

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO
E ACÚMULO DE FERRO NA ARQUITETURA DE RAÍZES DE *Avena sativa* L.**

Jacqueline Flores Schmitz
Engenheira Agrônoma/UFRGS
Mestre em Ciências – Biotecnologia Vegetal/UFRJ

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração em Recursos Genéticos, Biotecnologia em Melhoramento vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2023

CIP - Catalogação na Publicação

Schmitz, Jacqueline Flores
CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DE
FÓSFORO E ACÚMULO DE FERRO NA ARQUITETURA DE RAÍZES DE
Avena sativa L. / Jacqueline Flores Schmitz. -- 2023.
74 f.
Orientadora: Carla Andrea Delatorre.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2023.

1. Fósforo. 2. Ferro. 3. Arquitetura radicular. 4.
Avena sativa L.. I. Delatorre, Carla Andrea, orient.
II. Título.

JACQUELINE FLORES SCHMITZ
Engenheira Agrônoma - UFRGS

Mestre em Ciências - Biotecnologia Vegetal - UFRJ

TESE

Submetida como parte dos requisitos

para obtenção do Grau de

DOCTORA EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 25/05/2023

Pela Banca Examinadora

CARLA ANDREA DELATORRE

Orientadora -

PPG Fitotecnia/UFRGS

CARLA ANDREA DELATORRE

Coordenadora do Programa de

Pós-Graduação em Fitotecnia

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI

PPG Fitotecnia/UFRGS

FELIPE KLEIN RICACHENEVSKY

PPG Botânica/UFRGS

MARIA JOSÉ VILAÇA DE VASCONCELOS

EMBRAPA MILHO E SORGO

CARLOS ALBERTO BISSANI

Diretor da Faculdade de

Agronomia

"Quando você faz uma descoberta – mesmo se você for a última pessoa na Terra a ver a luz – você jamais vai se esquecer."

(Carl Sagan, 1934-1996)

-Agradecimentos-

À CAPES, pela concessão da bolsa ao longo dos quatro anos do meu doutorado.

À UFRGS, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, que me permitiram a realização do sonho de cursar um doutorado e trabalhar com pesquisa.

À minha orientadora, Carla Andrea Delatorre, pelas discussões científicas, ideias, conselhos profissionais e pessoais; pela inspiração de mulher forte e competente.

Ao professor Marcelo Teixeira Pacheco, pelas críticas construtivas, sempre me incentivando a oferecer o meu melhor e disponibilizando sua ajuda para o que fosse necessário.

Aos alunos de iniciação científica, Matheus Wünsche, Fernanda Kayser e Sara Mendez, pelo auxílio na condução e análise dos experimentos.

Aos técnicos de laboratório do DEPLAV, Fábio Bernt e Gustavo Maia Leão, pelo suporte na execução dos experimentos.

Aos colegas do departamento de Plantas de Lavoura, Paula Angonese e Guilherme Turra, pela disponibilidade em ensinar protocolos e esclarecer dúvidas.

Ao Departamento de Botânica da UFRGS, laboratório LAVeg, e em especial aos professores Felipe Ricachenevsky, Alexandra Mastroberti e à aluna de pós-doutorado Tamara Pastori pelo auxílio nos experimentos de acúmulo de ferro e análise de calose.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS, em especial ao técnico Henrique Beck Biehl, pela aquisição das imagens radiculares no microscópio confocal.

Aos professores da Faculdade de Agronomia, em especial aos do departamento Plantas de Lavoura e Horticultura/Silvicultura, pelos sorrisos e cumprimentos nos corredores, possibilitando dias mais agradáveis de trabalho. Em especial, à professora Renata Pereira da Cruz e ao professor Itamar Cristiano Nava, pelas conversas, conselhos e incentivos.

Aos meus mestres do Ensino Fundamental, Médio/Curso Normal, Curso Técnico, Graduação, Mestrado e Doutorado, que por meio de seus ensinamentos me mostraram o quão poderoso ser torna o ser humano que busca o conhecimento.

Às minhas amigas Estéfani Sulzbach, Cátia Meneguzzi e Bianca Machado, pelas inúmeras alegrias que me trouxeram no dia a dia.

Aos meus amigos, Jéssica Argenta, Vanessa Duarte e Charleston Lima, que compartilharam bons e maus momentos comigo, me ajudando a levantar e seguir em frente a cada tropeço dado ao longo do caminho.

Aos meus tios, Cláudia Schmitz, Cristina Schmitz, Ricardo Schmitz, Ricardo Bernardi e Pedro Henrique Rothmann pelo acolhimento emocional e suporte financeiro.

Aos meus avós, Hans Gerd Schmitz e Marlene Schmitz, que desde jovem me ensinaram os valores da ética e responsabilidade na vida pessoal e profissional.

Aos meus pais, Roberto Schmitz e Sônia Batista Flores, por encorajarem os meus sonhos e vibrarem por cada conquista que alcanço; em especial à minha mãe por todo amor incondicional.

A Deus, pela oportunidade de vivenciar as mais diversas experiências que me permitem evoluir cada dia mais.

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO E ACÚMULO DE FERRO NA ARQUITETURA DE RAÍZES DE *Avena sativa* L. ¹

Autora: Jacqueline Flores Schmitz

Orientadora: Carla Andrea Delatorre

RESUMO

Nos solos com pH ácido, a baixa disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) é um relevante problema para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Recentes estudos em *Arabidopsis thaliana* têm investigado a participação de genes de tolerância ao alumínio na resposta à deficiência de fósforo, sugerindo efeitos pleiotrópicos em solos ácidos, que envolvem o aumento da captação de Pi por diferentes mecanismos fisiológicos e moleculares. Uma parte dessa interação ocorre pela modulação da expressão das proteínas do módulo regulatório STOP1-ALMT1, além da dependência do acúmulo de ferro (Fe) nas raízes. Os principais objetivos deste estudo foram: i) identificar se o modelo proposto para explicar a redução do crescimento radicular em resposta à baixa disponibilidade de Pi que ocorre em *Arabidopsis*, também é válido em monocotiledôneas, como a espécie *Avena sativa* L.; ii) verificar se as modificações no sistema radicular de aveia causadas pela baixa disponibilidade de Pi estão correlacionadas com o acúmulo de Fe nas raízes; iii) analisar a expressão gênica de *STOP1* e *ALMT1* em raízes de aveia para avaliar o seu envolvimento na via de sinalização da interação entre Pi e Fe. Plantas de aveia do genótipo UFRGS 17 foram cultivadas em solução hidropônica com diversas concentrações de Pi e Fe, além da aplicação de malato exógeno. Parâmetros radiculares, acúmulo de calose e ferro, além da expressão gênica dos genes *STOP1* e *ALMT1* em ápices radiculares foram avaliados. Em condições de deficiência de Pi, as raízes diminuíram seu comprimento total e número de ramificações, mas aumentaram o comprimento das raízes principais. Tal resposta foi obtida devido ao aumento do número de células na região meristemática e maior tamanho celular na região de alongamento. A situação de deficiência de Pi promoveu acúmulo de calose em zonas radiculares e maior acúmulo de ferro na epiderme da raiz e no apoplasto das primeiras camadas do córtex, contudo não foi possível associar a produção de calose com a presença de ferro. O aumento de ferro pode não ser o principal componente a alterar o sistema radicular de aveia. A aplicação de malato exógeno promoveu alterações no sistema radicular, promovendo maior comprimento total de raízes independente da disponibilidade de Pi. Os genes candidatos *STOP1* e *ALMT1*, diferentemente de *Arabidopsis*, não estão envolvidos no estímulo da redução do comprimento do sistema radicular de *Avena sativa* sob deficiência de Pi. Os resultados apresentados neste estudo indicam que o modelo proposto na alteração radicular para *Arabidopsis* não é aplicável à aveia e contribuem para melhorar o entendimento do comportamento radicular de plantas de aveia submetidas a estresses abióticos nutricionais.

¹ Tese de doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74f.), Maio, 2023.

CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION BETWEEN PHOSPHORUS DEFICIENCY AND IRON ACCUMULATION ON THE ARCHITECTURE OF *Avena sativa* L. ROOTS ¹

Author: Jacqueline Flores Schmitz
Advisor: Carla Andrea Delatorre

ABSTRACT

In acidic soils, the low availability of inorganic phosphorus (Pi) is a problem for plant growth and development. Studies in *Arabidopsis thaliana* have suggested a role for aluminum tolerance genes in the phosphorus deficiency response, suggesting pleiotropic effects in acid soils, which involve increased phosphorus uptake by different physiological and molecular mechanisms. Part of this interaction occurs through the modulation of the expression of the STOP1-ALMT1 regulatory module proteins, in addition to the dependence on iron (Fe) accumulation in the roots. The main objectives of this study were: i) to identify whether the model developed for *Arabidopsis* to explain the reduction in root growth in response to low Pi, also occurs in monocotyledons, such as the species *Avena sativa* L.; ii) to verify if the modifications in the oat root system caused by the low Pi are correlated with Fe accumulation in the roots; iii) analyze *STOP1* and *ALMT1* gene expression in oat roots to assess their involvement in the signaling pathway of the interaction between Pi and Fe. Oat plants of the UFRGS 17 genotype were cultivated in hydroponic solution with several concentrations of Pi and Fe, in addition to the exogenous malate application. Root parameters, callose and iron accumulation, as well as gene expression of the *STOP1* and *ALMT1* genes in the root tips were evaluated. Under Pi deficiency, the root system decreased its total length and its number of branches, but increased the individual root length. This response was obtained due to an increase in the cell numbers in the meristematic region and bigger cell length in the elongation region. Pi deficiency promoted callose accumulation in root zones and iron accumulation in the root epidermis and in the apoplast of cortex first layers. However, it was not possible to associate the callose production with iron content. Accumulated iron may not be the main factor to alter the oat root system. Exogenous malate promoted changes in the root system, increasing total root length independently of Pi availability. The *STOP1* and *ALMT1* candidate genes, differently from *arabidopsis*, are not involved in stimulating the reduction of the root system length in *Avena sativa* under Pi deficiency. The results presented in this study suggest no validation of the root growth model of *arabidopsis* for oat and contribute to the knowledge about the oat root behavior nutritional to abiotic stress.

¹ Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (74p.), May, 2023.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. Sistema radicular: importância e desenvolvimento..... | 3 |
| 2.2. Fósforo: mobilização, absorção e transporte | 6 |
| 2.3. Ferro: absorção, transporte e a consequência da sua atividade redox..... | 8 |
| 2.4. A deficiência de fósforo e as alterações no sistema radicular | 9 |
| 2.5. Interação entre fósforo e ferro | 10 |
| 2.6. Aveia: uma monocotiledônea que vem ganhando espaço de destaque..... | 13 |
| 2.7. Referências bibliográficas | 15 |
| 3 CAPÍTULO I: ARTIGO | 24 |
| 3.1 Introduction..... | 25 |
| 3.2 Material and methods | 26 |
| 3.2.1 Plant material and growth conditions..... | 26 |
| 3.2.2 Growth root parameters and biomass..... | 27 |
| 3.2.3 Measurement of root epidermal cell lengths and number | 27 |
| 3.2.4 Callose staining..... | 28 |
| 3.2.5 Histochemical Fe staining | 28 |
| 3.2.6 RNA extraction and Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analysis | 28 |
| 3.2.7 Statistical analysis | 29 |
| 3.3 Results..... | 29 |
| 3.3.1 The effect of phosphate deficiency and iron concentrations in root growth parameters | 29 |
| 3.3.2 Influence of phosphorus and iron on root cell growth | 30 |
| 3.3.3 Root response of <i>Avena sativa</i> to malate supplementation is different from <i>Arabidopsis thaliana</i> response | 31 |
| 3.3.4 Callose deposition in root developmental zones | 32 |
| 3.3.5 Iron accumulation detection in <i>Avena sativa</i> roots..... | 33 |
| 3.3.6 Expression analyses of candidate genes <i>STOP1</i> and <i>ALMT1</i> | 35 |
| 3.4 Discussion | 37 |
| 3.5 Conclusion | 41 |
| 3.6 Author contributions..... | 41 |
| 3.7 Acknowledgments | 41 |
| 3.8 Data availability statement..... | 42 |
| 3.9 Conflict of interest..... | 42 |

| | Página |
|-------------------------------------|---------------|
| 3.10 References..... | 42 |
| 3.11 Supporting information..... | 48 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 57 |
| 5 VITA | 59 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| CAPÍTULO 1: ARTIGO | Página |
|--|---------------|
| Table 1. Iron accumulation analysis of transversal root sections of <i>A. sativa</i> UFRG 17 plants under different Pi and Fe concentrations + malate complementation..... | 35 |
| Table S1. Primer sequences of candidate and reference genes used for RT-qPCR on <i>Avena sativa L.</i> roots..... | 48 |
| Table S2. Root parameters evaluated in oat plants exposed to different phosphorus and iron conditions..... | 51 |
| Table S3. Root parameters evaluated in oat plants exposed to different phosphorus and iron conditions + exogenous malate..... | 52 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Página

Figura 1. Raízes de monocotiledôneas. Trigo à esquerda e aveia à direita. Adaptado de ZOBEL; WAISEL (2010).....5

Figura 2. Modelo proposto para resposta à deficiência de fósforo em *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de BALZERGUE e colaboradores (2017).....12

CAPÍTULO I

Figure 1. Root parameters. (A) Total root length (cm) and Number of tips, and (B) Longest root length in 15 DAG UFRGS 17 seedlings grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) (n=45). Letters denote different significant classes ($p \leq 0.05$) by ANOVA test with Duncan post-test. Error bars indicate SD.....30

Figure 2. Root cell parameters. (A) Root cell number in root tips (n=6) and (B) Root cell size in the root elongation zone (n=200) of 15 DAG UFRGS 17 seedlings grown in different conditions of Pi and Fe: +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/ 0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M). Asterisks denote significant difference between treatments by Student's t-test or Welch's t-test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).....31

Figure 3. (A) Total root length (cm) and (B) longest root length of 15 DAG UFRGS 17 seedlings grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) + acid malic (M) (200 μ M) (n=45). Letters denote different significant classes ($p \leq 0.05$) by ANOVA test with Duncan post-test. Error bars indicate SD.....31

Figure 4. Callose deposition in the root developmental zones of *A. sativa*. Meristematic zone (A-G), elongation zone (H-N) exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M). Meristematic zone (O-U), elongation zone (V-BB) exposed to +Pi+Fe; +Pi-Fe; +Pi++Fe; -Pi+Fe; -Pi-Fe; -Pi++Fe + acid malic (M) (200 μ M). Roots stained with the Aniline Blue dye (at pH 7.2). n=3.....32

Figure 5. Fe accumulation and distribution in roots of *A. sativa*. Roots exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) + acid malic (M) (200 μ M). n=3 (A-F) Negative control (NC). Roots submitted only to DAB staining, without ferrocyanide of Perls staining. (G-L) Roots submitted to Perls/DAB staining. (M-R) Negative control (NC)

to treatments with acid malic. (S-X). Roots submitted to Perls/DAB staining to treatments with acid malic.....34

Figure 6. Relative expression of *STO1* and *ALMT1*. (A) Tips roots of *A. sativa* plants exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) concentrations. Data are presented in relation to the reference genes *Ubiquitin (UBC21)* and *Elongation Factor (Efl-α)* using the efficiency method ($-\Delta\Delta Ct$). Different capital letters indicate differences among the treatments for *STO1* expression and small letters for *ALMT1* expression by ANOVA test with Tukey post-test ($p \leq 0.05$). Asterisks represents statistically significant differences in relation to the control by Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars indicate standard deviation (SD). Relative expression values were calculated based on three biological replicates (each replicate consists in a pool of ten plants) with three technical replicates.36

Figure 7. Response of *STO1* and *ALMT1* candidate genes under exogenous malate presence. (A) Relative gene expression of *STO1*. (B) Relative gene expression of *ALMT1*. Tips roots of *A. sativa* plants exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) concentrations + acid malic (200 µM) (M). Data are presented in relation to the reference genes *Ubiquitin (UBC21)* and *Elongation Factor (Efl-α)* using the efficiency method ($-\Delta\Delta Ct$). Asterisks represents statistically significant differences in relation to not addition of exogenous malate by Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars indicate standard deviation (SD). Relative expression values were calculated based on three biological replicates (each replicate consisted of a pool of ten plants) with three technical replicates.....36

Figure S1. Examples of confocal images of *Avena sativa* root tips (UFRGS 17) at 15 DAG dipped in a 10 µg/ml Propidium Iodide (PI) and analyzed with Olympus Fluoview software to numbers root cell (A; B) and size cell root (C; D).....49

Figure S2. *Avena sativa* seedlings (UFRGS 17) at 15 DAG grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM) and -Pi++Fe (0 mM/200 µM).....49

Figure S3. *Avena sativa* seedlings (UFRGS 17) at 15 DAG grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM). Plants purely illustrative chosen at random.....50

