



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del papel de *CLE14* en respuesta al estrés por carencia de fósforo.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

María Dolores Gutiérrez Alanís

TUTOR PRINCIPAL

[Dr. Luis Cárdenas Torres](#)  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dr. Luis Herrera Estrella](#)  
Cinvestav Irapuato

[Dra. Alejandra Covarrubias Robles](#)  
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Noviembre, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

A CYG,

En un suspiro cambiaste mi vida, mis pensamientos y me diste una lección de vida ...

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM y al LANGEBIO-CINVESTAV por proporcionar los recursos didácticos y humanos necesarios para mi formación en éste posgrado.

Al Dr. Luis Herrera Estrella, mi asesor durante todo el doctorado, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, porque me apoyó en mis ideas, por enseñarme el significado de "colmillo" y por permitirme aprender de usted, incluso sin la necesidad de utilizar palabras. Gracias por todo Dr. Luis.

Al Dr. Federico Sánchez, mi otro asesor en esta etapa de mi vida, por darme tantos consejos tanto del proyecto, académicos incluso personales. Gracias por toda su contribución en mi formación Dr. Federico... Aún se extraña su presencia.

Al Dr. Alfredo Cruz por ayudarme a sacarle el jugo a los datos, por ayudarme a ordenar mis ideas y por todas esas pláticas entretenidas que vienen incluidas al visitar su oficina.

Al Dr. Luis Cárdenas, por su enorme ayuda en el proceso de titulación.

A la Dra. Alejandra Covarrubias por formar parte del comité tutorial.

A Lenin Yong Villalobos, mi esposo por ser parte de mi vida sentimental y por su cariño y apoyo durante todos estos años... somos un excelente equipo amor.

A mis padres, por su incondicional apoyo en cualquier momento y situación, por enseñarme a ser independiente, a luchar siempre por lo que quiero y principalmente por enseñarme que todo es posible.

A toda mi familia porque siempre serán mi lugar de sanación.

A mis compañeros y amigos del laboratorio.



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1. El fósforo.....	6
1.2. El fósforo como nutriente esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas.....	7
1.3. <i>A. thaliana</i> como modelo de estudio .....	8
1.4. Genes involucrados en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz .....	10
1.5. Principales factores involucrados en la modificación de la arquitectura de la raíz en respuesta a carencia de fósforo .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	14
<b>3 HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	14
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
5.1. Material biológico.....	14
5.2. Esterilización de semillas.....	15
5.3. Germinación <i>in vitro</i> .....	15
5.4. Método de tinción histoquímica para $\beta$ -glucuronidasa .....	16
5.5. Método de tinción de hierro.....	16
5.6. Método de decoloración de raíces.....	17
5.7. Microscopía .....	18
5.8. Crecimiento en suelo.....	18
5.9. Extracción de DNA genómico.....	18
5.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
5.11. PCR tiempo real.....	20
5.12. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	20
5.13. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	21
5.14. Corte con endonucleasas .....	21
5.15. Transformación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> .....	21
5.16. Purificación de DNA plamídico.....	22
5.17. Medio Luria Bertani (LB).....	22
5.18. Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante agroinfiltración.....	23
5.19. BiFC mediante bombardeo de partículas.....	23
5.20. Construcciones mediante el sistema Gateway .....	24
5.20.1. Fusión transcripcional pCLE14::GFP/GUS .....	24
<b>6. RESULTADOS</b> .....	31

6.1. La carencia de fósforo induce la actividad del promotor del gen <i>CLE14</i> en la punta de la raíz primaria.....	31
6.2. La carencia de fósforo no induce la actividad del promotor del gen <i>CLE19</i> en la punta de la raíz primaria .....	33
6.3. <i>CLE14</i> actúa río abajo de los genes responsivos a fósforo <i>LPR1/LPR2</i> .....	35
6.4. <i>CLE14</i> dispara el agotamiento del meristemo de la raíz en una manera tejido-dependiente.....	37
6.5. <i>CLE14</i> inhibe la división asimétrica que genera los tejidos córtex y endodermis de manera tejido dependiente .....	41
6.6. El silenciamiento parcial del gen <i>CLE14</i> afecta genes de respuesta a la carencia de fósforo .....	43
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
7.1. <i>CLE14</i> : un componente clave en la respuesta morfológica a la baja disponibilidad de fósforo.....	46
7.2. <i>CLE14</i> actúa río abajo de la vía de señalización de <i>LPR1/LPR2</i> .....	47
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>48</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>57</b>

## ABREVIATURAS

<b>ACD</b>	Asymmetric cell division. División celular asimétrica.
<b>BiFC</b>	Complementación Bifuncional de Fluorescencia.
<b>CEI</b>	Cortex/Endodermis initial cell. Célula inicial de cortex y endodermis.
<b>CEID</b>	Célula hija de la célula inicial de cortex y endodermis.
<b>dpg,dag</b>	días postgerminación.
<b>GUS</b>	$\beta$ -Glucuronidasa.
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein. Proteína verde fluorescente.
<b>hpt</b>	horas postransferencia.
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico.
<b>QC</b>	Quiescent Center. Centro quiescente.
<b>RAM</b>	Root apical meristem. Meristemo apical de la raíz.
<b>REDOX</b>	Estado Óxido-reducción.
<b>RSCN</b>	Root stem cell niche. Nicho de células iniciales de la raíz.
<b>WT</b>	Wild type. Planta de tipo silvestre ( <i>Col0</i> ).
<b>YFP</b>	Yellow fluorescent protein. Proteína amarilla fluorescente.
<b>-P(i)</b>	Condiciones con carencia de fósforo.
<b>+P(i)</b>	Condiciones con 1 mM de fósforo.
<b>-Pi+CLE14</b>	Condiciones de carencia de fósforo adicionadas con péptido CLE14 (10 $\mu$ M).

## RESUMEN

La baja disponibilidad de fósforo inorgánico (Pi) es uno de los principales factores limitantes del crecimiento y desarrollo de la planta. Por ejemplo, cuando hay condiciones medioambientales de baja disponibilidad de fósforo, en la planta se observan cambios en la arquitectura de la raíz y se provoca un proceso de agotamiento del meristemo. Fenómeno en el cuál las células del meristemo empiezan a perder su capacidad proliferativa y, posteriormente, todas se diferencian irreversiblemente, resultando en un fenotipo de raíz corta. Los mecanismos moleculares por los cuales las plantas modulan la actividad meristemática para adaptarse a los cambios ambientales aún permanecen desconocidos. En este trabajo se describe el mecanismo a través del cuál *CLAVATA3/ESR-RELATED 14 (CLE14)* actúa como un efector importante en el proceso de agotamiento del meristemo apical de la raíz (RAM, root apical meristem) de *A. thaliana* en respuesta a bajas condiciones de Pi. La carencia de fósforo induce la movilización de hierro (Fe) en el RAM a través de la acción de *LOW PHOSPHATE ROOT1/LOW PHOSPHATE ROOT2 (LPR1/LPR2)*, un fenómeno que determina el sitio de expresión de *CLE14* en la región proximal del meristemo, donde los receptores *CLAVATA2 (CLV2)* y *PEP1 RECEPTOR 2 (PEPR2)* pueden percibir el péptido *CLE14* y a su vez disparar el agotamiento del RAM. Además, esto correlaciona con la desregulación de las vías *SHORT ROOT/SCARECROW (SHR/SCR)* y PIN/Auxinas. Adicionalmente, se muestra que bajo carencia del fósforo, *CLE14* actúa de manera tejido específica para modular la actividad meristemática de la raíz. En condiciones óptimas de suministro de fósforo (1 mM), *CLE14* se expresa en la cofia lateral y en la línea celular distal de la columela. En respuesta a la carencia de fósforo, este patrón se altera y desde las primeras horas se observa expresión de *CLE14* en el córtex, endodermis y cilindro vascular. Utilizando herramientas experimentales para dirigir la expresión de *CLE14* de manera tejido específico en el RAM, se descubrió que la inducción de *CLE14* en el córtex, endodermis y tejido provascular, es necesaria para causar una disminución en la capacidad proliferativa, inducir la diferenciación de las células meristemáticas y consecuentemente el agotamiento del meristemo. En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que *CLE14* actúa como un efector importante para iniciar la diferenciación celular y el agotamiento del RAM en respuesta a la carencia de fósforo.

**ABSTRACT**

Phosphorus (Pi) availability is one of the most limiting factors that affect plant growth and development. Among the diverse changes in root architecture by effect of low Pi availability is the root meristem exhaustion, a phenomenon in which the diverse groups of proliferative cells in the meristem start to lose its potential to proliferate, which in principle will alter the division pattern and organization and maintenance of the root stem cell niche and finally will cause that all initial cells in the niche and the whole meristematic cell will terminally and irreversibly differentiate. Resulting in a short root phenotype. However, the molecular mechanisms by which plants modulate root meristem activity to adapt upon environmental changes still remain unknown. Here, we report the mechanism through which CLE14 acts as a major effector in the phosphate starvation response affecting root meristem maintenance. The phosphate starvation induces an iron redistribution in the RAM through the LPR1/LPR2 action, a phenomenon that determines the sites of tissue-specific expression of CLE14 in the proximal meristem region, where the CLV2 and PEPR2 receptors can perceive the CLE14 peptide and in turn, triggers the full RAM exhaustion with concomitant downregulation of SHR/SCR and PIN/AUXIN pathway. In addition, we find that *CLE14* act as a major effector during root meristem exhaustion, in function of a shift in CLE14 expression pattern. In optimal conditions, *CLE14* is expressed within lateral root cap cells in the root tip. In response to phosphate starvation, we observed ectopic expression of CLE14 in cortex, endodermis, stele and proximal stem cell niche, since first hours of stimulum of phosphate starvation. Altering *CLE14* expression pattern in cortex, endodermis and provascular tissue, we find that *CLE14* must be expressed in cortex, endodermis and provascular tissue closer to the root stem cell niche in order to induce initially a decrease in the proliferative capacity of the initials in the stem cell niche, as revealed by the inhibition of the asymmetric cell division that generates cortex/endodermis lineages and finally root meristem exhaustion. Then, we propose that CLE14 peptide acts as an effector of the Pi-starvation response that triggers the root meristem exhaustion, which acts in a tight spatiotemporal manner to modulate root meristem activity in response to phosphate starvation conditions.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El fósforo

La disponibilidad de agua y de nutrientes son factores limitantes para la productividad de las plantas. Uno de los elementos que limita con mayor frecuencia el rendimiento de los cultivos es el fósforo (Marschner, 1995; Zhang and Forde, 1998). El fósforo es un nutriente importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pues forma parte estructural de compuestos fundamentales para su fisiología como el ATP, fosfolípidos de membrana, etc. El fósforo se encuentra en todas las células vivas y está involucrado en diversas funciones celulares clave que incluyen: La transferencia de energía, la fotosíntesis, la transformación de los azúcares y almidones, el transporte de nutrientes a través de la planta y la transferencia de las características genéticas de una generación a la siguiente. Debido a todas estas funciones, ningún otro elemento puede sustituir el papel del fósforo en la planta (Abel et al., 2002). El fósforo se clasifica como un nutriente primario o macronutriente, eso significa que las plantas requieren de él en cantidades relativamente altas. De hecho, después del nitrógeno es el elemento más limitante para los cultivos, principalmente debido a su baja disponibilidad en los suelos (Marschner, 1995).

En el suelo, el fósforo puede aparecer en forma orgánica ya sea como elemento constituyente de diversos materiales, entre los cuales se pueden considerar los restos vegetales o animales, el humus, etc. Pero también de manera inorgánica, de la cual, sólo el ión ortofosfato ( $\text{PO}_4^-/\text{Pi}$ ) es la forma asimilable por las plantas. Dependiendo de características del suelo como pH, abundancia de cationes y la materia orgánica, el fósforo se puede convertir a moléculas no asimilables como el ácido fítico (inositol hexafosfato) o formar compuestos minerales; el fósforo también reacciona con los óxidos de hierro, manganeso y aluminio para formar productos insolubles, los cuales no son fácilmente asimilados por la planta (Schachtman et al., 1998). El ión ortofosfato (Pi) se encuentra en la mayoría de las plantas en concentraciones entre 0.1 a 0.4 %. El Pi se puede absorber en forma iónica como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ , siendo la absorción en forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  mayor en suelos con valores de pH bajos, mientras que la absorción del ion  $\text{HPO}_4^-$  es mayor en suelos con valores de pH altos, por lo tanto, las formas más solubles y disponibles del fósforo alcanzan su mayor abundancia en

un rango de pH de 5.5 a 7.0. Por otra parte, a pesar de que en la mayoría de los suelos naturales y agrícolas la concentración de Pi es alta, la mayor parte se encuentra formando complejos insolubles, por lo que su disponibilidad es muy baja. Debido a los fenómenos antes descritos, la baja disponibilidad del fósforo es uno de los factores limitantes para la productividad de las plantas en suelos ácidos y alcalinos, los cuales constituyen más del 70 % del total de la tierra disponible para la agricultura en el mundo (Schachtman et al., 1998).

## **1.2. El fósforo como nutriente esencial en el crecimiento y desarrollo de la planta.**

El fósforo es uno de los principales macronutrientes para las plantas (Marschner, 1995). Sin embargo, en un gran número de suelos sólo una pequeña cantidad está presente en forma asimilable por la planta, lo que ocasiona que el estrés por carencia de este nutriente sea frecuente. Consecuentemente, las plantas han adquirido una gran cantidad de mecanismos adaptativos para contender con la deficiencia de fósforo mediante la alteración de su fisiología, metabolismo y morfología (Raghothama and Karthikeyan, 2005). Las adaptaciones bioquímicas y fisiológicas, tales como la elevación de la actividad en las fosfatasa y la secreción de ácidos orgánicos (Marschner, 1995), ayudan a aumentar la disponibilidad del fósforo endógeno y exógeno. Por su parte, las adaptaciones morfológicas que implican cambios en el programa de crecimiento y arquitectura de la raíz, hacen más eficiente la exploración del suelo en búsqueda de fósforo disponible (Lopez-Bucio et al., 2002). Entre estas adaptaciones morfológicas está el agotamiento del meristemo de la raíz, el cual involucra la inducción de un programa de desarrollo determinado (Lopez-Bucio et al., 2002; Sanchez-Calderon et al., 2005). En las plantas superiores, la organogénesis postembrionaria está mediada por los meristemos, que constituyen estructuras especializadas que proveen un reservorio importante de células madre no diferenciadas, así como una población de células en proliferación que se diferencian en los diferentes tipos celulares y que permite el crecimiento de la planta (Scheres, 2007). En este sentido, es de gran interés conocer cómo es que las células meristemáticas de la raíz pierden su identidad y se diferencian irreversiblemente en condiciones de carencia de fósforo.

### **1.3. *A. thaliana* como modelo de estudio.**

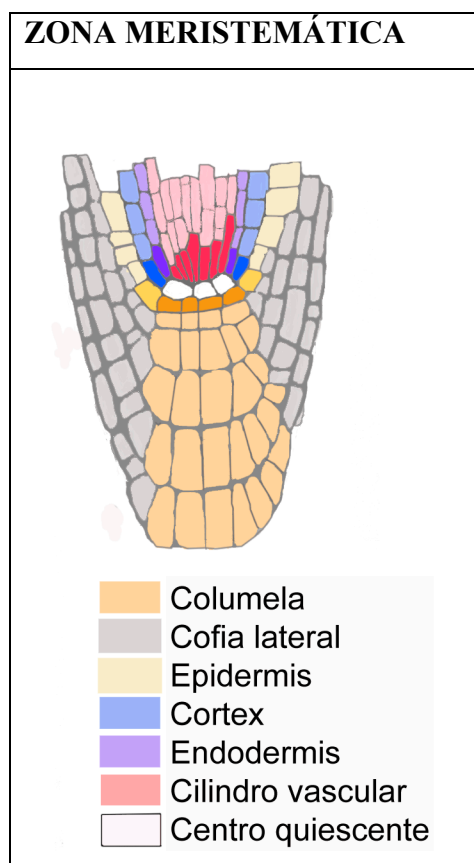
*A. thaliana* posee características que ofrecen una serie de ventajas a la hora de considerarla como modelo de investigación. Sus ventajas son: 1.- Un tamaño pequeño (aproximadamente 30 cm de altura). 2.- Un ciclo de vida corto (aproximadamente 6 semanas). 3.- Alta producción de semillas y la facilidad para realizar cruces. 4.- El patrón de formación de tejidos es simple y predecible facilitando el estudio de su morfología mediante microscopía. 5.- Existe una gran colección de mutantes inducidas por mutágenos químicos o por inserción de DNA (transposones y T-DNA) disponibles para su estudio. 6.- Su genoma ha sido completamente secuenciado y anotado.

La raíz primaria de *A. thaliana* puede dividirse longitudinalmente en tres zonas suprayacentes a la cofia: la meristemática, la de elongación y la de diferenciación. La zona meristemática está localizada en la punta de la raíz y se compone en su mayor parte de células que presentan una gran actividad proliferativa. Suprayacente a esta zona, se encuentra la zona de elongación, en la cual las células de los diferentes tejidos se alargan hasta alcanzar su longitud máxima. La región más alejada de la punta de la raíz se denomina zona de diferenciación y es en esta región donde se forman las células maduras con la capacidad de formar pelos radicales y raíces secundarias (Dolan et al., 1993).

La organización radial de la raíz de *A. thaliana* (Figura 1) está generada por una división predecible de células iniciales y una subsecuente adquisición de identidad celular. Existen tres capas radiales (de afuera hacia adentro: epidermis, córtex y endodermis), la endodermis se localiza cubriendo al cilindro vascular central el cual incluye al periciclo, de donde se originan las raíces laterales, el xilema, el floema y al parénquima vascular (Benfey and Scheres, 2000; Scheres et al., 1995). Este cilindro vascular en la raíz de *A. thaliana* es diarco, es decir, tiene dos polos de floema y dos polos de xilema (Dolan et al., 1993). Cada tipo celular de la raíz forma filas longitudinales de células que pueden ser rastreadas hasta las células iniciales, localizadas en el meristemo apical de la raíz (Malamy and Benfey, 1997). En un plano transversal a la altura de la zona meristemática se puede observar la cofia lateral que envuelve a la raíz hasta el ápice, así como un grupo de células que conforman el centro quiescente (Benfey and Scheres, 2000). El centro quiescente (CQ) está constituido por un grupo de células localizadas en la punta de la raíz que se



caracterizan por presentar una baja tasa de división, hasta de 10 veces menor a la de las células que lo rodean (Clowes and Karnowsky, 1977). El CQ consta de un grupo de células internas, conocidas como células iniciales estructurales, rodeado por un grupo de células que reciben el nombre de células iniciales funcionales, en conjunto esta estructura recibe el nombre de nicho de células iniciales o nicho de células madre de la raíz (Root stem cell niche, RSCN por sus siglas en inglés). Las células iniciales funcionales son células indiferenciadas que por medio de divisiones anticlinales/asimétricas (perpendiculares a la capa externa más cercana) o periclinales (paralelas a la capa externa más cercana), dan origen a las distintas capas celulares en una raíz (Scheres et al., 2002) manteniendo su identidad de células iniciales (Potten and Loeffler, 1990).



**Figura 1.- Estructura de la raíz.** Esquema del meristemo de la raíz y sus diferentes capas celulares. Las células alrededor del centro quiescente son conocidas en conjunto como nicho de células iniciales de la raíz (RSCN).

#### 1.4. Genes involucrados en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz.

los genes *SHORT ROOT (SHR)* y *SCARECROW (SCR)* codifican para factores de transcripción considerados miembros de la familia GRAS. Las mutantes de pérdida de función de dichos genes, *shr* y *scr*, desarrollan un fenotipo de agotamiento del meristemo que revela que las proteínas SCR y SHR son esenciales para el mantenimiento y funcionamiento del RSCN (Benfey et al., 1993). *SHR* se expresa en el cilindro vascular y la proteína SHR se mueve a la endodermis, en la célula hija que proviene de la célula inicial de córtex/endodermis (CEID) y el centro quiescente. Por otro lado, SHR induce la transcripción de *SCR* y ambas proteínas se unen para formar un factor transcripcional heterodimérico que induce la expresión de varios genes involucrados en la división celular asimétrica del CEID y del QC (Cruz-Ramirez et al., 2012; Cruz-Ramirez et al., 2013; Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Nakajima et al., 2001; Sabatini et al., 2003; Sozzani et al., 2010; Wysocka-Diller et al., 2000). En la CEID, el complejo SHR-SCR se une al promotor y activa su transcripción de la *CYCLIN D6 (CYCD6)*. Posteriormente, *CYCD6* junto con un CYCLIN DEPENDENT KINASE B2 (CDKB) forman un complejo que fosforila la proteína llamada RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) que cuando está fosforilada no se puede unir a SCR. El complejo SHR-SCR activo puede promover la división celular asimétrica (ACD) que se necesita para generar los tejidos como el córtex y la endodermis, también llamados en su conjunto tejido basal (Cruz-Ramirez et al., 2012; Sozzani et al., 2010). Además de la vía de señalización *SHR/SCR*, la acumulación de auxinas que alcanza un máximo de auxinas en la punta de la raíz también es importante en la especificación y mantenimiento del RSCN. Este pico de concentración de auxinas se logra en parte por la acción de las proteínas PIN que son transportadoras de eflujo de auxinas y por el factor de transcripción PLETHORA (Aida et al., 2004; Blilou et al., 2005; Galinha et al., 2007; Sabatini et al., 1999). Reportes recientes han mostrado que tanto la expresión de *CYCD6* como la acción de SCR-SHR, están influenciadas por los niveles de auxinas (Cruz-Ramirez et al., 2012; Cruz-Ramirez et al., 2013; Long et al., 2015). Además, se ha reportado que para que los genes *PLT* se transcriban, se requiere la expresión de los genes *SHR* y *SCR*, ya que en las mutantes *shr* y *scr* los niveles de transcrito *PLETHORA* disminuyen (Aida et al., 2004). Existen otros genes involucrados en el mantenimiento del meristemo apical de la raíz. Por ejemplo el gen *ROOT MERISTEM LESS (RML)*, que codifica para una

enzima involucrada en la síntesis del primer metabolito (glutamil-cisteína sintetasa) de la vía de síntesis del glutatión y ha sido reportado como necesario para el mantenimiento de la actividad proliferativa en el meristemo apical de la raíz. (Cheng et al., 1995; Vernoux et al., 2000) Por otro lado, el gen *HOBBIT (HBT)*, que codifica para los genes *APC/C* es miembro de un complejo promotor de la anafase y ha sido involucrado en la especificación de la identidad del centro quiescente (Pérez-Pérez et al., 2008; Willemsen et al., 1998). Es importante mencionar que el gen *FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE 2 (FPGSI)*, que causa efectos drásticos en el metabolismo del folato, está involucrado en la regulación del cambio entre crecimiento determinado/indeterminado del meristemo de la raíz en una ruta de señalización independiente a la de los factores de transcripción *SHR/SCR* y *PLT* (Reyes-Hernández et al., 2014).

En años recientes en plantas se han identificado varios péptidos capaces de mediar eventos de señalización en procesos como la interacción planta-patógeno, la diferenciación y la división celular (Matsubayashi and Sakagami, 1996; Pearce et al., 1991). Por ejemplo, se ha descrito que los péptidos *CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION-related (CLE)* pueden alterar el destino celular de las células madre y la diferenciación celular en los meristemos de la raíz y del brote (Casamitjana-Martínez et al., 2003; Fiers et al., 2005; Hobe et al., 2003; Ito et al., 2006; Jun et al., 2008; Meng et al., 2010). En *A. thaliana* la familia de los péptidos *CLE* comprende 32 miembros y se subdivide en dos grupos: tipo A y tipo B (Jun et al., 2008). Los *CLE* tipo A, como por ejemplo *CLV3*, *CLE19* y *CLE14*, ocasionan fenotipos con meristemos cortos y raíz corta (Fiers et al., 2005; Hirakawa et al., 2008; Ito et al., 2006; Meng et al., 2010; Strabala et al., 2006). Los péptidos tipo B, como por ejemplo *CLE41*, no reducen el tamaño del meristemo pero si promueven la proliferación celular e inhiben la diferenciación del tejido vascular (Whitford et al., 2008). También se ha demostrado que la expresión de algunos de los péptidos *CLE* responden a condiciones de estrés, por ejemplo la expresión de *CLE26*, que es inducida en respuesta a condiciones ambientales tales como alta temperatura, estrés por sequía, herbivoría o ataque por patógenos (Sharma et al., 2003). Además, los péptidos *CLE* también juegan un papel en la respuestas a estímulos ambientales nutricionales en *A. thaliana* y *Lotus japonicus* (Araya et al., 2014; Funayama-Noguchi et al., 2011; Okamoto et al., 2009). Un estudio cuantitativo de la expresión

de 39 genes *CLE* en *L. japonicus* mostró que *LjCLE19* y *LjCLE20* son los genes más fuertemente regulados en la raíz en respuesta a la disponibilidad de fósforo (Funayama-Noguchi et al., 2011), mientras que *LjCLE-RS2* fue positivamente regulado por la adición de nitrato (Okamoto et al., 2009). En *A. thaliana*, la familia de los genes *CLE* comprende 32 miembros de los cuales *CLE1*, 3, 4, and 7 juegan un papel en la regulación de la emergencia de las raíces laterales en respuesta a la baja disponibilidad de nitrógeno (Araya et al., 2014). Así mismo, en *Arabidopsis* la sobreexpresión de 9 genes *CLE* resultó en la inhibición del crecimiento de la raíz, un fenotipo que puede ser fenocopiado por la aplicación exógena de péptidos *CLE* sintéticos (Fiers et al., 2005; Ito et al., 2006; Jun et al., 2010; Strabala et al., 2006). *CLE40* es el péptido mejor caracterizado de todos los integrantes de familia que se expresan en la punta de la raíz. *CLE40* es transcrito en las células de la columela y es percibido en células vecinas por los receptores tipo cinasa ARABIDOPSIS CRINKLY4 (*ACR4*) y CLAVATA1 (*CLV1*). Se sabe que *CLE40* restringe la producción de nuevas células iniciales de columela (*CSC*) en el meristemo de la raíz y la mutante de pérdida de función de *cle40* tiene una raíz corta y genera múltiples capas de *CSC* (Hobe et al., 2003; Stahl et al., 2009). *CLE40* y el receptor CORYNE (*CRN*) y CLAVATA2 (*CLV2*) actúan en dos vías genéticamente separadas que antagonistamente regulan el agotamiento del meristemo proximal de la raíz (Pallakies and Simon, 2014), mostrando que los péptidos *CLE* pueden interactuar con múltiples receptores tipo cinasa (*LRR-RLKs*) para regular diferentes procesos de desarrollo.

### **1.5. Principales factores involucrados en la modificación de la arquitectura de la raíz en respuesta a estrés por carencia de fósforo.**

En *A. thaliana* la carencia de fósforo induce un incremento en el número de raíces laterales, un notable incremento en la formación de pelos radicales, una reducción en la longitud de la raíz primaria y el agotamiento del RAM (Lopez-Bucio et al., 2002; Perez-Torres et al., 2008; Sanchez-Calderon et al., 2005). Tratamientos de las plantas con auxinas en condiciones de carencia de fósforo, han permitido proponer que esta fitohormona tiene un papel central en la respuesta adaptativa de la raíz a la carencia de fósforo, bien mediante alteraciones en la señalización, (Lopez-Bucio et al., 2002; Lopez-Bucio et al., 2005) ó por la modificación en el transporte polar de auxinas (Al-Ghazi et al., 2003; Nacry et al., 2005). Para explicar la alteración observada en la

formación de raíces laterales, también se ha propuesto que existe una modulación en la sensibilidad a las auxinas. La deficiencia de fósforo induce la expresión del receptor de auxinas TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), y el factor de respuesta a auxinas<sup>19</sup> (ARF19), lo que permite activar o reprimir un grupo de genes responsivos a auxinas, dando como resultado la promoción del desarrollo de raíces laterales (Perez-Torres et al., 2008). Consistente con esto, en arroz los genes OsARF16 y OsARF12 han mostrado una asociación de la señalización por auxinas con genes de respuesta a carencia de fósforo (Shen *et al.* 2010; Wang *et al.* 2014).

Durante el agotamiento del RAM en respuesta a carencia de fósforo, se observa una reducción progresiva en la longitud del meristemo hasta perderse irreversiblemente. Esta pérdida es consecuencia de una disminución en los eventos de división celular y a una diferenciación celular prematura (Sanchez-Calderon et al., 2005). Los genes *LOW PHOSPHATE RESPONSE1 (LPR1)* y *PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2)*, han sido implicados en el ajuste de la actividad meristemática de la raíz a la baja disponibilidad de fósforo externo (Reymond et al., 2006; Svistoonoff et al., 2007; Ticconi et al., 2009). De hecho, se sabe que *LPR1* y *PDR2* interactúan genéticamente y funcionan juntos en respuesta en condiciones de bajo fósforo. En condiciones de baja disponibilidad de fósforo se ha propuesto que el módulo LPR1/PDR2 facilita la acumulación de Fe en el apoplasto de las células del RAM, lo que aparentemente induce la síntesis y deposición de callosa en la zona meristemática y de elongación de la raíz primaria, vía la actividad de ferroxidasa (Muller et al., 2015). A su vez, se ha propuesto que la acumulación de callosa interfiere con la comunicación simplástica que puede causar una alteración en el movimiento de SHR en el meristemo apical de la raíz causando el agotamiento del RAM (Muller et al., 2015). Interesantemente, *PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2)*, un gen de respuesta a la baja disponibilidad de fósforo, se requiere para la movilidad y expresión de los factores de transcripción SHR y SCR (Ticconi et al., 2009).

El uso de péptidos CLE bajo condiciones controladas ha expandido el conocimiento sobre el papel que ellos desempeñan durante el desarrollo de la planta. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los péptidos CLE modulan la actividad meristemática para adaptarse a cambios ambientales permanecen desconocidos.

## 2. ANTECEDENTES

En estudios previos del laboratorio se caracterizó la mutante *lpi4* (*LOW PHOSPHATE INSENSITIVE4*) la cual presenta un fenotipo de raíz larga cuando se crece en medio con bajo contenido de fósforo y no muestra agotamiento del RAM en condiciones de carencia de fósforo durante 12 días postgerminación (Chacón-López et al., 2014). Posteriormente, con la finalidad de identificar aquellos genes expresados diferencialmente en condiciones de carencia de fósforo, se realizó un análisis de transcripción global de la punta de la raíz primaria de la *lpi4* y de plantas silvestres. Particularmente, se puso especial atención en aquellos genes inducidos por la carencia de fósforo en plantas tipo silvestre y cuya activación estuviera disminuida o ausente en la mutante. Entre estos genes con expresión diferencial negativa se ubicó al gen que codifica para el péptido CLE14.

## 3. HIPOTESIS

En *A. thaliana*, algunos miembros de la familia de genes *CLE* participan en la modulación del agotamiento del meristemo de la raíz durante la respuesta a la carencia de fósforo.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del gen *CLE14* durante la respuesta a condiciones de carencia de fósforo en *A. thaliana*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetal

-Las plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en todos los experimentos fueron del ecotipo *Columbia* (*Col-0*).

- Se utilizaron las líneas *enhancer trap* de Haseloff: J0481, J0631, Q2500, J2341, J2351, J0471 ([www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff](http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff); Aoyama *et al* 1997), basadas en el sistema de transactivación GAL4 que son ampliamente utilizadas como marcadores de tipos celulares específicos y para dirigir la expresión del gen de interés de manera

tejido-específico (Sabatini et al., 2003).

Las líneas de Hasseloff se encuentran en el ecotipo *C24* por lo que se retrocruzaron 2-3 veces con *Col-0*.

-Las semillas *pCLE14::CLE14:GFP* se obtuvieron de *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC: <http://arabidopsis.info/BasicForm>).

-Las líneas *pPIN1::PIN1:GFP*, *pPIN2::PIN2:GFP*, *pPIN3::PIN3:GFP*, *pPIN7::PIN7:GFP*, *pSHR::SHR:GFP*, *pSCR::SCR:GFP* y las mutantes *sol2-1* y *clv2-3* fueron donadas por el Dr. Ben Scheres de la Universidad de Utrecht en Holanda

-La línea *pepr2-1* fue donada por el Dr. Frans Tax de la Universidad de Arizona en Estados Unidos de América

-La línea *lpr1lpr2* fue donada por el Dr. José López-Bucio de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Michoacán, México.

## 5.2. Esterilización de las semillas

Las semillas de *A. thaliana* se esterilizaron utilizando hipoclorito de sodio al 1.2 % con 0.08 % de Tritón X-100 en agua destilada. Las semillas se incubaron en la solución de cloro durante 5 minutos en un tubo Eppendorf, posteriormente se lavaron 4 veces con agua destilada estéril durante 5 minutos. Con el fin de promover y sincronizar la germinación, las semillas se estratificaron por incubación a 4°C durante 48 h en oscuridad y después de este periodo se procedió con la germinación *in vitro* de semillas bajo condiciones de luz y temperatura controladas de la manera descrita (Chacón-López et al., 2014).

