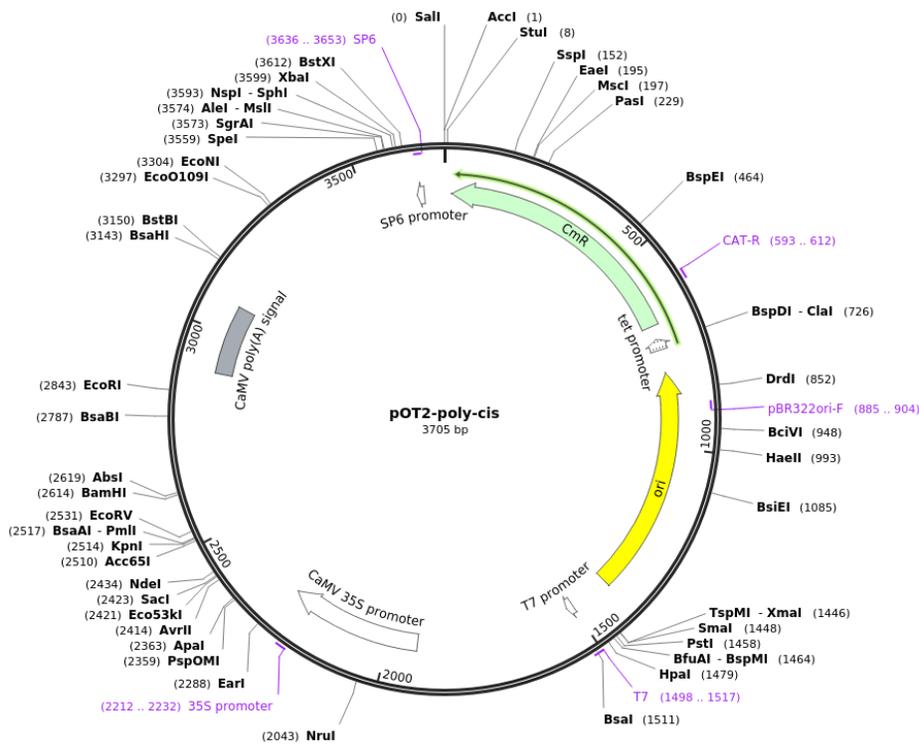


Figura S6. Vector pOT2-poly-cis para clonar cualquier gen o secuencia STTM o miRNA artificial bajo el promotor CaMV 35S. Addgen 141177.