Figure S4. Callose deposition in the root developmental zones of *A. sativa*. Maturation zone (A-G) exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) + acid malic (200 µM). n=3. Maturation zone (H-N). Roots stained with Aniline Blue dye (at pH 7.2).....50

Figure S5. Perls/DAB staining in *Avena sativa* roots growth in +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) + acid malic (200 µM). (A-B) Roots after only Perls staining. (C-D) Roots after Perls/DAB staining.....54

Figure S6. Perls/DAB technical control in roots of *A. sativa*. Roots (A-F) and transversal sections (G-L) of plants submitted to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0mM/0µM); -Pi++Fe (0mM/200µM) concentrations without Pearls/DAB staining54

Figure S7. Perls/DAB technical control in roots of *A. sativa* with exogenous malate. Roots (A-F) and transversal sections (G-L) of plants submitted to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) concentrations + acid malic (200 µM) without Pearls/DAB staining.....55

Figure S8. Fe accumulation in transversal sections roots of *A. sativa*. Roots exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) concentrations. n=3. (A-F) Negative control (NC). Roots submitted the DAB staining, but without ferrocyanide of Perls staining. (G-L) Roots submitted to Perls/DAB staining. (M-R) Negative control (NC) to malate treatment (M). Roots submitted the DAB, but without ferrocyanide of Perls staining. (S-X) Roots of malate treatment (M) submitted to Perls/DAB staining.....55

Figure S9. Relative expression of *STOP1* and *ALMT1*. Tips roots of *A. sativa* plants exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM) concentrations + acid malic (M) (200 µM). Data are presented in relation to the reference genes *Ubiquitin (UBC21)* and *Elongation Factor (Efl-α)* using the efficiency method ($-\Delta\Delta Ct$). Different letters indicate significant differences among the treatments by ANOVA test with Tukey post-test ($p \leq 0.05$). Asterisks represents statistically significant differences in relation to the control by Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars indicate standard deviation (SD). n=3 (each replicate consisted in a pool of ten plants).....56

-Lista de Abreviaturas e Símbolos-

AIA: ácido indol acético

Al: alumínio

Al³⁺: alumínio tóxico

ALS3: do inglês, *aluminum sensitive 3*

ALMT1: do inglês, *aluminum-activated malate transporter 1*

AO: ácidos orgânicos

Ca: cálcio

-COOH: grupo carboxila

DAB: do inglês, *3,3'-diaminobenzidine*

Fe: ferro

Fe²⁺: íon ferroso

Fe³⁺: íon férrico

FER1: do inglês, *ferritin 1*

FRO2: do inglês, *ferric reduction oxidase 2*

H⁺: próton

H₂PO₄⁻: fosfato

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IRT1: do inglês, *iron regulated transporter 1*

ISRR: do inglês, *international society for root research*

LPR1: do inglês, *low phosphate root 1*

MATE: do inglês, *multidrug and toxic compound extrusion*

OH•: radical hidroxila

O⁻²: superóxido

P: fósforo

PD: plasmodesmata

PDR2: do inglês, *phosphate deficiency response 2*

pH: potencial hidrogeniônico

PHO1: do inglês, *phosphate 1*

PHR1: do inglês, *phosphate starvation response 1*

PHT1: do inglês, *phosphate transporter 1*

Pi: fósforo inorgânico

PIN: do inglês, *PIN-formed*

PLT: do inglês, *plethora*

QTL: do inglês, *quantitative trait loci*

RAM: do inglês, *root apical meristem*

ROS: do inglês, *reactive oxygen species*

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

RT-qPCR: do inglês, reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction

SCN: do inglês, *stem cell niche*

SCR: do inglês, *scarecrow*

SHR: do inglês, short-root

STOP1: do inglês, *sensitive to proton rhizotoxicity 1*

WUS: do inglês, wuschel

YS1: do inglês, yellow stripe 1

YSL1: do inglês, *yellow stripe 1-like*

1 INTRODUÇÃO

Nos solos com pH ácido, a baixa disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) devido a sua ligação com óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) é um relevante problema para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Entre as principais respostas à deficiência de fósforo há a alteração na arquitetura do sistema radicular. Uma das estratégias essenciais comum a muitas espécies para tolerar esse estresse abiótico é a liberação de ácidos orgânicos (AO) pelas raízes tais como malato e citrato (DONG *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2013).

Estudos em arábido (*Arabidopsis thaliana*) têm investigado a participação de genes de resistência ao alumínio na resposta à deficiência de fósforo, sugerindo efeitos pleiotrópicos em solos ácidos, que envolvem o aumento da captação de fósforo por diferentes mecanismos fisiológicos e moleculares. Uma parte dessa interação ocorre pela modulação da expressão das proteínas do módulo regulatório STOP1-ALMT1, que abrange diferentes genes atuando *upstream* e *downstream* nessa via de sinalização, além da dependência do acúmulo de ferro nas raízes. Assim, quando há limitação de Pi, *ALMT1* é induzido e ocorre retenção de Fe^{3+} , componente chave para exaurir o meristema apical radicular (MÜLLER *et al.*, 2015; BALZERGUE *et al.*, 2017; MORA-MACÍAS *et al.*, 2017). Todavia, essa resposta no desenvolvimento das raízes ainda não foi elucidada em monocotiledôneas.

Em trigo (*Triticum aestivum* L.) já há evidências de respostas à deficiência de Pi e sua interação com o Al. A escassez de Pi por mais de dez dias é capaz de induzir a expressão de *ALMT1* nessa espécie. A observação de que uma cultivar tolerante ao Al também apresenta tolerância à presença de baixa disponibilidade de Pi permite inferir que ainda há muitos mecanismos em raízes a serem observados nessa relação (ESPINDULA; MINELLA; DELATORRE, 2009). Além disso, a expressão de *TaALMT1* em cevada (*Hordeum vulgare* L.) aumenta a habilidade das plantas de adquirirem fósforo de ambientes com solos ácidos e

confere benefícios no rendimento mesmo quando não há limitação deste nutriente (DELHAIZE *et al.*, 2009).

O grupo de pesquisa de melhoramento de aveia (*Avena sativa* L.) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul também tem estudado a tolerância ao Al (CASTILHOS *et al.*, 2011; HERVÉ *et al.*, 2013; NAVA *et al.*, 2006, 2016). Três *loci* gênicos de característica quantitativa (QTL) foram identificados a partir de linhagens recombinantes derivadas do cruzamento entre UFRGS 17 (tolerante ao Al) e UFRGS 930598-6 (sensível ao Al), conferindo tolerância ao Al e podendo ter associação ao gene transportador de malato (SCHNEIDER *et al.*, 2015). A sequência completa de *STOP1* em aveia foi caracterizada por clonagem e sequenciamento, identificando mais de uma cópia do gene no genoma. Ademais, a análise por expressão gênica de *STOP1* sugere sua funcionalidade (DABLE, 2018). Embora *ALMT1* tenha sido identificado apenas parcialmente nesse estudo, esse gene também parece estar presente em mais de uma cópia no genoma de aveia, sendo induzido por exposição da planta ao estresse por alumínio. O grupo de pesquisa também tem focado em estudos sobre o efeito da baixa disponibilidade de fósforo em aveia, uma vez que pouco se sabe sobre as respostas do sistema radicular de tal espécie sob a condição de deficiência de fósforo. Desse modo, os principais objetivos deste estudo foram:

- i) identificar se o modelo desenvolvido para explicar a redução do crescimento radicular em resposta à baixa disponibilidade de fósforo que ocorre em *Arabidopsis thaliana*, também é válido em monocotiledôneas, como a espécie *Avena sativa* L.;
- ii) mensurar e quantificar o comprimento e o número de células, respectivamente, de ápices radiculares de plantas de aveia submetidas a diferentes concentrações de fósforo e ferro;
- iii) identificar se há acúmulo de ferro em células radiculares sob baixa disponibilidade de fósforo;
- iv) verificar se as modificações que ocorrem no sistema radicular de aveia causadas pela baixa disponibilidade de fósforo estão relacionadas com o acúmulo de ferro nas raízes;
- v) relacionar a adição de malato exógeno com a alteração no crescimento radicular;
- vi) analisar a expressão gênica de *STOP1* e *ALMT1* em raízes para avaliar o seu envolvimento na via de sinalização da interação entre fósforo e ferro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistema radicular: importância e desenvolvimento

O sistema radicular é responsável pelo suporte, pela captação e condução de água e de minerais dos vegetais. Desta forma, a capacidade de explorar o solo por meio do tipo de arquitetura desenvolvida pelas raízes torna-se essencial para a adaptação de uma espécie às diversas condições ambientais (MA *et al.*, 2019). Sabe-se que as plantas possuem uma grande plasticidade no sistema radicular quando expostas a deficiências nutricionais, permitindo inferir que as respostas que regulam o processo de desenvolvimento das raízes sofrem alterações e são traduzidas em modificações morfológicas (GRUBER *et al.*, 2013). Tal plasticidade, uma característica que responde à pressão de seleção, pode auxiliar na busca por nutrientes no solo e, conseqüentemente, na produtividade das culturas, e gera uma oportunidade de estudo das variações naturais ocorridas nas raízes (LYNCH, 1995; GROSSMAN; RICE, 2012).

Para compreender as modificações morfológicas que ocorrem no sistema radicular é necessário conhecer como ocorre o seu desenvolvimento, assim como os seus tipos de tecidos. As raízes possuem distintas zonas quanto a sua atividade de crescimento: a zona meristemática, a zona de alongamento e a zona de maturação. A zona meristemática constitui a porção mais distal da raiz, formando o meristema apical radicular (RAM) que abriga o nicho das células tronco (SCN). Nessa região, as células possuem um estado indiferenciado e dão origem aos tecidos que constituem a raiz (DOLAN *et al.*, 1993; SABATINI *et al.*, 2003). Os reguladores chaves do crescimento e desenvolvimento da raiz primária também são conhecidos por atuarem nas raízes laterais (TIAN *et al.*, 2014). As células-tronco dependem do centro quiescente para posicioná-las, um pequeno grupo de células que requer *WUSCHEL* (*WUS*) e depende das vias de *PLETHORA* (*PLT*) e de *SHORTROOT* (*SHR*)/*SCARECROW* (*SCR*) (AIDA *et al.*, 2004; GALINHA *et al.*, 2007; SABATINI *et al.*, 2003; SHIMOTOHNO *et al.*, 2018). A zona de alongamento é caracterizada pela diminuição progressiva da divisão celular e pelo início da expansão longitudinal. A zona de

maturação/diferenciação é reconhecida por ser a região na qual as células possuem um estado diferenciado e adquirem sua função (ISHIKAWA; EVANS, 1995; BALUSKA *et al.*, 1996).

Em relação a origem e formação dos tecidos, a organização do RAM merece destaque. Nos cereais, o RAM está encoberto pela coleorriza para permanecer protegido durante a embriogênese e após a germinação (HOCHHOLDINGER; ZIMMERMANN, 2009). Os tecidos meristemáticos primários conhecidos como protoderme, meristema fundamental e procâmbio dão origem, respectivamente, à epiderme, ao córtex e ao cilindro vascular, constituindo a estrutura primária da raiz (APPEZATO-DA-GLÓRIA; HAYASHI, 2006). A epiderme é a camada mais externa da raiz, sendo constituída, normalmente, de uma camada de células na qual algumas se expandem e diferenciam-se em pelos radiculares. O córtex situa-se entre a epiderme e o cilindro vascular, sendo formado por camadas de células parenquimáticas. Nessa região está localizada a endoderme, a camada mais interna do córtex, caracterizada pela presença das estrias de Caspary. Além desse tecido, pode ocorrer a presença da exoderme logo abaixo da epiderme, também com capacidade de desenvolver as estrias de Caspary. O cilindro vascular é constituído pelo periciclo, responsável pela origem das raízes laterais e pelos tecidos vasculares – xilema e floema (ENSTONE; PETERSON; MA, 2003; APPEZATO-DA-GLÓRIA; HAYASHI, 2006). As estrias de Caspary, constituída por polímeros de lignina e suberina, são barreiras de difusão que controlam a homeostase dos nutrientes (ROPPOLO *et al.*, 2011). Quando há pouca formação das estrias e não há deposição de suberinas, a água e os nutrientes conseguem via apoplasto chegar e sair mais facilmente ao xilema. Contudo, a presença da endoderme suberizada vai obrigar que a água e os nutrientes tenham que entrar na célula para chegar ao xilema, permitindo a planta definir a entrada e a saída dos íons (BARBERON *et al.*, 2016).

A nomenclatura das classes de raízes, muitas vezes, dificulta a comparação de resultados e conclusões de uma espécie para outra, o que levou a *International Society for Root Research* (ISRR) a aprovar classes específicas para a identificação e nomenclatura desse órgão (ZOBEL, 2011). O sistema radicular é constituído de quatro classes básicas classificadas pela sua origem na planta: *tap root* ou radícula – primeira raiz que emerge da semente (embrionária); *lateral roots* – ramificações de outra raiz (pós-embrionário); *basal root* – raiz proveniente do hipocótilo/mesocótilo e *shoot-borne roots* – raízes provenientes do caule (ZOBEL; WAISEL, 2010). Nas eucotiledôneas, como *Arabidopsis thaliana*, as raízes são classificadas em raiz primária (*tap root*) e raízes laterais (secundárias e terciárias). Em algumas outras espécies desse grupo também ocorrem as raízes adventícias (*shoot-borne roots*) (ZOBEL, 2016). As monocotiledôneas (**figura 1**) possuem as raízes seminais (*basal*

roots), as raízes laterais, e as raízes da coroa/adventícias (*shoot-borne roots*); em algumas espécies como o milho ainda há a raiz primária (HOCHHOLDINGER *et al.*, 2004; EDMAIER *et al.*, 2014). A espécie *Avena sativa L.* possui um sistema radicular fibroso com raízes seminais e adventícias, além da ausência de raiz dominante. A partir do desenvolvimento do primórdio radicular presente no embrião são originadas de três a quatro raízes seminais. Enquanto as raízes adventícias surgem, posteriormente, dos nós basais do colmo da planta (WHITE, 1995).

Especificamente nas monocotiledôneas, as raízes adventícias podem ser necessárias para o aumento de vascularização, auxiliando em um maior fluxo de água e nutrientes, além de promover resistência ao acamamento devido a maior capacidade de ancoragem da planta (WIENGWEERA; GREENWAY, 1994; RENEAU *et al.*, 2020). As raízes laterais, de um modo geral, proporcionam um aumento da exploração e intensidade de forrageamento do volume do solo, promovendo eficiência na captação de água e nutrientes pouco móveis, como o fósforo (YU *et al.*, 2016). Raízes mais profundas, como as primárias/principais, permitem uma melhor busca pela água e por nutrientes com maior mobilidade, como o nitrogênio (UGA *et al.*, 2013).

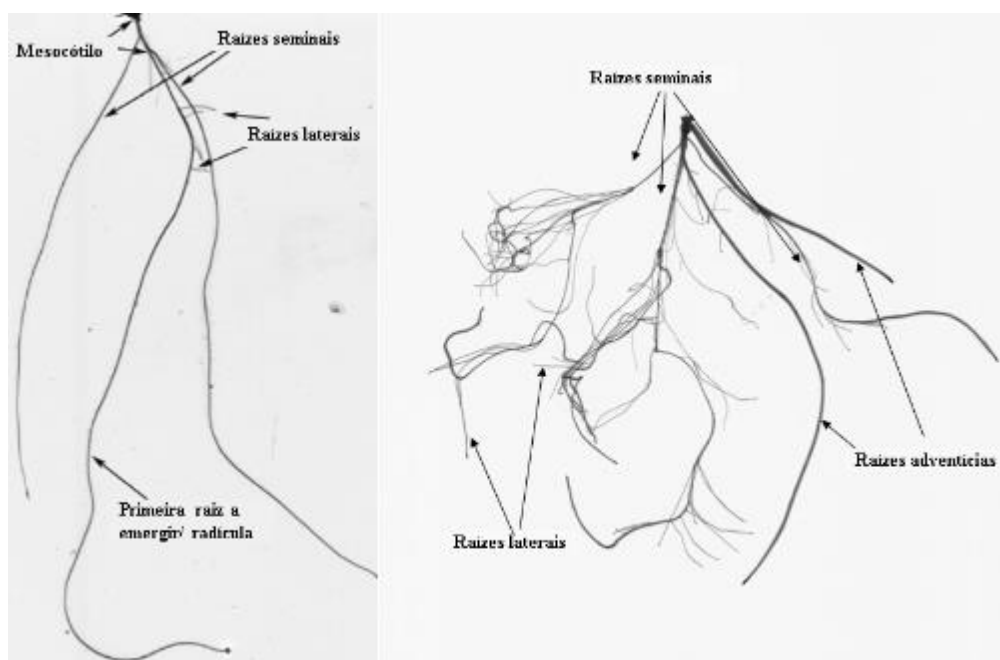


FIGURA 1. Raízes de monocotiledôneas. Trigo à esquerda e aveia à direita. Adaptado de ZOBEL; WAISEL (2010).