## 5.3. Germinación *in vitro*

Las semillas superficialmente esterilizadas se sembraron bajo condiciones de esterilidad en cajas Petri con medio de cultivo de Murashige y Skoog (Murashige, T. and Skoog, F, 1962), al 0.2X suplementado con 1 % de sacarosa. La composición del medio de cultivo es: 2.0 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.9 mM KNO<sub>3</sub>, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0.15 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 5 μM KI, 25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1 mM MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.3 mM ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 1 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0.1 μM CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA · 2 H<sub>2</sub>O, 10 mg/L inositol, 0.2 mg/L

glicina, 0.05 mM piridoxina, 0.05 mM ácido nicotínico y 0.01 mM tiamina. Para la selección de plantas con resistencia a antibióticos, el medio de cultivo fue suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, 20 µg/mL de higromicina o 20 µg/mL de glufosinato de amonio (PPT), de acuerdo a la resistencia de la línea transgénica en estudio. El medio para condiciones control de fósforo (+Pi) fue ajustado a pH 5.7 y adicionado con 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 10 µM FeSO<sub>4</sub>, mientras que el medio carente de fósforo (-Pi), no contiene KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, fue ajustado a pH 5.7 y adicionado con 10 µM FeSO<sub>4</sub>. Para el crecimiento de las plantas las cajas se orientaron verticalmente y mantenidas en una cámara de crecimiento con condiciones controladas de fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad) y temperatura (23 °C) de acuerdo a reportes previos (López-Bucio et al., 2002; Sanchez-Calderon et al. 2005). La cristalería utilizada para la preparación de medios rutinariamente se dejó en solución ácida (HCl 5 mM) durante toda la noche para eliminar posibles trazas de fósforo y al día siguiente se enjuagó con agua destilada varias veces.

Para los análisis en ausencia de Fe, los medios de cultivo se adicionaron con 50 µM de FerroZine™, un quelante específico de Fe<sup>2+</sup> que elimina la existencia de posibles trazas de hierro en el agar usado para la preparación de medios sólidos.

#### **5.4. Método de tinción histoquímica para β-glucuronidasa**

Con la finalidad de revelar la actividad de la β-glucuronidasa en las plantas transgénicas de estudio se tiñeron mediante el siguiente procedimiento (Sanchez-Calderon et al., 2005). Las muestras se incubaron en recipientes sellados con parafilm en buffer de tinción (Anexo I) a 37 °C durante el tiempo necesario dependiendo del tipo de promotor utilizado (Por seguridad, se debe revisar cada hora el proceso de tinción). Una vez retirado el buffer de tinción, las muestras vegetales se sometieron a un proceso de decoloración descrito posteriormente

#### **5.5. Método de tinción de hierro.**

En mi trabajo doctoral se muestra que el hierro tiene una relevancia crucial en la inducción de la expresión de mi gen de estudio *CLE14*. Por lo tanto para revelar la distribución del Fe en las plantas de estudio se utilizaron los protocolos de tinción



histoquímica de Fe de Turnbull/DAB o Perls/DAB descritos previamente (Meguro et al., 2007; Roschztardt et al., 2009). Las plántulas se incubaron por 30 minutos en la solución I, seguido de 2 enjuagues con agua destilada, posteriormente se incubaron durante una hora en la solución II, para después enjuagarse 2 veces con buffer de fosfatos a pH 7. Finalmente, las plántulas se sumergieron en solución de tinción por 3-10 minutos de acuerdo a los requerimientos del experimento.

Nota: Es muy frecuente que las plántulas se rompan durante el proceso de tinción, por lo que se recomienda evitar movimientos bruscos.

#### Solución I

Para 150 mL de solución:

6 mL de HCl.

6 g de ferricianuro de potasio.

#### Solución II

Para 150 mL de solución:

0.099 g de azida de sodio.

15 mL de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Aforar a 150 mL con etanol.

#### Solución de Tinción.

Para 100 mL de solución:

166.6 µL de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **5.6. Método de decoloración de raíces.**

Las plantas teñidas mediante los protocolos Turnbull/DAB o Perls/DAB se decoloraron con hidrato de cloral (1 g/mL en 15 % glycerol).

Las plantas sometidas a la tinción histoquímica de GUS se decoloraron mediante el método de decoloración de raíces descrito por Malamy y Benfey (Malamy and Benfey, 1997) como se describe a continuación. Las raíces se trataron con una solución de metanol (20 %) acidificado (0.24 N HCl) a 62°C durante 40 minutos y posteriormente con una solución básica compuesta por 0.7 % de NaOH en 60 % de etanol a temperatura ambiente durante 20 minutos. Al terminar estos

tratamientos, las raíces se rehidrataron con soluciones acuosas de etanol al 40 %, 20 % y 10 % durante 1 a 4 días para cada tratamiento y colocándose finalmente en glicerol al 50 %. Para su observación bajo el microscopio las muestras se montaron en portaobjetos.

### **5.7. Microscopía.**

Para la observación de las muestras sin fluorescencia se usó óptica de Nomarsky (Lang, 1968), un microscopio Leica de luz transmitida. Para el análisis de plántulas con expresión de proteínas fluorescentes (GFP o YFP), se usó un microscopio confocal Zeiss invertido LSM510 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Las plántulas para análisis por microscopía confocal se sumergieron en yoduro de propidio (1  $\mu$ M) por 15 minutos para facilitar el contraste con las células de interés y colocadas en un portaobjetos para su observación.

### **5.8. Crecimiento en suelo**

El trasplante a suelo se llevó a cabo cuando las plántulas germinadas *in vitro* habían formado las primeras hojas verdaderas. Las macetas se colocaron en charolas de plástico cubiertas para mantener condiciones de humedad adecuadas.

Las plantas se conservaron en cámaras de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad a una temperatura de 24 °C y se regaron con agua cada tercer día.

### **5.9. Extracción de DNA genómico.**

Para cada construcción realizada durante este proyecto doctoral, se utilizó DNA genómico de planta WT (*col0*). La extracción y purificación de DNA genómico se realizó de acuerdo al protocolo de Dellaporta (Dellaporta et al., 1983), utilizando plántulas de 3-6 semanas de edad. Para esto se añadieron 200  $\mu$ L de regulador de extracción, (EB; Anexo II) por cada 100 mg de muestra pulverizada en nitrógeno líquido, agitando vigorosamente en vortex para obtener una mezcla homogénea a la que se añadieron 50  $\mu$ L de SDS al 20 % para después incubar a 65°C por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 130  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm, por 5 minutos a temperatura ambiente. El

sobrenadante se transfirió a un tubo de Eppendorf agregando 60  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 640  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Estas muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70 % frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de BTE (Ver anexo II) y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo de Eppendorf agregando 20  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 450  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Esta solución se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70 % para después disolverla en 100  $\mu\text{L}$  de TE (Ver anexo II). La muestra se incubó por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio y 220  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se centrifugó por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con etanol al 70 %. Se secó a temperatura ambiente por 10 minutos y finalmente se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de TE. La presencia de DNA se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %. Las muestras de DNA se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en la genotipificación.

#### **5.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El PCR fue una técnica de uso rutinario durante este trabajo doctoral. La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El DNA que se usó como cadena patrón, junto con los oligonucleótidos correspondientes se sometieron a una serie de ciclos de diferentes temperaturas de desnaturalización, unión y extensión del oligonucleótido iniciador (Ver tabla 1), por acción de una DNA polimerasa termoestable, resultando en la amplificación del fragmento de DNA de interés, cuyos extremos quedaron definidos por la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

**Tabla 1. Programas de amplificación para las secuencias promotoras de los genes *CLE14* (pCLE14) y *CLE19* (pCLE14) y los marcos de lectura abierta de los genes *CLE14*, *CLV2* y *PEPR2*.**

Gene	Num. de ciclos	Temperatura de desnaturalización	Temperatura de alineamiento	Temperatura de extensión
pCLE14	35	98 °C / 1'	60 °C / 15"	72 °C / 1'30"
pCLE19	35	98 °C / 1'	60 °C / 15"	72 °C / 2'30"
CLE14	35	98 °C / 1'	60 °C / 15"	72 °C / 1'
CLV2	35	98 °C / 1'	60 °C / 15"	72 °C / 1'30"
PEPR2	35	98 °C / 1'	60 °C / 15"	72 °C / 1'30"

En un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ L para PCR se dispensó la siguiente mezcla de reacción: 50 pMol de oligonucleótido sentido (2  $\mu$ L), 50 pMol de oligonucleótido antisentido (2  $\mu$ L), 100 ng DNA genómico de plantas de 13 días de edad, 11  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O HPLC, 0.4  $\mu$ L de dNTPs (2 mM), 0.8  $\mu$ L de MgCl (50 mM) y 0.2  $\mu$ L de DNA polimerasa Phusion (Invitrogen).

### 5.11. PCR Tiempo real.

El RNA total extraído de las muestras fue purificado utilizando el kit Qiagen RNeasy plant mini de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un microgramo de RNA total fue utilizado para la producción de DNA complementario por medio de transcripción reversa utilizando el kit Super-Script III first-strand synthesis kit (Invitrogen). La reacción de PCR tiempo real fue llevada a cabo en un sistema de PCR tiempo real Applied Biosystems 7500 real-time PCR system utilizando química de detección a base de SYBR Green (Applied Biosystems) y primers específicos para los genes analizados. El gen *ACTINA2* de *Arabidopsis thaliana* (AtACT2, At3g18780) se utilizó como control interno en todos los experimentos de PCR tiempo real. Los niveles de expresión relativa de los genes analizados en los tratamientos experimentales con respecto al control fueron calculados usando el método ddCT de para la cuantificación relativa de acuerdo a reportes previos (Schmittgen and Livak et al., 2008).

### 5.12. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El análisis de los productos de amplificación por PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % de acuerdo al protocolo descrito por (Sambrook and Russell, 2001). La agarosa se preparó al 1 % en amortiguador TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 5 mM pH 8). La separación de los fragmentos en los geles se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 80 V/cm en una cámara de electroforesis con el mismo amortiguador. A la agarosa se le añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL para poder visualizar las bandas del DNA que fluorescen al irradiar el gel con luz ultravioleta. El tamaño de las fragmentos de DNA amplificados se determinó por comparación con marcadores de peso moleculares comerciales que se incluyeron en los geles.

### **5.13. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Ocasionalmente, fue necesaria la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR para su posterior clonación. La purificación de fragmentos de DNA en gel de agarosa se llevó a cabo empleando el sistema *Qiaquick Gel extraction*, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (QIAGEN).

### **5.14. Corte con endonucleasas**

Una técnica útil durante la generación de construcciones fue la digestión con enzimas específicas para el inserto. Para cortar el DNA con enzimas de restricción se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante (Invitrogen y/o New England Biolabs). La mezcla de reacción contenía una unidad de enzima por cada µg de DNA con el amortiguador de digestión correspondiente a una concentración final de 10 %. Las reacciones de digestión de DNA se incubaron por 3 h a 37 °C.

### **5.15. Transformación de *Escherichia coli* por electroporación**

Con el objetivo de incrementar la concentración de los vectores generados, estos se introdujeron en *E. coli*. La transformación de células *E. coli* por electroporación se realizó de acuerdo al protocolo siguiente: A 23 µL de células electrocompetentes previamente descongeladas se les adicionaron 2.5 µL de DNA

plasmídico (5-100 ng) y se mezclaron suavemente. Esta mezcla se depositó en una celda de electroporación de 0.2 mm, evitando la formación de burbujas y utilizando un electroporador Gene Pulser Xcell (BIORAD), se aplicó una descarga eléctrica de 2000 V durante 1.4 mseg. Inmediatamente se adicionó a la celda 1 mL de medio LB que fue transferido a un tubo de ensayo que se incubó 1 h a 37 °C en agitación continua en un agitador orbital (LAB-LINE), finalmente 50-100 µL de este medio se esparcieron en cajas de Petri con medio LB sólido adicionado con kanamicina (100 µg/mL) las cuales se incubaron durante 12 h a 37°C para permitir el crecimiento de colonias.

### **5.16. Purificación de DNA plasmídico**

La recuperación de DNA plasmídico se realizó por dos métodos diferentes. Para la obtención de DNA de alta pureza para secuenciación se utilizaron columnas del sistema Plasmid Midi Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QIAGEN).

Alternativamente, la extracción del DNA plasmídico para verificación de transformantes se realizó utilizando el protocolo de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001) como se describe brevemente a continuación: colonias de *E. coli* seleccionadas se inocularon en 3 mL de medio LB líquido adicionado con el antibiótico correspondiente y se incubaron para su crecimiento a 37 °C durante 14 h en agitación constante de 180 rpm, 1.5 mL de estos cultivos se pasaron a tubos Eppendorf que se centrifugaron por 1 minuto a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µL de GTE (Glucosa 20 %, Tris-HCl pH8 1 M, EDTA pH 8 0.5 M), agitando vigorosamente en vortex. Se adicionaron 200 µL de SDS alcalino (SDS 20 %, NaOH 10 N) mezclando suavemente por inversión, se incubó por un máximo de 5 minutos en hielo, se agregaron 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se incubó 10 minutos en hielo y se centrifugó por 15 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y este procedimiento se repitió en tres ocasiones. El DNA se precipitó del último sobrenadante recuperado, agregando 800µL de etanol absoluto, centrifugando por 15 minutos a 13,000 rpm desechando el sobrenadante y lavando la pastilla 3 veces con etanol al 80 %, finalmente, se dejó secar y se disolvió en 20 µL de buffer TE o agua destilada ultra-pura.

### 5.17. Medio Luria Bertani (LB)

La composición del medio LB utilizado para el crecimiento de bacterias es:

- Bacto-triptona 10 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- NaCl 10 g/L

Para la preparación de medio sólido se adicionaron 20 g/L de agar bacteriológico y para la selección de bacterias recombinantes con resistencia a ampicilina, este antibiótico se adicionó a una concentración final de 100 µg/mL.

### 5.18. Transformación de *A. thaliana* mediante agroinfiltración

Para la obtención de plantas transgénicas se siguió el protocolo conocido como "floral dip" (Martinez-Trujillo et al., 2004), se toma una azada de la cepa de *A. tumefaciens* transformada previamente mediante electroporación con el plásmido de interés y se inoculan 5 mL de medio YEB a pH 7.2. El cultivo se deja de 12 a 16 horas a 28 °C con agitación constante. Posteriormente, se centrifuga el cultivo a 4,000 rpm. Se disuelve la pastilla en 1 mL de medio MS (Anexo II) sin agar. Se repite el lavado 4 veces. Finalmente, se adiciona 0.5 µL de Silwet L-77.

Para transformar *A. thaliana* se coloca una gota de la solución obtenida en cada meristemo floral.

Medio de crecimiento para *A. tumefaciens*, medio YEB:

- 0.5 g de extracto de carne.
- 0.1 g de extracto de levadura.
- 0.5 g de Bactopeptona.
- 0.5 g de sacarosa.
- 30 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
- 2 g de agar.
- aforar a 100 mL con agua destilada.

### 5.19. BiFC mediante bombardeo de partículas

Para los análisis por BiFC, los cDNAs de los genes *CLV2*, *CLE14* y *PEPR2* se subclonaron en los vectores destino del sistema Gateway *pYFN43* y *pYFC4*, previamente descritos (Belda-Palazón et al., 2012), mediante reacciones de

recombinación de acuerdo a las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). Se obtuvieron las fusiones traduccionales bajo la regulación del promotor 35S a un fragmento N-terminal de la YFP para *CLE14* (p35S::CLE14:NYFP) y a un fragmento C-terminal de la YFP para *CLV2* (p35S::CLV2:CYFP y p35S::PEPR2:CYFP). Dichas construcciones se introdujeron a raíces de *A. thaliana* con un sistema de bombardeo de micro partículas PDS 1100/He, con el siguiente protocolo:

La mezcla para bombardeo fue preparada con:

- 10 µg de DNA.
- 50 µL de partículas de Tungsteno (W).
- 50 µL de CaCl 2.5 M.
- 20 µL de espermidina (100 µM)

Una vez preparada la mezcla se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 1-10 s a 5,000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 100 %, empleando centrifugación de 1-10 s a 5,000 rpm para compactar la pastilla que finalmente se resuspendió en 60 µL de etanol al 100 %. La suspensión de micropartículas recubiertas de DNA se sonicó 3 veces durante 3 minutos en agua destilada a temperatura ambiente y se espació por la membrana que se utilizó para realizar el disparo, empleando helio para generar una presión de 1200 psi.

Antes de usarse para ser recubiertas de DNA las partículas de Tungsteno se trataron de la siguiente manera

A 60 mg de partículas se les añadió 1.5 mL de HNO<sub>3</sub> 0.1 M, se sonicaron en un baño de agua destilada con hielo durante 20 minutos. Posteriormente se eliminó el HNO<sub>3</sub>, se agregó 1 mL de agua y se sonicó brevemente. Se eliminó el agua, se agregó 1 mL de etanol absoluto, se sonicó nuevamente y se centrifugó 30 s a 10,000 rpm. Finalmente, se eliminó el etanol y se agregó 1 mL de agua estéril.

## **5.20. Construcciones mediante el sistema Gateway**

### **5.20.1. Construcción de la fusión transcripcional pCLE14::GFP/GUS**

Con la finalidad de analizar la respuesta transcripcional del gen *CLE14* durante la respuesta a la carencia de fósforo, se realizó la construcción de la fusión



transcripcional pCLE14::GFP/GUS. Se colocaron los genes de la proteína verde fluorescente (GFP) y la  $\beta$ -glucuronidasa bajo el promotor putativo del gen *AtCLE14*. No hay estudios previos que definan la región del gen *CLE14* que constituye el promotor, por lo tanto, se decidió seleccionar toda la región intergénica que se encuentra río arriba del primer ATG del marco de lectura del gen *CLE14* (2119 pb). Se diseñaron oligonucleótidos específicos (pCLE14FW y pCLE14RW) que flanquean a esta región de 2119 pb y se les adicionaron los sitios att necesarios para permitir la recombinación mediante el sistema Gateway.

**Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos flanqueantes a la región promotora putativa del gen *CLE14*.**

Oligonucleótidos	Secuencia
pCLE14FW	ggggACAAgTTTgTACAAAAAagCAggCTAA
pCLE14RW	ggggACCACTTTgTACAAgAAAagCTgggTA

pCLE14FW. Secuencia de oligonucleótidos sentido.

pCLE14RW Secuencia de oligonucleótidos antisentido.

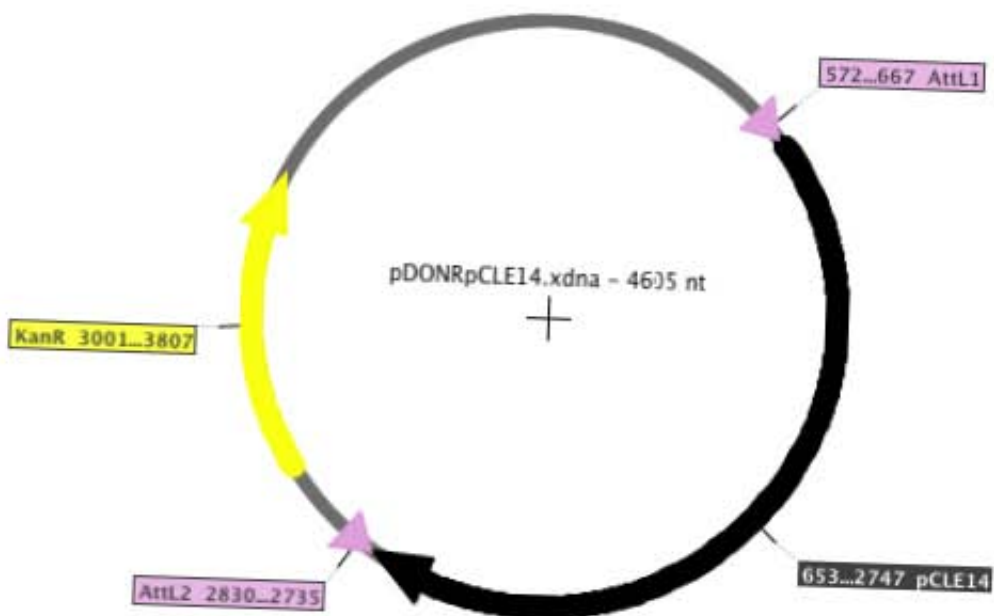
En amarillo se muestra los sitios att flanqueando a la región promotora putativa del gen *CLE14*.

Se amplificó la región promotora putativa del gen *CLE14*, bajo las condiciones descritas previamente (Ver tabla 1)

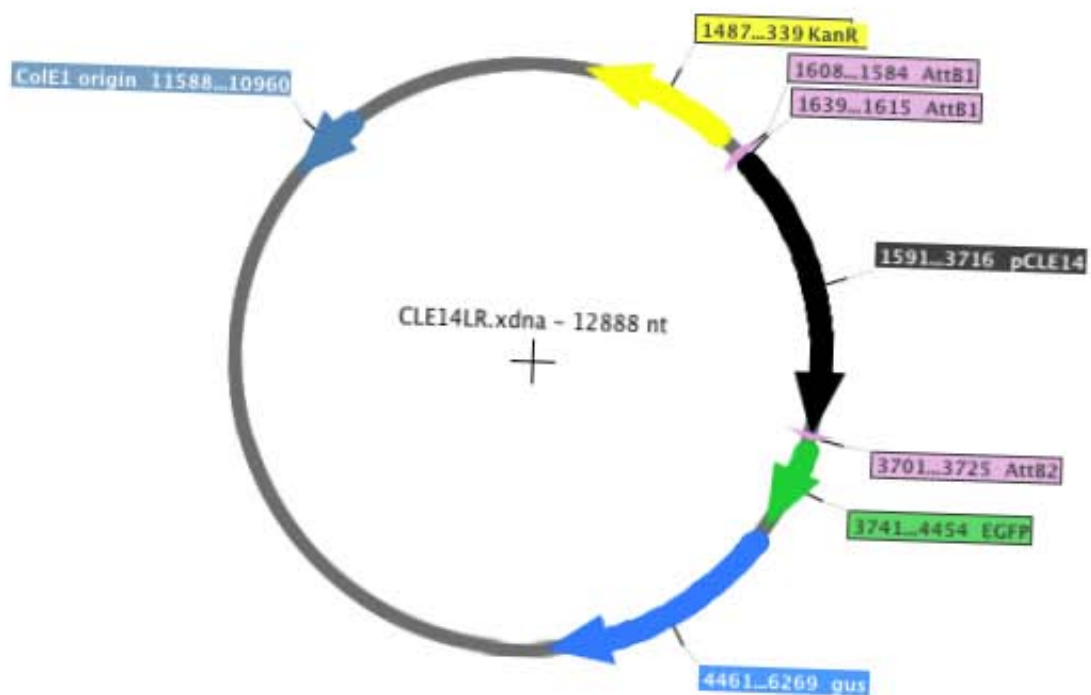
El fragmento obtenido en la reacción de amplificación y que corresponde a 2119 pb se purificó y se usó en la reacción de recombinación BP para la obtención del plásmido pDONRpCLE14 (Figura 2A). Este plásmido se usó para transformar por electroporación a las células de la cepa DH5  $\alpha$  de *E. coli*. Se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina y se extrajo DNA plasmídico por lisis alcalina. Para identificar las posibles clonas recombinantes, se analizaron los patrones de restricción empleando las enzimas *HindIII* y *EcoRV* (Figura 3). Se verificó el resultado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos pCLE14FW y pCLE14RW (Tabla 2). Una vez verificada la obtención del plásmido pDONRpCLE14 se realizó la recombinación LR y se obtuvo el plásmido CLE14LR (Figura 2B). De igual manera, el plásmido CLE14LR se usó para transformar las células electrocompetentes de la cepa DH5  $\alpha$

de *E. coli*, después se extrajo DNA plasmídico y se verificó la recombinación mediante digestión con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRV* y mediante PCR (Figura 4). Finalmente, se obtuvo DNA plasmídico de alta pureza mediante columnas comerciales y se mandó a secuenciar. Los resultados de la secuencia se analizaron mediante un BLAST. El resultado del alineamiento indicó que la construcción realizada no presenta alteración en la secuencia. Por lo tanto, se continuó con la transformación de *A. thaliana* con el plásmido CLE14LR mediante agroinfiltración.

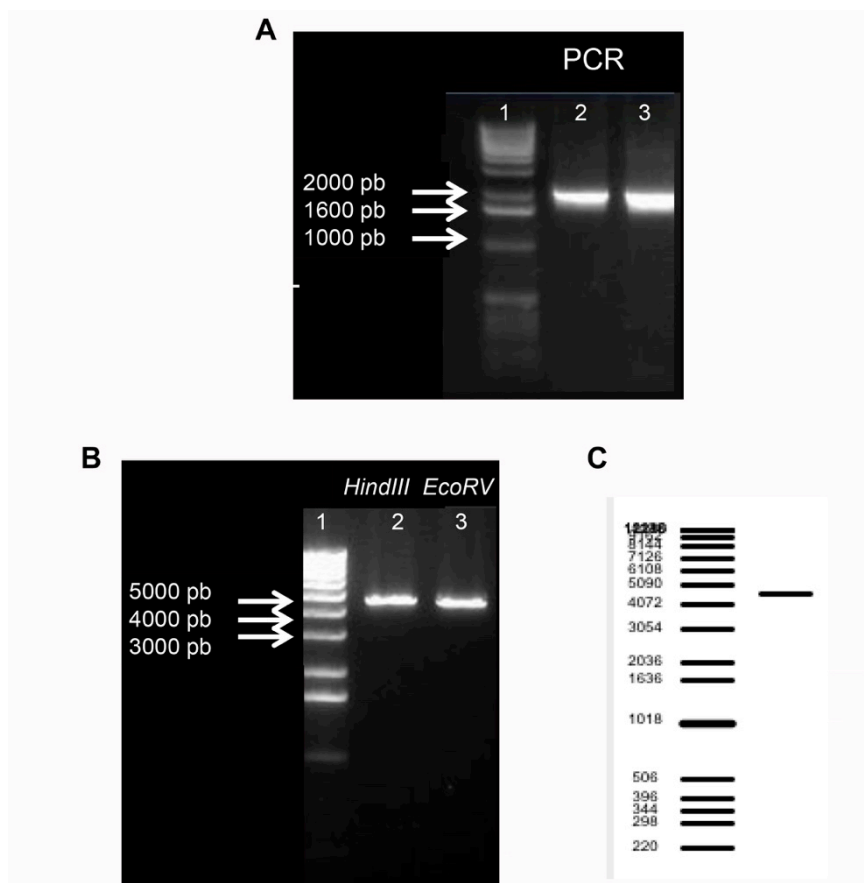
**A**



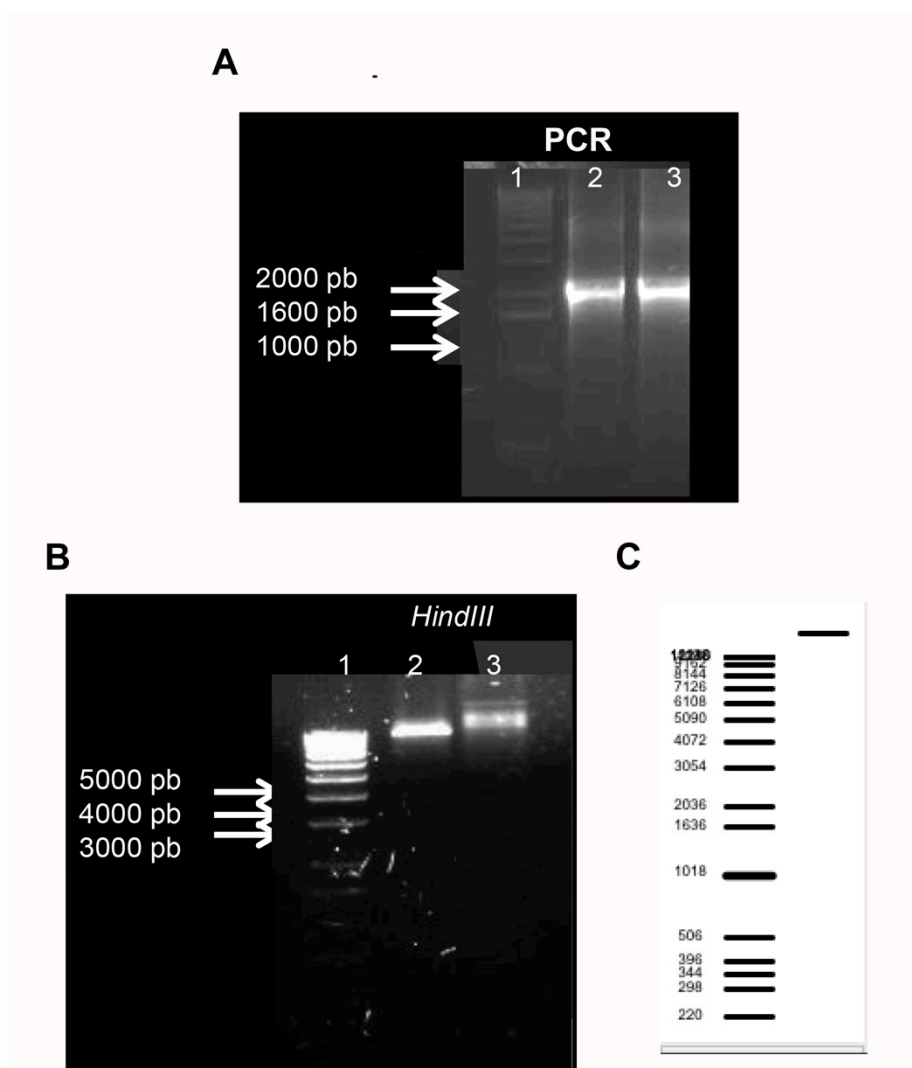
**B**



**Figura 2. Esquema de los vectores utilizados y obtenidos de la recombinación BP y LR mediante el sistema Gateway® para la construcción de la fusión transcripcional pCLE14::GFP/GUS.** **A.** Esquema del plásmido *pDONRpCLE14* obtenido de la recombinación BP, este vector tiene sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRV* que flanquea el producto de amplificación y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *HindIII* dentro del inserto. Además, contiene el gen de resistencia a kanamicina para su posterior selección en *E. Coli*. La flecha negra esquematiza la región promotora putativa del gen *CLE14*. **B.** Esquema del plásmido CLE14LR obtenido de la recombinación LR, se ilustra la posición de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRV* y *HindIII* que se encuentran dentro del inserto. Además, contiene el gen de resistencia espectinomicina para su posterior selección en *E. Coli*. Contiene el gen reportero para la  $\beta$ -Glucuronidasa (*uidA*) y para la proteína fluorescente GFP y el gen de resistencia a kanamicina para posteriormente seleccionar la planta transgénica. La flecha negra esquematiza la región promotora putativa del gen *CLE14*.



**Figura 3. Análisis del vector pDONRpCLE14 obtenido de la recombinación BP por sistema Gateway®.** **A.** Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2 y 3: Amplificación de la región promotora putativa del gen *CLE14* utilizando DNA genómico extraído de una planta WT (*Col 0*). **B.** Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: Electroforesis de la digestión del plásmido pDONRpCLE14 con la enzima *HindIII* cuyo sitio de corte se encuentra únicamente dentro del inserto, Carril 3: Electroforesis de la digestión del plásmido pDONRpCLE14 con la enzima *EcoRV*. **C.** Esquema del gel esperado para la digestión del plásmido pDONRpCLE14 con enzimas de restricción con sitio de reconocimiento único en el plásmido.



**Figura 4. Análisis del vector CLE14LR obtenido de la recombinación LR por medio del sistema Gateway®.** A. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2 y 3: Amplificación de una parte del inserto del plásmido CLE14LR con oligonucleótidos específicos. B. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: Electroforesis de la digestión de DNA plasmídico obtenido de diferentes clonas con la enzima *HindIII* cuyo sitio de corte se encuentra únicamente dentro del inserto, Carril 3: Electroforesis de DNA plasmídico sin cortar de una clona recombinante crecida en medio suplementado con espectinomicina. C. Esquema del gel esperado para la digestión del plásmido CLE14LR con enzimas de restricción *HindIII*, con sitio de reconocimiento único en el plásmido.

El plásmido CLE14LR que contiene la construcción pCLE14::GFP/GUS se usó para transformar cepas de *A. tumefaciens* mediante electroporación; La cepa transformada de *A. tumefaciens* se utilizó para transformar *A. thaliana* mediante agroinfiltración mediante los protocolos descritos previamente. Posteriormente, se colectaron las semillas de plantas infectadas con *A. tumefaciens* y se sembraron en medio MS suplementado con kanamicina. Se seleccionaron las plantas resistentes a kanamicina y se pasaron a suelo. Se obtuvieron aproximadamente 30 plantas resistentes. Se colectó la progenie y se analizó el patrón de tinción en cada una, se seleccionaron 3 líneas transgénicas diferentes que presentaron el patrón de tinción promedio y similar a la fusión traduccional pCLE14::CLE14:GFP publicada previamente (Meng and Feldman, 2010).