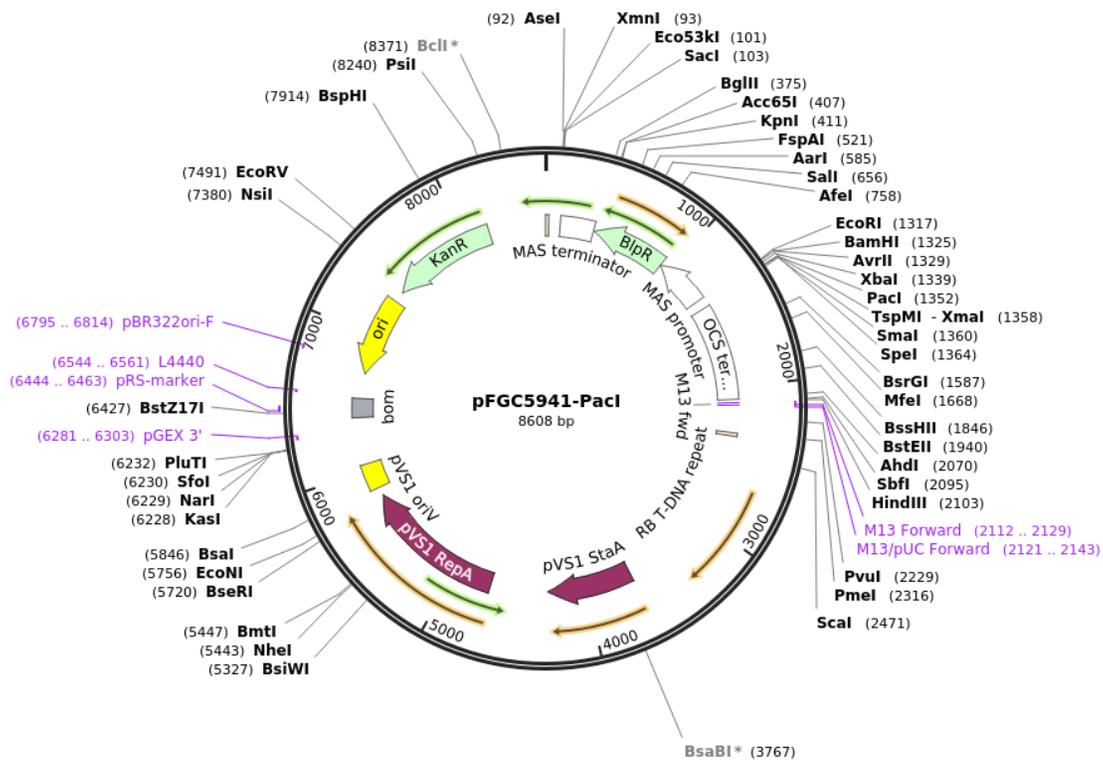


Figura S7. Vector pFGC5941 con expresión de resistencia a Basta® para cualquier gen o secuencia STTM. Addgen 44182.

Tablas suplementarias

Tabla S1. Lista de oligonucleótidos empleados en la prueba de RT-qPCR

Nombre	Acceso	Oligonucleótidos (5´-3´)
SPL23	GRMZM2G126018_T01	Forward ACACCAACGCGATCAATTGG Reverse ACCCTGAAAAACCAGAACGG
MATE/BIGE1	Zm00001d012883_T001	Forward CCCACGACGAGATGCCATAT Reverse AACGGCCTCTCTTTCTCTGC
zma-miR528	MI0013239	Stem-Loop GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACCTCCTC
zma-miR156a	Primer stem-loop	Stem-Loop GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACG ACGTGCTC
Universal reverse primer		GTGCAGGGTCCGAGGTA

Tabla S2. Formulación del medio N6P empleado para la inducción y proliferación de callos embriogénicos de maíz. *La composición está bajo la patente del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y se utiliza 10 mL/L del stock.

Componente	g/L
KNO3	2.38
(NH4)2SO4	0.463
KH2PO4	0.4
MgSO4-7H2O	0.185
CaCl2-2H2O	0.166
Na2EDTA-H2O	0.0375
FeSO4-7H2O	0.0278
MnSO4-H2O	0.0032
H3BO3	0.0016
ZnSO4-7H2O	0.0015
KI	0.00083
Adenina	0.1
Prolina	2.5
Caseína	0.2
Sacarosa	30
Cocktel 20 de vitaminas*	*
Gelzan	3.5

Tabla S3. Medios de cultivo utilizados en las distintas etapas de la embriogénesis somática. Las cantidades son para preparar 1L

Componentes	Medio inducción	Medio proliferación	Medio regeneración 50%	Medio regeneración 0%	Medio regeneración MS	Medio de selección
Sales medio N6	100%					
Sales medio MS					100%	
Adenina	10 mg					
Coctel 20	10 ml					
L-prolina	2.7 g					
Caseína	0.2 g					
Vitaminas MS modificados (R2)					100%	
Glicina					2 mg	
2,4-D	2 mg		1 mg	0.5 mg		
BA	0.5 mg					
pH	5.7					
Gelzan	3.5 g					
Cefotaxime	250 mg					
Basta						2 mg
Tiempo	3 semanas	2 a 3 años (subcultivos cada 3 a 4 semanas)	3 semanas	3 semanas	3 semanas	3 meses (subcultivos cada 3 semanas, o hasta regeneración)