2.2 Fósforo: mobilização, absorção e transporte

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais importantes e limitantes da produção na agricultura da maioria das regiões do mundo. Ele é um componente central para a formação de biomoléculas como os ácidos nucleicos e os fosfolipídios, além de desempenhar atividades de regulação enzimática e conversão de energia (BOWLER *et al.*, 2010). O fosfato ou ortofosfato proveniente das rochas fosfatadas, um recurso não renovável, é a principal configuração do elemento fósforo (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009). Essas formas minerais fosfatadas são quimicamente reativas, apresentando variações de solubilidade e conferindo ao P a característica de ser o nutriente mais imóvel e indisponível para as plantas (MCLAUGHLIN *et al.*, 2011). Contudo, devido a sua essencialidade, os vegetais absorvem este elemento da solução do solo por meio de íons de P inorgânico (Pi) – H_2PO_4^- , utilizando de diversas estratégias para sua mobilização e transporte (MUCHHAL; PARDO; RAGHOTHAMA, 1996; LYNCH; HO, 2005).

Uma estratégia de destaque na mobilização do P do solo pelas plantas, além da liberação de prótons e proteases, é a exsudação de ácidos orgânicos (AO) (LYNCH; HO, 2005), compostos de carbono que possuem pelo menos um grupo carboxílico (-COOH). Os AO de baixo peso molecular como oxalato, citrato, malato, fumarato e malonato estão presentes no solo a partir da decomposição da matéria orgânica, metabólitos microbianos e exsudatos das raízes (BOLAN *et al.*, 1994). Alguns como citrato, malato e fumarato são intermediários do ciclo de Krebs, atuam em processos metabólicos de assimilação de carbono e nitrogênio, regulação do pH do citosol e potencial osmótico, além de equilíbrio de cargas (RYAN; DELHAIZE; JONES, 2001). Os AO exsudados pelas raízes estão associados com deficiências nutricionais e estresses por íons inorgânicos, sendo produzidos em maiores quantidade pelas plantas na aquisição de P, detoxificação de metais pesados e tolerância ao alumínio tóxico (Al^{3+}) (RYAN; DELHAIZE; RANDALL, 1995; JONES; DARRAN; KOCHIAN, 1996). A solubilização do Pi pelos AO ocorre a partir da formação de complexos entre esses ácidos e metais como ferro (Fe), cálcio (Ca) e alumínio (Al). Tal complexação depende do número e posição de seus grupos funcionais como o carboxil (-COOH) e o fenólico (-OH) (BOLAN *et al.*, 1994).

Após a mobilização e o contato direto do P com as raízes, as plantas absorvem o Pi e este é transportado para os diferentes tecidos e órgãos. Os transportadores de fosfato são responsáveis por captar o íon fosfato e transportá-lo através da membrana. Existem

diferentes tipos de transportadores de fosfato: os transportadores de baixa afinidade, que são ativados em condições de alta disponibilidade de fósforo e os transportadores de alta afinidade, que são ativados em condições de baixa disponibilidade de fósforo (RAGHOTHAMA *et al.*, 1999). *PHT1* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 1*) faz parte de uma das famílias transportadoras de fosfato de alta afinidade, estando envolvido na captação de Pi da solução do solo, além da redistribuição e remobilização desse nutriente das raízes para a parte aérea (MUDGE *et al.*, 2002; PARRA-ALMUNA *et al.*, 2019). *PHT2*, *PHT3* e *PHT4* estão envolvidos no transporte intracelular de Pi, em organelas como mitocôndrias, plastídios e no complexo de Golgi (VERSAW; GARCIA, 2017). A família gênica de *PHO1* (*PHOSPHATE 1*) é conhecida por auxiliar no efluxo de Pi para fora da célula, na aquisição deste nutriente na epiderme e células corticais da raiz e pelo envolvimento com a transferência de fosfato para o cilindro vascular (ARPAT *et al.*, 2012; HAMBURGER *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004). Contudo, o cenário de limitação de fósforo é comumente encontrado pelas plantas, desencadeando modificações genéticas, fisiológicas e morfológicas principalmente no sistema radicular (PÉRET *et al.*, 2014).

O mecanismo de solubilização do fósforo pelos AO citrato e malato, também é conhecido como um mecanismo de tolerância à toxicidade pelo Al^{3+} presente em solos ácidos. Membros da família MATE, por exemplo, codificam transportadores de citrato ativados por alumínio, conferindo tolerância ao Al^{3+} em sorgo (*Sorghum bicolor*) e em cevada (FURUKAWA *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2007). Plantas de cobertura como tremoço branco (*Lupinus albus*), por exemplo, também possuem genes (*LaMATE*) solubilizadores de cátions metálicos, assim como de fósforo insolúvel (KAN *et al.*, 2022).

A exsudação de malato ocorre devido à expressão de genes que codificam transportadores de ácidos orgânicos como o *Aluminum Activated Malate Transporter* (*ALMT*) da família gênica *ALMT* (KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005). O primeiro membro identificado dessa família controla o principal mecanismo de tolerância ao Al^{3+} em trigo, sendo nomeado de *TaALMT1* (SASAKI *et al.*, 2004). Esse gene, constitutivamente expresso no ápice radicular, codifica uma proteína que aumenta sua atividade pela exposição ao alumínio para exsudar malato no apoplasto (KOBAYASHI *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2004). Sequências homólogas ao gene *ALMT1* foram identificadas por Schneider (2012) em genótipos de aveia. Posteriormente, sequências homólogas a este gene sugeriram a presença de mais de uma cópia no genoma hexaploide e a expressão foi obtida apenas quando a planta foi exposta a condições de estresse por Al^{3+} (DABLE, 2018).

Fatores de transcrição também operam na via de transdução de sinal de tolerância ao Al^{3+} . Em *Arabidopsis*, o fator de transcrição STOP1 da família de proteínas *zinc finger* ativa a expressão dos principais genes envolvidos na tolerância ao Al, como *ALMT1*, e também confere resistência a prótons (H^+), independente da presença de alumínio (IUCHI *et al.*, 2007). Em raízes de aveia hexaploide, *STOP1* foi caracterizado por ser constitutivo, porém apresenta maiores níveis de expressão relativa em raízes expostas ao Al^{3+} ou baixo pH. Sugere-se a partir de diferenças observadas entre as sequências clonadas de *STOP1*, que o gene encontra-se em mais de uma cópia no genoma da espécie (DABLE, 2018).

2.3 Ferro: absorção, transporte e a consequência da sua atividade redox

O Ferro (Fe) é um micronutriente essencial para as plantas, fazendo parte do transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração. Esse metal ocorre naturalmente no solo na forma de Fe^{3+} (ferro férrico) e na forma de Fe^{2+} (ferro ferroso), tendo sua disponibilidade influenciada pelos fatores como o pH, o estado redox e a aeração do solo (BECKER; ASCH, 2005). Assim, as plantas podem reagir tanto a sua deficiência quanto ao seu excesso (MORRISEY; GUERINOT, 2009). Comumente em solos aerados, encontra-se na forma Fe^{3+} , considerada menos disponível à absorção.

As plantas utilizam duas estratégias para captação de ferro. Dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas utilizam a estratégia do tipo I ou de redução; já as monocotiledôneas gramíneas utilizam a estratégia do tipo II ou quelação (TAKAGI, 1976; BIENFAIT *et al.*, 1983; RÖMHELD; MARSHNER, 1986; THOMINE; VERT, 2013). Contudo, a espécie *Oryza sativa* era considerada uma exceção, pois além da utilização da estratégia do tipo II, há o transporte de Fe^{2+} baseado na estratégia do tipo I (RICACHENEVSKY; SPEROTTO, 2014). Contudo, sabe-se que espécies de arroz não domesticado também compartilham de ambas estratégias (WAIRICH *et al.*, 2019). Na estratégia de redução, as espécies vegetais acidificam o solo pela ação das ATPases que liberam prótons (H^+), ocasionando a solubilidade do Fe e, pela ação de redutases como *FRO2* – *FERRIC REDUCTION OXIDASE 2* ocorre a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} (ROBINSON *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2010). Após essa etapa, o Fe é absorvido e transportado pelo principal canal transportador de ferro, IRT1 – IRON REGULATED TRANSPORTER 1 (EIDE *et al.*, 1996). Na estratégia de quelação, as gramíneas liberam fitosideróforos (aminoácidos não encontrados nas proteínas como o ácido muginéico) na rizosfera que formam quelatos com Fe^{3+} , solubilizando esse íon inorgânico (RÖMHELD; MARSHNER, 1986). Após essa fase,

o complexo fitosideróforos – Fe III é absorvido pelas raízes e transportado pelo carregador YS1 – YELLOW STRIPE 1 e YSL1 – YELLOW STRIPE 1-LIKE (CURIE *et al.*, 2001).

O Fe é altamente reativo e pode tornar-se tóxico via reação de Fenton. Tal atividade consiste em uma reação redox, na qual o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, por sua vez, é reduzido ao íon e ao radical hidroxila ($OH\bullet$) (WINTERBOURN, 1995). Essa reação bioquímica é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem ser encontradas em diferentes formas como, por exemplo, superóxidos (O^{2-}), H_2O_2 e $OH\bullet$. As ROS são conhecidas pelo seu potencial de danos às células dos organismos vivos. Contudo, também apresentam sua atuação como moléculas sinalizadoras e reguladoras do desenvolvimento radicular (CHOUDHARY; KUMAR; KAUR, 2020). Sabe-se, também, que o acúmulo de ROS gera a produção de calose nos feixes vasculares e na região do apoplasto das células (BENITEZ-AFONSO; JACKSON, 2009; HOEHENWARTER *et al.*, 2016; KONG *et al.*, 2013).

A calose (β -1,3-glicana) é um polissacarídeo produzido na membrana plasmática pela calose sintase, sendo uma parte da resposta de defesa das plantas aos estresses bióticos e abióticos (CUI; LEE, 2016). Quando esse polissacarídeo é produzido e acumulado na região dos plasmodesmata (PD) ocorrem modificações na sua permeabilidade, pois o acúmulo de calose inibe o transporte célula-a-célula por restringir a abertura do canal dos PD. A atuação na comunicação simplástica pode modular o transporte de nutrientes e sinalizadores (proteínas, hormônios, RNAm), influenciando no desenvolvimento radicular (VATÉN *et al.*, 2011).

2.4 A deficiência de fósforo e as alterações no sistema radicular

Muitos fatores podem regular a disponibilidade de fósforo, o que torna a arquitetura radicular e sua configuração no tempo e no espaço uma peça fundamental na aquisição desse elemento com baixa mobilidade no solo (LYNCH, BROWN, 2001). As modificações morfológicas em plantas com situação de deficiência de fósforo, na maioria dos casos, incluem a redução do comprimento radicular, o aumento do número e comprimento de raízes laterais, assim como de pelos radiculares (LYNCH, 2011).

As auxinas são hormônios conhecidos pela sua influência na divisão, alongamento e diferenciação celular, além da iniciação dos órgãos. A distribuição assimétrica de auxina (de maneira distal) é capaz de estabelecer um padrão de organização e polaridade no meristema radicular (SABATINI *et al.*, 1999). Sabe-se, também, que a fase de iniciação dos primórdios

das raízes laterais é dependente do ácido indol-3-acético (AIA) presente no ápice radicular. Contudo, a fase de emergência do primórdio da raiz lateral é dependente do AIA proveniente das folhas (BHALERAO *et al.*, 2002). Muitas das modificações morfológicas ocorridas no sistema radicular sob deficiência de fósforo são influenciadas pela sinalização das auxinas. Quando há uma baixa disponibilidade de Pi, há uma modificação das concentrações de auxina nas raízes devido a alterações no transporte desse hormônio. A condição de -Pi induz o aumento da concentração e do transporte de auxina no ápice da raiz primária e nas raízes laterais jovens, desencadeando uma desaceleração do crescimento da raiz primária e aumento da densidade das raízes laterais. Porém, há uma diminuição do acúmulo de auxina na zona do primórdio de iniciação da raiz lateral e em raízes laterais velhas, aumentando seu crescimento (NACRY *et al.*, 2005). As proteínas PIN controlam a distribuição de auxina para regular a divisão e a expansão celular da raiz principal (BLILOU *et al.*, 2005). Entretanto, sabe-se que tais proteínas também formam um gradiente de auxina para a formação das raízes laterais (BENKOVÁ *et al.*, 2003).

Genes específicos também são ativados para que ocorram reprogramações morfológicas tanto na parte aérea quanto radicular. As proteínas PHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1*) estão associadas à região promotora de muitos genes responsivos ao baixo conteúdo de fósforo no solo e envolvidas com as respostas das plantas a sua deficiência. Tais respostas incluem o acúmulo de antocianina, relação do crescimento parte aérea-parte radicular e peso total das plantas (RUBIO *et al.*, 2001). Em *Arabidopsis thaliana*, PDR2 (*Pi DEFICIENCY RESPONSE 2*) foi atuando identificado no monitoramento da quantidade de fósforo no ambiente, na manutenção da atividade meristemática, além do auxílio na reprogramação da arquitetura da raiz para maior captação de Pi (TICCONI *et al.*, 2004). Tal gene codifica uma ATPase do tipo P₅ presente no retículo endoplasmático, sendo necessária para a expressão de SCARECROW (TICCONI *et al.*, 2009). O gene LPR1 (*LOW PHOSPHATE ROOT 1*), codifica uma multicobre oxidase, promovendo a redução do alongamento e o aumento da quantidade de raízes laterais em zonas com baixa quantidade de Pi (REYMOND *et al.*, 2006; SVISTOONOF *et al.*, 2007).

2.5 Interação entre fósforo e ferro

Estudos sugerem que respostas no sistema radicular ocasionadas pela exposição das plantas à baixa disponibilidade de fósforo no ambiente estão relacionadas com a toxicidade causada pelo ferro (SVISTOONOF *et al.*, 2007; WARD *et al.*, 2008). Solos alcalinos, como

os calcários e salinos, possuem pH elevado, causando deficiência de Fe para as plantas devido à baixa solubilidade do metal nessas condições (LINDSAY; SCHWAB, 1982). Enquanto solos ácidos possuem grandes quantidades de óxidos de ferro solubilizados devido ao baixo pH, causado pelo acúmulo de matéria orgânica e/ou drenagem insuficiente. Tal condição, favorece a retenção do fósforo no solo, o qual fica ligado não somente com os óxidos de Fe, mas também com os óxidos de Al (BORTOLUZZI *et al.*, 2015).

Em *A. thaliana*, há duas vias que controlam a inibição do desenvolvimento radicular causado pela deficiência de Pi. Uma via mostra que o crescimento do meristema apical radicular, influenciado pela quantidade de Fe em resposta à concentração de Pi externo, está sob controle genético de *LPR1* e *PDR2* (MÜLLER *et al.*, 2015). Quando *PDR2* não está inibindo *LPR1*, este gene é induzido e, por possuir uma atividade de ferroxidase, ocasiona o acúmulo de Fe^{3+} no apoplasto de raízes de plantas submetidas à baixa disponibilidade de Pi. Esse acúmulo de Fe^{3+} gera uma grande quantidade de ROS, resultando em aumento de deposição de calose nas paredes celulares e nos plasmodesmata (MÜLLER *et al.*, 2015). A descoberta da regulação da expressão gênica de *AtFer1* (ferritina 1), através de elementos no seu promotor, pelo fator de transcrição *PHR1* permitiu revelar a ligação molecular entre o Fe e a homeostase do fósforo (BOURNIER *et al.*, 2013). Nessa mesma via regulatória, em condições de deficiência de Pi, ocorre a cooperação de transportadores ABC. Há a formação de um complexo de ALS3 (*ALUMINUM SENSITIVE 3*) com a proteína AtSTAR1 no tonoplasto que auxilia na regulação de Pi, modificando a arquitetura do sistema radicular para aumentar a capacidade da planta adquirir Pi. Tais alterações radiculares ocorrem porque esses transportadores também atuam na modulação da homeostase do Fe juntamente com *LPR1/LPR2* (DONG *et al.*, 2017).

A outra via da remodelagem do sistema radicular sob condições de baixa disponibilidade de fósforo está relacionada com os genes *STOP1* e *ALMT1*, descritos anteriormente como importantes mediadores da tolerância à toxicidade por alumínio. Enquanto a resposta sistêmica à deficiência de Pi é controlada, principalmente, por *PHR1* e *PHL1* (*PHR1-like 1*), a resposta local à deficiência de Pi é dependente do acúmulo de Fe (BALZERGUE *et al.*, 2017; MÜLLER *et al.*, 2015). Altas concentrações de Fe e baixas concentrações de Pi no meio extracelular ativam de modo pós-transcricional *STOP1*. Esse induz a expressão de *ALMT1* no meristema apical radicular, promovendo a secreção de malato e o acúmulo de Fe^{3+} no apoplasto das células do RAM (BALZERGUE *et al.*, 2017; MORA-MACÍAS *et al.*, 2017). Balzergue e colaboradores (2017) propõem que as vias *STOP1-ALMT1* e *LPR1-PDR2* atuam em paralelo com mecanismos similares de acúmulo de

ferro e calose, atividades da peroxidase e espessamento da parede celular, promovendo a inibição do alongamento da raiz primária (**figura 2**). Todavia, Mora-Macías e colaboradores (2017) sugerem que *LPR1* atua *downstream* de *STOP1* e *ALMT1*, mediando a oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} .