Para el análisis del patrón de expresión de cada una de las líneas transgénicas que llevan la construcción pCLE14::GFP/GUS se realizó un análisis de segregación mendeliana. Se verificó que tuvieran una sola inserción en su genoma en base a su resistencia a kanamicina (proporción 3:1). Posteriormente, permitimos la autofertilización con la finalidad de obtener plantas homocigotas, y seleccionamos aquellas que presentaron una progenie 100 % resistente a kanamicina y 100 % positiva para la fluorescencia por GFP.

## 6. RESULTADOS

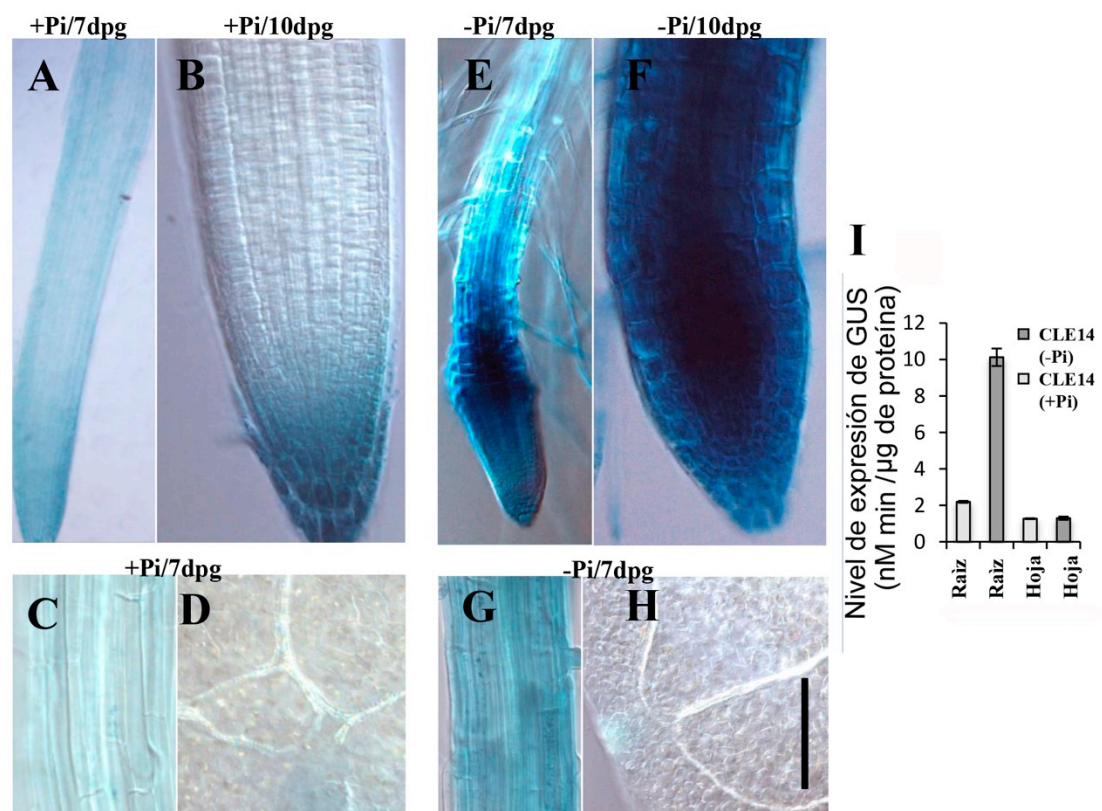
Los principales resultados de este trabajo de tesis están descritos en el artículo:

[Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Jiménez-Sandoval, P., Alatorre-Cobos, F., Oropeza-Aburto, A., Mora-Macías, J., Sánchez-Rodríguez, F., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. \(2017\). Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. Developmental Cell 41, 555-570. e553. \(Anexo III\).](#)

Aquellos que no fueron incluidos en la publicación referida se describen a continuación.

### 6.1. La carencia de fósforo induce la actividad del promotor del gen CLE14 en la punta de la raíz primaria.

El vector que contiene la construcción *pCLE14::GFP/GUS* posee adicionalmente el gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), por lo tanto, primero se realizó un análisis general de la planta transgénica obtenida (*pCLE14::GFP/GUS*) mediante la tinción histoquímica de GUS. Se germinaron plantas transgénicas en medio sin fósforo adicionado al medio de cultivo (-Pi) y se comparó el patrón de tinción con plantas transgénicas germinadas en medio suplementado con 1mM de fósforo (+Pi) por 7 y 10 días post-germinación (dpg). El análisis no reveló cambios observables en el patrón de tinción GUS en la parte aérea de las plántulas *pCLE14::GFP/GUS* germinadas en condiciones de -P en comparación con las plántulas germinadas en condiciones de +Pi (Figura 5 D, H). En contraste, hacia la punta de la raíz se observó un claro incremento en la intensidad de la tinción de GUS (Figura 5), sugiriendo que el gen *CLE14* está activo transcripcionalmente en respuesta a carencia de fósforo principalmente en la punta de la raíz. Posteriormente, se verificó este cambio mediante análisis por fluorometría, los resultados obtenidos, soportan lo observado mediante microscopía. (Figura 5 I).





**Figura 5. Análisis general del patrón de expresión del gen reportero GUS bajo la actividad del promotor de *CLE14* en respuesta a la baja disponibilidad de fósforo.** **A-D** Plántula *pCLE14::GFP/GUS* crecida en condiciones óptimas a los días 7 y 10 dpv. **E-H** Plántula *pCLE14::GFP/GUS* crecida en condiciones de estrés por carencia de fósforo a los días 7 y 10 dpv. **A, E.** Punta de la raíz primaria y cilindro central distal. **B, F.** Punta de la raíz primaria. **C, G.** Cilindro central proximal. **D, H.** Hoja. **I.** Análisis fluorométrico de la actividad histoquímica de GUS de la línea transgénica *pCLE14::GFP/GUS* en condiciones óptimas (+P) y de carencia de fósforo (-P). Los experimentos se realizaron por triplicado.  $n \geq 20$ . Escala en B, D, F, H: 20  $\mu\text{m}$ ; A, E: 150  $\mu\text{m}$ .

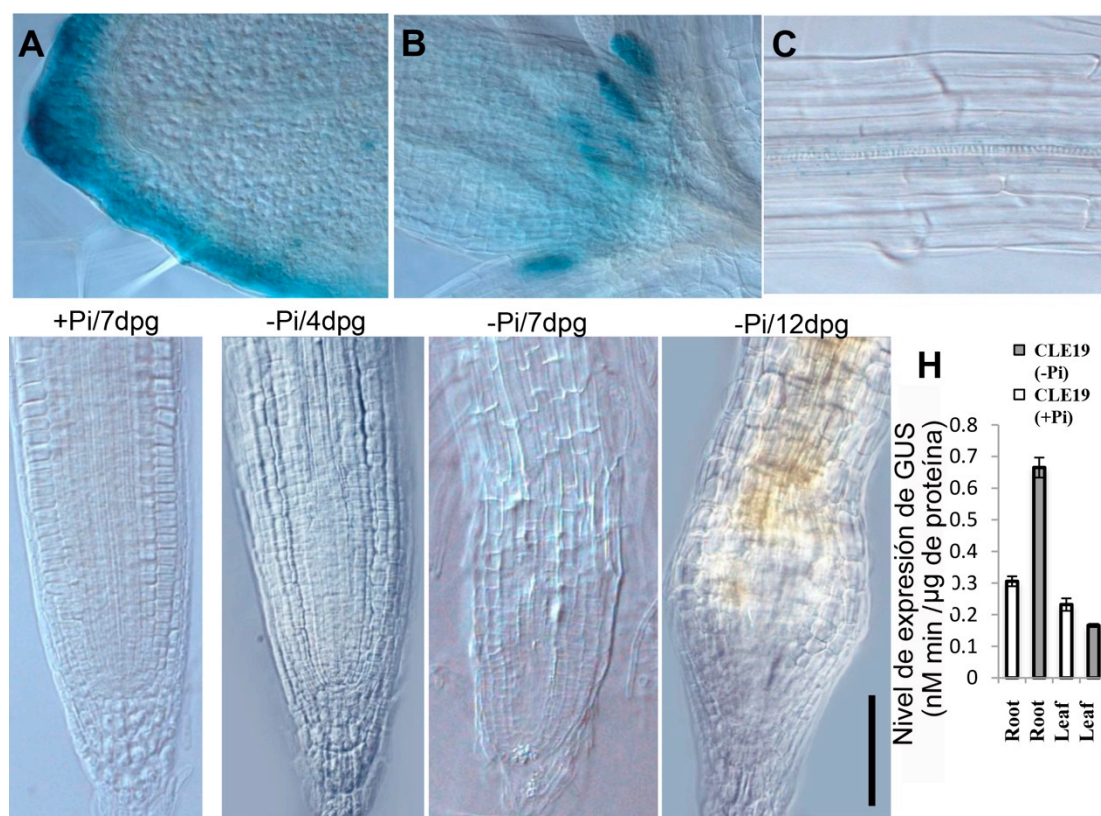
## **6.2. La carencia de fósforo no induce la actividad del promotor del gen *CLE19* en la punta de la raíz primaria**

Previamente se ha reportado en la literatura la respuesta transcripcional de 36 genes *CLE* bajo condiciones cambiantes de Pi en *Lotus japonicus* (LjCLE), encontrándose que *LjCLE14*, 16, 18, 19, 20, 22 y 34 se inducen en la raíz de *Lotus japonicus* en experimentos donde se varía el Pi de 0 a 5  $\mu\text{M}$  a través de un sistema de hidroponía, siendo *CLE19* y *CLE20* los de mayor inducción (Funayama-Noguchi et al., 2011). *CLE19* y *CLE20* no se expresan en el meristemo de la raíz de plántulas de *A. thaliana* crecidas bajo condiciones óptimas (Jun et al., 2010). Sin embargo, se analizó si bajo condiciones de carencia de fósforo, *CLE19* presenta actividad transcripcional en el RAM en respuesta a la carencia de fósforo en *A. thaliana*. Debido a que es complicado realizar un corte específico del RAM de *A. thaliana* para realizar una cuantificación por PCR tiempo real, se realizó la construcción *pCLE19::GFP/GUS*.

A pesar de que se ha descrito un UTR'5 para *CLE19* de 102 pb, se decidió seleccionar la mayor parte de la región intergénica que se encuentra río arriba del primer ATG del marco de lectura del gen *CLE19* (5500 pb). Se diseñaron oligonucleótidos específicos que flanquean a esta región y se les adicionaron los sitios att necesarios para permitir la recombinación mediante el sistema Gateway, siguiendo el mismo protocolo descrito previamente para la generación de la construcción *pCLE14::GFP/GUS* (Ver Material y Métodos, sección 5.20).

Se realizó un análisis general de la planta transgénica obtenida *pCLE19::GFP/GUS* mediante la tinción histoquímica de GUS. Se germinaron plantas transgénicas en condiciones de +Pi y -Pi durante 7 y 10 dpv. El análisis no reveló cambios

observables en el patrón de tinción de p*CLE19*::*GFP/GUS* en la parte aérea ni en el RAM en respuesta a la carencia de fósforo (Figura 6 D, H). Sugiriendo que el gen *CLE19* no está activo transcripcionalmente en respuesta a carencia de fósforo en la punta de la raíz. Adicionalmente se realizó un análisis por fluorometría con tejido de la raíz completa, los resultados indicaron un incremento en la actividad del promotor del gen *CLE19* a lo largo de la raíz (Figura 6 I). *CLE19* se expresa en periciclo de zona diferenciada a lo largo de la raíz, por lo que el incremento en la transcripción podría corresponder a esta zona, sin embargo, no se verificó ya que este análisis se encuentra fuera de los objetivos de este trabajo doctoral.



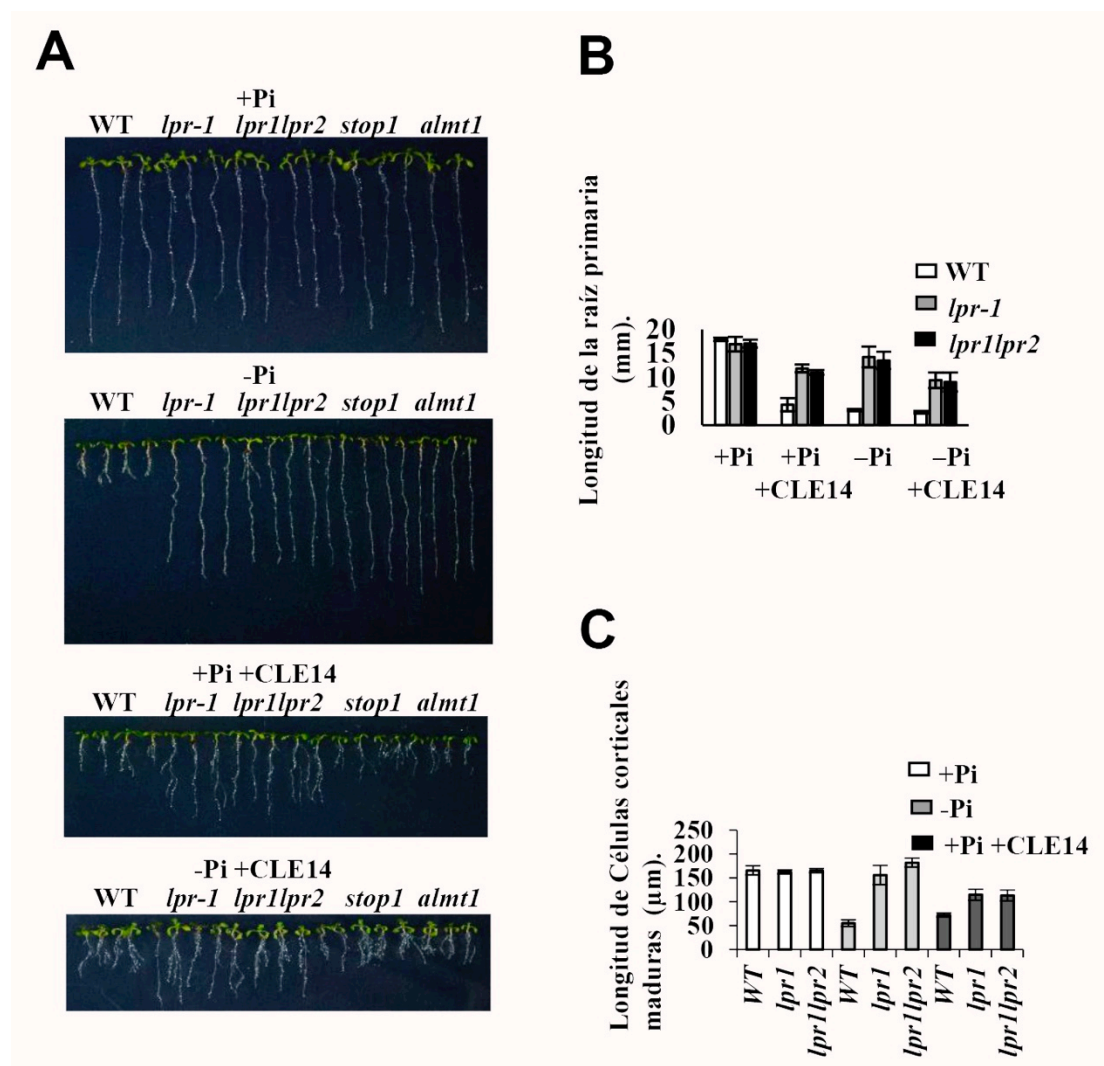
**Figura 6. Análisis general del patrón de expresión del gen reportero GUS bajo la actividad del promotor de *CLE19* en respuesta a la baja disponibilidad de fósforo.** p*CLE19*::*GFP/GUS* se germinó en +Pi por 7 días. (A-D), y en -Pi por 4-12 dpg (E-G). (A) hoja. (B) brote. (C) Zona diferenciada. (D-G) RAM. (H) Análisis cuantitativo de la transcripción de *CLE19* mediante ensayos fluorométricos. La flecha negra muestra tinción de GUS en periciclo. Los experimentos se realizaron por triplicado.  $\pm$ SE.  $n \geq 20$ . Escala: 50  $\mu$ m.

### 6.3. *CLE14* actúa río abajo de los genes responsivos a fósforo *LPR1/LPR2*

*LPR1* y *LPR2* son componentes clave en la percepción de la disponibilidad de fósforo en la raíz, además son necesarios para llevar a cabo el agotamiento del RAM en respuesta a la carencia de fósforo (Muller et al., 2015; Svistoonoff et al., 2007; Ticconi et al., 2009). La mutante *lpr1* desarrolla raíces primarias más largas que la WT en respuesta a la carencia de fósforo. *LPR2* juega un papel aditivo y similar en respuesta a la baja disponibilidad de fósforo. Por lo que la doble mutante *lpr1lpr2* muestra un fenotipo de raíz primaria aún más larga que las mutantes sencillas *lpr1* o *lpr2*. (Muller et al., 2015; Reymond et al., 2006; Svistoonoff et al., 2007; Ticconi et al., 2009). En la publicación obtenida de este trabajo doctoral, se encontró que nuestro gen de estudio *CLE14*, actúa río abajo de los genes *LPR1/LPR2* en la ruta de señalización que dispara el agotamiento del meristemo de la raíz en respuesta a carencia de fósforo (Gutiérrez-Alanís et al., 2017). De acuerdo con el hallazgo, notamos que el proceso de agotamiento del RAM en respuesta a carencia de fósforo puede ser restaurado en las mutantes insensibles a la carencia de fósforo, *lpr1* y *lpr1lpr2*, sin embargo, la longitud de la raíz primaria de las mutantes *lpr1* y *lpr1lpr2* es más larga que la plántula WT, tanto en condiciones de  $-Pi$  como en  $-Pi$  adicionado con péptido *CLE14* ( $-Pi+CLE14$ ).

La longitud de la raíz primaria en plantas bajo condiciones de carencia de fósforo depende de la actividad meristemática y de una correcta elongación en las células maduras (González-Mendoza et al., 2013; Sanchez-Calderon et al., 2005). Por lo tanto, una posible explicación a este fenómeno es que *CLE14* restaura el proceso de agotamiento del RAM en las mutantes *lpr1* y *lpr1lpr2* pero no previene el de elongación celular. Con la finalidad de desafiar esta hipótesis, analizamos el efecto del péptido *CLE14* sobre la longitud de las células corticales maduras en algunas de las mutantes insensibles a la carencia de fósforo: *lpr1*, *lpr1lpr2*, *almt1* y *stop1* (Mora-Macías et al., 2017), comparamos resultados con plántulas WT. Encontramos que las células corticales maduras en las mutantes *lpr1* y *lpr1lpr2* son más largas que en las plántulas WT en respuesta a la carencia de fósforo y a la adición del péptido *CLE14* (Figura 7). Estos datos indican que *CLE14*, *LPR1* y *LPR2* se encuentran en la misma ruta para el agotamiento del RAM, pero no para el proceso de acortamiento celular observado en respuesta a carencia de fósforo.

Interesantemente, las mutantes *almt1* y *stop1* restauran el fenómeno de agotamiento del RAM e inhibición de elongación celular con la adición del péptido CLE14, sugiriendo que estos genes se encuentran en la ruta de señalización que desencadena el agotamiento del RAM, acortamiento celular y como consecuencia el fenotipo de raíz corta obtenido a través de la adición exógena del péptido CLE14.



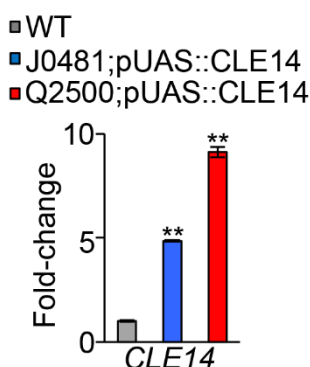
**Figura 7. Efecto de la adición exógena del péptido CLE14 sobre mutantes insensibles a las condiciones de carencia de fósforo. (A)** Plántulas WT, *lpr1*, *lpr1lpr2*, *almt1* y *stop1* germinadas en condiciones de +Pi, -Pi, +Pi+CLE14 y -Pi+CLE14 12 dpg. **(B)** Análisis cuantitativo de la longitud primaria en las plántulas WT, *lpr1*, *lpr1lpr2* a los 12 dpg. **(C)** Análisis cuantitativo de la longitud de las células corticales maduras en las plántulas WT, *lpr1*, *lpr1lpr2* a los 12 dpg. Los experimentos se realizaron por triplicado.  $n \geq 20$ . Escala en C: 20 y 50 µm.

#### **6.4. *CLE14* dispara el agotamiento del meristemo de la raíz en una manera tejido-dependiente**

En el transcurso de este trabajo, se observó que la transcripción de *CLE14* revelada por GFP es predominante en córtex, endodermis y tejido vascular desde las primeras horas de estrés por carencia de fósforo. Basado en estas observaciones, consideramos que hay una correlación importante entre el cambio drástico en el patrón de actividad del promotor de *CLE14* y el progresivo agotamiento del RAM, ambos inducidos por baja disponibilidad de fósforo. Una de las herramientas que permite explorar diferentes cambios en la localización de la expresión es la colección de líneas transgénicas de Jim Haseloff (Universidad de Cambridge, RU. <http://haseloff.plantsci.cam.ac.uk>). Las líneas de Haseloff son enhancer trap que funcionan mediante el sistema de trans-activación GAL4 (*GAL4VP16-UAS*). Estas líneas transgénicas ya han sido utilizadas previamente para dirigir la expresión de manera específica a diferentes tejidos de la raíz y como líneas de identidad celular. La localización de la expresión del gen de estudio se determina por la señal de la GFP, el cual es dirigido mediante el mismo sistema GAL4. (Fiers et al., 2005; Sabatini et al., 2003). Por lo tanto, para determinar si el posible efecto de *CLE14* durante el agotamiento del meristemo en respuesta a la carencia de fósforo es dependiente de tejido, generamos la línea transgénica *pUAS::CLE14*.

Para la construcción del plásmido *pUAS::CLE14* se utilizó el vector Multigateway pB7M24GW como vector destino y los plásmidos de entrada *pEN-L4-UAS-RI* y el *pDONRpCLE14* conteniendo únicamente el marco de lectura del gen *CLE14*. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo descrito para la construcción *pCLE14::GFP/GUS* (Ver Material y Métodos, sección 5.20). Se obtuvieron al menos 10 plantas transgénicas. En las líneas resultantes se verificó la presencia de la construcción *pUAS::CLE14*, se amplificó el inserto con oligonucleótidos específicos y se mandó a secuenciar, posteriormente, se realizaron las cruzas correspondientes con las líneas de la colección de J. Haseloff: J2351, J0571, Q2500, J0481 y J0631. (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff>). La línea J0481, dirige la expresión de UAS a epidermis y cofia lateral, la línea J0571 a córtex y endodermis, la Q2500 a endodermis y centro quiescente, la J2351 a cofia lateral y tejido vascular, la J0631 a lo largo de toda la raíz excepto en la punta de la raíz y J2341 en células iniciales de

columela. Se verificó el incremento en el nivel de transcrito en raíces de las líneas *Q2500;pUAS::CLE14* y *J0481;pUAS::CLE14* mediante PCR tiempo real (Figura 8).



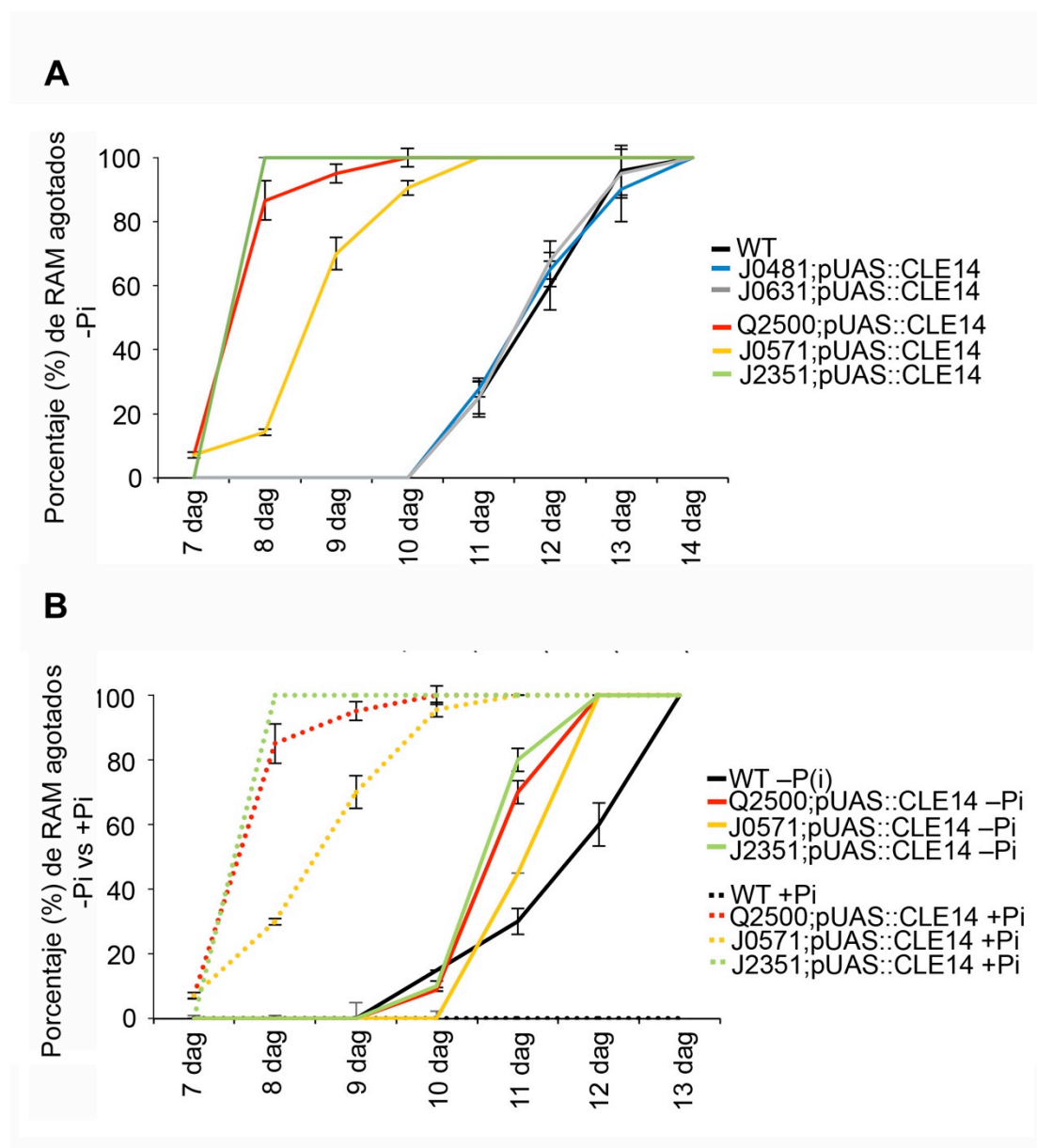
**Figura 8. Nivel de transcrito del gen *CLE14* en líneas que expresan el gen *CLE14* de manera tejido-específica a endodermis y QC.** El PCR tiempo real se realizó con RNA extraído de la punta de la raíz. Los experimentos se realizaron por triplicado. El gen *ACTINA2* de *A. thaliana* (*AtACT2*, *At3g18780*) se utilizó como control interno  $n \geq 100$ .  $\pm$ SE, \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ .

Las plantas de 6 semanas de edad de las líneas dobles transgénicas mostraron algún grado de infertilidad. Las líneas *J2351;pUAS::CLE14*, *J0481;pUAS::CLE14* y *J0631;pUAS::CLE14* son capaces de dar progenie tal como la WT. Por lo tanto, para este trabajo analizamos las raíces de las líneas homocigotas *J0481;pUAS::CLE14*, *J0631;pUAS::CLE14*, *J2351;pUAS::CLE14* y *J2341;pUAS::CLE14*. No pudimos obtener la planta homocigota *J0571;pUAS::CLE14* ni *Q2500;pUAS::CLE14*, por lo que estas líneas se analizaron como doble heterocigotas. Las plántulas *J0481;pUAS::CLE14*, *J0631;pUAS::CLE14*, *J2351;pUAS::CLE14*, *J2341;pUAS::CLE14*, *Q2500;pUAS::CLE14* y *J0571;pUAS::CLE14* se analizaron por 12 días bajo condiciones +Pi.

Los resultados previamente publicados (Gutiérrez-Alanís et al., 2017) posicionan a *CLE14* no solamente como un gen responsivo a la carencia de fósforo, sino que también como un factor clave en la respuesta de la raíz a la disponibilidad de fósforo. Para verificar que la acción de *CLE14* sobre el RAM de *A. thaliana* es tejido-dependiente, realizamos un análisis para comparar el tiempo necesario para que

ocurra el agotamiento del RAM por carencia de fósforo entre las líneas enhancer trap que poseen la construcción *pUAS::CLE14* y la WT. Las líneas *J0631;pUAS::CLE14*, *J0481;pUAS::CLE14*, *Q2500;pUAS::CLE14*, *J2351;pUAS::CLE14*, *J0571;pUAS::CLE14* y *J2341;pUAS::CLE14* se germinaron en condiciones +Pi y -Pi por 12 días. En condiciones de -Pi, cuando *CLE14* fue expresado en córtex, endodermis o tejido vascular (*J0571;pUAS::CLE14*, *Q2500;pUAS::CLE14* y *J2351;pUAS::CLE14* respectivamente), las plántulas mostraron un agotamiento más rápido que las plantas WT en bajo fósforo (Figura 9). En contraste, cuando *CLE14* fue expresado en epidermis/cofia o a lo largo de la raíz excepto en la punta de la raíz (*J0481;pUAS::CLE14* *J0631;pUAS::CLE14*, respectivamente), el tiempo en que las plántulas mostraron agotamiento del meristemo fue similar a la plántula WT (Figura 9). Estos datos soportan la idea que el agotamiento del RAM disparado por la carencia de fósforo depende de la expresión tejido específico de *CLE14*.



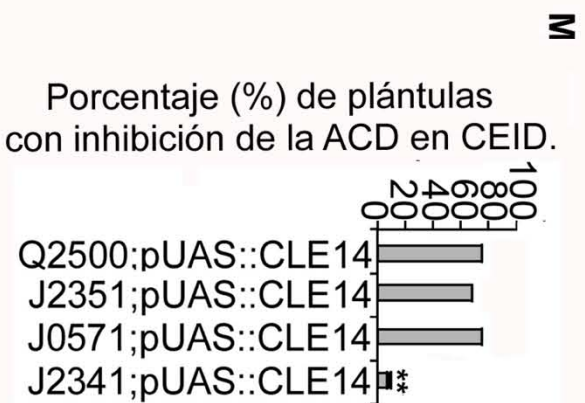
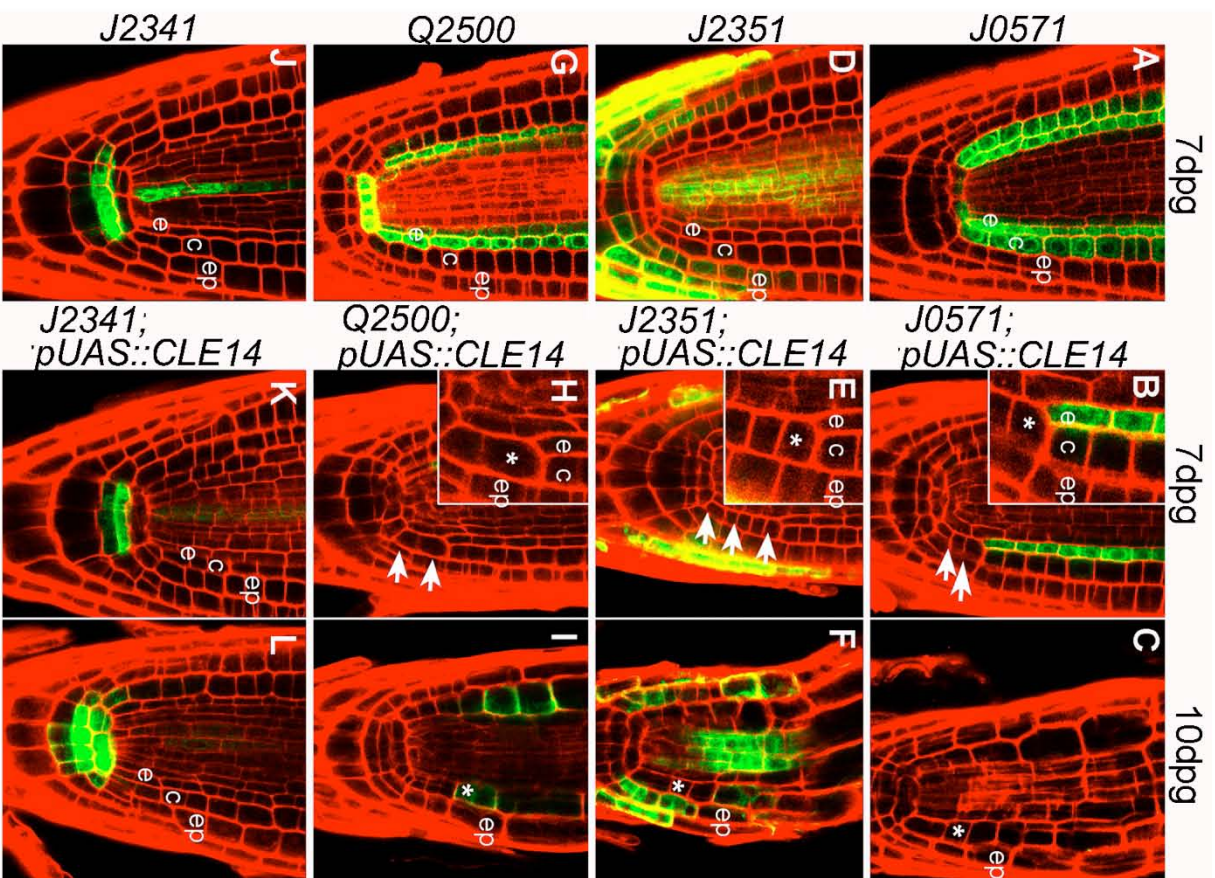


**Figura 9. Análisis comparativo entre el agotamiento del meristemo apical de la raíz observado en condiciones de carencia de fósforo con el agotamiento observado por la expresión de *CLE14*.** Cuantificación de meristemas agotados de plántulas expresando *CLE14* en diferentes tejidos. **(A)** Plántulas germinadas bajo condiciones de carencia de fósforo. **(B)** Comparación del porcentaje de agotamiento de plántulas expresando *CLE14* en diferentes tejidos germinadas bajo condiciones +Pi vs -Pi. Los experimentos se realizaron por triplicado.  $n \geq 20$ .