Tabla S4. Ciclos de amplificación de miR528 y miR156 en RT-qPCR

Sample Name	Target Name	C _T	Sample Name	Target Name	C _T	Sample Name	Target Name	C _T
WT	miR156	19.44387	STTM528-4	miR528	15.37384	STTM528-3	U6	16.26008
WT	miR156	19.40103	STTM528-5	miR528	14.55502	STTM528-3	U6	16.19626
WT	miR156	20.97441	STTM528-5	miR528	14.629	STTM528-3	U6	16.24895
pFGC-vacio	miR156	19.18026	STTM528-5	miR528	14.69303	STTM528-4	U6	17.16694
pFGC-vacio	miR156	19.42541	STTM528-8	miR528	15.18242	STTM528-4	U6	17.21342
pFGC-vacio	miR156	20.26523	STTM528-8	miR528	14.98592	STTM528-4	U6	17.46327
STTM156-4	miR156	19.3513	STTM528-8	miR528	15.20896	STTM528-5	U6	17.57108
STTM156-4	miR156	19.27583	NTC	miR528	Undetermined	STTM528-5	U6	17.16218
STTM156-4	miR156	19.16206	NTC	miR528	34.17766	STTM528-5	U6	16.99983
STTM156-5	miR156	19.44977	NTC	miR528	32.78158	STTM528-8	U6	18.46114
STTM156-5	miR156	20.02225				STTM528-8	U6	18.29134
STTM156-5	miR156	19.96693	WT	U6	15.81648	STTM528-8	U6	18.36548
STTM156-7	miR156	18.82921	WT	U6	15.3907	NTC	U6	34.20862
STTM156-7	miR156	18.62222	WT	U6	15.38097	NTC	U6	34.16144
STTM156-7	miR156	18.75286	pFGC-vacio	U6	14.99372	NTC	U6	33.26736
STTM156-8	miR156	19.51022	pFGC-vacio	U6	15.05304			
STTM156-8	miR156	19.72902	pFGC-vacio	U6	14.98635			
STTM156-8	miR156	19.64101	STTM156-4	U6	15.43188			
NTC	miR156	39.17361	STTM156-4	U6	15.31416			
NTC	miR156	34.50841	STTM156-4	U6	15.20344			
NTC	miR156	34.00405	STTM156-5	U6	18.16445			
WT	miR528	16.42016	STTM156-5	U6	18.24525			
WT	miR528	16.46902	STTM156-5	U6	18.3197			
WT	miR528	16.96223	STTM156-7	U6	16.23615			
pFGC-vacio	miR528	15.50667	STTM156-7	U6	16.24957			
pFGC-vacio	miR528	15.3813	STTM156-7	U6	16.1518			
pFGC-vacio	miR528	15.13979	STTM156-8	U6	15.9022			
STTM528-3	miR528	14.97029	STTM156-8	U6	15.74253			
STTM528-3	miR528	14.63167	STTM156-8	U6	16.07475			
STTM528-3	miR528	14.72902	NTC	U6	31.48298			
STTM528-4	miR528	15.03177	NTC	U6	31.51031			
STTM528-4	miR528	15.06084	NTC	U6	31.89292			

Tabla S5. Ciclos de amplificación de los genes objetivo de miR528 y miR156 en RT-qPCR