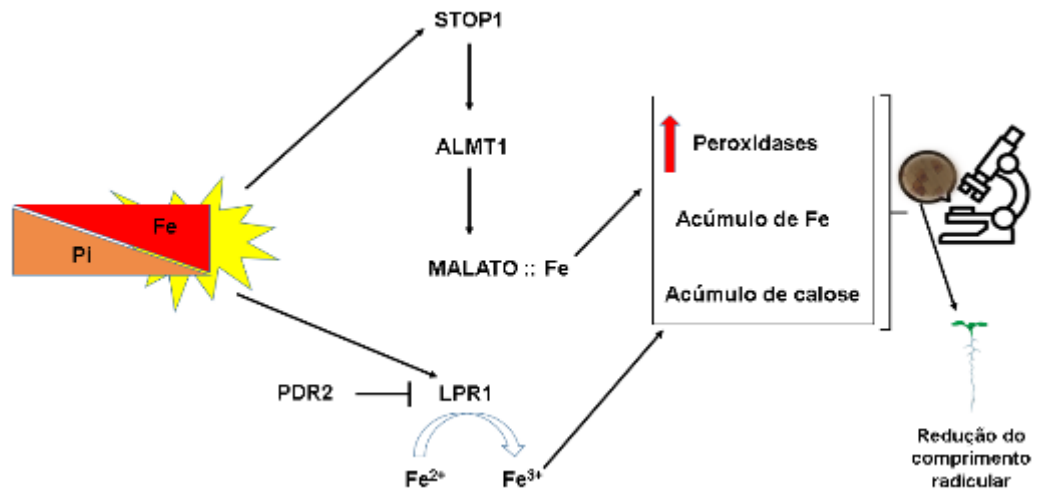


FIGURA 2. Modelo proposto para resposta à deficiência de fósforo em *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de BALZERGUE e colaboradores (2017).

Nas interações gênicas citadas, sabe-se que em *Arabidopsis* as respostas à baixa disponibilidade de Pi, $\text{Fe}^{2/3+}$ e Al^{3+} possuem passos de sinalização em comum para ativar *STOP1* como: dependência de baixo pH, cinética similar e o papel negativo de *ALS3/AtSTAR1*, promovendo o acúmulo do fator de transcrição *STOP1* no núcleo (GODON *et al.*, 2019). Segundo Godon *et al.* (2019), é o Fe, mas não a deficiência de Pi per se, o elemento suficiente capaz de acumular *STOP1* no núcleo e, conseqüentemente, ativar a expressão de *ALMT1*. Contudo, estudo recente mostra a atuação dos estresses como baixa disponibilidade de Pi, baixo pH, Fe em excesso e toxidez por Al^{3+} convergindo em dois níveis para a via de sinalização de *STOP1*. Pós-traducionalmente, por meio da regulação do *turnover* de *STOP1*, e transcricionalmente via a ativação da expressão de genes dependentes de *STOP1*, auxiliando na adaptação das raízes a diferentes estresses abióticos presentes em solos ácidos. Assim, é sugerido que condições de, somente, -Pi com baixo pH possuem um efeito maior que o excesso de Fe no acúmulo de *STOP1*, mostrando a importância da disponibilidade de fósforo para a modulação desse gene (OJEDA-RIVERA; OROPEZA-ABURTO; HERRERA-ESTRELLA, 2020).

Há discordâncias na literatura: Müller e colaboradores (2015) propõem que o grau de inibição da raiz primária em limitação de Pi está associado aos níveis de acúmulo de Fe na

zona de alongamento e na zona meristemática; Balzergue e colaboradores (2017) relatam que há associação com o acúmulo de Fe na zona de alongamento, mas não na zona meristemática e Mora-Macías e colaboradores (2017) relatam esse acúmulo, somente, na zona meristemática. Ainda, Wang e colaboradores (2019) relatam que não há ligação entre a quantidade de Fe nessas zonas radiculares e o grau de inibição da raiz primária. Um modelo de interação de componentes moleculares em *A. thaliana* foi proposto para elucidar a relação genética entre *ALS3/STAR1*, *STOP1-ALMT1* e *LPR1*. Em condições de deficiência de Pi haveria redução da atividade de *ALS3/STAR1* e, conseqüente, acúmulo de metabólitos ou íons no citosol, os quais promoveriam o acúmulo de *STOP1* no núcleo que induziria *ALMT1*. A proteína *ALMT1* promoveria o acúmulo no apoplasto de malato, o qual formaria complexos com Fe^{3+} (elemento dependente de *LPR1*), gerando espécies reativas de oxigênio e inibindo a raiz primária (WANG *et al.*, 2019). Embora a via *STOP1-ALMT1* esteja sendo amplamente estudada nas dicotiledôneas, como *Arabidopsis*, nas poáceas ainda não há confirmações do mecanismo e das vias que regulam o desenvolvimento radicular sob baixo Pi, no qual a absorção de ferro não envolve a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} (SILVA *et al.*, 2018).

2.6 Aveia: uma monocotiledônea que vem ganhando espaço de destaque

Segundo a classificação botânica de Cronquist (1988), a aveia insere-se na divisão das Magnoliophyta (angiospermas), classe Liliopsida (monocotiledôneas), subclasse Commelinidae, ordem Cyperales, família Poaceae (Graminaceae), tribo Avenae, gênero *Avena*. As aveias (*Avena* spp) são plantas de clima temperado, anuais e de dia longo que podem ser cultivadas em diferentes condições climáticas e para diversas finalidades (PRIMAVESI; RODRIGUES; GODOY, 2000). As diversas utilizações deste cereal são: consumo humano com a produção de grãos, matéria prima de cosméticos e insumos na indústria química, consumo animal de grãos ou formação de pastagens de inverno para pastejo ou elaboração de feno e de silagem, além da formação de cobertura do solo e adubação verde para implantação das culturas de verão em sucessão (DE MORI; FONTANELI; SANTOS, 2012).

No Brasil, a aveia vem aumentando seu espaço cultivável, com uma produção de 1.175,6 milhão de toneladas em 2022 (CONAB, 2022). Tal interesse no cultivo do cereal pode estar associado com o grande aporte de biomassa em sistema de plantio direto, além da resistência e limitação do crescimento populacional de nematoides por algumas cultivares (HOLLAWAY, 2002; RIEDE *et al.*, 2015; VÁZQUEZ *et al.*, 2020). O crescimento pela

busca de dietas funcionais por parte da população brasileira também tem influenciado na escolha dos agricultores, uma vez que os grãos de aveia fornecem inúmeros benefícios à saúde humana (WHITEHEAD *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2020). As espécies cultivadas no Brasil são as aveias preta (*Avena strigosa Schreb*), a branca (*Avena sativa L.*) e a amarela (*Avena byzantina K. Koch*), entretanto, como as duas últimas categorias foram amplamente cruzadas entre si, sugere-se que para produção de grãos elas sejam consideradas como *Avena sativa* (FEDERIZZI *et al.*, 2014).

A espécie é caracterizada como autógama e alopoliploide (ACQUAAH, 2012), pois seu genoma foi originado de uma agregação de três genomas diploides (AA, CC, DD), fazendo com que seja considerada um hexaploide de $2n = 6x = 42$ cromossomos (RINES *et al.*, 2006). Essa agregação consistiu primeiramente de um evento de tetraploidização entre o genoma C paterno (*Avena ventricosa*) e o genoma A materno (*Avena longiglumis*), seguido de uma hexaploidização entre uma espécie paterna diploide (*A. longiglumis*) e um genoma materno tetraploide AD (*Avena insularis*) (FU *et al.*, 2018).

A aveia é um dos principais cereais de inverno produzidos no sul do Brasil (CONAB, 2022) e, assim, como muitas outras culturas importantes na alimentação humana e animal, é altamente dependente de P nas áreas cultiváveis para aumentar a produção e auxiliar a suprir a demanda por alimentos (WITHERS *et al.*, 2018). Entretanto, muitos dos solos brasileiros são altamente intemperizados e ácidos, sendo ricos em óxidos de Fe e Al. Esses óxidos têm capacidade de se fixar ao P, imobilizando o fósforo inorgânico necessário para o aporte nutricional dos cultivos (RODRIGUES *et al.*, 2016; ROY *et al.*, 2016). Portanto, as interações entre o fósforo e metais como Fe e Al atuam na plasticidade do sistema radicular, influenciando não somente o potencial de rendimento da aveia, mas também dos demais cultivos produzidos nessas condições. Sabe-se, então, que o sistema radicular é crucial para o funcionamento das plantas. Contudo, no passado, a fenotipagem de raízes era negligenciada devido à dificuldade técnica de acessar o solo. Desse modo, características como comprimento, diâmetro, ângulo e ramificação das raízes não eram incorporadas aos programas de melhoramento (KUIJKEN *et al.*, 2015). Atualmente, tecnologias de fenotipagem, além de trabalhos em laboratório e em casa de vegetação, permitem a incorporação do fenótipo das raízes no pré-melhoramento, tornando-se uma excelente oportunidade para conhecer a complexidade dos sistemas de cultivo frente a estresses abióticos, entre eles, o nutricional (TRACY *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2021). Assim, conhecer as respostas morfológicas e fisiológicas da interação entre fósforo e ferro no desenvolvimento radicular de aveia permitirá que programas de melhoramento possam

explorar, futuramente, as variações existentes em diferentes genótipos e correlacioná-las com características agronomicamente relevantes para tolerância/rendimento.

2.7 Referências bibliográficas

ACQUAAH, G. Polyploidy in plant breeding. *In*: ACQUAAH, G. **Principles of plant genetics and breeding**. 2nd ed. Oxford: John Wiley, 2012. p. 452-469.

AIDA, M. *et al.* The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. **Cell**, Cambridge, v. 119, n. 1, p. 109-120, 2004.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; HAYASHI, A. H. Raiz. *In*: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 267-273.

ARPAT, A. B. *et al.* Functional expression of PHO1 to the Golgi and trans-Golgi network and its role in export of inorganic phosphate. **The Plant Journal**, Oxford, v. 71, n. 3, p. 479-491, 2012.

BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; BARLOW, P. W. Specialized zones of development in roots: view from the cellular level. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, n. 1, p. 3-4, 1996.

BALZERGUE, C. *et al.* Low phosphate activates *STOP1-ALMT1* to rapidly inhibit root cell elongation. **Nature Communication**, London, v. 8, n. 15, p. 11-16, 2017.

BARBERON, M. *et al.* Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. **Cell**, Cambridge, v. 164, n. 3, p. 447-459, 2016.

BHALERAO, R. P. *et al.* Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 325-332, 2002.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice – conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 168, n. 4, p. 558-573, 2005.

BENKOVÁ, E. *et al.* Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. **Cell**, Cambridge, v. 115, p. 591-602, 2003.

BENITEZ-AFONSO, Y.; JACKSON, D. Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 4, n. 7, p. 655-659, 2009.

BIENFAINT, H. F. *et al.* Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 59, n. 2, p. 196-202, 1983.

BLILOU, I. *et al.* The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. **Nature**, London, v. 433, n. 6, p. 39-44, 2005.

de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

DE MORI, C.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 26 p. (Documentos online– Embrapa, n. 136). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do136.htm. Acesso em: 18 nov. 2022.

DOLAN, L. *et al.* Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. **Development**, Cambridge, v. 119, n. 1, p. 71-84, 1993.

DONG, J. *et al.* An Arabidopsis ABC transporter mediates phosphate deficiency-induced remodeling of root architecture by modulating iron homeostasis in roots. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 244-259, 2017.

EDMAIER, K. *et al.* Influence of root characteristics and soil variables on the uprooting mechanics of *Avena sativa* and *Medicago sativa* seedlings. **Earth Surface Processes and Landforms**, Chichester, v. 39, n. 10, p. 1354-1364, 2014.

EIDE, D. *et al.* A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 93, n. 11, p. 5624-5628, 1996.

ENSTONE, D. E.; PETERSON, C. A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, n. 4, p. 335-351, 2003.

ESPINDULA, L. F.; MINELLA, E.; DELATORRE, C. A. Low-P tolerance mechanisms and differential gene expression in contrasting wheat genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 9, p. 1100-1105, 2009.

FEDERIZZI, L. C. *et al.* Importância da cultura da aveia. In: LÃNGARO, N. C.; CARVALHO, I. Q. (org.). **Indicações técnicas para a cultura da aveia: XXXIV Reunião da comissão brasileira de pesquisa de aveia**. Passo Fundo: Fundação ABC. Universidade de Passo Fundo, 2014. p. 13-23.

FU, Y. B. Oat evolution revealed in the maternal lineages of 25 *Avena* species. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, [art.] 4252, 2018.

FURUKAWA, J. *et al.* An aluminum-activated citrate transporter in Barley. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 1081-1091, 2007.

GALINHA, C. *et al.* PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. **Nature**, London, v. 449, n. 7165, p. 1053-1057, 2007.

GAO, H. *et al.* Effects of oat fiber intervention on cognitive behavior in LDLR^{-/-} mice modeling atherosclerosis by targeting the microbiome–gut–brain axis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 68, n. 49, p. 14480-14491, 2020.

- GROSSMAN, J. D.; RICE, K. J. Evolution of root plasticity responses to variation in soil nutrient distribution and concentration. **Evolutionary Applications**, Hoboken, v. 5, n. 8, p. 850-857, 2012.
- GRUBER, B. D. *et al.* Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. **Plant Physiology**, Rockville, v. 163, n. 1, p. 161-179, 2013.
- HERVÉ, C. B. *et al.* Tolerância ao alumínio tóxico em germoplasma brasileiro elite de aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 8, p. 1364-1370, 2013.
- HAMBURGER, D. *et al.* Identification and characterization of the Arabidopsis *PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 889-902, 2002.
- HOCHHOLDINGER, F. *et al.* From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 1, p. 42-48, 2004.
- HOCHHOLDINGER, F.; ZIMMERMANN, R. Molecular and genetic dissection of cereal root system development. **Annual Plant Reviews**, Oxford, v. 37, p. 175-191, 2009.
- HOEHENWARTER, W. *et al.* Comparative expression profiling reveals a role of the root apoplast in local phosphate response. **BMC Plant Biology**, London, v. 16, [art.] 106, 2016.
- HOLLAWAY, G. J. Effect of oat (*Avena sativa*) on the population density of *Pratylenchus thornei* in the field. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 31, n. 2, p. 147-149, 2002.
- ISHIKAWA, H.; EVANS, M. L. Specialized zones of development in roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, p. 725-727, 1995.
- IUCHI, S. *et al.* Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 104, n. 23, p. 9900-9905, 2007.
- JONES, D. L.; DARRAH, P. R.; KOCHIAN, L. V. Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. **Plant and Soil**, The Hague, v. 180, n. 1, p. 57-66, 1996.
- KAN, A. *et al.* Relationship between soil phosphorus dynamics and low-phosphorus responses at specific root locations of white lupine. **Soil Science and Plant Nutrition**, Oxford, v. 68, n. 5/6, p. 526-535, 2022.
- KOBAYASHI, Y. *et al.* Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 3, p. 843-852, 2007.
- KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, n. 1, p. 175-195, 2005.

- KONG, L. *et al.* Increasing in ROS levels and callose deposition in peduncle vascular bundles of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under nitrogen deficiency. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 8, n. 2, p. 109-116, 2013.
- KUIJKEN, R. C. P. *et al.* Root phenotyping: from component trait in the lab to breeding. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 18, p. 5389-5401, 2015.
- LINDSAY, W. L.; SCHWAB, A. P. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 5, n. 4/7, p. 821-840, 1982.
- LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, n. 1, p. 7-13, 1995.
- LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, n. 3, p. 1041-1049, 2011.
- LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. Topsoil foraging - an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 2, p. 225-237, 2001.
- LYNCH, J. P.; HO, M. D. Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. **Plant and Soil**, The Hague, v. 269, n. 1, p. 45-56, 2005.
- MA, L. *et al.* Effects of varied water regimes on root development and its relations with soil water under wheat/maize intercropping system. **Plant and Soil**, The Hague, v. 439, n. 1/2, p. 113-130, 2019.
- MAGALHÃES, J. V. *et al.* A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, London, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.
- NACRY, P. *et al.* A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 4, p. 2061-2074, 2005.
- MCLAUGHLIN, M. J. *et al.* The chemical nature of P accumulation in agricultural soils-implications for fertilizer management and design: an Australian perspective. **Plant and Soil**, The Hague, v. 349, n. 1/2, p. 69-87, 2011.
- MORA-MACÍAS, J. *et al.* Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 114, n. 17, p. E3563-E3572, 2017.
- MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chemical Reviews**, Easton, v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2009.
- MUCHHAL, U. S.; PARDO, J. M.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 93, n. 19, p. 10519-10523, 1996.