### **6.5. *CLE14* inhibe la división asimétrica que genera los tejidos córtex y endodermis de manera tejido dependiente**

Debido a que la carencia de fósforo induce la actividad del promotor de *CLE14* en las células CEID desde las primeras horas de estímulo por carencia de fósforo, analizamos si la transcripción tejido específica de *CLE14* en CEI-CEID podría afectar la capacidad de división celular asimétrica (ACD) de las células iniciales del córtex y endodermis. Analizamos el patrón de división celular en el RAM de las líneas *Q2500;pUAS::CLE14*, *J0571;pUAS::CLE14*, *J2351;pUAS::CLE14* germinadas en +Pi condiciones por 7 y 10 dpg. Cuando *CLE14* fue expresado en endodermis/QC, endodermis/córtex o cofia lateral/tejido vascular (*Q2500;pUAS::CLE14*, *J0571;pUAS::CLE14*, *J2351;pUAS::CLE14*, respectivamente), el 85 % de las plántulas mostraron que el potencial de división de la CEID fue afectada en diversos niveles, revelado por la presencia de una única capa de tejido que da lugar al córtex y endodermis (tejido basal; Figura 10), indicando que la ACD en CEID, que genera córtex y endodermis está afectada. En contraste, cuando *CLE14* fue expresado en células iniciales de columela y tejido vascular central (*J2341;pUAS::CLE14*) el porcentaje de plántulas con el fenotipo de capa única de tejido basal, disminuyó enormemente (Figura 10). Indicando que la transcripción de *CLE14* debe estar en córtex, endodermis o tejido vascular para inducir la diferenciación del CEID y afectar la apropiada formación del tejido basal.

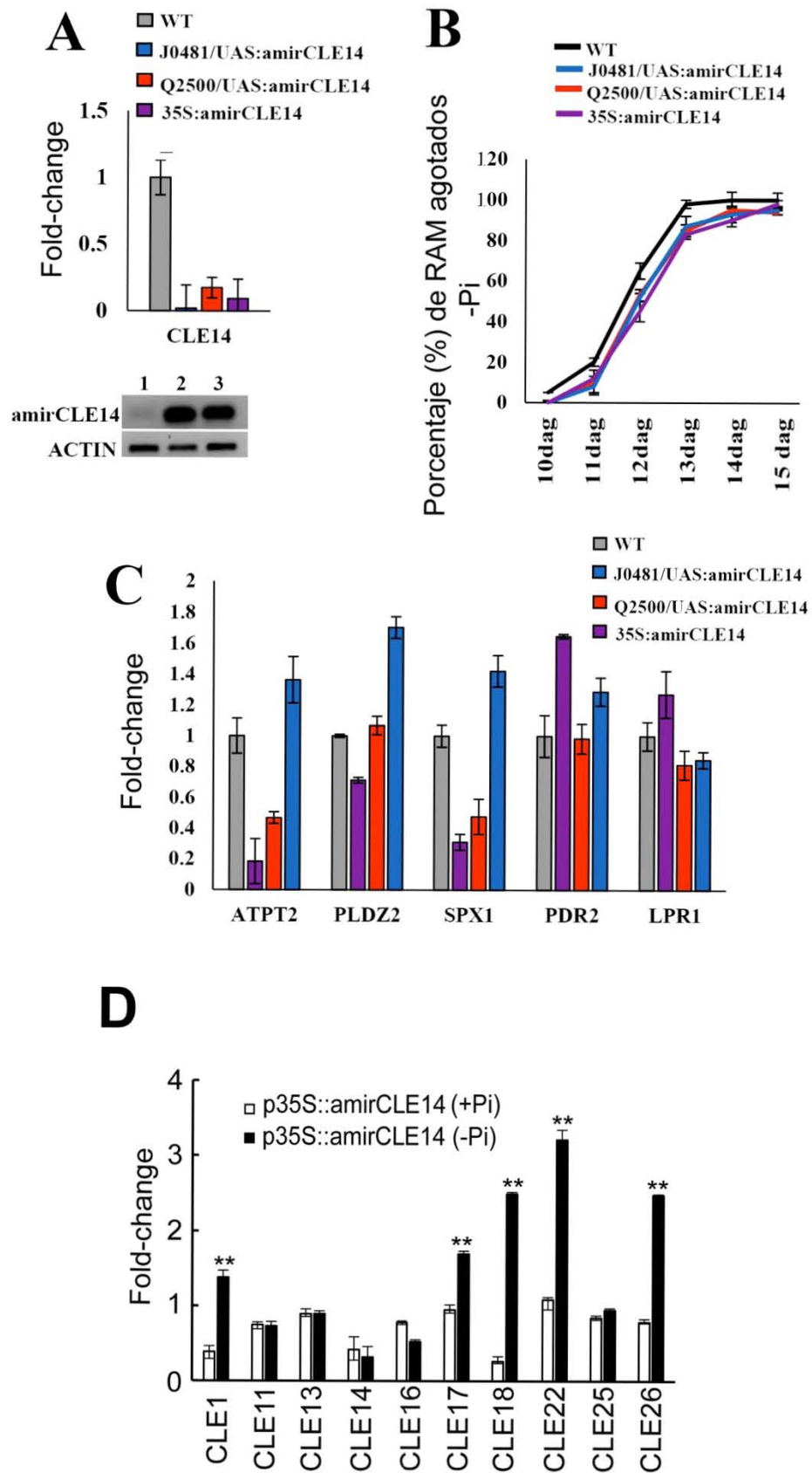


**Figura 10. Análisis comparativo del fenotipo de inhibición de la ACD entre líneas que expresan *CLE14* en córtex, endodermis, tejido vascular ó células iniciales de columela. (A-L) Punta de la raíz primaria de líneas transgénicas que expresan el gen *CLE14* en diferentes tejidos. Las plántulas se germinaron en medio con condiciones óptimas de crecimiento. (M) Cuantificación del número de plantas que presentaron la ausencia de la ACD necesaria para la formación de córtex y endodermis. Los experimentos se realizaron por triplicado.  $n \geq 20$ . Escala: 20  $\mu$ m**

### **6.6. El silenciamiento parcial del gen *CLE14* afecta genes de respuesta a la carencia de fósforo**

Desafortunadamente, no existe mutante *knockout* para el gen *CLE14*, por lo tanto realizamos la construcción de un microRNA dirigido a la región 3'UTR del gen *CLE14*. Los oligonucleótidos y selección de la región blanco del microRNA se diseñaron mediante la página <http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl>. La modificación del plásmido PS300 que contiene el microRNA, se realizó según el protocolo descrito en el sitio web mencionado. Una vez obtenida la amplificación descrita por este protocolo se introdujo en el vector pDONR221 mediante el mismo procedimiento descrito para la construcción de la fusión transcripcional *CLE14::GFP/GUS* (Ver Material y Métodos, sección 5.20). El microRNA se colocó bajo el promotor fuerte y constitutivo 35S utilizando el plásmido pFAST-G02, en paralelo también se colocó bajo el promotor UAS mediante el plásmido *pEN-L4-UAS-RI* con el objetivo de dirigir su expresión en tejidos específicos de la raíz mediante el uso de las líneas de Haseloff siguiendo el mismo protocolo descrito para la construcción de la fusión transcripcional *CLE14::GFP/GUS* (Ver Material y Métodos, sección 5.20). Con el plásmido obtenido se transformó *A. thaliana* mediante agroinfiltración. Se obtuvieron plantas homocigotas *p35S::amirCLE14* y *Q2500/pUAS::amirCLE14*. Se verificó la disminución en el nivel de transcrito en ambas líneas mediante PCR tiempo real (Figura 11 A).

Sembramos las líneas con silenciamiento parcial del gen *CLE14* en condiciones de +Pi y -Pi. El momento en el que se dá el agotamiento del meristemo en la planta silvestre es muy similar a las líneas transgénicas probadas (Figura 11 B). Sin embargo un análisis del nivel de transcrito mediante PCR tiempo real indica que el silenciamiento parcial del gen *CLE14* es suficiente para afectar el nivel de transcrito de genes de respuesta a carencia de fósforo conocidos (Figura 11 C). Estos datos muestran que el silenciamiento parcial del gen *CLE14* es capaz de afectar algunos genes característicos de respuesta a carencia de fósforo.



**Figura 11. Análisis del silenciamiento parcial del gen *CLE14*.** **A.** PCR tiempo real y RT-PCR cualitativo mostrando silenciamiento parcial del gen *CLE14* y microRNA maduro en líneas transgéncias *35S:amirCLE14* y *Q2500/UAS:amirCLE14*. **B.** Conteo de meristemos agotados de plántulas con silenciamiento parcial de *CLE14* crecidas en condiciones de carencia de fósforo. **C.** Análisis por PCR tiempo real mostrando el efecto del silenciamiento parcial del gen *CLE14* en genes característicos de respuesta a carencia de fósforo. **D.** PCR tiempo real de los 10 genes *CLE* normalmente expresados en la punta de la raíz en la línea *p35S::amirCLE14* crecida en condiciones de +Pi y -Pi por 7 días. El nivel de transcrito fue normalizado con WT. El gen *ACTINA2* de *A. thaliana* (*AtACT2*, *At3g18780*) se utilizó como control interno. Los experimentos se realizaron por triplicado.  $n \geq 20$ .  $\pm$ SE, \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ .

La ausencia de fenotipo en las líneas *35S:amirCLE14* y *Q2500/UAS:amirCLE14* sugiere la posibilidad de compensación funcional, mediante la inducción de otro miembro de la misma familia. Para verificar esta hipótesis se realizó un PCR tiempo real con RNA extraído de puntas de la raíz de la línea *p35S::amirCLE14* para evaluar el nivel de transcrito de los 10 genes *CLE* expresados normalmente en la punta de la raíz en comparación con la línea WT. Efectivamente encontramos una inducción de 5 genes *CLE* (*CLE1*, *CLE17*, *CLE18*, *CLE22* y *CLE26*) a consecuencia del silenciamiento parcial del gen *CLE14* (Figura 11 D). Mostrando que existe compensación funcional en ausencia del transcrito del gen *CLE14* resultando en ausencia de fenotipo.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. *CLE14*: un componente clave en la respuesta morfológica a la baja disponibilidad de fósforo

En este estudio se reveló un rol sin precedentes para el péptido *CLE14*. Nuestros resultados muestran que la expresión de *CLE14* se induce 3 veces bajo carencia de fósforo, el estrés no solamente incrementa su transcripción si no también cambia dramáticamente su dominio de expresión hacia las células del nicho de células madre de la raíz y tejido vascular a lo largo de la zona meristemática.

Interesantemente, otros genes de la familia *CLE* expresados en la raíz y/o capaces de inducir el consumo del meristemo tal como *CLE11* y *CLE19*, no son responsivos a la carencia de fósforo en el RAM (Casamitjana-Martínez et al., 2003; Jun et al., 2010;

Strabala et al., 2006). Sugiriendo que la inducción del gen *CLE14* es específico para el estrés por carencia de fósforo.

El rol de *CLE14* como un componente clave en el mecanismo que dispara el agotamiento del RAM en plántulas privadas de fósforo está fundamentado en varios de nuestros hallazgos: 1) La expresión de *CLE14* está inducida en el RAM por bajo fósforo antes de que cualquier cambio morfológico se observe. 2) La expresión de *CLE14* gradualmente se incrementa en el RAM en correlación con una progresiva diferenciación en condiciones de bajo fósforo. 3) La expresión de *CLE14* en córtex/QC, córtex/endodermis o cofia lateral/cilindro vascular desencadena el agotamiento del RAM.

## **7.2. *CLE14* actúa río abajo de la vía de señalización de *LPR1/LPR2***

LPR1/LPR2 están involucrados en la movilización del Fe de la columela madura y cofia lateral hasta CEI y tejido vascular en el meristemo de la raíz (Muller et al., 2015; Ticconi et al., 2009). Un hallazgo importante en mi trabajo es que en plantas crecidas en carencia de fósforo la movilización de fierro hacia estas células correlaciona con el patrón de expresión de *CLE14* bajo el mismo estrés. Aún más, la activación transcripcional de *CLE14* en raíces WT crecidas en condiciones de bajo fósforo está significativamente reducida en la doble mutante *lpr1/lpr2*. Encontramos además que el fenotipo de no agotamiento del RAM de *lpr1/lpr2* en carencia de fósforo puede ser revertido a un fenotipo similar a la WT mediante la aplicación exógena de *CLE14*, por lo tanto, nuestros datos sugieren que *CLE14* actúa río abajo de *LPR1/LPR2* en la vía de señalización que desencadena el agotamiento del RAM en respuesta a carencia de fósforo.

Ha sido propuesto que la vía de señalización LPR1/LPR2 controla la producción de ROS por la activación de su actividad de ferroxidasa en plantas privadas de Pi (Muller et al., 2015) y la redistribución de fierro podría afectar el estado celular REDOX en el cual el balance entre  $H_2O_2/O_2^-/OH^\bullet$  es crucial para mantenerlo (Kosman, 2010; Meguro et al., 2007). Reportes previos sugieren que los cambios en el estado REDOX puede influir muchos procesos incluyendo la regulación de la actividad de varios factores de transcripción en plantas (Schmidt and Schippers, 2015). Ya que en las

plántulas privadas de Fe no se observa la inducción de *CLE14* por carencia de Pi, es posible que la activación de *CLE14* es debida a un cambio en el estado REDOX de células específicas en el RAM. De acuerdo con esta hipótesis, ha sido reportado que la perturbación del estado REDOX del QC a un estado más reducido, induce la división celular en el QC (Jiang et al., 2003), lo cual es consistente con el evento más temprano detectado en el RAM de plántulas crecidas en bajo Pi, el cual involucra divisiones atípicas en el QC (Sanchez-Calderon et al., 2005). Estos datos sugieren que la inducción de *CLE14* es una consecuencia de una alteración en el estado REDOX celular del RAM ocasionado por la redistribución de Fe a través de LPR1/LPR2 en condiciones de carencia de Pi.

La producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  a través de la adición de Paraquat al medio incrementa la oxidación en la punta de la raíz y probablemente estas especies no provocan la transcripción de *CLE14* y el agotamiento del RAM porque la proporción de las diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno es importante para la salida de la fase proliferativa y el inicio de la diferenciación celular (Jiang et al., 2003; Tsukagoshi et al., 2010). Por lo tanto, es posible que una proporción de  $H_2O_2/O_2^-$  específica en algunas células a lo largo del RAM podría ser necesaria para disparar el agotamiento del RAM en respuesta a la deficiencia de fósforo en el medio.

## 8. PERSPECTIVAS

A pesar de los hallazgos novedosos en este estudio, aún quedan preguntas abiertas que posiblemente serán de suma importancia abordar en el futuro. Por ejemplo, la demostración de la función de *CLE14-CLV2* sobre *POLL* y *PLL1*, además del mecanismo por el cuál estas fosfatasa alteran la expresión de *SHR*, *SCR*, *WOX5* y otros factores de transcripción esenciales para el mantenimiento del RSCN. Otro estudio interesante a futuro será analizar el efecto de *CLE14* sobre la vía auxina-*PLETHORA* (*PLT*) bajo el contexto de condiciones de carencia de fósforo, ya que la vía auxina-*PLT* es esencial para la especificación de las células iniciales y el mantenimiento del RSCN (Bennett and Scheres, 2010). Explorar la relación *CLE14* dependiente de Pi/Fe, además de otros componentes clave en el mecanismo que controla la capacidad proliferativa del QC y del CEID, tales como



*RETINOBLASTOMA-RELATED* y *CyclinD6* (Cruz-Ramirez et al., 2012; Cruz-Ramirez et al., 2013; Sozzani et al., 2010).

## 9. REFERENCIAS

- Abel, S., Ticconi, C.A., and Delatorre, C.A. (2002). Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum* 115, 1-8.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R., and Scheres, B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119, 109-120.
- Al-Ghazi, Y., Muller, B., Pinloche, S., Tranbarger, T.J., Nacry, P., Rossignol, M., Tardieu, F., and Dumas, P. (2003). Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant, Cell & Environment* 26, 1053-1066.
- Araya, T., Miyamoto, M., Wibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y.N., Sawa, S., Fukuda, H., von Wiren, N., and Takahashi, H. (2014). CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 2029-2034.
- Babbs, C.F., Pham, J.A., and Coolbaugh, R.C. (1989). Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiology* 90, 1267-1270.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A.F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., and Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* 7, e46907.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., and Aeschbacher, R.A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119, 57-70.
- Benfey, P.N., and Scheres, B. (2000). Root development. *Current Biology* 10, R813-R815.
- Bennett, T., and Scheres, B. (2010). Chapter Three - Root Development—Two Meristems for the Price of One? In *Current Topics in Developmental Biology* 120, 67-102.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44.
- Casamitjana-Martínez, E., Hofhuis, H.F., Xu, J., Liu, C.-M., Heidstra, R., and Scheres, B. (2003). Root-Specific CLE19 Overexpression and the *sol1/2* Suppressors Implicate a CLV-like Pathway in the Control of *Arabidopsis* Root Meristem Maintenance. *Current Biology* 13, 1435-1441.
- Clowes, A.W., and Karnowsky, M.J. (1977). Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature* 265, 625-626.
- Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., and Scheres B. (2012). A bistable circuit involving *SCARECROW-RETINOBLASTOMA* integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150, 1002-1015.
- Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Wachsmann, G., Du, Y., Arteaga-Vazquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A.B., Chandler, V., and Scheres B. (2013). A *SCARECROW-RETINOBLASTOMA* protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS Biology* 11, e1001724.
- Chacón-López, A., Ibarra-Laclette, E., Sánchez-Calderón, L., Gutiérrez-Alanis, D., and Herrera-Estrella, L. (2014). Global expression pattern comparison between *low phosphorus insensitive 4* and WT *Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signaling & Behavior* 6, 382-392.
- Cheng, J.-C., Seeley, K.A., and Sung, Z.R. (1995). *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiology* 107, 365-376.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N. (1996). The *SCARECROW* Gene Regulates an Asymmetric Cell

Division That Is Essential for Generating the Radial Organization of the *Arabidopsis* Root. *Cell* 86, 423-433.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), pp.19-21.

Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119, 71-84.

Dubrovsky, J.G. (1997). Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert *Cactaceae*; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203, 85-92.

Fiers, M., Golemic, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., and Liu, C.M. (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. *The Plant Cell* 17, 2542-2553.

Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.

Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806-809.

Funayama-Noguchi, S., Noguchi, K., Yoshida, C., and Kawaguchi, M. (2011). Two CLE genes are induced by phosphate in roots of *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* 124, 155-163.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449, 1053-1057.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of Polar Auxin Transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* Vascular Tissue. *Science* 282, 2226-2230.

González-Mendoza, V., Zurita-Silva, A., Sánchez-Calderón, L., Sánchez-Sandoval, M.E., Oropeza-Aburto, A., Gutiérrez-Alanís, D., Alatorre-Cobos, F., and Herrera-Estrella, L. (2013). *APSR1*, a novel gene required for meristem maintenance, is negatively regulated by low phosphate availability. *Plant Science* 205, 2-12.

Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Jiménez-Sandoval, P., Alatorre-Cobos, F., Oropeza-Aburto, A., Mora-Macías, J., Sánchez-Rodríguez, F., Cruz-Ramírez, A. and Herrera-Estrella, L., (2017). Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. *Developmental Cell*, 41(5), 555-570.

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.-T., and Benfey, P.N. (2000). The *SHORT-ROOT* Gene Controls Radial Patterning of the *Arabidopsis* Root through Radial Signaling. *Cell* 101, 555-567.

Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H. (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15208-15213.

Hirsch, J., Marin, E., Floriani, M., Chiarenza, S., Richaud, P., Nussaume, L., and Thibaud, M.C. (2006). Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimistry* 88, 1767-1771.

Hobe, M., Muller, R., Grunewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Development Genes and Evolution* 213, 371-381.

Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., and Fukuda, H. (2006). Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* 313, 842-845.

Jiang, K., Meng, Y.L., and Feldman, L.J. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130, 1429-1438.

Jun, J., Fiume, E., Roeder, A.H., Meng, L., Sharma, V.K., Osmont, K.S., Baker, C., Ha, C.M., Meyerowitz, E.M., Feldman, L.J., and Fletcher J.C. (2010). Comprehensive analysis of CLE polypeptide signaling gene expression and overexpression activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154, 1721-1736.

Jun, J.H., Fiume, E., and Fletcher, J.C. (2008). The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 743-755.

Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., and Sawa, S. (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development* 137, 3911-3920.

- Klauser, D., Desurmont, G.A., Glauser, G., Vallat, A., Flury, P., Boller, T., Turlings, T.C.J., and Bartels, S. (2015). The *Arabidopsis* Pep-PEPR system is induced by herbivore feeding and contributes to JA-mediated plant defence against herbivory. *Journal of Experimental Botany* 66, 5327-5336.
- Kosman, D.J. (2010). Redox Cycling in Iron Uptake, Efflux, and Trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 285, 26729-26735.
- Lang, W. (1982). Nomarski differential interference-contrast microscopy. Oberkochen, Carl Zeiss.
- Lee, H., Chah, O.K., and Sheen, J. (2011). Stem-cell-triggered immunity through CLV3p-FLS2 signalling. *Nature* 473, 376-379.
- Long, Y., Smet, W., Cruz-Ramírez, A., Castelijn, B., de Jonge, W., Mähönen, A.P., Bouchet, B.P., Perez, G.S., Akhmanova, A., Scheres, B., and Blilou I. (2015). *Arabidopsis* BIRD Zinc Finger Proteins Jointly Stabilize Tissue Boundaries by Confining the Cell Fate Regulator *SHORT-ROOT* and Contributing to Fate Specification. *The Plant Cell*. 27(4), 1185-1199.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129, 244-256.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Perez-Torres, A., Rampey, R.A., Bartel, B., and Herrera-Estrella, L. (2005). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* 137, 681-691.
- Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33-44.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition). Functions of Mineral Nutrients-8: Macronutrients (Academic Press Elsevier) pp: 229–312.
- Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J. L., and Herrera-Estrella, L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 63-70.
- Matsubayashi, Y., and Sakagami, Y. (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7623-7627.
- Meguro, R., Asano, Y., Odagiri, S., Li, C., Iwatsuki, H., and Shoumura, K. (2007). Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Archives of Histology and Cytology* 70, 1-19.
- Meng, L., and Feldman, L.J. (2010). CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of *Arabidopsis*. *Planta* 232, 1061-1074.
- Meng, L., Ruth, K.C., Fletcher, J.C., and Feldman, L. (2010). The roles of different CLE domains in *Arabidopsis* CLE polypeptide activity and functional specificity. *Molecular Plant* 3, 760-772.
- Miwa, H., Betsuyaku, S., Iwamoto, K., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S. (2008). The Receptor-Like Kinase SOL2 Mediates CLE Signaling in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 49, 1752-1757.
- Mora-Macías, J., Ojeda-Rivera, J.O., Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Oropeza-Aburto, A., Raya-González, J., Jiménez-Domínguez, G., Chávez-Calvillo, G., Rellán-Álvarez, R., and Herrera-Estrella, L. (2017). Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 201701952.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998). *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *The EMBO Journal* 17, 6903-6911.
- Muller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K.L., Hause, G., Dinesh, D.C., Burstenbinder, K., and Abel, S. (2015). Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental Cell* 33, 216-230.
- Murashige, T. and Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nacry, P., Canivenc, G., Muller, B., Azmi, A., Van Onckelen, H., Rossignol, M., and Doumas, P. (2005). A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138, 2061-2074.

- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P.N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307-311.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., and Kawaguchi, M. (2009). Nod Factor/Nitrate-Induced CLE Genes that Drive HAR1-Mediated Systemic Regulation of Nodulation. *Plant and Cell Physiology* 50, 67-77.
- Pallakies, H., and Simon, R. (2014). The CLE40 and CRN/CLV2 signaling pathways antagonistically control root meristem growth in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 7, 1619-1636.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C.A. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253, 895-899.
- Perez-Torres, C.A., Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., and Herrera-Estrella, L. (2008). Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in *Arabidopsis* by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor. *The Plant Cell Online* 20, 3258-3272.
- Pérez-Pérez, J.M., Serralbo, O., Vanstraelen, M., González, C., Criqui, M.C., Genschik, P., Kondorosi, E., and Scheres, B. (2008). Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *The Plant Journal* 53, 78-89.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.
- Raghothama, K., and Karthikeyan, A. (2005). Phosphate acquisition. *Plant and Soil* 274, 37.
- Reichheld, J.P., Vernoux, T., Lardon, F., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1999). Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *The Plant Journal* 17, 647-656.
- Reyes-Hernández, B.J., Srivastava, A.C., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Ramos-Parra, P.A., Lira-Ruan, V., Díaz de la Garza, R.I., Dong, G., Moon, J.C., and Blancaflor, E.B. (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 202, 1223-1236.
- Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L., and Desnos, T. (2006). Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 29, 115-125.
- Roschttardt, H., Conéjéro, G., Curie, C., and Mari, S. (2009). Identification of the Endodermal Vacuole as the Iron Storage Compartment in the *Arabidopsis* Embryo. *Plant Physiology* 151, 1329-1338.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres B. (1999). An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* 99, 463-472.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Development* 17, 354-358.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (pp3. 17-3.32) (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., and Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46, 174-184.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811-814.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., and Ayling, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116, 447-453.
- Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 345-354.
- Scheres, B., Benfey, P., and Dolan, L. (2002). Root development. *The Arabidopsis Book*, e0101.
- Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K., and Benfey, P. (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121, 53-62.
- Schmidt, R., and Schippers, J.H. (2015). ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1850, 1497-1508.
- Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method (2008). *Nature protocols*; 3(6): 1101.

- Sharma, V.K., Ramirez, J., and Fletcher, J.C. (2003). The *Arabidopsis* *CLV3-like* (*CLE*) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. *Plant Molecular Biology* 51, 415-425.
- Shen, C., Wang, S., Bai, Y., Wu, Y., Zhang, S., Chen, M., ... & Qi, Y. (2010). Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 3971-3981.
- Somssich, M., Bleckmann, A., and Simon, R. (2016). Shared and distinct functions of the pseudokinase CORYNE (CRN) in shoot and root stem cell maintenance of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 67, 4901-4915.
- Song, S.-K., Hofhuis, H., Lee, M.M., and Clark, S.E. (2008). Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Developmental Cell* 15, 98-109.
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M.A., Busch, W., Van Norman, J.M., Vernoux, T., Brady, S.M., Dewitte, W., Murray, J.A.H., and Benfey, P.N. (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466, 128-132.
- Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R. (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems. *Current Biology* 19, 909-914.
- Strabala, T.J., O'Donnell P, J., Smit, A.M., Ampomah-Dwamena, C., Martin, E.J., Netzler, N., Nieuwenhuizen, N.J., Quinn, B.D., Foote, H.C., and Hudson, K.R. (2006). Gain-of-function phenotypes of many *CLAVATA3/ESR* genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved *CLAVATA3/ESR* domain. *Plant Physiology* 140, 1331-1344.
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L., and Desnos, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* 39, 792-796.
- Ticconi, C.A., Lucero, R.D., Sakhonwasee, S., Adamson, A.W., Creff, A., Nussaume, L., Desnos, T., and Abel, S. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14174-14179.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P.N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143, 606-616.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., and Inzé, D. (2000). The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell* 12, 97-109.
- Wang, S., Zhang, S., Sun, C., Xu, Y., Chen, Y., Yu, C., Qian, Q., Jiang, D.A. and Qi, Y., (2014). Auxin response factor (OsARF12), a novel regulator for phosphate homeostasis in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 201(1), pp.91-103.
- Ward, J.T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D.E., and Raghothama, K.G. (2008). The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiology* 147, 1181-1191.
- Whitford, R., Fernandez, A., De Groot, R., Ortega, E., and Hilson, P. (2008). Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18625-18630.
- Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1998). The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 125, 521-531.
- Wu, Y., Xun, Q., Guo, Y., Zhang, J., Cheng, K., Shi, T., He, K., Hou, S., Gou, X., and Li, J. (2016). Genome-wide expression pattern analyses of the *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Molecular Plant* 9, 289-300.
- Wysocka-Diller, J.W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127, 595-603.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., and Ryan, C.A. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22, 508-522.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (1998). An *Arabidopsis* *MADS* box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279, 407-409.

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.-</b> Estructura de la raíz.....	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema de los vectores utilizados y obtenidos de la recombinación BP y LR mediante el sistema Gateway <sup>®</sup> para la construcción de la fusión transcripcional pCLE14::GFP/GUS.....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Análisis del vector pDONRpCLE14 obtenido de la recombinación BP por sistema Gateway <sup>®</sup> .....	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Análisis del vector CLE14LR obtenido de la recombinación LR por medio del sistema Gateway <sup>®</sup> .....	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b> Análisis general del patrón de expresión del gen reportero GUS bajo la actividad del promotor de <i>CLE14</i> en respuesta a la baja disponibilidad de fósforo .....	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Análisis general del patrón de expresión del gen reportero GUS bajo la actividad del promotor de <i>CLE19</i> en respuesta a la baja disponibilidad de fósforo. ....	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> Efecto de la adición exógena del péptido CLE14 sobre mutantes insensibles a las condiciones de carencia de fósforo.....	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Nivel de transcrito del gen <i>CLE14</i> en líneas que expresan el gen <i>CLE14</i> de manera tejido-específica a endodermis y QC.....	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> Análisis comparativo entre el agotamiento del meristemo apical de la raíz observado en condiciones de carencia de fósforo con el agotamiento observado por la expresión de <i>CLE14</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 10.</b> Análisis comparativo del fenotipo de inhibición de la ACD entre líneas que expresan <i>CLE14</i> en córtex, endodermis, tejido vascular ó células iniciales de columela.....	<b>42</b>
<b>Figura 11.</b> Análisis del silenciamiento parcial del gen <i>CLE14</i> .....	<b>45</b>
<b>Tabla 1.</b> Programas de amplificación para las secuencias promotoras de los genes <i>CLE14</i> (pCLE14) y <i>CLE19</i> (pCLE14) y los marcos de lectura abierta de de los genes <i>CLE14</i> , <i>CLV2</i> y <i>PEPR2</i> .....	<b>19</b>
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los oligonucleótidos flanqueantes a la región promotora putativa del gen <i>CLE14</i> .....	<b>25</b>

## ANEXO I

### Solución de tinción para revelar la actividad de la $\beta$ -glucuronidasa

0,05 M Buffer de fosfatos a pH 7,2.

0,5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ .

0,5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ .

2 mM X-gluc.

Agua destilada.

Para 3 mL de Solución de Tinción:

Adicionar 205,2  $\mu$ L del Stock 0,5 M  $Na_2HPO_4$  y 94,8  $\mu$ L de 0,5 M  $NaH_2PO_4$ .

Adicionar 15  $\mu$ L de 100 mM  $K_3Fe(CN)_6$

Adicionar 15  $\mu$ L de 100 mM  $K_4Fe(CN)_6$

Adicionar 60  $\mu$ L de 100 mM X-Gluc.