Sample Name	Target Name	Ct	Sample Name	Target Name	Ct	Sample Name	Target Name	Ct
WT	SPL23	27.2867699	STTM528-4	MATE	28.7250252	WT	18S	13.7593651
WT	SPL23	27.543375	STTM528-5	MATE	28.42586136	WT	18S	13.7089453
WT	SPL23	27.6720867	STTM528-5	MATE	28.6071682	WT	18S	13.6313839
pFGC.vacio	SPL23	26.968689	STTM528-5	MATE	28.69430542	pFGC.vacio	18S	15.9641294
pFGC.vacio	SPL23	26.8859215	STTM528-8	MATE	28.69459724	pFGC.vacio	18S	15.8355083
pFGC.vacio	SPL23	26.709547	STTM528-8	MATE	27.77936363	pFGC.vacio	18S	15.9723835
STTM156-4	SPL23	25.9360714	STTM528-8	MATE	28.08641243	STTM156.1	18S	15.2468414
STTM156-4	SPL23	25.7193928	NTC	MATE	Undetermined	STTM156.1	18S	15.1352901
STTM156-4	SPL23	25.8868275	NTC	MATE	35.4296074	STTM156.1	18S	15.4543219
STTM156-5	SPL23	25.9198418	NTC	MATE	35.377491	STTM156.2	18S	14.7859573
STTM156-5	SPL23	25.9109974	WT	RAPTOR	24.7028351	STTM156.2	18S	14.9057512
STTM156-5	SPL23	25.9237652	WT	RAPTOR	24.5448475	STTM156.2	18S	14.8101177
STTM156-7	SLP23	25.82605934	WT	RAPTOR	24.4868469	STTM156-3	18S	12.7269554
STTM156-7	SLP23	25.55588341	pFGC.vacio	RAPTOR	24.0963612	STTM156-3	18S	12.5939283
STTM156-7	SLP23	25.48769379	pFGC.vacio	RAPTOR	24.2092037	STTM156-3	18S	12.7145491
STTM156-8	SLP23	26.92929268	pFGC.vacio	RAPTOR	24.1672916	STTM156-4	18S	17.636282
STTM156-8	SLP23	26.71528816	STTM156-4	RAPTOR	24.2670889	STTM156-4	18S	17.4561024
STTM156-8	SLP23	26.43325996	STTM156-4	RAPTOR	24.3386393	STTM156-4	18S	17.1997852
NTC	SPL23	Undetermined	STTM156-4	RAPTOR	24.2307997	STTM528-3	18S	13.543828
NTC	SPL23	Undetermined	STTM156-5	RAPTOR	23.5478783	STTM528-3	18S	13.3691368
NTC	SPL23	Undetermined	STTM156-5	RAPTOR	23.7628098	STTM528-3	18S	13.1940832
WT	MATE	29.0283413	STTM156-5	RAPTOR	23.7660275	STTM528-4	18S	13.0324078
WT	MATE	29.7475443	STTM156-7	RAPTOR	23.35425949	STTM528-4	18S	12.9785213
WT	MATE	29.8384752	STTM156-7	RAPTOR	23.42737007	STTM528-4	18S	12.964222
pFGC.vacio	MATE	30.7069645	STTM156-7	RAPTOR	23.30340767	NTC	18S	29.517786
pFGC.vacio	MATE	30.5167828	STTM156-8	RAPTOR	24.44357681	NTC	18S	29.911375
pFGC.vacio	MATE	30.7120838	STTM156-8	RAPTOR	24.48575974	NTC	18S	29.7342453
STTM528-3	MATE	28.1992168	STTM156-8	RAPTOR	24.42230797			
STTM528-3	MATE	27.8428249	NTC	RAPTOR	Undetermined			
STTM528-3	MATE	27.9348259	NTC	RAPTOR	35.7439804			
STTM528-4	MATE	28.2435265	NTC	RAPTOR	Undetermined			
STTM528-4	MATE	28.2942104						

Tabla S6. Análisis de Kruskal-Wallis del peso fresco de callos en medios con y sin Basta® en diferentes días después del subcultivo.

Estadísticos de prueba^{a,b}			
	Peso_g_4días_ sinBASTA	Peso_g_11días_ sinBASTA	Peso_g_21días_ sinBASTA
H de Kruskal-Wallis	14.419	15.068	13.187
gl	5	5	5
Sig. asin.	0.013	0.010	0.022
a. Prueba de Kruskal Wallis			
b. Variable de agrupación: Tipo de callo			
Estadísticos de prueba^{a,b}			
	Peso_g_4días_ BASTA	Peso_g_11días_ BASTA	Peso_g_21días_ BASTA
H de Kruskal-Wallis	8.250	12.410	14.301
gl	5	5	5
Sig. asin.	0.143	0.030	0.014
a. Prueba de Kruskal Wallis			
b. Variable de agrupación: Tipo de callo			

Tabla S7. Análisis de Kruskal-Wallis con múltiples comparaciones mediante la prueba Games-Howel del peso fresco de callos en medios sin y con Basta®.