- MUDGE, S. R. *et al.* Expression analysis suggests novel roles for members of the *Pht1* family of phosphate transporters in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 341-353, 2002.
- MÜLLER, J. *et al.* Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 33, n. 2, p. 216-230, 2015.
- NAVA, I. C. *et al.* Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 148, n. 3, p. 353-358, 2006.
- NAVA, I. C. *et al.* Aluminium tolerance of oat cultivars under hydroponic and acid soil conditions. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 52, n. 2, p. 224-236, 2016.
- OJEDA-RIVERA, J. O.; OROPEZA-ABURTO, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Dissection of root transcriptional responses to low pH, aluminum toxicity and iron excess under Pi- limiting conditions in Arabidopsis wild-type and *stop1* seedlings. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, [art.] 01200, 2020.
- PARRA-ALMUNA, L. *et al.* Expression analysis and functional characterization of two *PHT1* family phosphate transporters in ryegrass. **Planta**, Berlin, v. 251, n. 1, [art.] 6, 2019.
- PÉRET, B. *et al.* Root architecture responses: in search of phosphate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 4, p. 1713-1723, 2014.
- PRIMAVESI, A. C.; RODRIGUES, A. A.; GODOY, R. **Recomendações técnicas para o cultivo de aveia**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. 39 p. (Boletim de Pesquisa). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/45809/recomendacoes-tecnicas-para-o-cultivo-de-aveia>. Acesso em: 19 nov. 2022.
- RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.
- RENEAU, J. W. *et al.* Maize brace roots provide stalk anchorage. **Plant Direct**, Oxford, v. 4, n. 11, [art.] e00284, 2020.
- RICACHENEVSKY, F. K.; SPEROTTO, R. A. There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, [art.] 189, 2014.
- RIEDE, C. R. *et al.* IPR AFRODITE – new oat cultivar with nematode resistance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 15, n. 4, p. 278-281, 2015.
- RINES, H. W. *et al.* Oat. In: CHITTARANJAN, K. **Cereals and millets: genome mapping and molecular breeding in plants**. Berlin: Springer, 2006. p. 211-242.
- ROBINSON, N. J. *et al.* A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature**, London, v. 397, n. 6721, p. 694-697, 1999.

RODRIGUES, M. *et al.* Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 542, p. 1050-1061, 2016.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 80, n. 1, p. 175-180, 1986.

ROPPOLO, D. *et al.* A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. **Nature**, London, v. 473, p. 380-383, 2011.

ROY, E. D. *et al.* The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, London, v. 2, [art.] 16043, 2016.

RUBIO, V. *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes & Development**, New York, v. 15, n. 16, p. 2122-2133, 2001.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, 2001.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 22, n. 4, p. 531-536, 1995.

SABATINI, S. *et al.* An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. **Cell**, Cambridge, v. 99, n. 5, p. 463-472, 1999.

SABATINI, S. *et al.* SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. **Genes & Development**, New York, v. 17, n. 3, p. 354-358, 2003.

SASAKI, T. *et al.* A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, 2004.

SCHNEIDER, A. B. **Identificação de genes candidatos à tolerância ao alumínio em aveia hexaploide**. 2012. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SCHNEIDER, A. B. *et al.* Chromosome-anchored QTL conferring aluminum tolerance in hexaploid oat. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 35, [art.] 121, 2015.

SHIMOTOHNO, A. *et al.* Root stem cell niche organize specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. **Genes & Development**, New York, v. 32, n. 15/16, p. 1085-1100, 2018.

SILVA, G. B. P. *et al.* Organic acid carriers in tolerance to toxic aluminum in wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 10, [art.] e20180106, 2018.

- SVISTOONOFF, S. *et al.* Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. **Nature Genetics**, London, v. 39, n. 6, p. 792-796, 2007.
- TAKAGI, S. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. **Soil Science and Plant Nutrition**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 423-433, 1976.
- THOMINE, S.; VERT, G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 3, p. 322-327, 2013.
- TIAN, H. *et al.* The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 33, n. 5, p. 745-753, 2014.
- TICCONI, C. A. *et al.* *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 801-814, 2004.
- TICCONI, C. A. *et al.* ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 106, n. 33, p. 14174-14179, 2009.
- TRACY, S. R. *et al.* Crop improvement from phenotyping roots: highlights reveal expanding opportunities. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 25, n. 1, p. 105-118, 2020.
- UGA, Y. *et al.* Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. **Nature Genetics**, London, v. 45, n. 9, p. 1097-1105, 2013.
- VATÉN, A. *et al.* Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 21, n. 6, p. 1144-1155, 2011.
- VÁZQUEZ, E. *et al.* No-tillage and liming increase the root mycorrhizal colonization, plant biomass and N content of a mixed oat and vetch crop. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 200, [art.] 104623, 2020.
- VERSAW, W. K.; GARCIA, L. R. Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 39, p. 25-30, 2017.
- WAIRICH, A. *et al.* The combined strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). **Scientific Reports**, London, v. 9, [art.] 16144, 2019.
- WANG, X. *et al.* Genetic dissection of Fe-dependent signaling in root developmental responses to phosphate deficiency. **Plant Physiology**, Rockville, v. 179, n. 1, p. 300-316, 2019.
- WANG, Y. *et al.* Structure and expression profile of the *Arabidopsis PHO1* gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 1, p. 400-411, 2004.
- WARD, J. T. *et al.* The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 3, p. 1181-1191, 2008.

WHITE, E. M. Structure and development of oats. *In*: WELCH, R. H. **The oat crop: production and utilization**. Dordrecht: Springer, 1995. (World Crop Series). p. 88-118.

WHITEHEAD, A. *et al.* Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan: a meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 100, n. 6, p. 1413-1421, 2014.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82, n. 83, p. 969-974, 1995.

WITHERS, P. J. A. *et al.* Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, London, v. 8, [art.] 2537, 2018.

WIENGWEERA, A.; GREENWAY, H. Performance of seminal and nodal roots of wheat in stagnant solution: K⁺ and P uptake and effects of increasing O₂ partial pressures around the shoot on nodal root elongation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 405, p. 2121-2129, 2004.

WU, J. R. *et al.* The benefit of secondary prevention with oat fiber in reducing future cardiovascular event among CAD patients after coronary intervention. **Scientific Reports**, London, v. 9, [art.] 3091, 2019.

YANG, M. *et al.* QTL mapping of root traits in wheat under different phosphorus levels using hydroponic culture. **BMC Genomics**, London, v. 22, n. 1, [art.] 174, 2021.

YU, P. *et al.* Genetic control of lateral root formation in cereals. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 21, n. 11, p. 951-961, 2016.

ZOBEL, R. W. A developmental genetic basis for defining root classes. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 4, p. 1410-1413, 2011.

ZOBEL, R. W.; WAISEL, Y. A plant root system architectural taxonomy: a framework for root nomenclature. **Plant Biosystems**, Bologna, v. 144, n. 2, p. 507-512, 2010.

ZOBEL, R. W. Arabidopsis: an adequate model for dicot root systems? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, [art.] 58, 2016.

3 CAPÍTULO I: ARTIGO

RESPONSES OF *Avena sativa* ROOTS UNDER PHOSPHORUS DEFICIENCY AND IRON CONTENT VARIATIONS

Manuscrito a ser submetido à *Physiologia Plantarum – Special Issue – Root Response to Biotic & Abiotic Stresses*.

Autores: Jacqueline Flores Schmitz, Matheus Wünsch, Tamara Pastori, Fernanda Kayser, Felipe Ricachenevsky; Alexandra Mastroberti, Carla Andrea Delatorre

Abstract

Phosphorus deficiency triggered by the low availability of inorganic phosphorus (Pi) due to its binding to iron (Fe) and aluminum (Al) oxides is a common abiotic stress in acidic soils. The *STOP1-ALMT1* pathway, as well as Fe, plays a role in the root development response of *Arabidopsis thaliana* subjected to Pi starvation. However, in oats (*Avena sativa* L.) this response has not yet been elucidated. In this study, the root development of oats cultivated at different concentrations of Pi and Fe was evaluated using root parameters obtained by WinRHIZO. We also investigated the role of iron and malate, and *AsSTOP1* and *AsALMT1* genes under low Pi conditions, analyzing callose and iron accumulation, and gene expression. Oat plants decreased the total length and branch number of their root system under phosphorus deficiency and iron presence, but increased the length of the main roots. We also observed a higher number of meristematic cells and bigger cell size than in phosphorus sufficiency. Iron accumulated in the apoplast region when Pi is lacking, and malate presence seems to modify these processes, including *ALMT1* expression. Differently from *Arabidopsis thaliana*, phosphorus deficiency does not reduce *Avena sativa* individual root length.

3.1 Introduction

Phosphorus (P) is a fundamental component of nucleic acids, ATP molecules, and membrane phospholipids for plant cells (Bowler et al., 2010). Its availability promotes relevant alterations in the root system architecture, which is the main organ that acquires nutrients in the soil solution to express crops potential yield (Lynch & Brown, 2001; Kellermeier et al., 2014; Tang et al., 2020). Brazilian soils are highly weathered and acidic, rich in iron (Fe) and aluminum (Al) oxides. These oxides can bind to P, immobilizing the inorganic phosphorus (Pi) needed for crop nutrition (Rodrigues et al., 2016; Roy et al., 2016). Morphological changes in P deficiency conditions include most of the time reduction in root length, increase in the number of lateral roots and root hairs to enhance P uptake (Ticconi et al., 2004; Lynch, 2011; Wang et al., 2019). In addition to these changes, as an adaptation strategy to low P, roots may increase mycorrhizal symbioses and change rhizosphere through secretion of organic acids, H⁺, and phosphatases to acquire P more efficiently (Yadav & Tarafdar, 2001; Jansa et al., 2005; Zhou et al., 2020).

It is known that phosphorus limitation increases iron availability. Iron is a micronutrient to plants, taking part in electron transport in photosynthesis and respiration. This metal occurs naturally in soils in the forms of Fe³⁺ (ferric iron) and Fe²⁺ (ferrous iron), and its availability also is influenced by factors such as pH, redox state, and soil aeration (Becker & Asch, 2005). Plants react to both its deficiency and excess (Morrissey & Guerinot, 2009). Commonly in aerated soils, iron is found in the Fe³⁺ form, considered less available for plant uptake. Dicots and non-grass monocots use the type I or reduction strategy to acquire iron, while the grassy monocots use the type II or chelation strategy (Takagi, 1976; Bienfait et al., 1983; Romheld & Marschner, 1986; Thomine & Vert, 2013). *Oryza sativa* plants uses a combined strategy, which is not exclusive to domesticated rice (Ricachenevsky & Sperotto, 2014; Wairich et al., 2019). In the reduction strategy, the plant root acidifies the soil by releasing H⁺ through H⁺-ATPases expressed in the epidermis, causing Fe solubility. By the action of reductases such as *FRO2 – FERRIC REDUCTION OXIDASE 2* Fe³⁺ is reduced to Fe²⁺. In the chelation strategy, grasses release phytosiderophores (PS) (amino acids not found in proteins such as mugineic acid) in the rhizosphere, it forms chelates with Fe³⁺, solubilizing this inorganic ion (Romheld & Marschner, 1986).

In *Arabidopsis thaliana*, two pathways control the trajectory of root development caused by Pi deficiency. In one pathway the root apical meristem growth, influenced by Fe content in response to external Pi levels, is under the genetic control of *LPRI (low phosphate*

response 1) and *PDR2* (*phosphate deficiency response 2*) (Müller et al., 2015). When *PDR2* is not inhibiting *LPR1*, this protein, due to its ferroxidase activity, causes the accumulation of Fe^{3+} in the apoplast of root cells at low Pi availability. This accumulation of Fe^{3+} generates a large amount of ROS, increasing callose deposition on cell walls and closing plasmodesmata (Müller et al., 2015). Evidence was found that the *STOP1-ALMT1* pathway has a fundamental role in the root growth response in *Arabidopsis thaliana* submitted to low availability of Pi. In this condition, *STOP1* (*sensitive to proton rhizotoxicity 1*) induces *ALMT1* (*aluminum-activated malate transporter 1*) expression in the root apical meristem (RAM), promoting both malate exudation and Fe^{3+} accumulation in the apoplast of the RAM cells, repressing the primary root growth (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017).

Avena sativa L. is one of the major winter cereals produced in southern Brazil (Conab, 2022). Like the majority of crops, it has a high dependency on Pi availability to express its potential yield (Withers et al., 2018). Oat plants not only have the strategy of releasing organic acids in a P-deficient condition (Wang et al., 2016, 2018) but also increase the activity of extracellular and intracellular acid phosphatases (Żebrowska et al., 2017). However, the oat root development responses to low P and iron availability is not yet elucidated. The objective of this study are (I) to evaluate the responses of *Avena sativa* root development to P and iron, aiming to compare Poaceae with dicots mechanism; (II) to explore the role of malate in P deficiency and, (III) to investigate the iron response and the root expression pattern of candidate genes *STOP1* and *ALMT1* in low-P conditions.

3.2 Material and methods

3.2.1 Plant material and growth conditions

Avena sativa L. genotype UFRGS 17 (Coronado² / Cortez³ / Pendek / ME1563 // 76-29 / 76-23 / 75-28 / CI833), considered tolerant to aluminum stress (Castilhos et al., 2011; Hervé et al., 2013; Nava et al., 2016) was obtained from the UFRGS Oat Breeding Program (Brazil) and used in this study. Seeds were surface-sterilized in a solution containing 2.5% v/v sodium hypochlorite and 0.001% Tween-20 for 2 min, and washed several times with distilled water. The seeds were transferred onto germination paper moistened with deionized water for three days at 25°C with constant light. After germination, the seedlings with adequate radicle and coleoptile emission were arranged on plastic pot lids adapted with plastic screens and placed over 3 L vases for hydroponic cultivation. The hydroponic

solution was aerated using RISHENING RS-680 model air compressors. The experiment was carried out in a completely randomized design with six treatments: +Pi+Fe, +Pi-Fe, +Pi++Fe, -Pi+Fe, -Pi-Fe, and -Pi++Fe. Seedlings were grown at 21°C \pm 2°C under long day photoperiod (16-hour light) with white light illumination (215 μ mol/cm²) in a hydroponic culture using nutrient solution adapted from (Nava et al., 2006). The +Pi+Fe solution contained: 4 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 2 mM MgSO₄·7H₂O, 4 mM KNO₃, 0.435 mM (NH₄)₂·SO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 2 μ M MnSO₄·H₂O, 0.3 μ M CuSO₄·5H₂O, 0.8 μ M ZnSO₄·7H₂O, 30 μ M NaCl, 0.10 μ M Na₂MoO₄·2H₂O, 10 μ M H₃BO₃, 50 μ M EDTA – Fe III (C₁₀H₁₂N₂O₈FeNa₃·3H₂O). For -Pi and -Fe conditions, phosphorus and iron were omitted from the solution, respectively, and 200 μ M EDTA – Fe was added to ++Fe. Potassium concentrations in -Pi treatments were compensated with 0.5 mM KCl. The solution was changed weekly, the pH was adjusted to 5.8, and the electrical conductivity was maintained between 1.9 e 2.1 mS cm⁻¹. For malate complementation, L(-)- malic acid 200 μ M (Sigma-Aldrich, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) was added to the hydroponic solution. Oat seedlings were harvested after 15 days.

3.2.2 Growth root parameters and biomass

After the harvest, the plant roots were immediately preserved in a 25% ethyl alcohol solution. An optical scanner STD4800 (Epson, Japan) was used to scan the whole roots. WinRHIZO software (Pro2020a, Regent Instruments Inc., Quebec, Canada) was used to analyze the root parameters. The roots were scanned in an aqueous solution. The parameters generated using the WinRHIZO system included the total length of the root system (cm), the root system surface (cm²), the root system volume (cm³), the number of root tips, and the average root diameter (mm). The average root diameter was calculated into three portions: the total length of the root system (cm) with a diameter between 0 mm – 0.5 mm, 0.5 mm – 1 mm, and 1 mm – 1.5 mm. The length of the longest root was measured by ImageJ software 1.53 (Fiji). Shoot and root dry weight (DW) were measured after being oven-dried for 48 h at 65°C.

3.2.3 Measurement of root epidermal cell lengths and number

To stain the cell wall of epidermal cells we adapt instructions of the Benfey Lab (<https://sites.duke.edu/benfey/protocols/confocal-imaging-of-roots/>). Root tips measuring ~1 cm were dipped in a 10 μ g/ml Propidium Iodide (PI) P-4170 solution (Sigma-Aldrich, Merck,

KGaA, Darmstadt, Germany) for 15 min and washed two times with distilled water. Images were collected on an Olympus FV100 confocal microscope using a 10x or 20x UPLFLN objective. For PI visualization, the laser 559 nm was used. Cell lengths and numbers were measured with the Olympus Fluoview software (**Fig. S1**).