Adicionar 2,610 mL de agua destilada.

### SOLUCION STOCK/ PARA REVELAR LA ACTIVIDAD DE GUS

$Na_2HPO_4$             0,5 M        Para 70 mL pesar 4,97 g de  $Na_2HPO_4$  y aforar al volumen.

$NaH_2PO_4$            0,5 M        Para 70 mL pesar 4.2 g de  $NaH_2PO_4$  y aforar al volumen.

$K_3Fe(CN)_6$         100 mM      Para 1 mL pesar 0,033 g de  $K_3Fe(CN)_6$  y aforar al volumen.

$K_4Fe(CN)_6$         100 mM      Para 1 mL pesar 0,042 g de  $K_4Fe(CN)_6$  y aforar al volumen.

EDTA                0,5 M        Para 70 mL pesar 13,027 g y aforar al volumen.

X-gluc               100 mM      Para 200  $\mu$ L pesar 0,010 g de X-gluc y añadir 192  $\mu$ L de Dimetil Formamida.

## **ANEXO II**

### **Soluciones para extracción de DNA genómico (Dellaporta DNA)**

#### **Regulador de extracción Dellaporta (EB)**

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

50 mM EDTA (pH 8.0)

500 mM NaCl

10 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol

#### **BTE**

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

#### **TE**

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

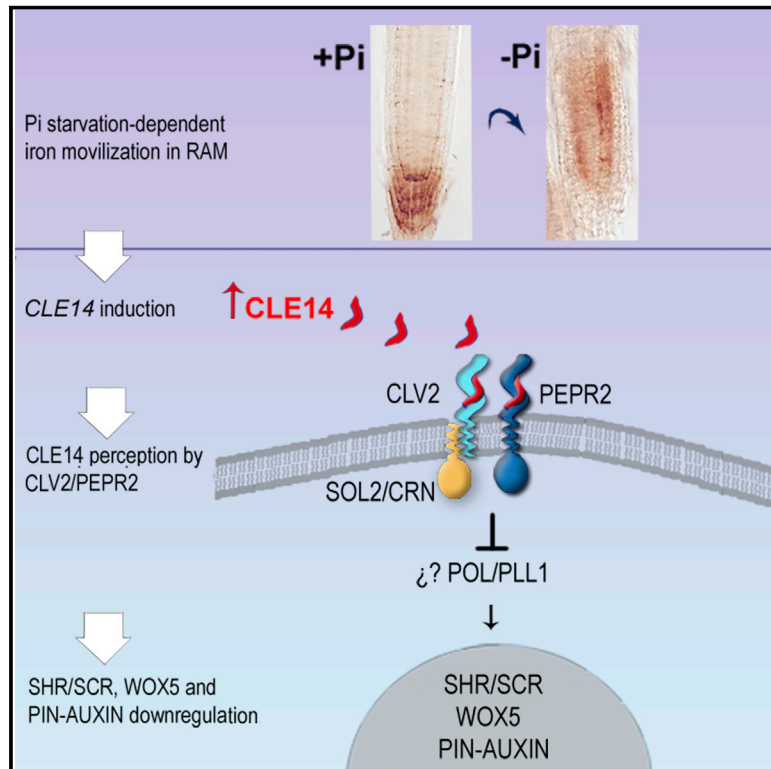
10 mg/mL RNAsa A



# Developmental Cell

## Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling

### Graphical Abstract



### Authors

Dolores Gutiérrez-Alanís,  
 Lenin Yong-Villalobos,  
 Pedro Jiménez-Sandoval, ...,  
 Federico Sánchez-Rodríguez,  
 Alfredo Cruz-Ramírez,  
 Luis Herrera-Estrella

### Correspondence

lherrerae@cinvestav.mx

### In Brief

Phosphorus limitation profoundly affects root development in *Arabidopsis thaliana*. Gutiérrez-Alanís et al. show that in response to low Pi, CLE14 peptide is expressed in proximal meristem, is perceived by CLV2 and PEPR2 receptors, and causes differentiation of surrounding RAM, leading to root meristem exhaustion.

### Highlights

- CLE14 peptide is a component of the Pi starvation response
- CLE14 is the signal that triggers full root meristem differentiation in low Pi
- CLE14 acts downstream of LOW PHOSPHATE ROOT1/LOW PHOSPHATE ROOT2 (LPR1/LPR2)
- CLE14 triggers full root meristem differentiation through CLV2/PEPR2 receptors



# Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling

Dolores Gutiérrez-Alanís,<sup>1,4</sup> Lenin Yong-Villalobos,<sup>1</sup> Pedro Jiménez-Sandoval,<sup>3</sup> Fulgencio Alatorre-Cobos,<sup>1</sup> Araceli Oropeza-Aburto,<sup>1</sup> Javier Mora-Macías,<sup>1</sup> Federico Sánchez-Rodríguez,<sup>4,5</sup> Alfredo Cruz-Ramírez,<sup>2</sup> and Luis Herrera-Estrella<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Metabolic Engineering Group

<sup>2</sup>Molecular and Developmental Complexity Group

<sup>3</sup>Structural Biology Group

Unidad de Genómica Avanzada, Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, 36821 Irapuato, Guanajuato, Mexico

<sup>4</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico

<sup>5</sup>In memory of Professor Federico Sánchez-Rodríguez

<sup>6</sup>Lead Contact

\*Correspondence: lherrerae@cinvestav.mx

<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.009>

## SUMMARY

Low inorganic phosphate (Pi) availability causes terminal differentiation of the root apical meristem (RAM), a phenomenon known as root meristem exhaustion or determined growth. Here, we report that the CLE14 peptide acts as a key player in this process. Low Pi stress induces iron mobilization in the RAM through the action of LPR1/LPR2, causing expression of CLE14 in the proximal meristem region. CLV2 and PEPR2 receptors perceive CLE14 and trigger RAM differentiation, with concomitant down-regulation of SHR/SCR and PIN/AUXIN pathway. Our results reveal multiple steps of the molecular mechanism of one of the most physiologically important root nutrient responses.

## INTRODUCTION

Phosphorus is an essential macronutrient for plant growth and development, whose availability and uptake represent a constraint for plant productivity in natural and agricultural ecosystems. In *Arabidopsis thaliana*, an adaptive strategy to cope with limiting inorganic phosphate (Pi) involves modifications in the architecture of the root system, including an increase in lateral root formation, enhanced root hair growth, a reduction in primary root length, and the terminal differentiation of all cells at the root meristem (Lopez-Bucio et al., 2002; Sanchez-Calderon et al., 2005), which could be regulated by DNA methylation (Yong-Villalobos et al., 2015). In terms of meristem differentiation, the roots of Pi-deprived seedlings show a progressive loss in the proliferative capacity of the cells at the meristematic zone, causing reduction in the length of the meristem until it is fully differentiated, a process also called determined growth (Sanchez-Calderon et al., 2005).

*LOW PHOSPHATE ROOT 1 (LPR1)*, *LOW PHOSPHATE ROOT 2 (LPR2)*, and *PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (PDR2)* have been implicated in the response of the root meristem to Pi availability (Reymond et al., 2006; Svistoonoff et al., 2007; Ticconi et al., 2009). *PDR2* interacts genetically with the *LPR1/LPR2* ferroxidase paralogs, and function together in an ER-resident pathway (Ticconi et al., 2009). In low Pi, the LPR1-PDR2 module determines the sites of iron (Fe) accumulation and callose deposition in the meristem and elongation zone of the primary root, via apoplastically located LPR1 activity. Callose deposition interferes with symplastic communication and causes impaired movement of *SHORT ROOT (SHR)*, leading to root meristem differentiation (Muller et al., 2015).

*SHR* and *SCARECROW (SCR)* encode members of the GRAS-domain transcription factor family. The *shr* and *scr* mutants develop a fully differentiated root meristem, revealing that the SHR-SCR pathway is a regulatory mechanism essential for stem cell specification and maintenance in the root stem cell niche (RSCN) (Benfey et al., 1993; Bennett and Scheres, 2010; Di Laurenzio et al., 1996). *SHR* is expressed in the stele and the protein moves to the mature endodermis, the cortex/endodermis initial cell (CEI), the cortex/endodermis initial daughter cell (CEID), and the quiescent center (QC). *SHR* induces the transcription of *SCR* and binds to *SCR* to form a transcriptional complex that induces the expression of several genes involved in the asymmetric cell division of the CEID and the QC (Cruz-Ramirez et al., 2012, 2013; Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Nakajima et al., 2001; Sabatini et al., 2003; Sozzani et al., 2010).

The *CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE)* peptides play a role in response to nutrients in *A. thaliana* and *Lotus japonicus* (Araya et al., 2014; Funayama-Noguchi et al., 2011; Okamoto et al., 2009). A quantitative study of the expression of 39 *CLE* genes in *L. japonicus* showed that *LjCLE19* and *LjCLE20* are strongly upregulated in response to Pi availability (Funayama-Noguchi et al., 2011). In *A. thaliana*, the *CLE* gene family comprises 32 members, of which *CLE1*, 3,

4, and 7 play a role in regulating lateral root emergence in response to N deprivation (Araya et al., 2014). Overexpression of nine CLE genes results in the inhibition of root growth, a phenotype that can be mimicked by the exogenous application of synthetic CLE peptides (Fiers et al., 2005; Ito et al., 2006; Jun et al., 2010; Meng et al., 2010; Strabala et al., 2006). In the root tip the best characterized is CLE40, which is transcribed in columella cells and is perceived by the receptor-like kinase (RLK) ARABIDOPSIS CRINKLY 4 (ACR4) and CLAVATA1 (CLV1) to restrict columella stem cell (CSC) fate. The *cle40* loss-of-function mutant has a short root and generates multiple layers of CSC (Hobe et al., 2003; Stahl et al., 2009, 2013). CLE40 and the CRN/CLV2 complex act in two genetically distinct pathways that antagonistically regulate proximal root meristem differentiation, showing that the same peptide can activate multiple RLKs (Pallakies and Simon, 2014).

The use of CLE peptides in controlled conditions has expanded our knowledge of their role during plant development. However, the mechanisms by which CLE peptides are involved in modulating root meristem activity to adapt to the environment remain unknown. We found that the low Pi-dependent iron redistribution in the root apical meristem (RAM) induces *CLE14* transcription and triggers the gradual differentiation of cells in the RSCN, until the whole root meristem is terminally differentiated. Here we show that, in response to Pi starvation, *CLE14* acts downstream of LPR1/LPR2 in a CLV2/PEP1 RECEPTOR 2 (PEPR2)-dependent pathway, leading to RAM differentiation.

## RESULTS

### Pi Deficiency Induces *CLE14* Expression in the Primary Root Tip

Based on the observation that several members of the *L. japonicus* CLE family are induced in response to Pi availability (Funayama-Noguchi et al., 2011), we determined transcript levels of the ten CLE genes (*CLE1*, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 22, 25, and 26) that are expressed in the *A. thaliana* root tip in response to low Pi availability (Jun et al., 2010; Meng and Feldman, 2010). We used RNA isolated from the root tips (approximately 200  $\mu$ m) of wild-type (WT) (Columbia-0 [Col-0]) seedlings grown in medium containing 1 mM phosphate (+Pi) or lacking phosphate (–Pi). Our results show that only *CLE14*, *CLE22*, and *CLE26* increase upon Pi starvation (Figure 1M). *CLE26* overexpression causes a long root phenotype (Strabala et al., 2006) and *CLE22* has a similar gene expression pattern to *CLE26* in the root tip (Jun et al., 2010), suggesting functional redundancy. On the other hand, *CLE14* is downregulated in the transcriptomic profile of the root tip of the *low phosphorus insensitive 4* (*lpi4*) mutant (Chacón-López et al., 2014), which develops a long root phenotype, and whose RAM does not differentiate in low Pi (Sanchez-Calderon et al., 2006). Therefore, we decided to further characterize *CLE14* function in Pi-deprived seedlings.

To analyze in detail the *CLE14* transcriptional pattern in low Pi, we generated a transcriptional fusion whereby the GFP gene was cloned downstream of the *CLE14* promoter (*pCLE14::GFP*). For analysis of the *pCLE14::GFP* expression pattern in the RAM during the first hours of low Pi stress, seedlings were grown for 7 days post germination (dpg) in +Pi, then transferred to –Pi for 24 or 48 hr (hours post transfer [hpt]). In +Pi seedlings, we

observed *GFP* expression in the lateral root cap (LRC) and the columella layer at the very tip of the root (Figures 1A, 1H, and S1A). After 24 hpt to –Pi, *GFP* expression extended to cells of the cortex, endodermis, stele, and the CEID in the RAM (Figures 1B and 1I). At 48 hpt of –Pi, we detected *GFP* expression in the same inner layers of the RAM, but in a higher number of cells (Figures 1C and 1J). An extended time-course assay of the spatiotemporal transcription pattern of *pCLE14::GFP* for 4, 7, 10, and 12 dpg showed that the *GFP* signal increases gradually in low Pi conditions, in correlation with a progressive differentiation of the RAM. Starting at 4 dpg, *GFP* intensity became stronger in cortical, endodermal, and stele cells under –Pi (Figures 1D–1G, 1K, and 1L), until 12 dpg when the RAM showed signs of differentiation such as root hair formation close to the very root tip, and the *GFP* signal dramatically decreased (Figure 1G). In contrast, we did not observe *CLE14* induction in the RAM of +Pi-grown seedlings (Figure S1A). We then analyzed *CLE14* transcript levels in root tips of WT seedlings transferred to –Pi for 24 hr and 4 and 7 days. Our results showed that *CLE14* transcripts increased in a time-dependent manner in low Pi (Figure 1N). These results show that *CLE14* transcription is induced by low Pi, and this occurs before any morphological alterations are observed in the RAM.

To observe *CLE14* peptide localization in the RAM, we used the *pCLE14::CLE14~GFP* translational fusion previously described (Meng and Feldman, 2010). In +Pi-grown roots the *CLE14~GFP* signal is localized in the LRC and in the basal end of columella cells (Meng and Feldman, 2010). We found that 24 to 48 hpt to –Pi, *CLE14~GFP* is localized in cells of the cortex, endodermis, stele, and CEID (Figures 1O–1S). After 10 days of growth in –Pi *CLE14~GFP* was observed in all cells of the cortex, endodermis, and stele in the RAM (Figure 1T). These results demonstrate that *CLE14* is translated and localized in the same cells and tissues where its mRNA is transcribed.

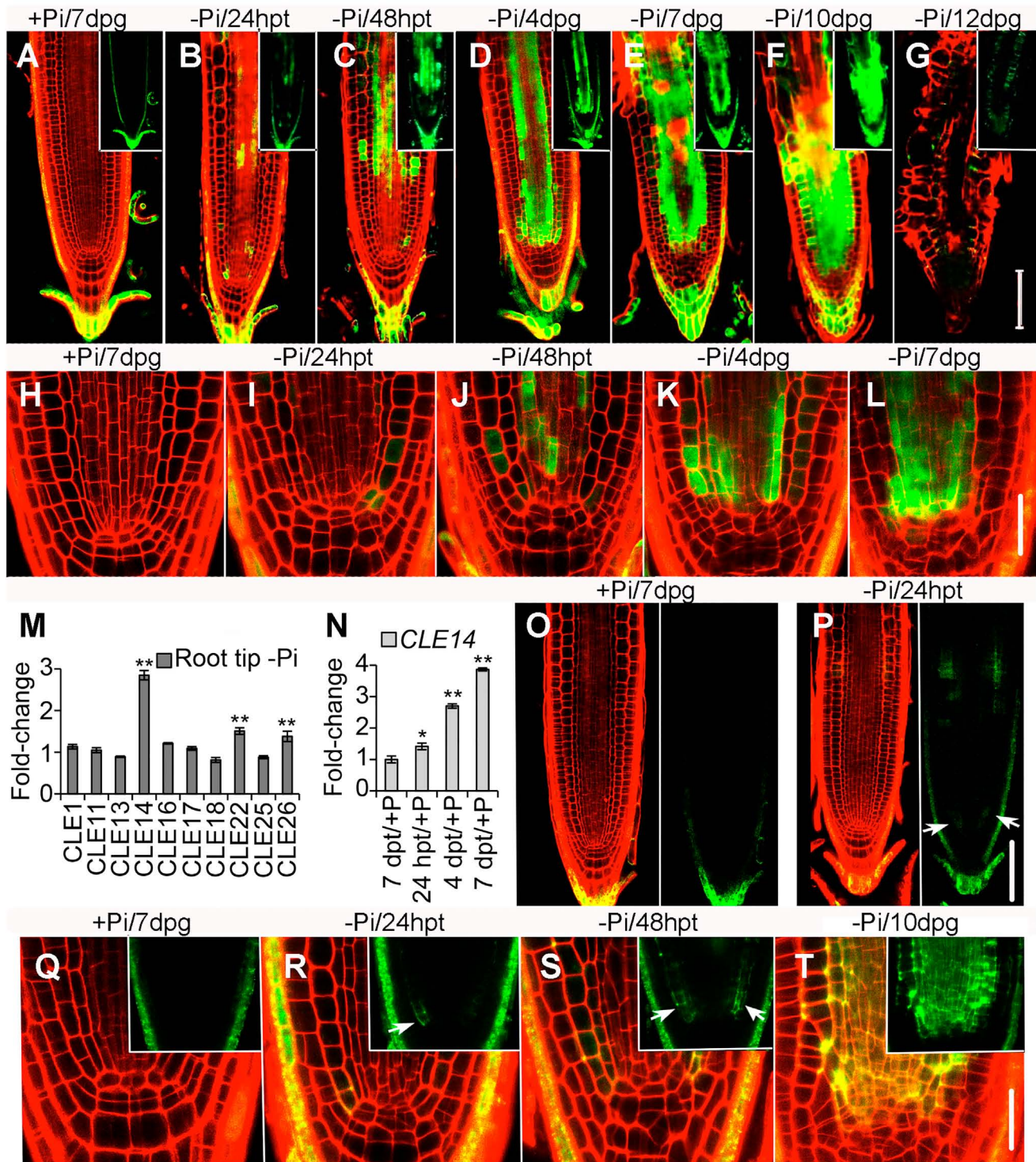
### Increased *CLE14* Transcription Is Specific to Pi Starvation

To test whether the *pCLE14::GFP* expression pattern observed in the RAM of Pi-deprived seedlings is specific to P stress, we analyzed the transcription patterns of *pCLE14::GFP* seedlings grown in media lacking N, Fe, or K. Our results showed that none of these stresses induced *CLE14* transcription in the RAM 2 dpt (Figure S1B), a time point at which –Pi-grown seedlings already showed clear induction of the transgene. We also explored other abiotic stress conditions (light, temperature, and drought), and no *CLE14* induction was observed in the RAM of seedlings after 2 days of exposure to absence of light, high (37°C) and low (4°C) temperatures, or treatment with 150 mM mannitol (Figure S1B).

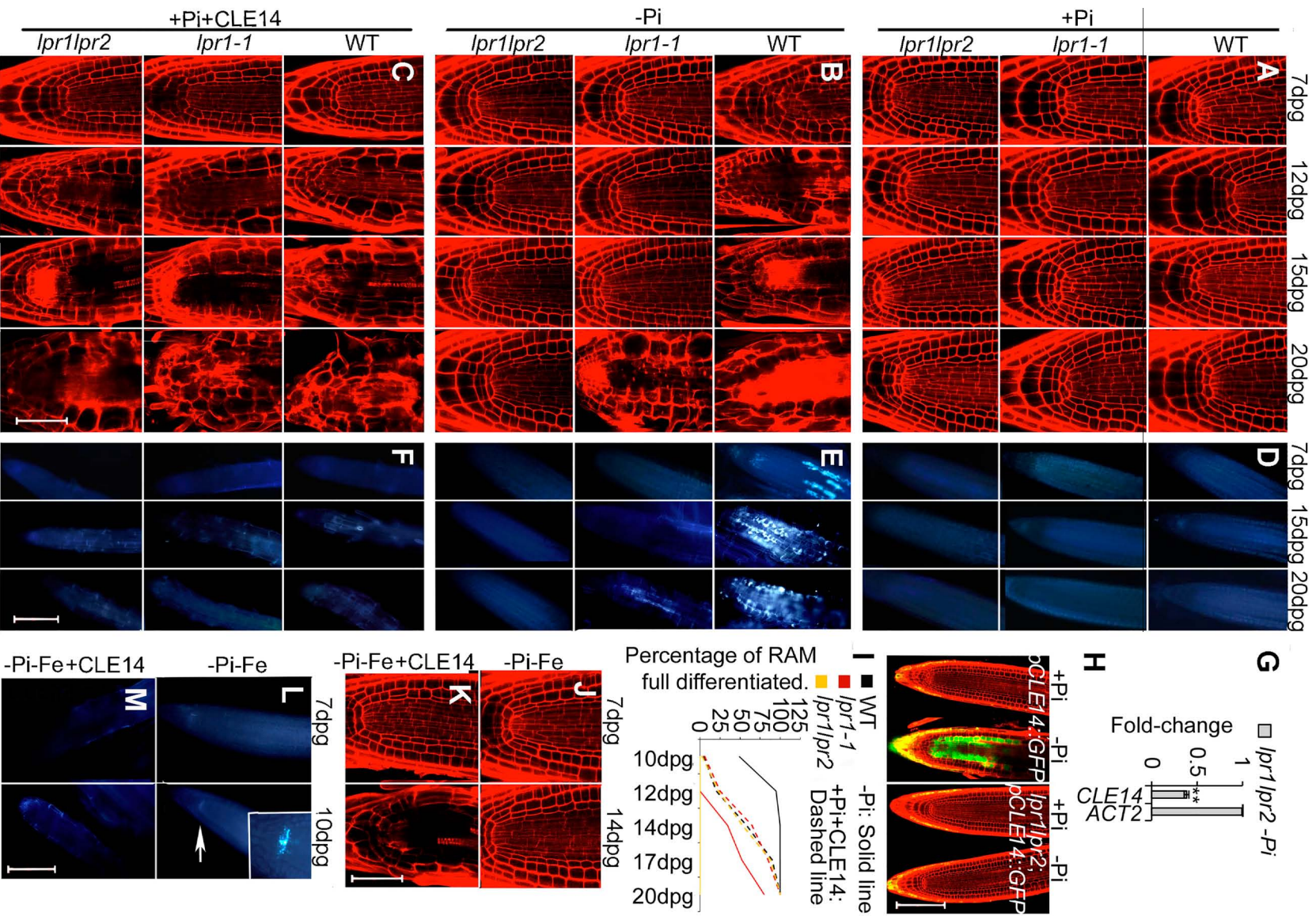
### *CLE14* Acts Downstream of the Pi Starvation-Responsive Genes *LPR1/LPR2*

LPR1 and LPR2 ferroxidases are key components in root Pi sensing and are necessary for RAM differentiation under low Pi conditions (Muller et al., 2015; Svistoonoff et al., 2007). *lpr1-1* and *lpr1lpr2* seedlings develop a longer primary root than the WT under low Pi conditions, as they do not undergo meristem differentiation (Svistoonoff et al., 2007). To investigate whether *CLE14* is genetically downstream of such a pathway, we carried









(legend on next page)

out time-course assays using WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* seedlings grown in +Pi, -Pi, and +Pi supplemented with 10  $\mu$ M synthetic CLE14 peptide (+Pi + CLE14). We evaluated the integrity and organization of the RAM at 7, 12, 15, and 20 dpg. We defined a fully differentiated/exhausted meristem with two parameters: the presence of root hair-forming epidermal cells, and mature xylem at the very root tip. In +Pi, the structure of the RAM of WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* seedlings was normal and remained undifferentiated over a 20-day period (Figure 2A). In -Pi, 100% of the WT seedlings showed full RAM differentiation by day 12, only 70% of the *lpr1-1* seedlings showed a fully differentiated RAM at 20 dpg, and none of the *lpr1lpr2* seedlings showed signs of RAM differentiation even after 20 dpg (Figure 2B). In contrast, in +Pi + CLE14 treatments 100% of the WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* seedlings developed a terminally differentiated RAM (Figure 2C). To confirm that CLE14 acts downstream of LPR1/LPR2, we examined the expression of CLE14 in WT and *lpr1lpr2*. We found that the level of *CLE14* transcript in the roots of *lpr1lpr2* seedlings grown in -Pi is 62% lower than that of the WT (Figure 2G). We also found that the induction of *pCLE14::GFP* in the RAM of Pi-deprived seedlings was lost in the *lpr1lpr2* background (Figure 2H). These results strongly suggest that *CLE14* acts downstream of LPR1/LPR2 in a pathway that is necessary to trigger RAM differentiation upon Pi starvation.

It has been reported that RAM differentiation in response to low Pi is the result of a process whereby LPR1 triggers callose deposition in the root tip, affecting cell-to-cell communication (Muller et al., 2015). To determine whether RAM differentiation is triggered by the application of CLE14 peptide via callose deposition, we examined callose formation in WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* seedlings grown in +Pi, -Pi, and +Pi + CLE14 for 7, 15, and 20 dpg. In +Pi, the RAM of all lines did not show callose deposition (Figure 2D). On the other hand, in -Pi conditions the RAM of most WT seedlings showed a clear staining for callose in the meristematic zone 7 and 15 dpg prior to full RAM differentiation (Figure 2E). In contrast, the RAM of *lpr1* seedlings did not show callose deposition at 7, 15, and 20 dpg. However, 70% of the seedlings that do not produce callose in the RAM developed a fully differentiated meristem by 20 dpg (Figures 2E and 2I). The RAM of all *lpr1lpr2* seedlings tested did not show staining for callose nor differentiate RAM at 20 dpg (Figures 2E and 2I). When seedlings were grown in +Pi + CLE14, full RAM differentiation was observed in 100% of WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* seedlings, while no callose deposition was observed in any of the lines tested (Figures 2F and 2I). These results suggest that CLE14 can induce full RAM differentiation in the absence of callose deposition at the RSCN, and that callose deposition and CLE14-mediated induction of RAM differentiation are indepen-

dent processes acting downstream of LPR1/LPR2 upon low Pi stress.

Because the contact of the root tip with low-phosphate medium reprograms plant root architecture through an Fe-dependent mechanism that involves LPR1 and LPR2 (Svistoonoff et al., 2007), we analyzed whether RAM differentiation induced by exogenous application of CLE14 is influenced by Fe availability. We grew WT seedlings for 7, 10, and 14 dpg in -Pi lacking Fe (-Pi-Fe) and in -Pi-Fe with added CLE14 peptide (-Pi-Fe + CLE14). We observed that despite a discrete callose deposition in the RSCN detected 10 dpg in -Pi-Fe, RAM differentiation was not triggered by low Pi availability even in 14-dpg in media lacking Fe (Figures 2J and 2L). In contrast, the seedlings grown in -Pi-Fe + CLE14 showed full RAM differentiation at 14 dpg, even in the absence of callose deposition (Figures 2K and 2M). Our results show that exogenously added CLE14 peptide triggers full RAM differentiation in the absence of Fe, suggesting that *CLE14* acts downstream of Fe action in this phenomenon. These observations also indicate that callose deposition in the QC and surrounding cells is not required for full RAM differentiation in response to Pi starvation.

### The Increased Expression of *CLE14* in Pi-Deprived Seedlings is Fe-Distribution Dependent

Our results suggest that for RAM differentiation to occur in response to low Pi, the presence of Fe in the medium is necessary, and is perceived through a pathway in which LPR1/LPR2 act upstream of *CLE14* transcription. Therefore, we analyzed whether external Fe availability is involved in modulating the transcriptional activation of *CLE14* in response to low Pi. *pCLE14::GFP* seedlings were grown in +Pi, -Pi, and -Pi-Fe for 4, 7, and 12 dpg. Our results show that *CLE14* expression was not induced in low Pi medium lacking Fe, and no RAM differentiation was observed even after 12 days (Figure 3C). In contrast, when Fe was added to the medium, Pi deficiency led to both *CLE14* upregulation and full RAM differentiation (Figures 3A and 3B), suggesting that Fe is required to trigger *CLE14* transcription in response to low Pi availability. To determine whether CLE14 is directly responsive to external Fe concentration, we analyzed the effect of increasing Fe concentrations on the expression of *pCLE14::GFP* in the root tip. We grew *pCLE14::GFP* seedlings in +Pi and -Pi medium supplemented with 10, 50, 100, 150, 300, or 500  $\mu$ M Fe for 7 days. In +Pi we did not observe any change in *pCLE14::GFP* expression in the root tip at any of the Fe concentrations tested, which correlates with the absence of RAM differentiation (Figure S2A). In -Pi, we observed that none of the Fe concentrations tested enhanced the expression of *pCLE14::GFP*, nor caused accelerated RAM

#### Figure 2. *CLE14* Acts Downstream of LPR1/LPR2

(A–C) RAM of WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* grown in +Pi, -Pi, and +Pi + CLE14 at 7–20 dpg.  $n \geq 20$ .

(D–F) Duplicated experiment of that shown in (A) to (C) showing callose formation by aniline blue staining.

(G) qRT-PCR analyses using RNA of Pi-deprived roots of WT and 7-dpg *lpr1lpr2*. The transcript levels of WT were normalized.  $n \geq 100$ . Shown are the means of three independent experiments  $\pm$  SE; \*\* $p < 0.01$ .

(H) RAM of *pCLE14::GFP* and *pCLE14::GFP;lpr1lpr2* grown in +Pi and -Pi by 7 dpg.  $n \geq 20$ .

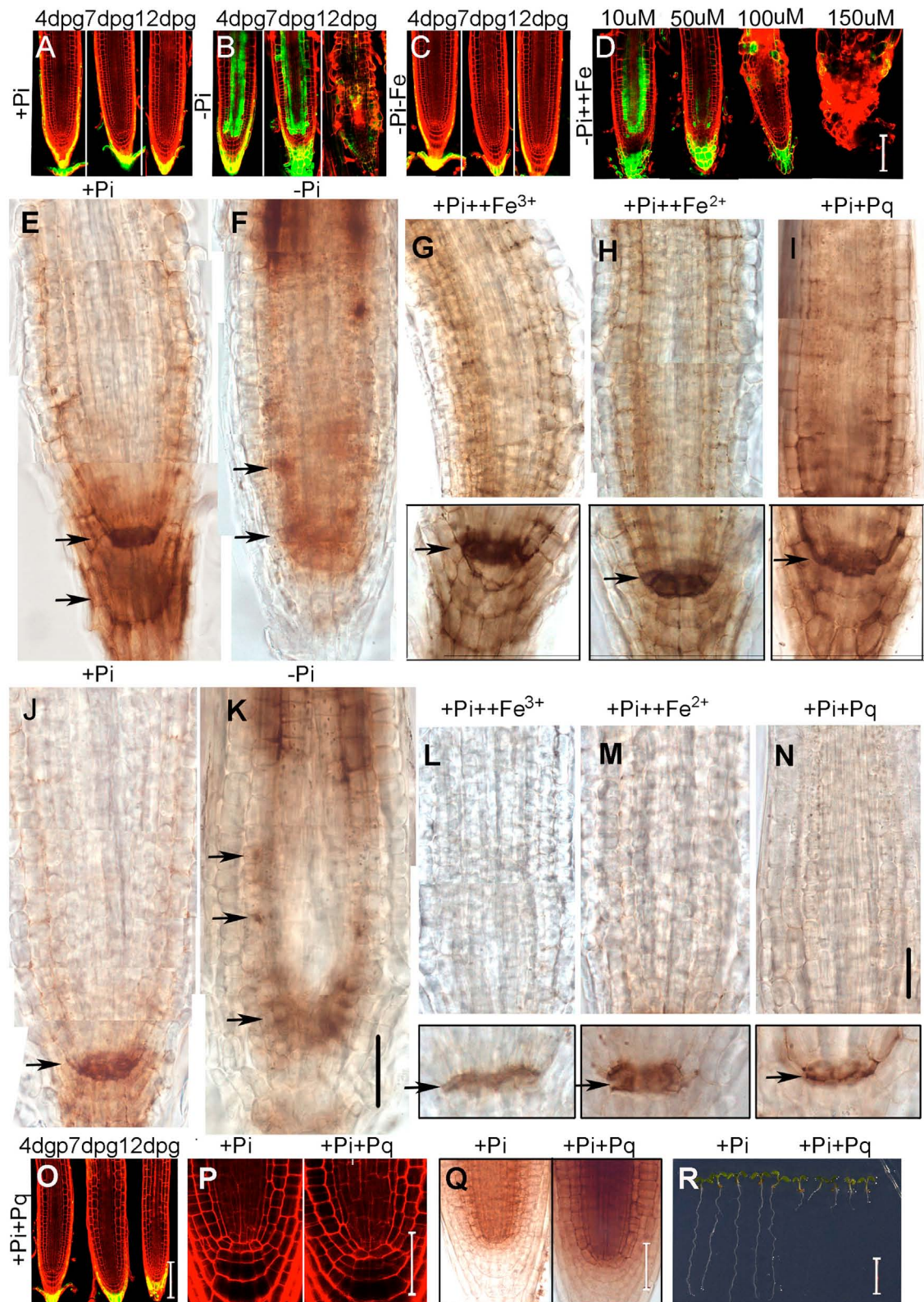
(I) Quantitative analysis of the timing of full RAM differentiation in WT, *lpr1-1*, and *lpr1lpr2* grown in -Pi (solid line) or +Pi + CLE14 (dashed line).  $n \geq 50$ .