Comparaciones múltiples								
Games-Howel						Intervalos de confianza al 95%		
Variable dependiente	(I) Tipo de callo	(J) Tipo de callo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite Superior	
Peso_g_4días_sinBASTA	Silvestre (WT)	miR156(4)	.26667*	0.06386	0.019	0.0337	0.4997	
		miR156(7)	.36333*	0.06386	0.002	0.1303	0.5963	
		miR528(3)	.36333*	0.06386	0.002	0.1303	0.5963	
		miR528(8)	.37333*	0.06386	0.001	0.1403	0.6063	
		pFGC5449(2)	0.12667	0.06386	1.000	-0.1063	0.3597	
	miR156(4)	Silvestre (WT)	-.26667*	0.06386	0.019	-0.4997	-0.0337	
		miR156(7)	0.09667	0.06386	1.000	-0.1363	0.3297	
		miR528(3)	0.09667	0.06386	1.000	-0.1363	0.3297	
		miR528(8)	0.10667	0.06386	1.000	-0.1263	0.3397	
	pFGC5449(2)	pFGC5449(2)	-0.14000	0.06386	0.732	-0.3730	0.0930	
		Silvestre (WT)	-0.12667	0.06386	1.000	-0.3597	0.1063	
		miR156(4)	0.14000	0.06386	0.732	-0.0930	0.3730	
		miR156(7)	.23667*	0.06386	0.045	0.0037	0.4697	
		miR528(3)	.23667*	0.06386	0.045	0.0037	0.4697	
	miR528(8)	miR528(8)	.24667*	0.06386	0.034	0.0137	0.4797	
		Peso_g_11días_sinBASTA	Silvestre (WT)	miR156(4)	.65333*	0.07288	0.007	0.2915
miR156(7)				.86333*	0.08551	0.003	0.4571	1.2696
miR528(3)				.85333*	0.06412	0.006	0.4648	1.2419
miR528(8)	.80667*			0.05925	0.016	0.3392	1.2742	
pFGC5449(2)	0.28000			0.07461	0.111	-0.0843	0.6443	
miR156(4)	Silvestre (WT)	-.65333*	0.07288	0.007	-1.0152	-0.2915		
	miR156(7)	0.21000	0.07587	0.255	-0.1739	0.5939		
	miR528(3)	0.20000	0.05055	0.114	-0.0700	0.4700		
	miR528(8)	0.15333	0.04422	0.229	-0.1825	0.4892		
	pFGC5449(2)	-.37333*	0.06333	0.024	-0.6743	-0.0723		
pFGC5449(2)	Silvestre (WT)	-0.28000	0.07461	0.111	-0.6443	0.0843		
	miR156(4)	.37333*	0.06333	0.024	0.0723	0.6743		
	miR156(7)	.58333*	0.07753	0.013	0.1987	0.9680		
	miR528(3)	.57333*	0.05302	0.007	0.2826	0.8640		
	miR528(8)	.52667*	0.04702	0.023	0.1660	0.8873		
Peso_g_21días_sinBASTA	Silvestre (WT)	miR156(4)	1.37333*	0.07739	0.006	0.8312	1.9155	
		miR156(7)	1.46667*	0.12888	0.003	0.8171	2.1162	
		miR528(3)	1.52667*	0.08333	0.002	1.0501	2.0033	
		miR528(8)	1.33000*	0.13536	0.006	0.6308	2.0292	
		pFGC5449(2)	0.22000	0.13060	0.604	-0.4424	0.8824	
	miR156(4)	Silvestre (WT)	-1.37333*	0.07739	0.006	-1.9155	-0.8312	
		miR156(7)	0.09333	0.10760	0.928	-0.7212	0.9079	
		miR528(3)	0.15333	0.04372	0.159	-0.0840	0.3907	
		miR528(8)	-0.04333	0.11528	0.997	-0.9259	0.8393	
		pFGC5449(2)	-1.15333*	0.10965	0.025	-1.9861	-0.3206	
	pFGC5449(2)	Silvestre (WT)	-0.22000	0.13060	0.604	-0.8824	0.4424	
		miR156(4)	1.15333*	0.10965	0.025	0.3206	1.9861	
		miR156(7)	1.24667*	0.15048	0.007	0.5329	1.9604	
		miR528(3)	1.30667*	0.11392	0.013	0.5524	2.0610	
		miR528(8)	1.11000*	0.15606	0.012	0.3689	1.8511	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla S7. Continuación