3.2.4 Callose staining

The callose staining was performed as described by Müller et al. (2015) with minor modifications. Root tips measuring ~1 cm were cut and stained for 1.5 h with 0.1% (w/v) aniline blue in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2). Confocal microscopy was performed on an Olympus FV100 using a 20x UPLFLN objective. The laser 405 nm was used for callose visualization.

3.2.5 Histochemical Fe staining

Perls iron staining and DAB intensification were adapted from (Roschztardt et al., 2009) and (Müller et al., 2015). The roots were incubated for up to 1 hr in 4% (v/v) HCl, 4% (w/v) K-ferrocyanide (Perls stain) with vacuum infiltration. After, the roots were washed in distilled water and incubated for 1 h in methanol containing 10 mM Na-azide and 0.3% (v/v) H₂O₂. After washing with 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4), plants were incubated for up to 30 min in the same buffer containing 0.025% (w/v) DAB (Sigma-Aldrich) and 0.005% (v/v) H₂O₂. The histochemical Fe staining was stopped by washing the roots with distilled water. After staining, samples were analyzed and photographed using a Leica M165 FC stereomicroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with the digital camera Leica DFC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Observations of transversal sections and longitudinal roots were carried out using a bright field microscope Leica DMR–HC equipped with a digital camera Leica DFC 500.

3.2.6 RNA extraction and Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analysis

The experiment was carried out in a completely randomized design with three biological and four technical replicates per treatment. A pool of root tips from ten plants for each biological replicate was sectioned and immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Total RNA was extracted by grinding the plant tissues in liquid nitrogen and 600 µl of Concert™ reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) following the

manufacturer's protocol. The concentration and quality of RNA were evaluated by spectrophotometer (Biochrom Libra S80, Cambridge, UK) and agarose gel at 1%. Afterwards, first-strand cDNA was synthesized using the M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (M1701, Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's guide. Real-time PCR analysis was performed in the QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and SYBR Green was used to monitor dsDNA synthesis. A ROX passive reference dye was used to provide a constant fluorescent signal for sample background correction throughout the qPCR assay. The genes specific primers used were described in **table S1**. Analysis of the stability of the reference genes *UBC21*, *HNR* (Yang et al., 2020), and *EFl α* (Kemen et al., 2014) was performed from the Ct values obtained in the RT-qPCR reaction using the algorithm Normfinder in the RefFinder platform. The average of the two genes with the best stability was used as the reference in relative expression calculations. The amplified products were compared by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

3.2.7 Statistical analysis

Data were statistically analyzed by Rstudio software (version 4.1.1). All data were subjected to Shapiro-Wilk and Bartlett tests and histogram analysis, followed by ANOVA ($p \leq 0.05$). The comparison of means was performed by the Duncan or Tukey test at 5% level, the Welch's t-test, or the Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Statistical details of each experiment (test used, replicates, etc.) can be found in the figure legend sections.

3.3 Results

3.3.1 The effect of phosphate deficiency and iron concentrations in root growth parameters

In order to explore the response of *Avena sativa* roots to phosphorus and iron, growth parameters were measured. When P was not present and there was iron in the solution the total root length and the number of roots (indicated by the number of root tips) were smaller if compared to control conditions (+Pi+Fe) (**Fig. 1A**), suggesting reduction in size of total root architecture. Interestingly, phosphate starvation did not reduce the length of the longest root, and in +Pi+Fe, the longest root was smaller despite a greater total length of the root

system (**Fig. 1B**). Removal of Pi from the solution also caused reduction in root area, volume and dry weight (**Table S2**). Pi was essential for a high number of root tips (**Fig. 1B**). Oat plants in the presence of phosphorus have more branched roots, but in phosphorus limitation, plants change root architecture to produce longer thinner roots (**Fig. S2**). Although iron excess had the same influence in the total root length independently of Pi presence, the number of tips reduced even more without Pi, but the length of the longest root increased. The longest root increased its length when iron was removed independently of Pi presence (**Fig. 1B**).

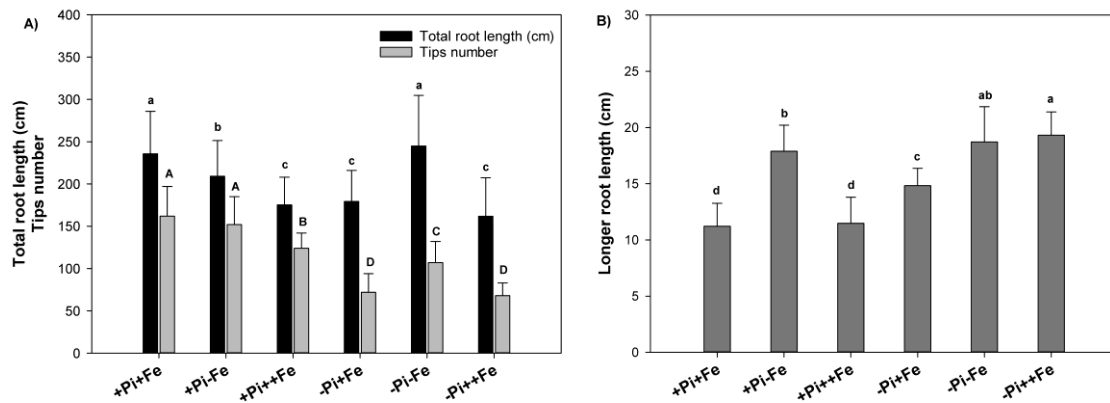


Figure 1. Root parameters. (A) Total root length (cm) and Number of tips, and (B) Longer root length in 15 DAG UFRGS 17 seedlings grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) (n=45). Letters denote different significant classes ($p \leq 0.05$) by ANOVA test with Duncan post-test. Error bars indicate SD.

3.3.2 Influence of phosphorus and iron on root cell growth

We investigated if phosphorus and iron availability affect the number or the size of cell roots. The number of cells from the meristematic zone until the elongation zone was measured as well as the cell size in the elongation zone. In the presence of iron, independently if 50 or 200 μ M, the removal of Pi increased the number of cell roots in the tip (**Fig. 2A**). Removal of iron also increased the number of root tip cells in comparison to +Pi+Fe, whereas excess of iron reduced it.

The effect of absence of iron on cell size was opposite depending on P availability. If P was present the absence of iron caused reduction in root cell size, but the absence of both nutrients increased cell size. Significant differences also were found for changes in Fe concentration in -Pi condition (**Fig. 2B**).

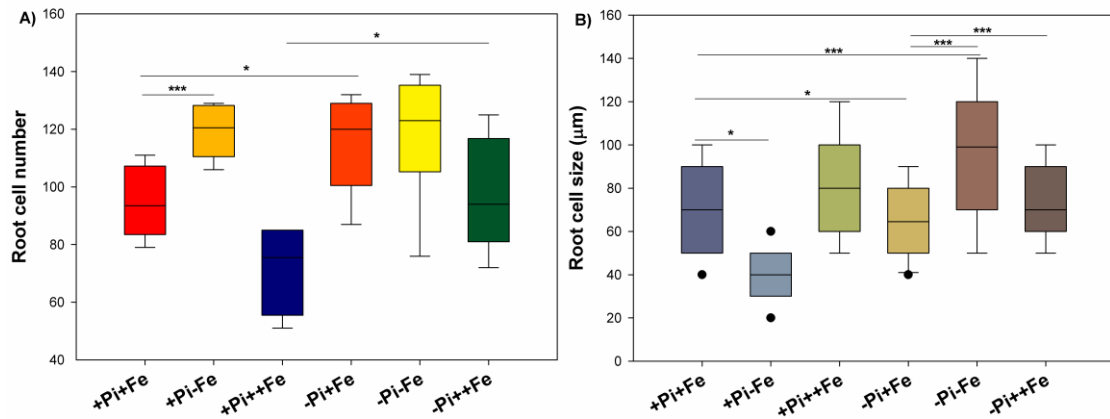


Figure 2. Root cell parameters. **(A)** Root cell number in root tips (n=6) and **(B)** Root cell size in the root elongation zone (n=200) of 15 DAG UFRGS 17 seedlings grown in different conditions of Pi and Fe: +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM); -Pi++Fe (0 mM/200 µM). Asterisks denote significant difference between treatments by Student's t-test or Welch's t-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

3.3.3 Root response of *Avena sativa* to malate supplementation is different from *Arabidopsis thaliana* response

Studies in *Arabidopsis thaliana* found that malate exudation plays a role in limiting root growth under P limitation (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017). To verify if a similar response occurred in oat roots, exogenous malic acid was added to the roots via hydroponic solutions. Different from *Arabidopsis*, the addition of malate to oat roots caused greater total root length in all P and iron availabilities evaluated, and it increased the length of the longest root in all conditions, mainly in -Pi++Fe+M (**Fig. 3; Fig. S3**). It is also possible to observe a significant increase of root dry weight and root volume in -Pi+Fe+M, -Pi++Fe+M when compared with -Pi+Fe and -Pi++Fe (**Table S3**).

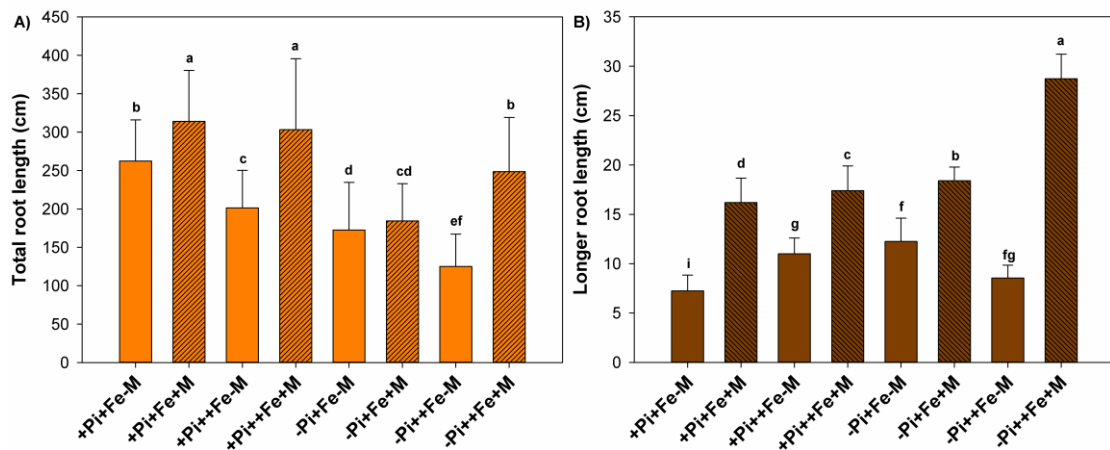


Figure 3. **(A)** Total root length (cm) and **(B)** longest root length of 15 DAG UFRGS 17 seedlings grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe

(0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) + acid malic (M) (200 μ M) (n=45). Letters denote different significant classes ($p \leq 0.05$) by ANOVA test with Duncan post-test. Error bars indicate SD.

3.3.4 Callose deposition in root developmental zones

To analyze whether modifications in the oat root architecture under phosphorus limitation and iron deficiency and excess were related to callose accumulation, we evaluated the callose production in each root development zone. In the meristematic zone, significant callose depositions were found in +Pi-Fe (**Fig. 4C**), -Pi+Fe (**Fig. 4E**), and -Pi-Fe (**Fig. 4F**) treatments. It is possible to observe slightly different patterns in +Pi++Fe (**Fig. 4D**) and -Pi++Fe (**Fig. 4G**) when compared with technical (**Fig. 4A**) and solution (+Pi+Fe) controls (**Fig. 4B**). More callose content was accumulated in the elongation (**Fig. 4M**) and maturation zone (**Fig. S4F**) of -Pi-Fe, in comparison to +Pi+Fe (**Fig. 4I**; **Fig. S4B**), but there were spots and stains in areas of the other conditions in less quantity.

The behavior of callose accumulation in roots exposed to exogenous malate was also investigated. The callose content decreased in some regions of the meristematic zone of +Pi-Fe+M (**Fig. 4Q**), +Pi++Fe+M (**Fig. 4R**), -Pi-Fe+M (**Fig. 4T**), and -Pi++Fe+M (**Fig. 4U**) conditions, in relation to no malate addition treatments.

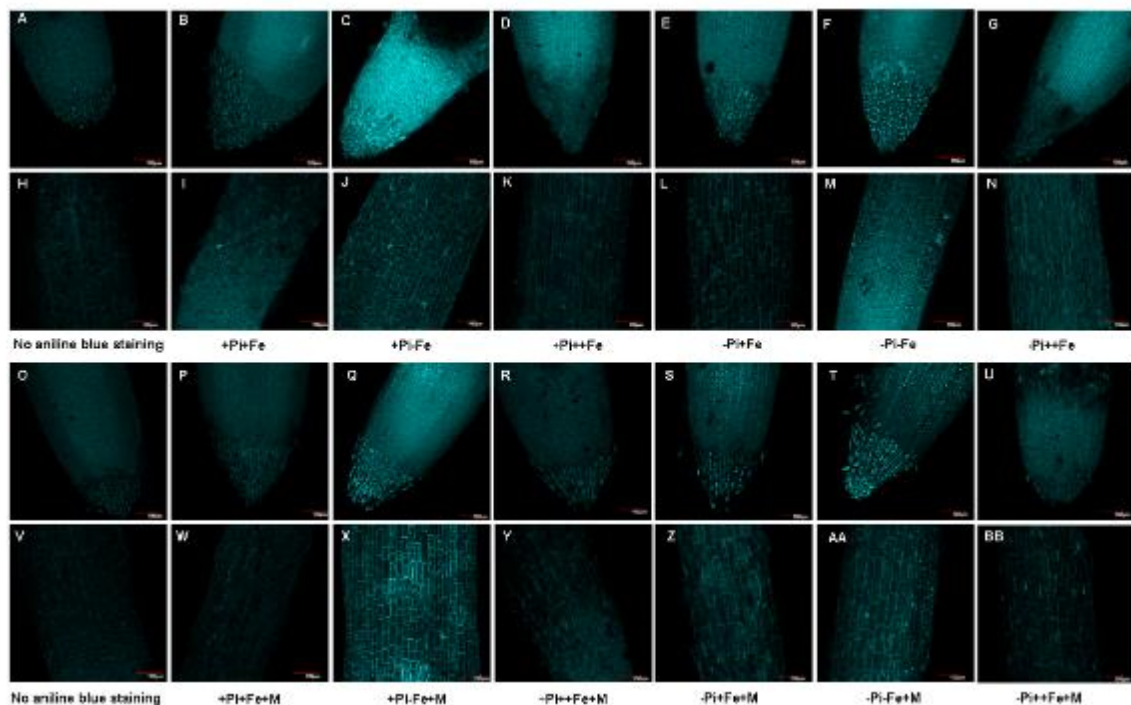


Figure 4. Callose deposition in the root developmental zones of *A. sativa*. Meristematic zone (**A-G**), elongation zone (**H-N**) exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M). Meristematic zone (**O-U**), elongation zone (**V-BB**) exposed to +Pi+Fe; +Pi-Fe; +Pi++Fe; -Pi+Fe; -Pi-Fe; -Pi++Fe + acid malic (M) (200 μ M). Roots stained with the Aniline Blue dye (at pH 7.2). n=3

3.3.5 Iron accumulation detection in *Avena sativa* roots

In order to explore whether low Pi availability in *A. sativa* plants cause Fe accumulation in specific root regions, we evaluated the presence of Fe in different root zones. Then, the roots were stained with Perls/DAB technique, for the negative control (**Fig. S6; Fig. S7**), we removed the Perls reagent (ferrocyanide, responsible for a blue color **fig. S5**). The DAB reagent is responsible for a brown color, intensifying the Fe staining by redox activity of the Prussian blue (Roschztardt et al., 2009). There was a higher amount of Fe accumulated in all root zones of both +Pi+Fe and +Pi++Fe treatments (**Fig. 5G-I**). In -Pi conditions, Fe accumulated mainly in the meristematic zone and a smaller amount was observed in the root maturation zone. The presence of accumulated iron was also evaluated in plant roots exposed to malate supplementation. In malate presence and up to 50 μ M Fe, roots showed a lower Fe content accumulated in the elongation and maturation zone, although not much difference occurred in the meristematic zone (**Fig. 5S,T,V,W**), compared with malate absence (**Fig. 5G,H, J, K**). These results appear to be independent of the presence or absence of phosphorus. In the iron excess condition, malate exogenous presence caused less iron accumulation in the meristematic zone, but no difference was evident for the elongation and maturation zone (**Fig. 5U-X**).