(J and K) RAM of WT grown in -Pi-Fe or -Pi-Fe + CLE14 at 7–14 dpg.  $n \geq 20$ .

(L and M) Duplicated experiment of that shown in (J) and (K) showing aniline blue staining; in (L), the arrow indicates the QC and the inset is a magnification of the QC.

Scale bars, 50  $\mu$ m (F, H, and M) and 20  $\mu$ m (C and K).





**Figure 3. *CLE14* Expression Is Fe-Distribution Dependent under Pi Starvation**

(A–C) RAM of *pCLE14::GFP* grown in +Pi, -Pi, and -Pi-Fe by 4–12 dpg.  $n \geq 30$ .

(D). RAM of *pCLE14::GFP* grown in -Pi with increasing concentration of Fe by 7 dpg.  $n \geq 30$ .

(legend continued on next page)

differentiation when compared with seedlings grown in medium containing 10  $\mu\text{M}$  Fe. In fact, we detected a clear toxic effect in root growth and cell death in Fe concentrations above 150  $\mu\text{M}$  (Figure 3D). These results together show that Fe per se is not sufficient to induce *CLE14* transcription and suggest that the induction is dependent on Fe perception in the context of the response to  $-\text{Pi}$  conditions.

LPR1 modulates Fe transport from the mature columella to the inner cells of the RSCN via the apoplast, suggesting that Fe mobilization occurs along the root tip in response to  $-\text{Pi}$  stress (Muller et al., 2015; Svistoonoff et al., 2007). Moreover, the expression pattern directed by the *CLE14* promoter in Pi-deprived seedlings is similar to the expression pattern previously reported for LPR1 (Muller et al., 2015). Since *CLE14* transcription in the RAM requires low Pi and Fe in the medium, we analyzed whether Fe mobilization in the RAM of Pi-deprived seedlings is required to activate *CLE14* expression. We examined Fe distribution in the RAM in  $+\text{Pi}$  and  $-\text{Pi}$  conditions and compared these results with Fe distribution patterns at the root tip of seedlings growing under conditions that decreased the rate of root growth. We grew WT seedlings in  $+\text{Pi}$ ,  $-\text{Pi}$ ,  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{3+}$ , and  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{2+}$  for 7 days, and stained them with Perls/DAB (3,3'-diaminobenzidine) histochemical assay for  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  visualization and with the Turnbull/DAB assay to visualize  $\text{Fe}^{2+}$  (Meguro et al., 2007; Muller et al., 2015). For Perls/DAB staining in  $+\text{Pi}$ , we observed a strong staining in the QC and root cap (RC) (Figure 3E), whereas in  $-\text{Pi}$  (Figure 3F) Fe was observed in the cortex, endodermis, and stele, along the root tip.  $\text{Fe}^{2+}$  localization in the RAM revealed by Turnbull/DAB staining showed that in  $+\text{Pi}$ , there is a strong staining in QC and RC (Figure 3J). In Pi-deprived seedlings, we observed  $\text{Fe}^{2+}$  mainly in the stele and in some cortex and endodermis cells of the RAM (Figure 3K). We observed that  $\text{Fe}^{2+}$  distribution in the transit-amplifying cells of Pi-deprived roots shows a strong correlation with the induction in the transcription of *pCLE14::GFP* in the same spatiotemporal domain (Figures 3B, 3F, 3K, and S2B). We also observed, for both Perls/DAB and Turnbull/DAB staining, a decrease in Fe deposition in the QC of Pi-deprived seedlings compared with Pi-replete seedlings, clearly observable after 4 days of stimulus (Figures 3F, 3K, and S2B). We compared the Fe distribution pattern observed in  $-\text{Pi}$  with that observed under  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{3+}$  and  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{2+}$ . Perls/DAB staining of WT grown in  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{3+}$  and  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{2+}$  media showed a strong staining in QC and RC (Figures 3G and 3H). In Turnbull/DAB staining, we observed a strong Fe staining in QC (Figures 3L and 3M), in correlation with both the maintenance of the RSCN and the normal development of the RAM. These results suggest that Fe mobilization to cortex, endodermis, or stele in transit-amplifying cells or the decrease in QC is specific to Pi-deprived seedlings. We tested another condition that profoundly affects root growth, reactive oxygen species (ROS) overproduction. We used 0.063  $\mu\text{M}$  paraquat ( $+\text{Pi} +$

Pq), a compound that increases  $\text{O}_2^-$  production and decreases root growth rate in optimal conditions (Babbs et al., 1989; Reichheld et al., 1999). We observed that the root growth of Pq-treated seedlings was significantly inhibited and showed a ROS overproduction in comparison with untreated seedlings (Figures 3Q and 3R). However, we did not observe any detectable increase in the transcription of *CLE14*, and RAM organization was maintained (Figures 3O and 3P). We also analyzed Fe distribution in the RAM of WT grown in  $+\text{Pi}$  and  $+\text{Pi} + \text{Pq}$ , as revealed by Perls/DAB and Turnbull/DAB staining. In both cases, we observed strong RAM staining in QC and RC, similar to that observed in Pi-replete seedlings (Figures 3I and 3N). These results support the notion that the Fe deposition induced by low Pi is required for the activation of *CLE14*, which in turn mediates full RAM differentiation.

In agreement with our hypothesis, the undifferentiated RAM phenotype of *lpr1lpr2* and *lpi4* in low Pi, which can be reverted by application of *CLE14* (Figures 2C and S2D), did not show Fe mobilization in the RAM in low Pi compared with WT (Figure S2C).

#### CLE14 Triggers Full RAM Differentiation in a Tissue-Dependent Manner

We observed *pCLE14::GFP* expression in cortex, endodermis, and stele cells as an early response to low Pi. Also, *CLE14* transcription in LRC, cortex, and stele of the RAM was observed in 100% of the analyzed roots (Figure 4A) and in the endodermis of 40% of the roots, while in the CEID we observed fluorescence in 75% of the roots after 24 hpt to  $-\text{Pi}$ . *CLE14* transcription was rarely observed in the epidermis of the meristematic zone or in the cells of the distal meristem in low Pi (Figure 4A). Based on these observations, we reasoned that there is a correlation between the low Pi-induced expression of *CLE14* in specific tissues of the RAM and its progressive differentiation. To address whether the possible effect of *CLE14* on RAM differentiation in Pi-deprived seedlings is tissue dependent, we generated a *pUAS::CLE14* line to be used with the GAL4VP16-UAS (upstream activating sequence) transactivation system. We crossed our *pUAS::CLE14* transgenic line with the following enhancer trap lines from the collection established by J. Haseloff (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/>): J0481, which drives UAS expression in epidermis and LRC, J0571 in cortex and endodermis, Q2500 in endodermis and QC, J2351 in LRC and stele, J0631 along the entire root axis except in the root tip, and J2341 in CSC. We obtained and analyzed double homozygous transgenic lines (STAR Methods). In addition, we evaluated the level of *CLE14* transcripts by qRT-PCR in roots of *Q2500;pUAS::CLE14* and *J0481;pUAS::CLE14* compared with WT roots (Figure 4S). Six-week-old double transgenic plants showed different degrees of severity in phenotypic penetrance, probably due to the different effects of *CLE14* in diverse

(E–N) RAM showing (E–I) Perls/DAB staining or (J–N) Turnbull/DAB staining in WT grown for 7 dpv in  $+\text{Pi}$ ,  $-\text{Pi}$ ,  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{3+}$ ,  $+\text{Pi} ++\text{Fe}^{2+}$ , or  $+\text{Pi}$  added with paraquat media.  $n \geq 50$ . Panels show a photographic reconstruction.

(O) RAM of *pCLE14::GFP* grown in  $+\text{Pi} + \text{Pq}$  for 4–12 dpv.  $n \geq 20$ .

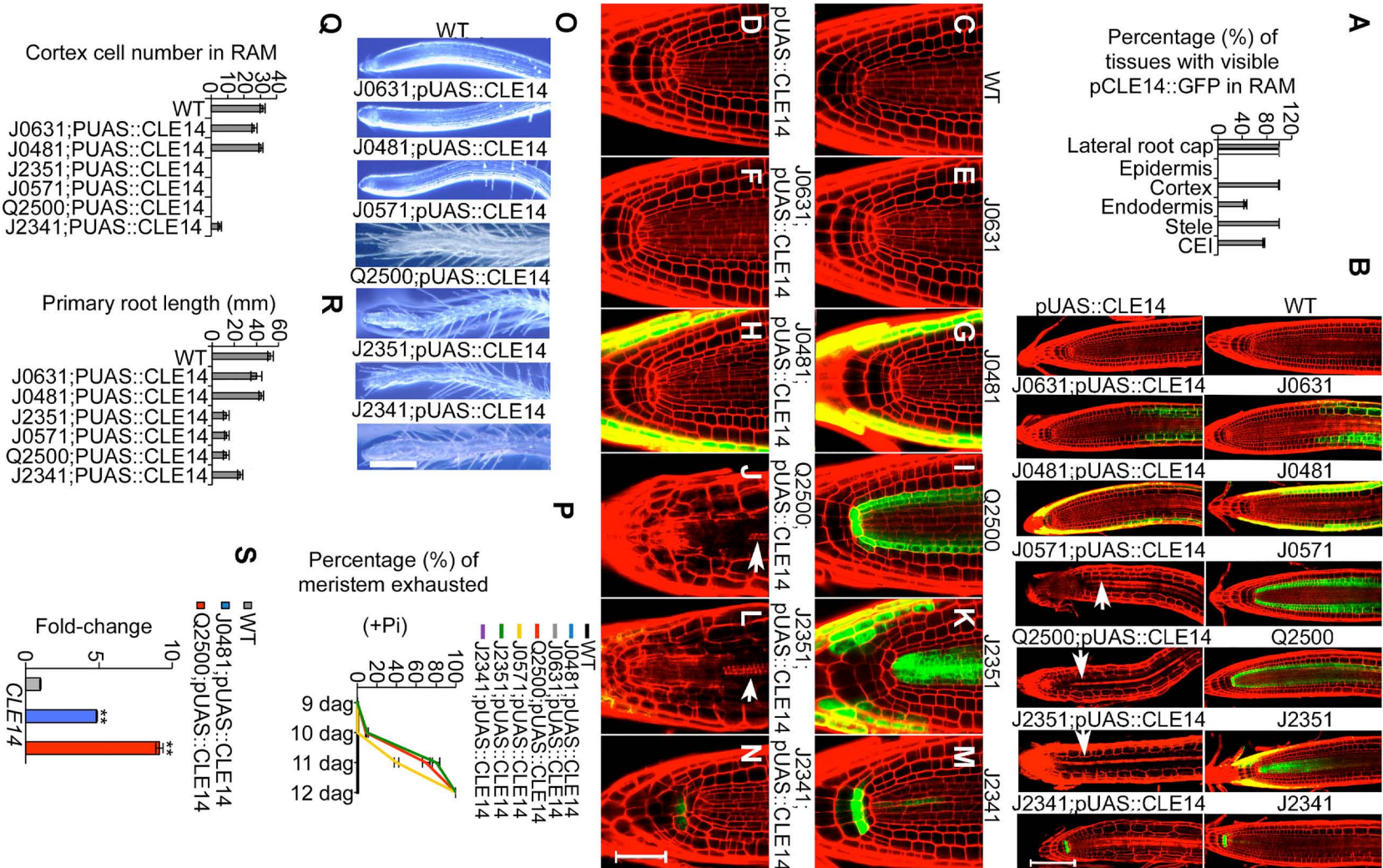
(P) RAM of WT grown in  $+\text{Pi}$  or  $+\text{Pi} + \text{Pq}$  for 7 dpv.  $n \geq 30$ .

(Q) Duplication of experiment shown in (P) showing DAB staining for peroxide.

(R) Duplicate of experiment shown in (P) showing the effect of paraquat on root growth.

Black arrows show Fe deposition. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$  (D, O, K, and N), 20  $\mu\text{m}$  (P and Q), and 1 cm (R). See also Figure S2.





(legend on next page)

expression domains. *J2351;pUAS::CLE14*, *J0571;pUAS::CLE14*, and *Q2500;pUAS::CLE14* plants showed infertility and/or premature mortality, so these lines were analyzed in segregating progeny of doubly hemizygous plants. *J0481;pUAS::CLE14*, *J0631;pUAS::CLE14*, and *J2341;pUAS::CLE14* lines were analyzed as double homozygotes.

The morphological traits of the root tip in double transgenic lines were analyzed in a time-course assay for 12 days in +Pi. In contrast with the non-transactivating control, when *CLE14* is transcribed in endodermis/QC, cortex/endodermis, or LRC/stele (*Q2500;pUAS::CLE14*, *J0571;pUAS::CLE14*, and *J2351;pUAS::CLE14*, respectively), a progressive reduction in the root meristem size and mature xylem and root hair cells were observed in the zone where previously meristematic cells were located, indicative of a fully differentiated RAM at 12 dpd (Figures 4B–4D, 4I–4L, 4P–4R, and S3). When *CLE14* was expressed in CSC (*J2341;pUAS::CLE14*), the meristem size drastically decreased and no clearly defined QC and CSC could be observed. However, even at 12 dpd no mature xylem cells or root hair formation were observed at the very tip of the primary root (Figures 4M–4R and S3). When *CLE14* was expressed in LRC/epidermis, or along the root elongation/differentiation zone, except in the root tip (*J0481;pUAS::CLE14* and *J0631;pUAS::CLE14*) no phenotype indicating meristem differentiation was observed, even at 12 dpd (Figures 4B, 4E–4H, 4O–4R, and S3). Interestingly, expression of *CLE14* in cortex, endodermis, and stele led to full RAM differentiation under +Pi conditions. These results show that mimicking a similar *CLE14* expression pattern to that induced by low Pi leads to full RAM differentiation.

#### CLE14 Peptide Triggers Full RAM Differentiation in Low Pi Conditions via CLV2 and PEPR2 Receptors

It has been suggested that CLAVATA2 (CLV2) and CORYNE (CRN), also called SUPPRESSOR OF LLP1 2 (SOL2), form a receptor complex that transmits the CLE14 signal (Meng and Feldman, 2010). Therefore, we analyzed the root phenotype of *clv2-3* and *clv2sol2* mutants in response to low Pi. Seedlings were grown in +Pi and –Pi for 10 dpd and 14 dpd. In +Pi, *clv2-3* and *clv2sol2* seedlings had the typical meristem organization observed in WT and remained undifferentiated over the 14-day period (Figures 5A, 5B, and S4). In –Pi, neither *clv2-3* nor *clv2sol2* show a difference in RAM size or primary root length when compared with the WT (Figures 5A, 5B, and S4). These observations suggest that in addition to the CLV2/CRN complex another receptor perceives the CLE14 peptide and transduces this signal, leading to root meristem differentiation. To test our hypothesis we studied *PEPR2*, a *RLK* that contributes to defense

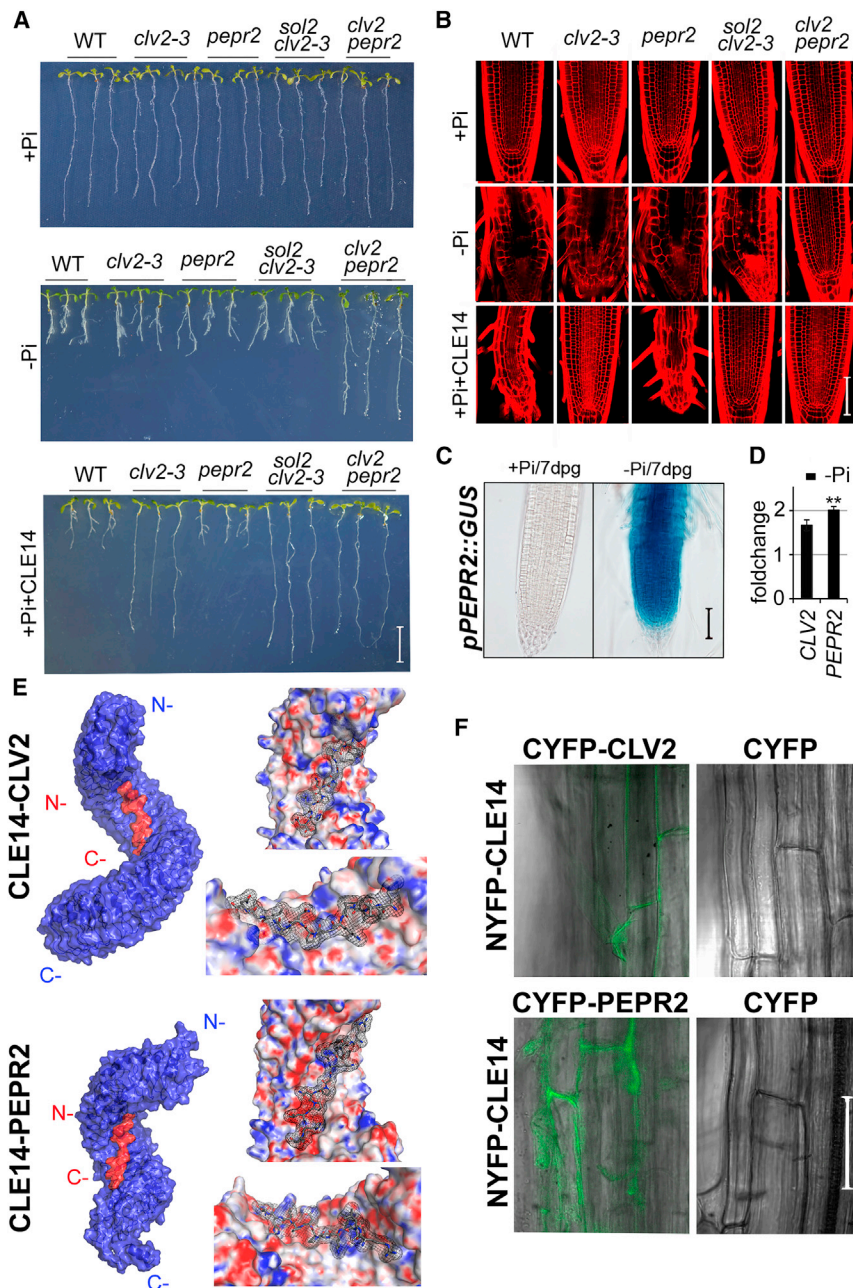
responses in *A. thaliana* (Yamaguchi et al., 2010). We selected *PEPR2* because it is induced in response to Pi starvation in WT seedlings, while its expression is downregulated in the root tip of Pi-deprived *lpi4* seedlings (Chacón-López et al., 2014). We crossed *pepr2-1* with *clv2-3* to obtain the *clv2pepr2* double mutant. In +Pi, we did not observe evidence of meristematic cell disorganization or differentiation in the *pepr2-1* or *clv2pepr2* seedlings (Figures 5A, 5B, and S4). Interestingly, *clv2pepr2* seedlings showed a long root phenotype and a functional and well-organized RAM in –Pi conditions at 14 dpd. Seedlings of the *pepr2* showed a differentiated RAM similar to that of the WT seedlings (Figures 5A, 5B, and S4). These findings indicate that in –Pi, CLV2 and PEPR2 have redundant functions in the mechanism that triggers RAM differentiation. To analyze sensitivity to CLE14 peptide, we grew *clv2-3*, *pepr2-1*, *clv2sol2*, and *clv2pepr2* seedlings in +Pi + CLE14 for 10 and 14 days. We observed that *clv2pepr2* seedlings were insensitive to CLE14 peptide; *clv2-3* and *clv2sol2* also were insensitive (Miwa et al., 2008). In contrast, *pepr2-1* seedlings were sensitive to CLE14 treatment (Figures 5A, 5B, and S4). These results could be due to the fact that CLV2 is expressed along the RAM in +Pi conditions while PEPR2 is not (Somssich et al., 2016; Wu et al., 2016), suggesting that in +Pi conditions the CLV2/SOL2 receptor complex perceives CLE14 peptide and triggers RAM differentiation, while in response to –Pi conditions, *PEPR2* transcription is induced in the root tip. Therefore it is possible that under –Pi conditions, both CLV2 and PEPR2 are present in the RAM and act in parallel to bind CLE14 and trigger RAM differentiation. To support this notion, we determined the levels of *PEPR2* transcript in the root tip of 7-day-old WT seedlings grown in +Pi and –Pi by qRT-PCR. We found that the transcript levels of *PEPR2* increase in upon Pi starvation (Figure 5D), which correlates with the activation of *PEPR2* transcription in the RAM as revealed by pPEPR2:GUS marker gene (Figure 5C) previously reported (Wu et al., 2016). Our genetic and transcriptional evidence suggests that, in response to low Pi, CLV2 and PEPR2 have redundant functions in a mechanism that senses CLE14 and triggers full RAM differentiation.

To determine whether CLE14 indeed binds to the CLV2 and PEPR2 receptors, we carried out *in silico* and *in vivo* binding analyses. We first analyzed the structures of PEPR2 and CLV2 obtained by docking modeling against CLE14 peptide. In Figure 5E, predicted peptide interaction sites are accounted for after docking refinement for both CLV2 and PEPR2 (root-mean-square deviation of 2.486 and 2.551 for PEPR2/CLE14 and CLV2/CLE14, respectively). Subtle differences between the PEPR2 and CLV2 ectodomains were observed. For instance, in the PEPR2/CLE14 complex, the N-terminal region

#### Figure 4. CLE14 Triggers RAM Differentiation in a Tissue-Dependent Manner

(A) Quantitative analyses of *CLE14* expression in the distinct layers of the RAM at 24 hpt under Pi starvation.  $n \geq 30$ .  
 (B) RAM of WT and Hasseloff lines harboring the pUAS:CLE14 construct at 12 dpd in +Pi.  $n \geq 50$ .  
 (C–N) RSCN of WT and Hasseloff lines harboring the pUAS:CLE14 construct at 12 dpd in +Pi.  
 (O) RAM of WT and Hasseloff lines harboring pUAS::CLE14 construct at 12 dpd in +Pi.  $n \geq 50$ .  
 (P–R) Quantitative analysis of full RAM differentiation timing (P), cortex cell number in RAM (Q), and primary root length of RAM (R) of WT and Hasseloff lines harboring pUAS:CLE14 construct grown in +Pi for 12 dpd.  $n \geq 20$ .  
 (S) qRT-PCR analyses of *CLE14* expression in WT, Q2500;UAS:CLE14, and J0481;UAS:CLE14 grown in +Pi for 7 dpd.  $n \geq 100$ .  
 Shown are the means of three independent experiments  $\pm$  SE, \*\* $p < 0.01$ . White arrows shows differentiated vascular tissue. Scale bars, 50  $\mu$ m (B), 20  $\mu$ m (N), and 150  $\mu$ m (O). See also Figure S3.





**Figure 5. CLE14 Acts through CLV2 and PEPR2 Receptors**

(A) WT, *clv2-3*, *pepr2-1*, *sol2clv2*, and *clv2pepr2* grown in +Pi, -Pi, and +Pi + CLE14 for 10 dpg.  $n \geq 30$ .

(B) RAM of WT, *clv2-3*, *pepr2-1*, *sol2clv2*, and *clv2pepr2* grown in +Pi, -Pi, and +Pi + CLE14 for 14 dpg.  $n \geq 30$ .

(C) RAM of pPEPR2::GUS grown in +Pi and -Pi for 7 dpg.

(D) qRT-PCR analyses of WT seedlings grown in +Pi and -Pi for 7 dpg. Transcript levels of Pi-replete root tips were normalized.  $n \geq 100$ . Shown are the means of three independent experiments  $\pm$  SE; \*\* $p < 0.01$ .

(E) Upper: structural model of the CLV2/CLE14 complex. Lower: PEPR2/CLE14 complex. Full CLV2 or PEPR2 ectodomain is shown in blue and CLE14 in red. Right: electrostatic surface of CLV2 or PEPR2 around the CLE14-binding groove. Blue, white, and red indicate positive, neutral, and negative surface charges, respectively. CLE4 is shown in stick representation with a mesh (gray).

(F) Interaction of CLV2/CLE14 and PEPR2/CLE14 complex by BiFC in epidermal cells of *A. thaliana* using the pYFN43 and pYFC43 vectors (Belda-Palaz3n et al., 2012). Right: interaction of CLE14 with empty CYFP used as a control.  $n \geq 20$ .

Scale bars, 1 cm (A), 50  $\mu$ m (B and C), and 20  $\mu$ m (F). See also Figure S4.

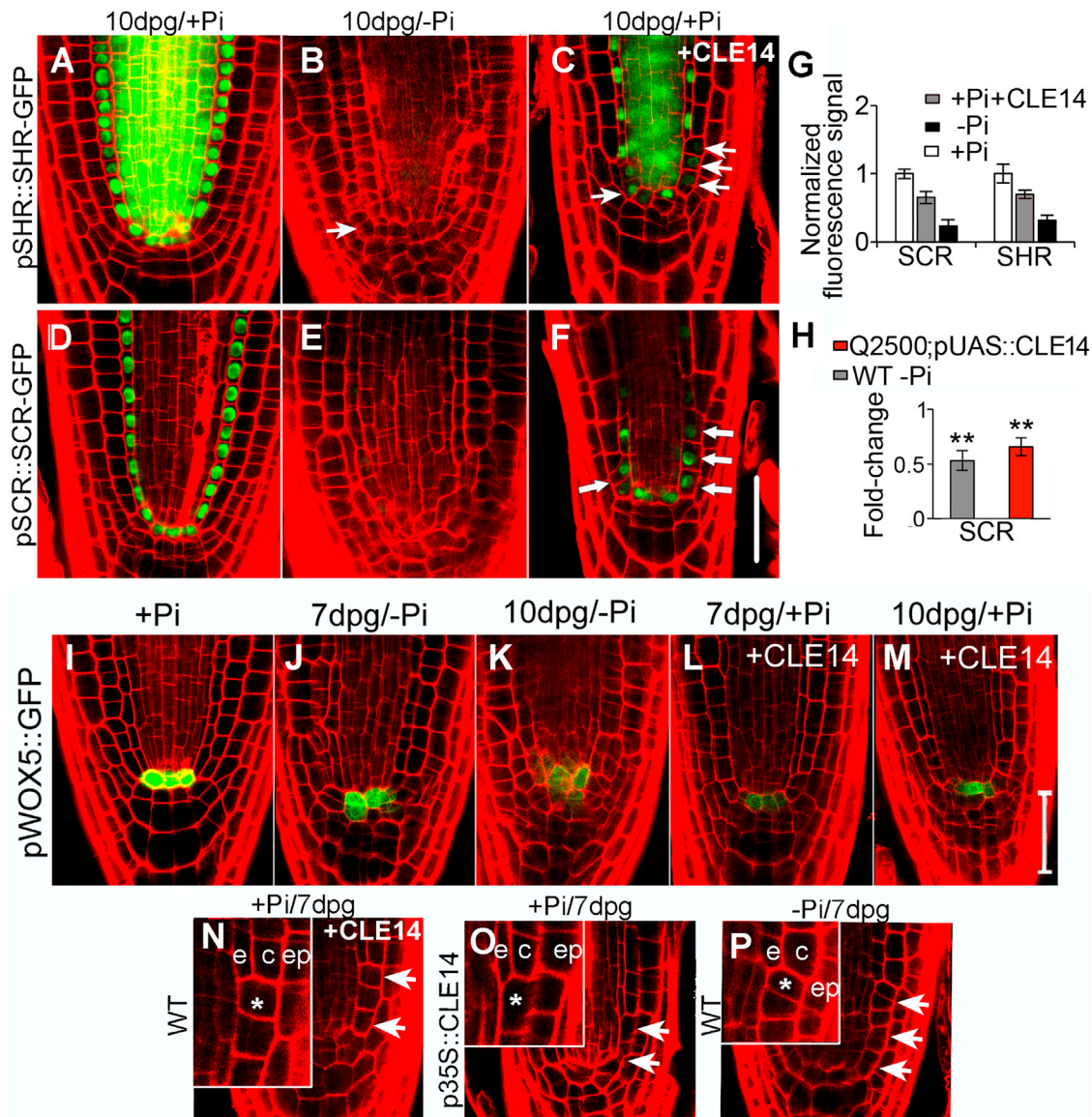
of CLE14 is buried in a cavity of non-hydrophobic residues that may account for selectivity (Figure 5E), which is supported by the binding affinity and dissociation constant predictions:  $-14.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  and  $3.1 \times 10^{-11} \text{ M}$ , and  $-11.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  and  $9.0 \times 10^{-11} \text{ M}$  for PEPR2/CLE14 and CLV2/CLE14, respectively. These results clearly predict that both PEPR2 and CLV2 ectodomain receptors are able to interact with CLE14. We demonstrated that both PEPR2 and CLV2 bind to CLE14 by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays in roots of *A. thaliana* (Figure 5F). Together, these results show that Pi starvation induces CLE14 in the RAM, which is perceived by CLV2 and PEPR2 to trigger a downstream mechanism that leads to RAM differentiation.

any alteration in the patterning and organization of the RSCN is observed (Figure S5A). By using the *pSHR::SHR~GFP* and *pSCR::SCR~GFP* transgenic lines, we followed the expression patterns of SHR and SCR at 24, 48, or 72 hpt in the RAM of Pi-deprived seedlings. Our results showed that the distribution and intensity of SHR~GFP and SCR~GFP is clearly altered by 48 hpt in -Pi, before any morphological alteration in the RAM is observed (Figure S5B).

Since, upon Pi starvation, LPR1/LPR2-PDR2 alters SHR and SCR expression, and CLE14 acts downstream of the ferroxidases, we asked whether CLE14 itself could modulate the expression of SHR and/or SCR. Therefore, we analyzed *pSHR::SHR~GFP* and *pSCR::SCR~GFP* seedlings grown

### CLE14 Is an Upstream Repressor of the SHR-SCR and PIN-AUX Pathways

It has been proposed that, under low Pi conditions, the LRP1/LPR2-PDR2 pathway modulates the expression and transport of SHR, an essential transcription factor for RSCN maintenance (Muller et al., 2015; Ticconi et al., 2009). Since the expression of CLE14 is induced by low Pi (prior to any detectable morphological change in the RAM), it could also act upstream by affecting the expression of transcription factors involved in RSCN maintenance. To test this hypothesis, we first analyzed whether SHR or SCR expression is influenced by low Pi before



### Figure 6. Pi Starvation and Exogenous CLE14 Negatively Affect SHR and SCR

(A–F) RAM of pSHR:SHR~GFP and pSCR:SCR~GFP seedlings grown in +Pi, –Pi, and +Pi + CLE14 at 10 dpg.  $n \geq 20$ .

(G) Quantitative GFP expression of pSHR:SHR~GFP and pSCR:SCR~GFP by confocal microscopy.  $n \geq 20$ .

(H) qRT-PCR analyses in WT and Q2500;pUAS::CLE14 grown in +Pi, –Pi, and +Pi + CLE14 at 7 dpg. Transcript levels of Pi-replete root tips were normalized.  $n \geq 100$ .

(I–M) RAM of pWOX5::GFP grown in +Pi, –Pi, and +Pi + CLE14 at 7 dpg or 10 dpg.  $n \geq 20$ .

(N) RAM of WT grown in +Pi + CLE14 at 7 dpg.  $n \geq 20$ .

(O) RAM of p35S::CLE14 grown in +Pi + CLE14 at 7 dpg.  $n \geq 20$ .

(P) RAM of WT grown in –Pi at 7 dpg.  $n \geq 20$ .

Shown are the means of three independent experiments  $\pm$  SE; \*\* $p < 0.01$ . White arrows indicate decreased GFP expression. In (N), (O), and (P) epidermis (ep), cortex (c), and endodermis (e) are indicated in the root tip and (\*) indicates ground tissue with unknown identity.

Scale bars, 20  $\mu$ m. See also Figures S5 and S6.

in +Pi, –Pi, and +Pi + CLE14 for 10 days. We observed that the expression of SHR~GFP and SCR~GFP decreased in the CEID and QC of seedlings grown in +Pi + CLE14 (Figures 6C and 6F) when compared with seedlings grown in +Pi (Figures 6A and 6D). We confirmed the decrease in SHR~GFP and SCR~GFP expression by a semi-quantitative analysis of GFP fluorescence

in the RSCN based on confocal microscopy images (Figure 6G). In addition, we observed that SCR transcript levels decreased in Q2500;pUAS::CLE14 grown in +Pi (Figure 6H). In –Pi-grown seedlings we observed a more drastic reduction in the expression of SHR~GFP and SCR~GFP (Figures 6B and 6E). It has been shown that WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)



expression is undetectable in *shr* and *scr* mutants (Sarkar et al., 2007); we found that seedlings of the *pWOX5::GFP* line showed a clear decrease in GFP expression in the QC at 7 and 10 dpv in  $-Pi$  and  $+Pi + CLE14$  (Figures 6I–6M). On the other hand, we noticed that exogenous application of CLE14 peptide apparently affects CEID division, leading to the generation of a single ground tissue layer in *pSHR::SHR~GFP* and *pSCR::SCR~GFP* seedlings (Figures 6C and 6F). A similar phenotype was observed in WT seedlings grown in  $+Pi + CLE14$  (Figure 6N), upon overexpression of CLE14 (Figure 6O), and in WT seedlings grown in  $-Pi$  conditions (Figure 6P). These results suggest that Pi starvation increases CLE14, which is perceived by CLV2 and PREP2 in a signaling pathway that acts negatively on SHR and SCR expression, affecting RSCN maintenance.