Comparaciones múltiples							
Games-Howel							
Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Peso_g_4días_conBASTA	Silvestre (WT)	miR156(4)	0.08333	0.07708	0.880	-0.1756	0.3422
		miR156(7)	0.07000	0.07708	0.937	-0.1889	0.3289
		miR528(3)	0.06667	0.07708	0.948	-0.1922	0.3256
		miR528(8)	0.04000	0.07708	0.994	-0.2189	0.2989
		pFGC5449(2)	-0.16333	0.07708	0.340	-0.4222	0.0956
	miR156(4)	Silvestre (WT)	-0.08333	0.07708	0.880	-0.3422	0.1756
		miR156(7)	-0.01333	0.07708	1.000	-0.2722	0.2456
		miR528(3)	-0.01667	0.07708	1.000	-0.2756	0.2422
		miR528(8)	-0.04333	0.07708	0.992	-0.3022	0.2156
		pFGC5449(2)	-0.24667	0.07708	0.065	-0.5056	0.0122
	pFGC5449(2)	Silvestre (WT)	0.16333	0.07708	0.340	-0.0956	0.4222
		miR156(4)	0.24667	0.07708	0.065	-0.0122	0.5056
		miR156(7)	0.23333	0.07708	0.087	-0.0256	0.4922
		miR528(3)	0.23000	0.07708	0.093	-0.0289	0.4889
		miR528(8)	0.20333	0.07708	0.161	-0.0556	0.4622
	Peso_g_11días_conBASTA	Silvestre (WT)	miR156(4)	.41333*	0.09898	0.013	0.0809
miR156(7)			0.29667	0.09898	0.091	-0.0358	0.6291
miR528(3)			.38000*	0.09898	0.022	0.0475	0.7125
miR528(8)			.37333*	0.09898	0.025	0.0409	0.7058
pFGC5449(2)			-0.18000	0.09898	0.490	-0.5125	0.1525
miR156(4)		Silvestre (WT)	-.41333*	0.09898	0.013	-0.7458	-0.0809
		miR156(7)	-0.11667	0.09898	0.839	-0.4491	0.2158
		miR528(3)	-0.03333	0.09898	0.999	-0.3658	0.2991
		miR528(8)	-0.04000	0.09898	0.998	-0.3725	0.2925
		pFGC5449(2)	-.59333*	0.09898	0.001	-0.9258	-0.2609
pFGC5449(2)		Silvestre (WT)	0.18000	0.09898	0.490	-0.1525	0.5125
		miR156(4)	.59333*	0.09898	0.001	0.2609	0.9258
		miR156(7)	.47667*	0.09898	0.004	0.1442	0.8091
		miR528(3)	.56000*	0.09898	0.001	0.2275	0.8925
		miR528(8)	.55333*	0.09898	0.001	0.2209	0.8858
Peso_g_21días_conBASTA		Silvestre (WT)	miR156(4)	.62667*	0.13603	0.006	0.1698
	miR156(7)		0.42333	0.13603	0.075	-0.0336	0.8802
	miR528(3)		.67667*	0.13603	0.003	0.2198	1.1336
	miR528(8)		.73667*	0.13603	0.002	0.2798	1.1936
	pFGC5449(2)		-.61667*	0.13603	0.007	-1.0736	-0.1598
	miR156(4)	Silvestre (WT)	-.62667*	0.13603	0.006	-1.0836	-0.1698
		miR156(7)	-0.20333	0.13603	0.674	-0.6602	0.2536
		miR528(3)	0.05000	0.13603	0.999	-0.4069	0.5069
		miR528(8)	0.11000	0.13603	0.960	-0.3469	0.5669
		pFGC5449(2)	-1.24333*	0.13603	0.000	-1.7002	-0.7864
	pFGC5449(2)	Silvestre (WT)	.61667*	0.13603	0.007	0.1598	1.0736
		miR156(4)	1.24333*	0.13603	0.000	0.7864	1.7002
		miR156(7)	1.04000*	0.13603	0.000	0.5831	1.4969
		miR528(3)	1.29333*	0.13603	0.000	0.8364	1.7502
		miR528(8)	1.35333*	0.13603	0.000	0.8964	1.8102

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.