Further, we analyzed Fe presence in different root tissues. For this, roots were transversely sectioned and Fe accumulation was observed qualitatively in the epidermis, cortex, endodermis, vascular cylinder, and apoplast. The results concerning this analysis are presented in **Fig. S8**. The classification of Fe accumulation was divided into no evidence of staining (NE), weak (W), moderate (M), and strong (S) staining (**Table 1**). Epidermis and apoplast were the tissue and region with more Fe accumulated in the majority of treatments. However, stronger staining in these places was observed in -Pi+Fe and -Pi++Fe, compared with +Pi+Fe condition; it suggests that Pi absence can favor accumulation of iron inside the roots (**Table 1; Fig. S8**). Interestingly, exogenous malate seems to have interacted more with DAB than with ferrocyanide (Perls), intensifying the brown color in the sections (**Fig. S8**), although the roots turned blue prior to the DAB intensification (**Fig. S5**). The Fe accumulation in -Pi+Fe+M and -Pi++Fe+M (**Table 1**) did not change with malate addition in the same conditions (**Table 1**).



Figure 5. Fe accumulation and distribution in roots of *A. sativa*. Roots exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) + acid malic (M) (200 μ M). n=3 (A-F) Negative control (NC). Roots submitted only to DAB staining, without ferrocyanide of Perls staining. (G-L) Roots submitted to Perls/DAB staining. (M-R) Negative control (NC) to treatments with acid malic. (S-X). Roots submitted to Perls/DAB staining to treatments with acid malic.

Table 1: Iron accumulation analysis of transversal root sections of *A. sativa* UFRG 17 plants under different Pi and Fe concentrations + malate complementation. NE– no evidence of staining; W – weak staining; M – moderate staining; S – strong staining

| | Epidermis | Cortex | Endodermis | Vascular cylinder | Apoplast |
|-----------|-----------|--------|------------|-------------------|----------|
| +Pi+Fe | M | W | M | M | M |
| +Pi-Fe | W | NE | W | W | W |
| +Pi++Fe | S | M | S | W | M |
| -Pi+Fe | S | M | M | W | S |
| -Pi-Fe | W | NE | W | W | W |
| -Pi++Fe | S | S | M | W | S |
| +Pi+Fe+M | M | S | W | M | S |
| +Pi-Fe+M | W | NE | W | W | W |
| +Pi++Fe+M | S | M | W | W | S |
| -Pi+Fe+M | S | M | M | M | S |
| -Pi-Fe+M | W | W | W | W | W |
| -Pi++Fe+M | S | S | W | W | S |

3.3.6 Expression analyses of candidate genes *STOP1* and *ALMT1*

Aiming to verify the possible involvement of *STOP1* and *ALMT1* genes with phosphorus deficiency in *A. sativa* plants, we analyzed the relative expression of these genes in different treatments of Pi and Fe. We also compared its expression when oat plants were submitted to exogenous malate in hydroponic solutions. The *STOP1* gene expression was downregulated in all conditions when compared to control (+Pi+Fe). Otherwise, *ALMT1* expression was similar to control when phosphorus was present and in -Pi++Fe, showing that Fe concentration combined with phosphorus deficiency may influence the *ALMT1* response. *STOP1* and *ALMT1* was significantly downregulated in -Pi+Fe, when compared with +Pi+Fe (**Fig. 6**).

Malate addition promoted *ALMT1* downregulation in all treatments (**Fig. S9; Fig. 7B**). The gene *STOP1* had its pattern of expression altered in presence of malate in +Pi-Fe+M, +Pi++Fe+M, and -Pi-Fe+M, differing from their respective controls (without exogenous malate) (**Fig. 7A**).

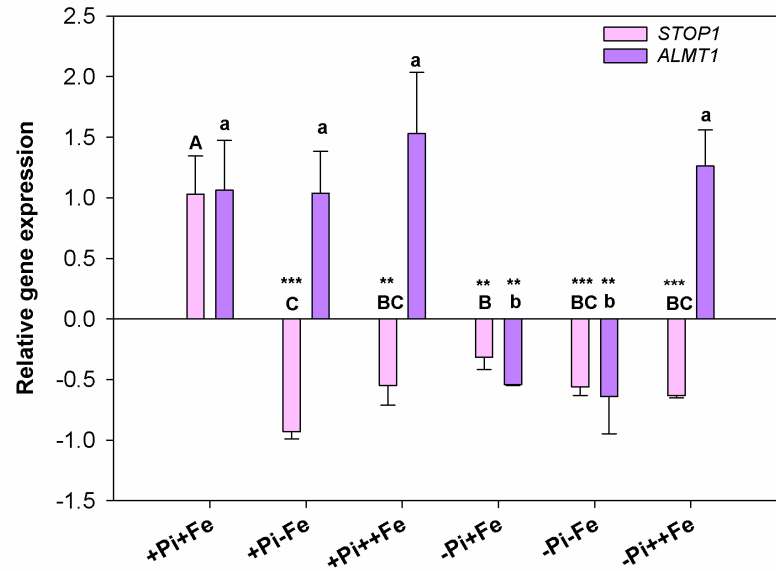


Figure 6. Relative expression of *STOP1* and *ALMT1*. (A) Tips roots of *A. sativa* plants exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) concentrations. Data are presented in relation to the reference genes *Ubiquitin (UBC21)* and *Elongation Factor (Efl-a)* using the efficiency method ($-\Delta\Delta Ct$). Different capital letters indicate differences among the treatments for *STOP1* expression and small letters for *ALMT1* expression by ANOVA test with Tukey post-test ($p \leq 0.05$). Asterisks represents statistically significant differences in relation to the control by Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars indicate standard deviation (SD). Relative expression values were calculated based on three biological replicates (each replicate consisted in a pool of ten plants) with three technical replicates.

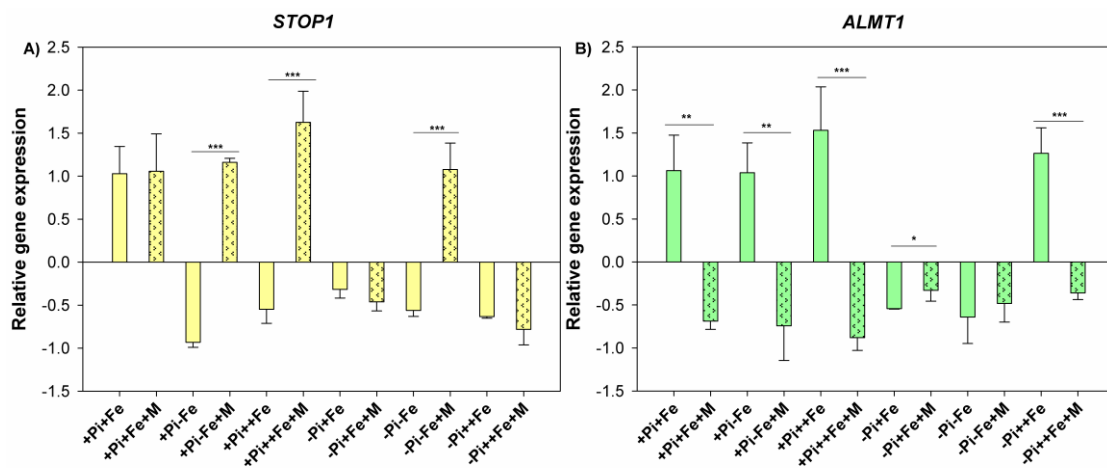


Figure 7. Response of *STOP1* and *ALMT1* candidate genes under exogenous malate presence. (A) Relative gene expression of *STOP1*. (B) Relative gene expression of *ALMT1*. Tips roots of *A. sativa* plants exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) concentrations + acid malic (200 μ M) (M). Data are presented in relation to the reference genes *Ubiquitin (UBC21)* and *Elongation Factor (Efl-a)* using the efficiency method ($-\Delta\Delta Ct$). Asterisks represents statistically significant differences in relation to not addition of exogenous malate by Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars indicate standard deviation (SD). Relative expression values were calculated based on three biological replicates (each replicate consisted of a pool of ten plants) with three technical replicates.

3.4 Discussion

Due to a different root system, monocotyledonous and dicotyledonous species may differ in their root architecture in response to low phosphorus concentration. While it is evident a reduction in the root length of *Arabidopsis thaliana* under -Pi (Sánchez-calderón et al., 2005; Svistoonoff et al., 2007), there is an increment in root length in monocot species such as *Oryza sativa* and *Zea mays* (Ding et al., 2018, 2021; Nguyen & Stangoulis, 2019). In our study, we observed that although there is a reduction in the total length of the root system under phosphorus deficiency and iron presence, there is an increase in the length of the main roots (**Fig. 1**). This result can be related to a higher number of meristematic cells produced up to the limit of the elongation zone in the absence of phosphorus (**Fig. 2**). The total root length is longer in Pi presence only because there is a higher number of branches, represented by the higher tip numbers (**Fig. 1**). In rice, the increase in root length in low Pi was associated with root cell elongation and more endogenous auxin, suggesting that it would have more expansin genes and proteins induced and activated, respectively (Ding et al., 2021). *OsPSTOLI* and their homologues in other Poaceae crops are involved with P uptake and root morphology. Wheat lines with ectopic expression of *OsPSTOLI* developed more crown roots and greater root biomass under low Pi when compared with the no transgenic line. Furthermore, differentially regulated genes related to carbohydrates allocation from photosynthetic source organs to sink tissues were found in roots of transgenic wheat. Thus, the partitioning of carbohydrates from leaves to roots could be influenced by *OsPSTOLI* (Kettenburg et al., 2023). Based on our results, *Avena sativa* plants allocate more sources to produce longer roots in phosphorus deficiency, but in a small number of roots. Equally, Żebrowska et al. (2017) observed that the shoot growth is inhibited in -Pi treatment, but the root elongation is not significantly affected in oats. In addition, it was observed a higher amount of phosphatase production in phosphorus starvation when compared with the control situation. These enzymes can be located in the epidermis of young roots and may be released in the rhizosphere as a response to -Pi, which is suggested as an acclimation mechanism of oat plants in low Pi condition (Żebrowska et al., 2017).

It is known that the root length is negatively correlated with iron in *A. thaliana*. The Pi absence would not be responsible for root inhibition, but the higher Fe availability. Small primary roots during P deficiency would be caused by Fe toxicity in the root tip, confirmed by continuous root growth when Fe is removed from the medium (Ward et al., 2008). Increase of P availability is found in the medium with less Fe, since this metal affects Pi

bioavailability (Svistoonoff et al., 2007). In our findings, iron presence seems to reduce the total root system length because there are fewer lateral roots (branches), but it does not affect the length of the longest root (**Fig 1**). No other symptom of Fe toxicity was observed at 200 μ M, one part of the iron might be stored in root cell vacuoles under -Pi, to alleviate its toxic effect (Fe) in the cytoplasm as suggested for rice plants (Ding et al., 2018).

Organic acids promote a decrease in phosphorus soil adsorption and an increase in its solubilization, making this element more available to plants (Bolan et al., 1994). Malate and citrate are the main organic acids exudated by oat roots, mainly in the latter stages of Pi deficiency (Wang et al., 2016, 2018). Although *ALMT1*, a gene induced by *STOP1*, encodes a malate transporter activated by tolerant plants to aluminum toxicity (Sasaki et al., 2004; Sawaki et al., 2009), pleiotropic effects have been observed in molecular responses to Pi acquisition (Magalhaes et al., 2018). In *A. thaliana* plants it was established that *STOP1-ALMT1* pathway interacts in a parallel way with *LPR1-PDR2* to inhibit cell division in the stem cell niche (SCN) when roots tips are in contact with low phosphorus (Balzergue et al., 2017). Previously, antagonistic relations between Fe and Pi were identified. Iron deposition was found in the cell walls of the RAM and elongation zone during phosphorus limitation modulated by *LPR1* and *PDR2* (Müller et al., 2015). The most intriguing data about this dicot species is that iron accumulation depends on malate (Mora-Macías et al., 2017). Then, in *A. thaliana* it was observed that the primary root growth is not altered by malate complementation under +Pi conditions, but in -Pi conditions malate rescues the mutant phenotype of *stop1* and *almt1* seedlings (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017). Differently in *A. sativa*, acid malic complementation increases the total root length in both phosphorous conditions (-Pi and +Pi), and even in iron-excess situations (**Fig. 3**). These responses agree with the beneficial role played by organic acids in plant nutrition (Schulze et al., 2002; Ryan et al., 2014; Tiziani et al., 2020).

Callose deposits are observed in the root cell walls of plants exposed to a range of biotic and abiotic stresses, among them, metal toxicity (Piršelová et al., 2012). Iron excess, for example, inhibits primary root growth and decreases plasmodesmata permeability via callose synthase regulation (O'Leary et al., 2018). It was found that phosphate limitation triggers callose deposition in the meristems and elongation zones, inhibiting the symplastic communication in the root stem cell niche in *A. thaliana*. However, this deposition in SCN, RAM, and elongation zone also was associated with Fe toxicity response in -Pi conditions (Müller et al., 2015; Balzergue et al., 2017). In *A. sativa* roots, the quantity of callose accumulated in different zones seems not totally associated with iron and low Pi (**Fig. 4**).

Just like in rice (Ding et al., 2018), we found a small amount of callose deposited in the elongation and meristematic zone of oat roots, when compared with *Arabidopsis*. In rice, the high expression of β -1,3 glucanases is suggested as responsible for the reversion of the small callose deposited in low Pi (Ding et al., 2018). Interestingly, in oats, the iron presence decreased the callose content, mainly in the meristematic zone when compared with iron deficiency, independently of the Pi condition. This finding could be related to the “root-to-shoot-to-root” Fe translocation which is absent in plants in zones with iron supply. This translocation model suggests that in an iron deficiency situation, Fe could be redistributed from the shoot to the roots to overcome the necessary concentration to turn off the Fe deficiency responses (Valentinuzzi et al., 2020).

In dicotyledonous species such as *Arabidopsis*, malate has been suggested as a key player in primary root inhibition by promoting iron accumulation in the apoplast of root cells (Mora-Macías et al., 2017). One hypothesis is that in low phosphorus and high iron concentration, malate and Fe^{3+} could form complexes in the cellular walls of the RAM and elongation zone. This would promote the Fe accumulation dependent on *LPRI*, in addition to reactive oxygen species generation and accumulated callose (Balzergue et al., 2017). In our work, we observed more iron accumulated in the meristematic zone of the roots exposed to -Pi, but Fe seems to accumulate in both -Pi and +Pi situations (**Fig. 5**). However, in root sections, it was possible to visualize a stronger Fe accumulation in phosphorus deficiency when compared with phosphorus sufficiency, mainly in the apoplast region (**Fig. S7**). Abiotic stresses can induce the formation of an exodermis closer to the root tip, then its Casparian strips form a barrier to the apoplastic movement of ions (Enstone et al., 2003). Most roots of *A. sativa* plants have an exodermis layer between the epidermis and cortex tissues (Bonnett, 1961). This anatomical condition could prevent iron accumulation in the apoplastic regions, but more accumulation would be expected in the first layers of the root. A similar pattern was found in transversal sections of the oat roots analyzed in our study (**Fig S7**), leading us to infer that stress by phosphorus deficiency and higher iron content can induce exodermis formation in young roots. When exogenous malate is added to the solution, the whole roots have less iron accumulated externally, but there are no significant alterations in root tissues (**Fig 5**). Probably, malic acid forms complexes with the iron that was not absorbed by the roots. Our results could infer that the lack of Pi generates iron accumulation in several root tissues and zones, but it seems not to be induce inhibition of root growth. One possible explanation could be the use of different Fe uptake strategies between the species *Arabidopsis thaliana* and *Avena sativa*. The mechanism by which Fe^{3+} is chelated with

phytosiderophores to be uptake in grasses might cause the iron accumulated inside of root tissues not so harmful as to inhibit the root growth. The chelate form Fe-phytosiderophore might be directly transported from the apoplast or the rhizosphere to the shoot without being released as Fe^{+3} in the root cell.