Low Pi availability downregulates PIN2 and PIN7 expression (González-Mendoza et al., 2013), the auxin maxima at the RSCN (Sanchez-Calderon et al., 2005), and PIN1~GFP and PIN3~GFP prior to the full RAM differentiation (Figure S5C). We explored whether exogenous CLE14 addition could alter PIN protein expression and the DR5 spatiotemporal expression pattern at 7 and 10 dpv. *pDR5::GFP* seedlings grown in  $+Pi + CLE14$  showed a reduced expression at both 7 and 10 dpv (Figures S6A–S6C). Also, PIN1~GFP, PIN2~GFP, and PIN3~GFP gradually decreased in provascular and epidermis/cortex cells in  $+Pi + CLE14$ , in a similar manner to the expression patterns of the same markers grown in  $-Pi$  prior to full RAM differentiation (Figures S6D–S6P). Taken together, our results indicate that both major pathways involved in RSCN maintenance are affected by CLE14.

### CLE14 Partial Silencing Causes Transcriptional Induction of Other CLE Family Members

We generated a *CLE14* hypomorphic loss-of-function line by targeting the 3' UTR of the *CLE14* mRNA with an artificial microRNA (*amiR-CLE14*) under transcriptional control of the 35S promoter (*p35S::amiR-CLE14*). Silencing of the *CLE14* mRNA and the presence of *amiRNACLE14* were confirmed by RT-PCR (Figure S7A). Using the *amiR-CLE14* lines, we carried out a time-course assay to determine whether *CLE14* partial silencing affects RAM differentiation in response to Pi limitation. We observed that the roots of *p35S::amiR-CLE14* seedlings grown in  $-Pi$  medium for 12 days did not show a difference in RAM differentiation timing when compared with the WT (Figure S7B). The lack of an evident phenotype in *amiR-CLE14* seedlings and the fact that there are ten *CLE* genes expressed in the root tip (Jun et al., 2010; Meng and Feldman, 2010) suggested functional redundancy or a compensatory effect from other members of the *CLE* gene family. Moreover, *CLE17* is expressed in an expression domain similarly to *CLE14* in the RAM, and its overexpression resulted in root growth inhibition (Jun et al., 2010). To test this hypothesis, we analyzed by qRT-PCR the expression pattern of the ten root-expressed *CLE* genes in *p35S::amiR-CLE14* and WT seedlings grown in  $+Pi$  and  $-Pi$  conditions. We found that partial *CLE14* silencing in *p35S::amiR-CLE14* seedlings correlated with a significantly higher level of *CLE1*, *CLE17*, *CLE18*, *CLE22*, and *CLE26* transcripts in response to low Pi, compared with transcript levels in WT seedlings grown under the same conditions (Figure S7C). These results indicate that root-expressed *CLE* family members comprise a complex

network in which reduced expression of one member of the network causes transcriptional induction of other *CLE* family members, resulting in absence of a root meristem phenotype. Further experiments with single and multiple *CLE* mutants will be required to identify the *CLE* gene(s) that compensate for the reduced expression of *CLE14* in response to Pi deprivation.

## DISCUSSION

Upon Pi scarcity, the growth of the *A. thaliana* primary root is arrested due to the inhibition of cell elongation and root meristem exhaustion whereby the proliferative cells in the meristem start to lose their potential to proliferate, culminating in terminal differentiation of the root (Lopez-Bucio et al., 2002; Sanchez-Calderon et al., 2005). However, little is understood about the processes and signals that allow the root meristem to adapt to low Pi availability. Our work provides insights into the mechanism to adjust RAM activity in response to Pi status in *A. thaliana* and uncovers a molecular player of Pi starvation signaling, the *CLE14* peptide.

### CLE14: A Key Player in the Pi Starvation Morphological Response

Our results show that the expression of *CLE14* is induced 3-fold upon Pi starvation. Pi stress not only increases its transcription, but also increases its expression domain to cells in the RSCN and vascular tissue along the RAM zone (Figure 1). The role of *CLE14* as a key player of a molecular network that triggers RSCN differentiation and meristem exhaustion in Pi-deprived seedlings is supported by several of our findings: (1) *CLE14* expression is induced by low Pi in the RAM before any evident cell differentiation is observed; (2) the expression of *CLE14* gradually increases in the RAM in correlation with a progressive differentiation in low Pi; and (3) expression of *CLE14* in Pi-replete enhancer trap seedlings in the cortex/QC, cortex/endodermis or LRC/stele leads to full RAM differentiation.

### CLE14 Acts Downstream of the LPR1/LPR2 Pathway

LPR1 and LPR2 are involved in the mobilization of Fe from the mature columella cells and LRC to the QC, CEI, and ground tissue cells in the RAM (Muller et al., 2015; Ticconi et al., 2009). A major finding of our work is that mobilization of Fe to these cells in low Pi strongly correlates with the expression pattern of *CLE14* under Pi stress (Figure 3). It was reported that RAM differentiation under low Pi conditions is the result of a process in which the LPR1-LPR2-PDR2 pathway interferes with expression and transport of the GRAS-domain transcription factor SHR, as a consequence of callose deposition in cells of the RSCN (Muller et al., 2015; Ticconi et al., 2009). We found that in WT seedlings grown in medium lacking both Pi and Fe, *CLE14* induction and the process of meristem exhaustion do not take place. These observations suggest that RAM differentiation in response to Pi starvation requires the redistribution of Fe in the RSCN, which then induces *CLE14* expression in the SCN. This assumption is confirmed by the decreased transcriptional activation of *CLE14* under low Pi conditions in the *lpr1/lpr2* double mutant (Figure 2H). Moreover, the long root phenotype displayed by *lpr1/lpr2* seedlings in the absence of Pi can be reverted to a short root phenotype by the exogenous application of *CLE14* (Figure 2C). It is important to note that the observed reversion of the *lpr1/lpr2*

long root phenotype occurs in the absence of callose deposition in the RSCN. This evidence not only positions LPR1 and LPR2 genetically upstream of *CLE14*, but also suggests, at least under our conditions, that callose deposition at the RSCN is not essential for RAM differentiation. Moreover, RAM differentiation seems more related to an effect of *CLE14* perception and its effect on SHR, SCR, and *WOX5* expression, as has been shown in *Arabidopsis* embryos (Song et al., 2008). We cannot exclude the possibility that callose deposition contributes to RAM differentiation. However, the finding that *CLE14* can induce complete RAM differentiation in Pi-deprived *lpr1/lpr2* in the absence of callose deposition in the RSCN points to *CLE14* as a key player in this developmental process.

It has been proposed that the LPR1/LPR2 pathway controls the production of ROS by the activation of its ferroxidase activity in Pi-deprived plants (Muller et al., 2015). Our results also suggest a change in  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  proportion along the root tip (Figures 3 and S2B). Fe redox cycling participates in the generation of ROS, and the balance of  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2^-/\text{OH}^-$  (ROS) is crucial in maintaining cellular REDOX status in root meristem (Jiang et al., 2003; Kosman, 2010). Therefore, it is possible that the transcriptional activation of *CLE14* is caused directly or indirectly by a specific change in the redox status of some cells in the RAM, through a transcription factor sensitive to redox variation.

### **CLE14 Acts through CLV2 and PEPR2 Receptors to Promote Full RAM Differentiation**

We propose that the role of *CLE14* on the differentiation of the RSCN in response to Pi starvation occurs via *CLV2* and *PEPR2*, two distinct types of receptors with overlapping functions. *CLV2* is part of the *CLV* signaling pathway and plays an important role in regulating stem cell fate (Fletcher et al., 1999), while *PEPR2* has been reported to play a role in defense response signaling (Yamaguchi et al., 2010). Several of our findings support the notion that *CLE14* is perceived by both *CLV2* and *PEPR2* to trigger full RAM differentiation in low Pi: (1) phosphate starvation triggers *CLE14* induction in the root tip; (2) modeling of docking and BiFC-based experiments supports the interaction of *CLE14* with *CLV2* and *PEPR2*; and (3) only the *clv2 3pepr2* double mutant showed an undifferentiated RAM in low Pi at 14 dpg. In support of our findings, genetic evidence indicates that different receptor complexes are required for a proper developmental response to CLE peptides. For instance, *CLV1*, *CLV2/SOL2*, and *RPK2* can act in parallel to transmit the *CLV3* signal (Kinoshita et al., 2010). Moreover, *CLV3* (a CLE family member) can also be perceived by the flagellin receptor kinase *FLS2*, an RLK that senses bacterial flagellin to trigger resistance to pathogens (Lee et al., 2011).

Although the *CLE14* expression pattern in response to Pi starvation is not identical to that of *PEPR2*, both receptors are expressed in the cells in which expression of *CLE14* is activated in response to Pi deprivation, as occurs with *CLV3* and its receptor *CLV2* or *CLE40-ACR4* (Song et al., 2006; Stahl et al., 2009). The fact that *PEPR2* transcription is elevated in all tissues of the proximal meristem in response to phosphate starvation suggests that *PEPR2* action upon Pi starvation could allow the perception of not only *CLE14* but also of other CLE peptides which are expressed in the RAM, in domains different from that of *CLE14* (Jun et al., 2010).

### **CLE14 Acts Upstream of a Molecular Mechanism that Negatively Regulates SHR and SCR**

RSCN maintenance depends on the action of both SHR and SCR transcription factors, since their respective loss of function mutants develop a fully differentiated root meristem (Benfey et al., 1993; Di Laurenzio et al., 1996). SCR and SHR are responsible for specification of the ACD of the CEID, which are responsible for the creation of the two ground tissue layers and the renewal of the CEI at the RSCN. Because of this, both *shr* and *scr* mutants develop a single ground tissue layer with mixed identity (Cruz-Ramirez et al., 2012). Several of our results place both Pi starvation stress and the *CLE14* peptide as negative regulators of SHR and SCR expression in the RSCN (Figure 6). For instance, when *CLE14* transcription is directed to the cortex, endodermis, or stele initials, the CEID fails to divide asymmetrically and develops an RAM with a single ground tissue layer (Figure 6), a phenotype that resembles *shr* and *scr* mutants. The similarity in phenotypes and the fact that *CLE14* negatively affects SHR and SCR expression suggest that *CLE14* triggers RAM differentiation by repressing the expression of SHR and SCR. Despite the findings of our study, is it still possible that *CLE14* affects other key transcription factors to cause RAM differentiation in response to low Pi conditions, such as the PLETHORA transcription factors that act in a positive feedforward loop that involves PIN proteins and auxin redistribution and maxima formation, both of which we showed are affected upon Pi starvation and exogenous *CLE14* addition.

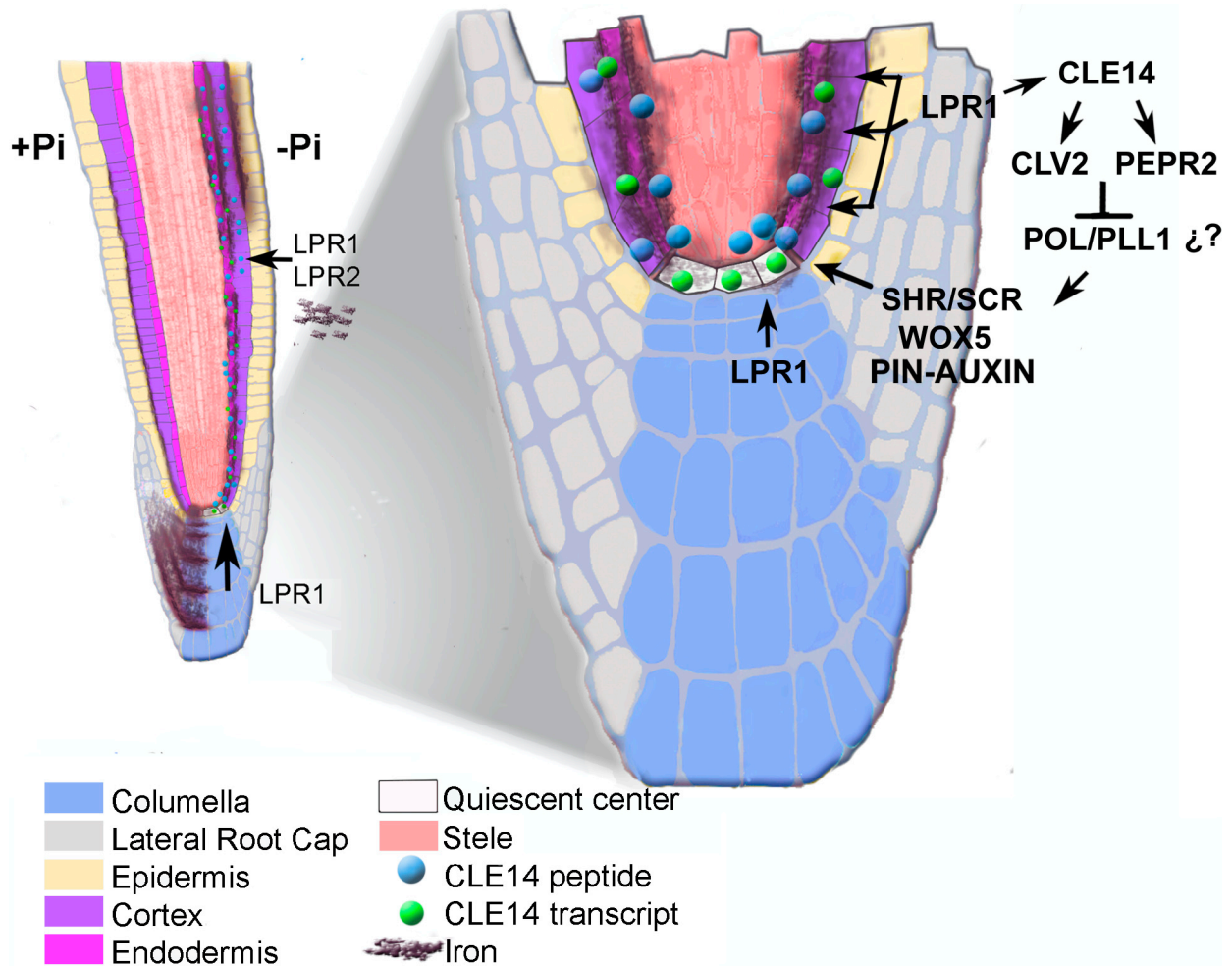
Our findings uncover a mechanism for *CLE14* perception that involves *PEPR2* and *CLV2*, which correlates with SHR and SCR downregulation. However, the events that occur between *CLE14* perception and the effects on SHR and SCR remain to be determined. A *CLE14*-independent *CLV2* pathway has been previously described as negative regulator of shoot and RSCN maintenance, in which *CLV2* acts upstream to repress *POLTERGEIST* (*POLL*) and *POLTERGEIST-LIKE 1* (*PLL1*) function. *POL* and *PLL1* are two phosphatase C proteins which negatively regulate SHR and SCR expression (Song et al., 2008). We hypothesize that *CLE14-CLV2/PEPR2* may be acting via the *POLL/PLL1* pathway. This proposal is supported by two lines of evidence: (1) in the *poll;pll1* double mutant a clear decrease in the expression of SHR in the embryo root was observed and, in turn, SCR levels decreased; (2) the postembryonic primary root of *poll;pll1* double mutant seedlings develops a fully differentiated RAM.

This study is a compendium of findings that shed light on the molecular mechanism through which the *A. thaliana* RAM fully differentiates as a final response to low Pi conditions (Figure 7). Future experimental work should focus on demonstrating the function of *CLE14-CLV2* on *POLL* and *PLL1*, and the mechanism by which these phosphatases alter the expression of SHR, SCR, and other pivotal transcription factors for shoot and root SCN maintenance.

### **STAR★METHODS**

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING



**Figure 7. Conceptual Model of the Role of CLE14 in the Response to Pi Starvation**

In low Pi, the LPR1/LPR2 pathway is involved in the mobilization of Fe from the mature columella cells and LRC to the CEI and ground tissue. This Fe distribution is required to trigger CLE14 induction in CEID, ground tissue, and stele, where it is perceived by CLV2 and PEPR2. CLE14 signaling causes full RAM differentiation through downregulation of the two major pathways involved in RSCN maintenance: the SHR-SCR and PIN-auxin pathways. See also Figure S7.

● **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

● **METHOD DETAILS**

- Microscopy
- DNA Constructs
- qRT-PCR
- Docking Modeling
- BIFC

● **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

**SUPPLEMENTAL INFORMATION**

Supplemental Information includes seven figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.009>.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conceptualization and Methodology, D.G.-A., L.H.-E., F.S.-R., and A.C.-R.; Investigation, D.G.-A., L.Y.-V., P.J.-S., F.A.-C., and A.O.-A.; Resources,

A.O.-A. and J.M.-M.; Writing, D.G.-A., A.C.-R., L.H.-E., and F.S.-R.; Funding Acquisition, L.H.-E.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank Dr. Ben Scheres and Dr. Frans Tax for providing published transgenic lines (pSHR::SHR~GFP, pSCR::SCR~GFP, pPIN1::PIN1~GFP, pPIN2::PIN2~GFP, pPIN3::PIN3~GFP, and pPIN7::PIN7~GFP; *sol2-1*, *pepr2-1*, and *clv2-3*); Dr. David King for a sample of synthetic CLE14 peptide; Dr. Lopez-Bucio for providing paraquat reagent and the *lpr1lpr2* double mutant; Dr. Jia Li for providing the pPEPR2::GUS transgenic line; Dr. Marcos Castellanos-Urbe for his help in obtaining pCLE14::CLE14~GFP; Dr. Stewart Gillmor for language editing of the manuscript; and M.J. Ortega for technical support. D.A. was supported by a CONACYT (Mexico) PhD fellowship. This work was supported in part by grants from the Howard Hughes Medical Institute (grant 55005946 to L.H.-E.) and CONACYT.

Received: August 22, 2016

Revised: March 2, 2017

Accepted: May 8, 2017

Published: June 5, 2017



## REFERENCES

- Araya, T., Miyamoto, M., Wibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y.N., Sawa, S., Fukuda, H., von Wiren, N., and Takahashi, H. (2014). CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 2029–2034.
- Babbs, C.F., Pham, J.A., and Coolbaugh, R.C. (1989). Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.* **90**, 1267–1270.
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A.F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., and Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* **7**, e46907.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., and Aeschbacher, R.A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57–70.
- Bennett, T., and Scheres, B. (2010). Chapter 3. Root development—two meristems for the price of one? In *Current Topics in Developmental Biology*, C.P.T. Marja, ed. (Academic Press), pp. 67–102.
- Casamitjana-Martinez, E., Hoffhuis, H.F., Xu, J., Liu, C.-M., Heidstra, R., and Scheres, B. (2003). Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Curr. Biol.* **13**, 1435–1441.
- Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., et al. (2012). A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* **150**, 1002–1015.
- Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Wachsmann, G., Du, Y., Arteaga-Vazquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A.B., Chandler, V., et al. (2013). A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS Biol.* **11**, e1001724.
- Chacón-López, A., Ibarra-Laclette, E., Sánchez-Calderón, L., Gutiérrez-Alanis, D., and Herrera-Estrella, L. (2014). Global expression pattern comparison between low phosphorus insensitive 4 and WT *Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signal. Behav.* **6**, 382–392.
- DeLano, W.L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. <http://www.pymol.org>.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**, 423–433.
- Fiers, M., Golemiec, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., and Liu, C.M. (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* **17**, 2542–2553.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911–1914.
- Funayama-Noguchi, S., Noguchi, K., Yoshida, C., and Kawaguchi, M. (2011). Two CLE genes are induced by phosphate in roots of *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.* **124**, 155–163.
- González-Mendoza, V., Zurita-Silva, A., Sánchez-Calderón, L., Sánchez-Sandoval, M.E., Oropeza-Aburto, A., Gutiérrez-Alanis, D., Alatorre-Cobos, F., and Herrera-Estrella, L. (2013). *APSR1*, a novel gene required for meristem maintenance, is negatively regulated by low phosphate availability. *Plant Sci.* **205**, 2–12.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.-T., and Benfey, P.N. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**, 555–567.
- Hobe, M., Muller, R., Grunewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Dev. Genes Evol.* **213**, 371–381.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., and Fukuda, H. (2006). Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**, 842–845.
- Jiang, K., Meng, Y.L., and Feldman, L.J. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* **130**, 1429–1438.
- Jun, J., Fiume, E., Roeder, A.H., Meng, L., Sharma, V.K., Osmont, K.S., Baker, C., Ha, C.M., Meyerowitz, E.M., Feldman, L.J., et al. (2010). Comprehensive analysis of CLE polypeptide signaling gene expression and overexpression activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **154**, 1721–1736.
- Kayes, J.M., and Clark, S.E. (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843–3851.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., and Sawa, S. (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development* **137**, 3911–3920.
- Kosman, D.J. (2010). Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *J. Biol. Chem.* **285**, 26729–26735.
- Kurcinski, M., Jamroz, M., Blaszczyk, M., Kolinski, A., and Kmiecik, S. (2015). CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic Acids Res.* **43**, W419–W424.
- Lee, H., Chah, O.K., and Sheen, J. (2011). Stem-cell-triggered immunity through CLV3p-FLS2 signalling. *Nature* **473**, 376–379.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* **129**, 244–256.
- Meguro, R., Asano, Y., Odagiri, S., Li, C., Iwatsuki, H., and Shoumura, K. (2007). Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch. Histology Cytol.* **70**, 1–19.
- Meng, L., and Feldman, L.J. (2010). CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of *Arabidopsis*. *Planta* **232**, 1061–1074.
- Meng, L., Ruth, K.C., Fletcher, J.C., and Feldman, L. (2010). The roles of different CLE domains in *Arabidopsis* CLE polypeptide activity and functional specificity. *Mol. Plant* **3**, 760–772.
- Miwa, H., Betsuyaku, S., Iwamoto, K., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S. (2008). The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1752–1757.
- Muller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K.L., Hause, G., Dinesh, D.C., Burstenbinder, K., and Abel, S. (2015). Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Dev. Cell* **33**, 216–230.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P.N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**, 307–311.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., and Kawaguchi, M. (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* **50**, 67–77.
- Pallakies, H., and Simon, R. (2014). The CLE40 and CRN/CLV2 signaling pathways antagonistically control root meristem growth in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **7**, 1619–1636.
- Reichheld, J.P., Vernoux, T., Lardon, F., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1999). Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.* **17**, 647–656.
- Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L., and Desnos, T. (2006). Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **29**, 115–125.



- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev.* *17*, 354–358.
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., and Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *46*, 174–184.
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Gutierrez-Ortega, A., Hernandez-Abreu, E., and Herrera-Estrella, L. (2006). Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiol.* *140*, 879–889.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* *446*, 811–814.
- Shimada, T.L., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *61*, 519–528.
- Somssich, M., Bleckmann, A., and Simon, R. (2016). Shared and distinct functions of the pseudokinase CORYNE (CRN) in shoot and root stem cell maintenance of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *67*, 4901–4915.
- Song, S.-K., Lee, M.M., and Clark, S.E. (2006). POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells. *Development* *133*, 4691–4698.
- Song, S.-K., Hofhuis, H., Lee, M.M., and Clark, S.E. (2008). Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev. Cell* *15*, 98–109.
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M.A., Busch, W., Van Norman, J.M., Vernoux, T., Brady, S.M., Dewitte, W., Murray, J.A.H., and Benfey, P.N. (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* *466*, 128–132.
- Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R. (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr. Biol.* *19*, 909–914.
- Stahl, Y., Grabowski, S., Bleckmann, A., Kühnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Pinto, K.G., Kirschner, G.K., Schmid, J.B., Wink, R.H., and Hülsewede, A. (2013). Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol.* *23*, 362–371.
- Strabala, T.J., O'Donnell, P.J., Smit, A.M., Ampomah-Dwamena, C., Martin, E.J., Netzler, N., Nieuwenhuizen, N.J., Quinn, B.D., Foote, H.C., and Hudson, K.R. (2006). Gain-of-function phenotypes of many CLAVATA3/ESR genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. *Plant Physiol.* *140*, 1331–1344.
- Svistonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L., and Desnos, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* *39*, 792–796.
- Ticconi, C.A., Lucero, R.D., Sakhonwasee, S., Adamson, A.W., Creff, A., Nussaume, L., Desnos, T., and Abel, S. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 14174–14179.
- Vangone, A., and Bonvin, A.M. (2015). Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes. *eLife* *4*, e07454.
- Wu, Y., Xun, Q., Guo, Y., Zhang, J., Cheng, K., Shi, T., He, K., Hou, S., Gou, X., and Li, J. (2016). Genome-wide expression pattern analyses of the *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Mol. Plant* *9*, 289–300.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., and Ryan, C.A. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *22*, 508–522.
- Yong-Villalobos, L., González-Morales, S.I., Wrobel, K., Gutiérrez-Alanis, D., Cervantes-Peréz, S.A., Hayano-Kanashiro, C., Oropeza-Aburto, A., Cruz-Ramírez, A., Martínez, O., and Herrera-Estrella, L. (2015). Methylome analysis reveals an important role for epigenetic changes in the regulation of the *Arabidopsis* response to phosphate starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, E7293–E7302.

## STAR★METHODS

## KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
<i>DB3.1 Competent Cells</i>	ThermoFisher Scientific	Cat#11782-018
DH5 $\alpha$ Competent Cells	ThermoFisher Scientific	Cat#18265017
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> : GPV2260 strain	<a href="#">González-Mendoza et al., 2013</a>	N/A
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
synthetic CLE14 peptide	Genscript	N/A
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Trizol Reagent	Invitrogen	Cat#15596018
Agar Plant TC, micropropagation grade	PhytoTechnology Laboratories	Cat#A111
Aniline blue fluorochrome	Biosupplies	Cat#100-1
<b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>		
<i>Col 0</i> ( <i>A. thaliana</i> accession)	ABRC	Cat#CS28166
<i>pCLE14::CLE14-GFP</i>	NASC	Cat#N66292
<i>pCLE14::GFP</i>	This paper	N/A
<i>p35S::amirCLE14</i>	This paper	N/A
<i>pUAS::CLE14</i>	This paper	N/A
<i>p35S::CLE14</i>	This paper	N/A
<i>pPEPR2::GUS</i>	<a href="#">Wu et al., 2016</a>	N/A
<i>lpr1-1</i>	ABRC	Cat#SALK_016297
<i>lpr2-1</i>	ABRC	Cat#SALK_091930
<i>lpi4</i>	<a href="#">Chacón-López et al., 2014</a>	N/A
<i>sol2-1</i>	<a href="#">Casamitjana-Martinez et al., 2003</a>	N/A
<i>clv2-3</i>	<a href="#">Kayes and Clark, 1998</a>	N/A
<i>pepr2-1</i>	<a href="#">Yamaguchi et al., 2010</a>	Cat#SALK_036564
Haseloff line Q2500	NASC	Cat#N9135
Haseloff line J0481	NASC	Cat#N9093
Haseloff line J2341	NASC	Cat#N9118
Haseloff line J0571	NASC	Cat#N9094
Haseloff line J0631	NASC	Cat#N9095
Haseloff line J2351	NASC	Cat#N9119
<b>Oligonucleotides</b>		
pUAS::CLE14 FW GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAATGAAAG TTTGGAGCCAAAGA	Elim Biopharm	N/A
pUAS::CLE14 RW GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATT GTTGTGAAGCGGGTT	Elim Biopharm	N/A
pCLE14::GFP FW GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATCAGA GTGAAGGAACCTTTCCAAG	Elim Biopharm	N/A
pCLE14::GFP RW GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAA TGTTTTCTCTCCGTAAGAGT	Elim Biopharm	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
Plasmid: YFN43	<a href="#">Belda-Palazón et al., 2012</a>	N/A
Plasmid: YFC43	<a href="#">Belda-Palazón et al., 2012</a>	N/A

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Plasmid: pKGWFS7	Vlaams Instituut voor Biotechnologie	N/A
Plasmid: pB7m24GW2	Vlaams Instituut voor Biotechnologie	N/A
Plasmid: pFAST-G02	Shimada et al., 2010	N/A

**CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Luis Herrera-Estrella ([lherrerae@cinvestav.mx](mailto:lherrerae@cinvestav.mx)).

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

*pCLE14::CLE14-GFP*, *pPEPR2::GUS*, *sol2-1*, *clv2-3* and *pepr2-1* (SALK\_036564) mutants have been described previously (Casamitjana-Martinez et al., 2003; Kayes and Clark, 1998; Meng and Feldman, 2010; Wu et al., 2016; Yamaguchi et al., 2010). See also [Key Resources Table](#). Seeds were germinated on 0.5% (w/v) Suc, 1% (w/v) TC agar. Seedlings were grown in 0.1x MS salts under a 16/8-h photoperiod at 22°C, in medium containing 2.0 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.9 mM KNO<sub>3</sub>, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>· 2H<sub>2</sub>O, 0.15 mM MgSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O, 5 μM KI, 25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1 mM MnSO<sub>4</sub>· H<sub>2</sub>O, 0.3 mM ZnSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O, 1 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>· 2H<sub>2</sub>O, 0.1 μM CuSO<sub>4</sub>· 5H<sub>2</sub>O, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>· 6H<sub>2</sub>O, 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA· 2H<sub>2</sub>O, 10 mg L-1 inositol, and 0.2 mg L-1 Gly. The glassware was routinely cleaned with 5mM HCl solution overnight, after the glassware was washed with distilled water.

The +Pi++Fe<sup>2+</sup> media contained 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 150 μM FeSO<sub>4</sub> at pH 5.7. The +Pi++Fe<sup>3+</sup> media contained 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 150 μM Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> at pH 5.7.

The +Pi medium was pH 5.7 and contained 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 μM FeSO<sub>4</sub>, whereas –Pi medium was pH 5.7 and contained 10 μM FeSO<sub>4</sub>, without KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. For the medium with excess of Fe (referred as ++Fe), the quantity of Fe described, is the final Fe concentration in the media. In the experiments in which we did not add external Fe to the media (–Pi-Fe), we added 50μM ferrozine, a specific Fe<sup>2+</sup> chelating agent to block Fe traces in the agar used.

For +P+CLE14 medium, we used 10μM of the synthetic CLE14 peptide at 98% purity. We observed a lower activity of the synthetic CLE14 peptide under high light regimen.

To obtain Hasseloff lines harboring the pUAS::CLE14 construct, first we introgressed Hasseloff lines (originally in the C24 ecotype) into the Col-0 ecotype. In parallel, we generated pUAS::CLE14 transgenic line in WT (Col-0) via *Agrobacterium* mediated transformation. We crossed each Hasseloff line with pUAS::CLE14 transgenic plants. In the resulting progeny (T0), we tested antibiotic resistance and GFP fluorescence. In addition, we amplified the pUAS::CLE14 construct by PCR in each line generated, and the PCR-product was sequenced. The sequence alignment analysis and oligonucleotide primer sequences are available upon request. Double hemizygous (T0) *J2351;pUAS::CLE14*, *J0481;pUAS::CLE14* and *J0631;pUAS::CLE14* were able to give progeny, but it was not possible to obtain double homozygous *J2351;pUAS::CLE14* due to infertility in T1 and/or T2 progeny. When CLE14 expression was directed to the cortex, endodermis or vascular tissue as *J0571;pUAS::CLE14*, we observed a decrease in root meristem size and the GFP fluorescence was largely reduced, indicating cell identity alteration. We counted a RAM as fully differentiated when we observed the presence of root hair-forming epidermal cells root and mature xylem at the very root tip.

The timing of full RAM differentiation and the RSCN phenotype in double transgenic lines (*Q2500;pUAS::CLE14*, *J0571;pUAS::CLE14* and *J2351;pUAS::CLE14*) was faster and more drastic than in WT grown in +Pi supplemented with 10μM CLE14 peptide (+P+CLE14).

**METHOD DETAILS****Microscopy**

For histochemical analysis of GUS activity in the pPEPR2::GUS transgenic line, seedlings were incubated at 37°C in a GUS reaction buffer (0.5 mg.ml<sup>-1</sup> of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7.0) by 6 hours. The stained seedlings were cleared with chloral hydrate (1 g/ml, 15% glycerol).

For analysis of GFP and YFP expression, we used an inverted Zeiss LSM510 confocal laser-scanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). For analysis of GFP expression, seedlings were stained in a 10 μg/ml propidium iodide solution (Sigma). Fluorescence of eGFP was excited at 488 nm, emitted light was collected between 500 nm and 540 nm. PI was excited with the 514 nm laser line.

The histochemical Fe staining was done as described previously (Muller et al., 2015). The stained roots by Turnbull/DAB or Perls/DAB were optically cleared with chloral hydrate (1 g/ml, 15% glycerol). We used Nomarski optics on a Leica microscope for analysis and photography. To improve the resolution in the picture of the stained seedlings with Fe-specific histochemical procedure (perl/DAB staining) in [Figures 3E–3N](#), optical sections of approx. 40μM were taken with a 100X objective. Images were assembled in Adobe Photoshop.

### DNA Constructs

Gateway® recombination cloning technology (Invitrogen) and *Agrobacterium*-mediated transformation were used to generate pCLE14::GFP, pUAS::CLE14, pWOX5::GFP and p35S::amirR-CLE14 transgenic lines. For the pCLE14::GFP construct, the PCR-amplified sequence was the CLE14 2,297 bp upstream sequence. The PCR product was inserted into pDONR221 and subsequently recombined into the pKGWFS7 destination vector. To create UAS::CLE14 construct, the 243 bp sequence of CLE14 open reading frame was PCR amplified, the PCR product was inserted into pDONR 221 and subsequently recombined into the multisite pB7m24GW2 destination vector. To create p35S::amirCLE14 construct we use a previously described protocol ([www.wmd3.weigelworld.org](http://www.wmd3.weigelworld.org)), the PCR product was inserted into pDONR 221 and moved to pFASTG02 vector (Shimada et al., 2010). The oligonucleotide primer sequences are available upon request (See also Key Resources Table). The plasmids were transfected into *A. tumefaciens* strain (GPV2260) by electroporation. Transgenic *A. thaliana* plants were obtained via the *Agrobacterium* mediated transformation system.

### qRT-PCR

RNA was isolated using the TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed with the Super-Script III first-strand synthesis kit (Invitrogen). qRT-PCR was performed with an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system using SYBR Green detection chemistry (Applied Biosystems) and gene-specific primers (see Table S1). The ACTIN2 gene was used as an internal control. Relative expression levels were computed by the Ct method of relative quantification.

### Docking Modeling

Ectodomain PEPR2 and CLV2 structures were obtained by homology modeling using the I-TASSER algorithm. Protein surfaces were analyzed in order to look for peptide binding-like regions through PeptiMap Server <http://peptimap.cluspro.org/>. Initial peptide orientation and docking was modeled by CABS-dock algorithm (Kurcinski et al., 2015). Final dockings were obtained through high resolution modeling of peptide-protein interactions from the Rosetta FlexPepDock protocol. Electrostatic surface and model structure representations were made in PBEQ-Solver Server (<http://www.charmm-gui.org/?doc=input/pbeqsolver>) and PyMOL (DeLano, 2002), respectively. Binding affinity and  $K_D$  predictions were calculated using PRODIGY method (Vangone and Bonvin, 2015).

### BIFC

We subcloned CLV2, CLE14 and PEPR2 cDNAs into the destination vectors pYFN43 and pYFC43 (Belda-Palazón et al., 2012) by Gateway LR reactions to generate C- and N-terminal fusions to the two YFP fragments. We introduced the YFP translational fusions p35S::CLE14~NYFP, p35S::CLV2~CYFP and p35S::PEPR2~CYFP into *A. thaliana* root with a PDS1100/He micro-particle bombardment system using 10  $\mu$ g of total plasmid DNA.

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

The statistical parameters including, the exact value of n, dispersion and precision measures (mean  $\pm$  SE), and the statistical significance are included in both Figures and Figure Legends. The statistical analyses were performed using R, all data was analyzed by one-way ANOVA with Tukey's HSD analysis.  $p < 0.001$  was considered to be statistically significant.

**Developmental Cell, Volume 41**

**Supplemental Information**

**Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization**

**Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem**

**Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling**

**Dolores Gutiérrez-Alanís, Lenin Yong-Villalobos, Pedro Jiménez-Sandoval, Fulgencio Alatorre-Cobos, Araceli Oropeza-Aburto, Javier Mora-Macías, Federico Sánchez-Rodríguez, Alfredo Cruz-Ramírez, and Luis Herrera-Estrella**

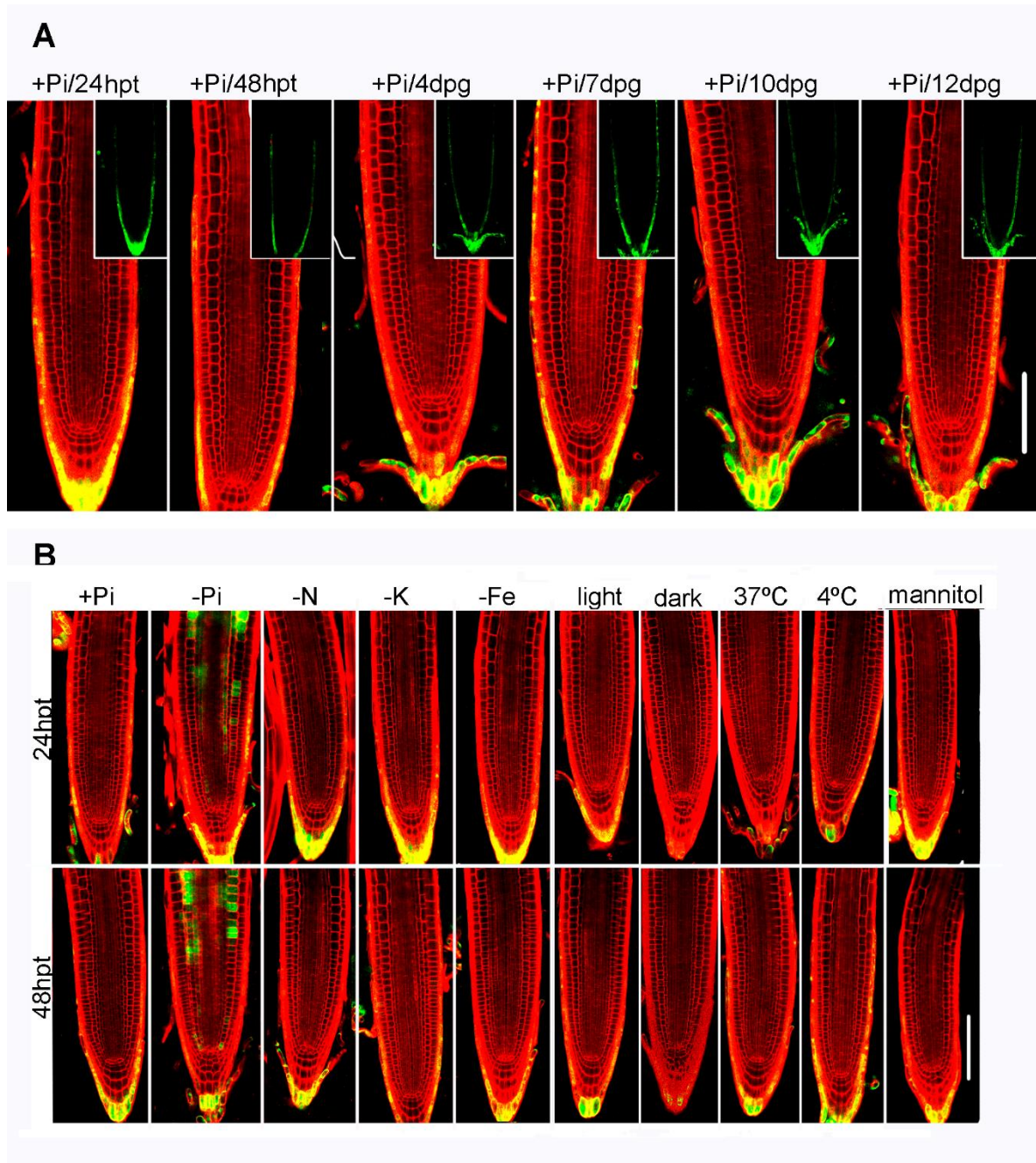


Figure S1, related to Figure 1.

**Figure S1. Increased CLE14 expression in root tip is specific to Pi starvation conditions.** (A) pCLE14::GFP seedlings were grown in +Pi for 7dpg and subsequently transferred to +Pi at 24, 48h or grown in +Pi for 4, 7, 10 or 12 dpg. (B) pCLE14::GFP seedlings were grown in +Pi for 7dpg and transferred to media with nutrient deficiency or another abiotic stress stimuli for 24h or 48h. n=42. Scale: 50  $\mu$ m.



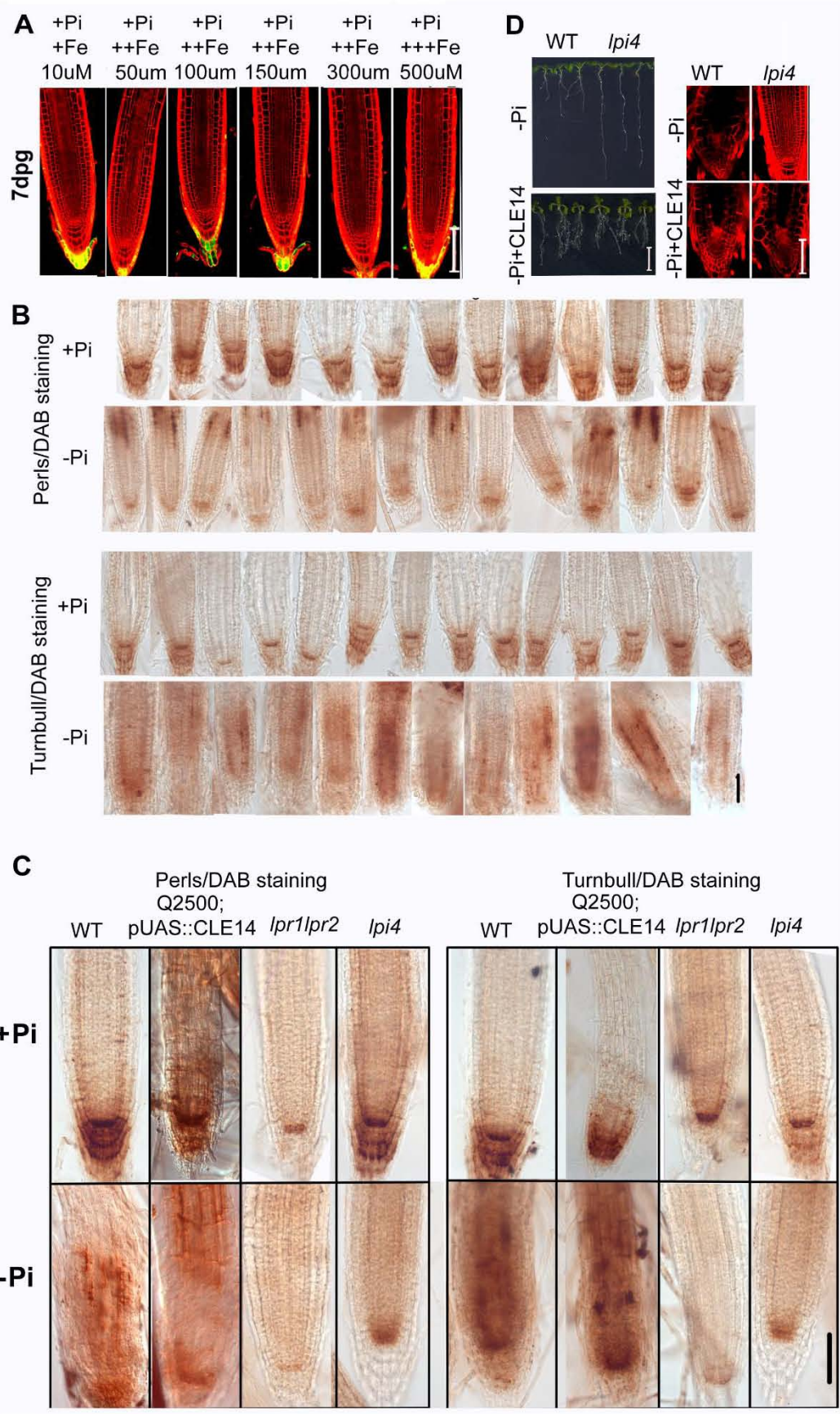


Figure S2, related to Figure 3.

**Figure S2. Phosphate starvation triggers iron redistribution along the root (A).** RAM of pCLE14::GFP of 7dpg seedlings grown in +Pi with increasing concentration of Fe. **(B)** Perls/DAB staining of Fe<sup>3+</sup> and Fe<sup>2+</sup> or Turnbull/DAB staining of Fe<sup>2+</sup> in WT grown in +P and -P at 4dpg. **(C)** Perls/DAB staining of Fe<sup>3+</sup> and Fe<sup>2+</sup> or Turnbull/DAB staining of Fe<sup>2+</sup> in WT, Q2500;pUAS::CLE14, *lpi4* and *lpr1lpr2* seedlings grown in +P and -P at 7dpg. n ≥ 30. **(D)** WT and *lpi4* grown in -Pi and -Pi+CLE14 at (*Right*) 10 and (*Left*) 12dpg. n ≥ 20. Scale A,B,C:50 μm. D,: 1cm and 50 μm.



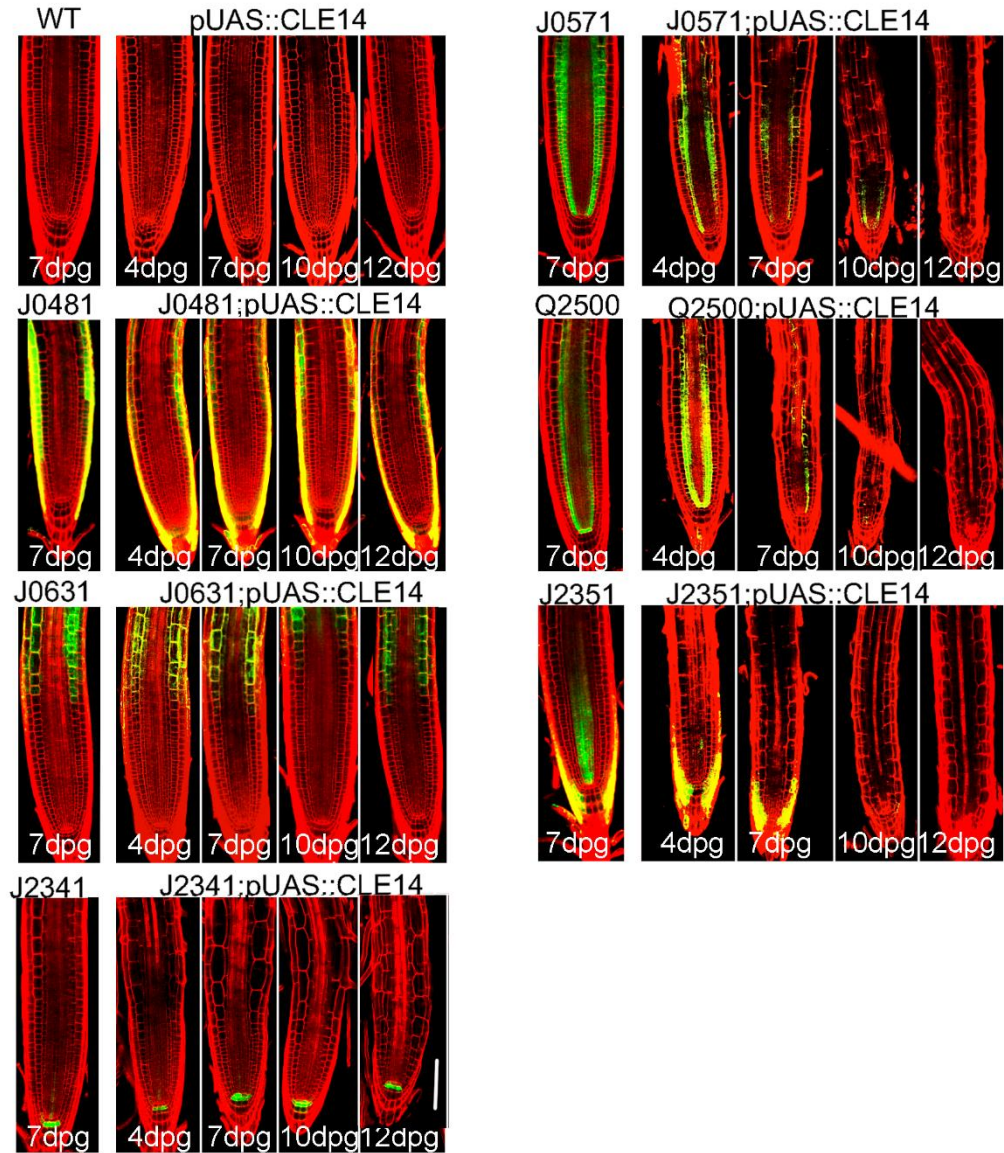


Figure S3, related to Figure 4.

**Figure S3. Full root meristem differentiation triggered by CLE14 depends on its cell-specific expression.** CLE14 was expressed in different tissues of the root tip by using Hasseloff enhancer-trap lines. Seedlings were grown in +Pi conditions for 4-12dpg. Experiments were done in triplicate.  $\pm$ SE.  $n \geq 20$ . Scale O:50  $\mu$ m.

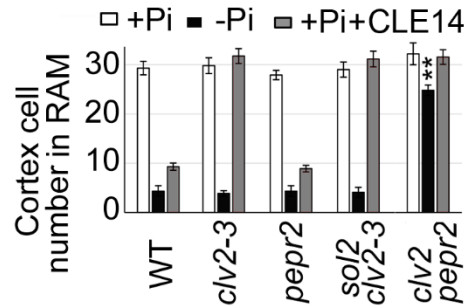


Figure S4, related to Figure 5.

**Figure S4. The RAM of *clv2pepr2* is insensitive to phosphate starvation.** Quantitative analyses of the cell cortex in the meristem zone of WT, *clv2-3*, *pepr2-1*, *sol2clv2* and *clv2pepr2* grown in +Pi, -Pi and +Pi+CLE14 for 10dpg,  $n \geq 20$ .  $\pm$ SE, \*\*= $p < 0.0$ . Experiments were done in triplicate.

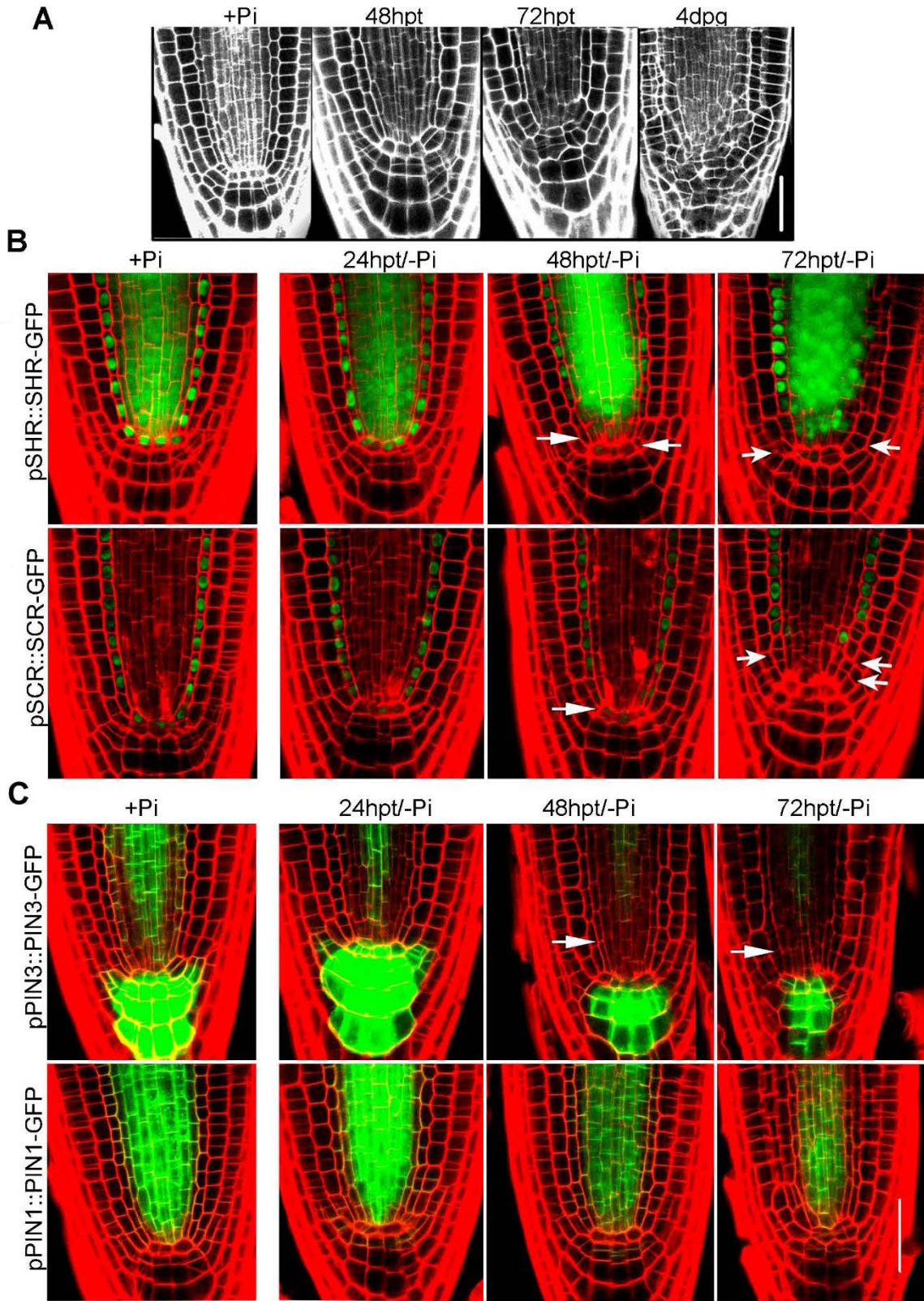


Figure S5, related to Figure 6.

**Figure S5. Phosphate deprivation alters SHR-SCR and PIN-DR5 expression in the stem cell niche after 24 hours upon stress. (A)** Tissue patterning in the RAM is disorganized in response to Pi starvation at 72 hours after stress. WT (Col-0) were grown in +Pi for 7 days and then transferred to -Pi for 24-72h, in parallel we also grew WT in -Pi for 4dpg. **(B)** RAM of pSHR::SHR~GFP and pSCR::SCR~GFP. **(C)** RAM of pDR5::GFP marker and *pPIN3::PIN3~GFP* and *pPIN1::PIN1~GFP*. Seedlings were grown in +Pi for 7dpg, then transferred to -Pi for 24-72 hours. Experiments were done in triplicate. n ≥ 20. Scale:20 μm. White arrows show decreased GFP expression.



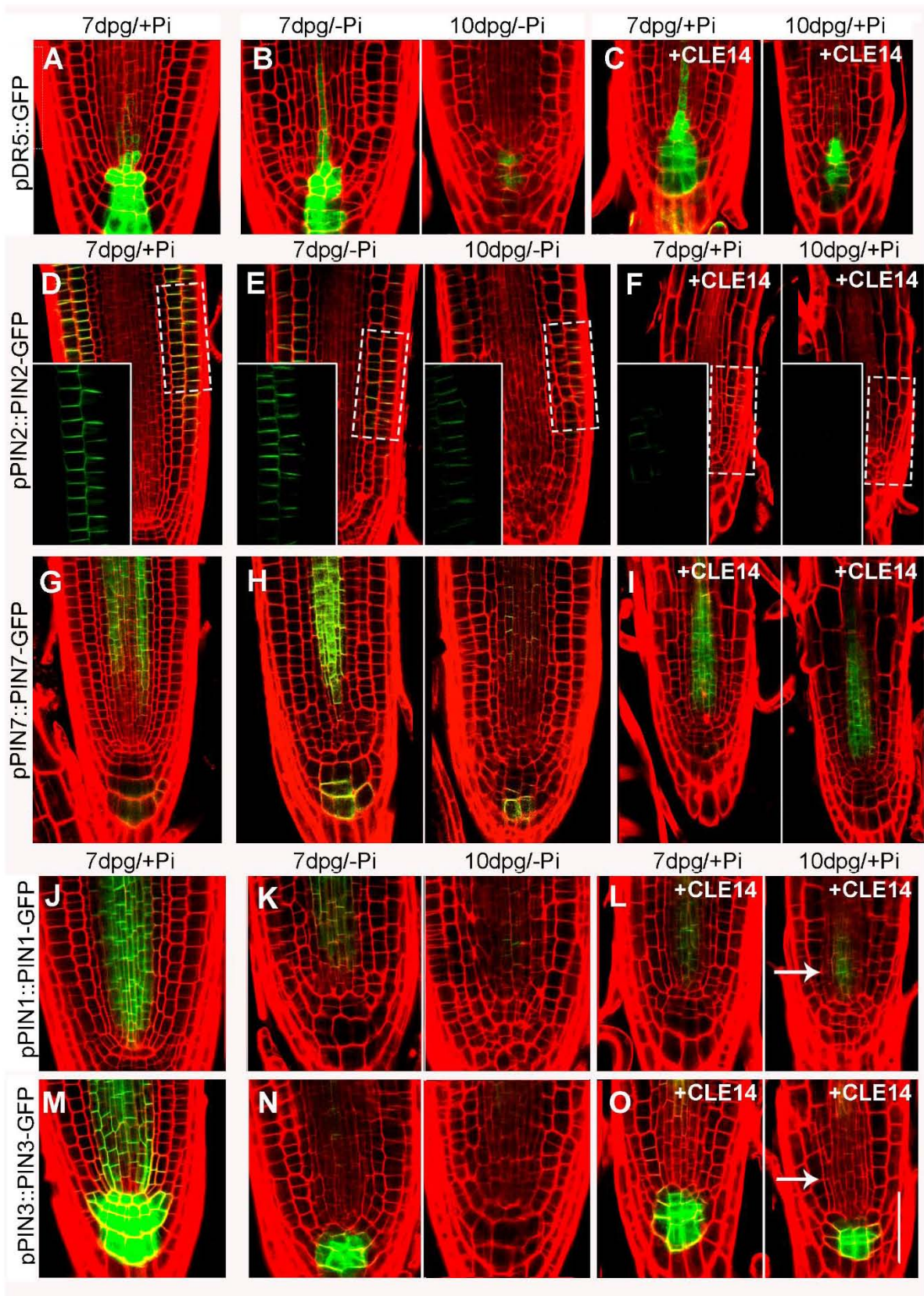


Figure S6, related to Figure 6.

**Figure S6. CLE14 acts negatively on PIN-AUX pathways.**

**(A-P)** RAM showing pDR5::GFP marker and *pPIN1::PIN1~GFP*, *pPIN2::PIN2~GFP*, *pPIN3::PIN3~GFP* and *pPIN7::PIN7~GFP* in seedlings grown in +Pi, -Pi and +Pi+CLE14 at 7dpg and 10dpg.  $n \geq 20$ . Experiments were done in triplicate.  $n \geq 20$ . Scale:20  $\mu\text{m}$ . White arrows show GFP expression decreased.

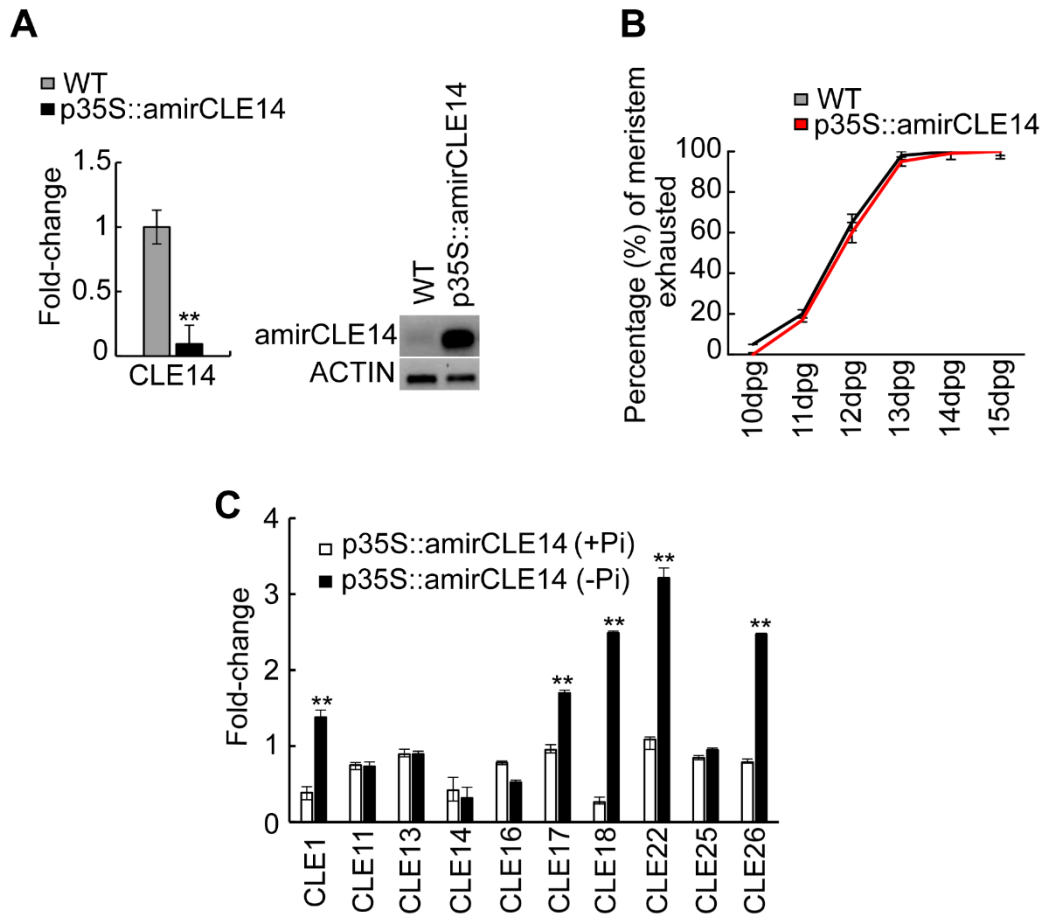


Figure S7, related to Figure 7.

**Figure S7. CLE14 silencing affects the transcription of other CLE members.** (A) *Left:* CLE14 gene silencing validation by qRT-PCR. *Right:* RT-PCR analyses of mature amirCLE14. (B) Quantitative analysis of the timing of full RAM differentiation in WT and p35S::amirCLE14 seedlings grown in -Pi. (C) qRT-PCR analyses of different CLE transcripts in WT and p35S::amirCLE14 grown in +Pi and -Pi by 7dpg. We used WT to normalize level transcripts,  $n \geq 20$ .  $\pm$ SE, \*\*= $p < 0.01$ . Experiment done in duplicate.

<b>Oligonucleotides</b>	<b>Sequence</b>
<b>CLE14 FW</b>	AGCCAAAGATTATCGTTTCTAATCGTC
<b>CLE14 RW</b>	GCGGTCACTTCCGATAATATTCTCTTG
<b>CLE1 FW</b>	TCTCGACCGATGTTCCCAAACGCAGA
<b>CLE1 RW</b>	TGATGGCGAGGATCGGGACCTCCA
<b>CLE11 FW</b>	TCAACGGCAACGTCAAAGTCCA
<b>CLE11 RW</b>	TAGCTAGTGATGCAAAGGGTTTGGACCG
<b>CLE13 FW</b>	ACTACCGGCCGGGAAGAAGAGCT
<b>CLE13 RW</b>	AGTGGTGCAAGGGGTTTGGACCAGAT
<b>CLE16 FW</b>	GAAGGAGACGAGCATAACC
<b>CLE16 RW</b>	GCTGATGAAGAAATACCAAACCTGAG
<b>CLE17 FW</b>	GTGTTGGTACGAAGACAGGG
<b>CLE17 RW</b>	ACGACAAAACCTATCTGAAAACCTGAC
<b>CLE18 FW</b>	GATGTTTTGGTGAAGGCTGAG
<b>CLE18 RW</b>	TGCTATTCGTGAAGACCCATC
<b>CLE22 FW</b>	CTTGACTCCAATGCTGCGTCATCA
<b>CLE22 RW</b>	TAGGACCTGTGAAGACCCTTCTCT
<b>CLE25 FW</b>	CTCTGCACCAAGTGTTCCATCA
<b>CLE25 RW</b>	TGGCCGTCTCGAAGTTTCTGC
<b>CLE26 FW</b>	CAGCTGTGAACATGAACAACCTCCGATGCCA
<b>CLE26 RW</b>	GACACATATATGCAGGTAGGGGTAAGG
<b>ACTIN 2 FW</b>	GAATTGTCTCGTTGTCCTCCTCAC
<b>ACTIN 2 RW</b>	TGCAAATCCAGCCTTCACCATAC

Table S1, related to STAR Methods.

**TABLE S1. Sequence of oligonucleotides used in qRT-PCR analysis.**