It was previously mentioned the important role of *STOPI* and *ALMT1* as signals for a pathway in low phosphorus conditions and malate exudation. Our research group has identified three *ALMT1* homologous sequences in the *A. sativa* UFRGS 17 genotype and a deletion in one of these sequences in an aluminum-sensitive genotype, UFRGS 930598-6, indicates that this malate transporter might be a candidate gene for aluminum tolerance in oat (Schneider et al., 2012, 2015) as found in other species (Sasaki et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Collins et al., 2008). Three sequences highly similar to *STOPI* gene were also identified and when a common region for the three sequences was used as primers, the expression was induced in UFRGS 17 root tips, without significant differences between control and low pH, but being modulated by aluminum. Additionally, the same was done to the *ALMT1* sequences, and UFRGS 17 roots had a significantly higher expression in aluminum presence when compared to UFRGS 930598-6 (Dable, 2018). Considering that the Al presence reduces Pi availability, we thought that those genes might be involved in phosphorus signaling in oat roots. The significant downregulation of *STOPI* in all treatments, and to *ALMT1* in phosphorus deficiency (-Pi+Fe, -P-Fe) do not allow us to infer that the *STOPI-ALMT1* pathway is modulated by phosphorus deficiency in oats (**Fig. 6**). In *A. thaliana* was observed *AtALMT1* induction in both conditions -Pi and +Pi at pH 5.5, likewise in our +Pi treatments and -Pi++Fe. Besides that, it has been shown that Fe stimulates the expression of *pALMT1::GUS*, inferring that this gene would not be stimulated by -Pi *per se* (Godon et al., 2019). When exogenous malate is added to the solution, *STOPI* is significantly up-regulated by both +Pi and -Pi (**Fig. 7**). Probably, this response is related to the decrease of pH over the days by the addition of the organic acid (the pH was adjusted to 5.8 shortly after adding malate) because in *A. thaliana* *STOPI* is induced in roots exposed to low pH (Ojeda-Rivera et al., 2020). The candidate gene *ALMT1* is significantly downregulated in almost all treatments with malate, compared with no malate addition in oat roots (**Fig.7**). This could make us assume that the roots are receiving a signal to not exudate malate when the organic acid is freely available in hydroponic solution. In another oat research group, metabolomics analysis found higher exudation of citrate and malate at advanced stages (~after four weeks) of -Pi. In addition, transcripts encoding members of the MATE and ALMT family were up-regulated in Pi absence. It was also found modulation of

transcripts encoding other malate and citrate transporters in -Pi (Wang et al., 2018). It leads us to assume that some other *ALMT* genes might be involved in the response to phosphorus deficiency in *A. sativa* or that the *ALMT1* homologous genes can be induced later. Summarizing, when oat plants are exposed to phosphorus deficiency the roots are longer and less branched due to increase of both the meristematic cell number and size cell in the elongation zone. Callose deposits can be formed and iron is more accumulated in the apoplast region. The malate presence seems to modify these processes, including *ALMT1* expression.

3.5 Conclusion

In conclusion, our data suggest that phosphorus deficiency promotes root architecture modifications of *Avena sativa* plants, causing a decrease in the total length of the root system. This decrease is due to a root system less branched, but the individual roots are longer, due to a slight increase in number and size of root cells. The lack of phosphorus leads to iron accumulation in the epidermis root and in the apoplast of the cortex first layers, although the Fe accumulated might not be a principal factor to alter the root architecture.

3.6 Author contributions

C.A.D and J.F.S planned and supervised the study; J.F.S, M.W. and F.K executed the experiments; J.F.S contributed to the root parameters, callose and iron accumulation analysis, besides to perform qPCR assays e its analysis; M.W contributed to image J analysis; T.P. contributed to the iron accumulation experiment, including execution of transversal and longitudinal root sections; C.A.D., J.F.S, F.R. and A.M. contributed to the interpretation of the data and provided intellectual input; J.F.S. drafted manuscript with contributions of all the authors. All authors read and approved the final manuscript.

3.7 Acknowledgments

The authors are grateful to professor Marcelo Teixeira Pacheco (Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil) for all advice in the statistical analysis. We thank Charleston dos Santos Lima for teaching the use of Sigmaplot and Vanessa Freitas Duarte for experimental help. We are grateful to lab technicians Fábio Bernt and Gustavo Maia Leão for all the

support in the Biotechnology Lab, and Henrique Beck Biehl for acquiring the images in the confocal microscope. This study was financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (CNPq).

3.8 Data availability statement

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

3.9 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

3.10 References

- Balzerque, C., Dartevelle, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J.M., Creff, A., Bissler, M., Brouchoud, C., Hagège, A., Müller, J., Chiarenza, S., Javot, H., Becuwe-Linka, N., David, P., Péret, B., Delannoy, E., Thibaud, M.C., Armengaud, J., Abel, S., Pellequer, J.L., Nussaume, L. & Desnos, T. (2017) Low phosphate activates *STOP1-ALMT1* to rapidly inhibit root cell elongation. *Nature Communication*, 8 (15), 11–16
- Becker, M. & Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice - Conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168 (4), 558–573
- Bienfait, H.F., Bino, R.J., Van der Blik, A.M., Duivenvoorden, J.F. & Fontaine, J.M. (1983) Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 59 (2), 196–202
- Bolan, N.S., Naidu, R., Mahimairaja, S. & Baskaran, S. (1994) Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils*, 18 (4), 311–319
- Bonnett, O.T. (1961) Roots. The Oat Plant: Its Histology and Development. Bulletin 672, University Ed. p. 112
- Bowler, M.W., Cliff, M.J., Waltho, J.P. & Blackburn, G.M. (2010) Why did nature select phosphate for its dominant roles in biology? *New Journal of Chemistry*, 34 (5), 784–794

- Castilhos, G., Farias, J.G., Schneider, A.B., Oliveira, P.H., Nicoloso, F.T., Chitolina Schetinger, M.R. & Delatorre, C.A. (2011) Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 74 (1), 114–121
- Collins, N.C., Shirley, N.J., Saeed, M., Pallotta, M. & Gustafson, J.P. (2008) An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics*, 179 (1), 669–682
- Conab - National Supply Company (2022) Oat. Available at: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/item/7686-aveia>
- Dable, A.L.W. (2018) Cloning and expression analysis of candidate sequences of *STOP1* and *ALMT1* in oat (*Avena sativa* L.). Federal University of Rio Grande do Sul. Dissertation
- Ding, Y., Wang, Z., Mo, S., Liu, J., Xing, Y., Wang, Y., Ge, C. & Wang, Y. (2021) Mechanism of low phosphorus inducing the main root lengthening of rice. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40 (3), 1032–1043
- Ding, Y., Wang, Z., Ren, M., Zhang, P., Li, Z., Chen, S., Ge, C. & Wang, Y. (2018) Iron and callose homeostatic regulation in rice roots under low phosphorus. *BMC Plant Biology*, 18 (326), 1–14
- Enstone, D.E., Peterson, C.A. & Ma, F. (2003) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (4), 335–351
- Godon, C., Mercier, C., Wang, X., David, P., Richaud, P., Nussaume, L., Liu, D. & Desnos, T. (2019) Under phosphate starvation conditions, Fe and Al trigger accumulation of the transcription factor STOP1 in the nucleus of *Arabidopsis* root cells. *The Plant Journal*, 99 (5), 937–949
- Hervé, C.B., Calai, F.A., Nava, I.C. & Delatorre, C.A. (2013) Aluminum tolerance in elite Brazilian oat germplasm. *Ciência Rural*, 43 (8), 1364–1370
- Jansa, J., Mozafar, A. & Frossard, E. (2005) Phosphorus acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal fungal community of a single field site. *Plant and Soil*, 276 (1-2), 163–176
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T.J., Danku, J., Salt, D.E. & Amtmann, A. (2014) Analysis of the root system architecture of *Arabidopsis* provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *The Plant Cell*, 26 (4), 1480–1496
- Kemen, A.C., Honkanen, S., Melton, R.E., Findlay, K.C., Mugford, S.T., Hayashi, K.,

- Haralampidis, K., Rosser, S.J. & Osbourn, A. (2014) Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (23), 8679–8684
- Kettenburg, A.T., Lopez, M.A., Yogendra, K., Prior, M.J., Rose, T., Bimson, S., Heuer, S., Roy, S.J. & Bailey-Serres, J. (2023) *PHOSPHRUS-STARVATION TOLERANCE 1 (OsPSTOL1)* is prevalent in upland rice and its expression in wheat enhances root growth and hastens low phosphate signaling. *Plant, Cell and Environment*, 1, 1–19
- Kobayashi, Y., Hoekenga, O.A., Itoh, H., Nakashima, M., Saito, S., Shaff, J.E., Maron, L.G., Piñeros, M.A., Kochian, L.V. & Koyama, H. (2007) Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145 (3), 843–852
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4), 402–408
- Lynch, J.P. (2011) Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology*, 156 (3), 1041–1049
- Lynch, J.P. & Brown, K.M. (2001) Topsoil foraging - an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 237 (2), 225–237
- Magalhaes, J.V., Piñeros, M.A., Maciel, L.S. & Kochian, L.V. (2018) Emerging pleiotropic mechanisms underlying aluminum resistance and phosphorus acquisition on acidic soils. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–12
- 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. & 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*, 114 (17), E3563–E3572
- Morrissey, J. & Guerinot, M. L. (2009) Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Review*, 109 (10), 4553–4567
- Müller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K.L., Hause, G., Dinesh, D.C., Bürstenbinder, K. & Abel, S. (2015) Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental Cell*, 33 (2), 216–230
- Nava, I.C., Delatorre, C.A., Lima Duarte, I.T., Pacheco, M.T. & Federizzi, L.C. (2006) Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). *Euphytica*, 148 (3), 353–358

- Nava, I.C., Delatorre, C.A., Pacheco, M.T., Scheeren, P.L. & Federizzi, L.C. (2016) Aluminium tolerance of oat cultivars under hydroponic and acid soil conditions. *Experimental Agriculture*, 52 (2), 224–236
- Nguyen, V.L. & Stangoulis, J. (2019) Variation in root system architecture and morphology of two wheat genotypes is a predictor of their tolerance to phosphorus deficiency. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41 (109), 1–13
- O’Lexy, R., Kasai, K., Clark, N., Fujiwara, T., Sozzani, R. & Gallagher, K.L. (2018) Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and breakdown of callose. *Journal of Experimental Botany*, 69 (15), 3715–3728
- Ojeda-Rivera, J.O., Oropeza-Aburto, A. & Herrera-Estrella, L. (2020) Dissection of root transcriptional responses to low pH , aluminum toxicity and iron excess under Pi-limiting conditions in *Arabidopsis* wild-type and *stop1* seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 11, 01200
- Piršelová, B., Mistríková, V., Libantová, J., Moravčíková, J. & Matušíková, I. (2012) Study on metal-triggered callose deposition in roots of maize and soybean. *Biologia*, 67 (4), 698–705
- Ricachenevsky, F.K. & Sperotto, R.A. (2014) There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. *Frontiers in Plant Science*, 5 (189), 1–5
- Rodrigues, M., Pavinato, P.S., Withers, P.J.A., Teles, A.P.B. & Herrera, W.F.B. (2016) Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. *Science of Total Environmental*, 542, 1050–1061
- Romheld, V. & Marschner, H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80 (1), 175–180
- Roschttardt, H., Conéjéro, G., Curie, C. & Mari, S. (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiology*, 151 (3), 1329–1338
- Roy, E.D., Richards, P.D., Martinelli, L.A., Coletta, L. D., Lins, S.R.M., Vazquez, F.F., Willig, E., Spera, S.A., VanWey, L.K. & Porder, S. (2016) The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants*, 2, 16043
- Ryan, P.R., James, R.A., Weligama, C., Delhaize, E., Rattey, A., Lewis, D.C., Bovill, W.D., McDonald, G., Rathjen, T.M., Wang, E., Fettell, N.A. & Richardson, A.E. (2014) Can citrate efflux from roots improve phosphorus uptake by plants? Testing

- the hypothesis with near-isogenic lines of wheat. *Physiologia Plantarum*, 151 (3), 230–242
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G. & Herrera-Estrella, L. (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 46 (1), 174–184
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E. & Matsumoto, H. (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37 (5), 645–653
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., Fujita, M., Shinozaki, K., Shibata, D., Kobayashi, M. & Koyama, H. (2009) *STOP1* regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiology*, 150 (1), 281–294
- Schneider, A.B., Nava, I.C., Hervé, C.B., Islamovic, E., Limberger, E., Jackson, E.W. & Delatorre, C.A. (2015) Chromosome-anchored QTL conferring aluminum tolerance in hexaploid oat. *Molecular Breeding*, 35, 121
- Schneider, A.B., Campbell, R.D., Islamovic, E., Delatorre, C.A. (2012) Identification and characterization of *Aluminum Malate Transporter 1* (*ALMT1*) gene in *Avena sativa* L. Conference: XXXII Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 1, 1–5
- Schulze, J., Tesfaye, M., Litjens, R.H.M.G., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., Allan, D. & Vance, C.P. (2002) Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant and Soil*, 247 (1), 133–139
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L. & Desnos, T. (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics*, 39 (6), 792–796
- Takagi, S.I. (1976) Naturally occurring iron- chelating compounds in oat- and rice-rootwashings 1. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22 (4), 423–433
- Tang, H., Chen, X., Gao, Y., Hong, L. & Chen, Y. (2020) Alteration in root morphological and physiological traits of two maize cultivars in response to phosphorus deficiency. *Rhizosphere*, 14, 100201
- Thomine, S.; Vert, G. (2013) Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16 (3), 322-327
- Ticconi, C.A., Delatorre, C.A., Lahner, B., Salt, D.E. & Abel, S. (2004) *Arabidopsis pdr2*

- reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *The Plant Journal*, 37 (96), 801–814
- Tiziani, R., Pii, Y., Celletti, S., Cesco, S. & Mimmo, T. (2020) Phosphorus deficiency changes carbon isotope fractionation and triggers exudate reacquisition in tomato plants. *Scientific Reports*, 10, 15970
- Valentinuzzi, F., Pii, Y., Roberto, T., Chiara, M., Maria, G., Astol, S., Mimmo, T., Cesco, S. (2020) Root-shoot-root Fe translocation in cucumber plants grown in a heterogeneous Fe provision. *Plant Science*, 293, 110431
- Wairich, A., de Oliveira, B.H.N., Arend, E.B., Duarte, G.L., Ponte, L.R., Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K. & Fett, J.P. (2019) The combined strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). *Scientific Reports*, 9, 16144
- Wang, J., Qin, Q., Pan, J., Sun, L. & Sun, Y. (2019) Transcriptome analysis in roots and leaves of wheat seedlings in response to low-phosphorus stress. *Scientific Reports*, 9, 19802
- Wang, Y., Krogstad, T., Clarke, J.L., Hallama, M., Øgaard, A.F., Eich-Greatorex, S., Kandeler, E. & Clarke, N. (2016) Rhizosphere organic anions play a minor role in improving crop species' ability to take up residual phosphorus (P) in agricultural soils low in P availability. *Frontiers in Plant Science*, 7, 19802
- Wang, Y., Lysøe, E., Armarego-Marriott, T., Erban, A., Paruch, L., Van Eerde, A., Bock, R., Liu-Clarke, J. (2018) Transcriptome and metabolome analyses provide insights into root and root-released organic anion responses to phosphorus deficiency in oat. *Journal of Experimental Botany*, 69 (15), 3759–3771
- Ward, J.T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D.E., Raghothama, K.G. (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 147 (3), 1181–1191
- Withers, P.J.A., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., De Carvalho, T.S., Guilherme, L.R.G., Benites, V.D.M., Gatiboni, L.C., De Sousa, D.M.G., Nunes, R.D.S., Rosolem, C.A., Andreote, F.D., Oliveira, A. De., Coutinho, E.L.M. & Pavinato, P.S. (2018) Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific Reports*, 8, 2537
- Yadav, R. & Tarafdar, J. (2001) Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils*, 34, 140–143
- Yang, Z., Wang, K., Aziz, U., Zhao, C. & Zhang, M. (2020) Evaluation of duplicated

- reference genes for quantitative real-time PCR analysis in genome unknown hexaploid oat (*Avena sativa* L.). *Plant Methods*, 16 (138), 1–14
- Żebrowska, E., Milewska, M. & Ciereszko, I. (2017) Mechanisms of oat (*Avena sativa* L.) acclimation to phosphate deficiency. *PeerJ*, 5, e3989
- Zhou, Y., Neuhäuser, B., Neumann, G. & Ludewig, U. (2020) *LaALMT1* mediates malate release from phosphorus-deficient white lupin root tips and metal root to shoot translocation. *Plant Cell and Environment*, 43 (7), 1691–1706

3.11 Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article:

Table S1. Primer sequences of candidate and reference genes used for RT-qPCR on *Avena sativa* L. roots.
*Not described

| Primer | | Sequence | Amplicon size (pb) | Source |
|------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| STOP_F5 | Forward (5' → 3') | ACGTGAAGGAGAGCGATGAT | 230 | (Dable, 2018) |
| STOP_R3 | Reverse (5' → 3') | GTTCAACGGCGAGAAATAGC | | |
| ALMT_F496 | Forward (5' → 3') | CCGGAGATCAAGGCCAAGTACG | 179 | (Dable, 2018) |
| ATLM_R654 | Reverse (5' → 3') | CCAGACGGGGAAGAGGAAGACGG | | |
| UBC21_F | Forward (5' → 3') | GCCCATCGGAGACACCTTTTG | 133 | (Yang et al., 2020) |
| UBC21_R | Reverse (5' → 3') | CCTGTCTTGAAGTGAACATTTGG | | |
| EF1- α _F | Forward (5' → 3') | TCCCCATCTCTGGATTTGAG | Nd* | (Kemen et al., 2014) |
| EF1- α _R | Reverse (5' → 3') | TCTCTTGGGCTCGTTGATCT | | |
| HNR_F | Forward (5' → 3') | ATTGGGTTTGTCACTTCCGTAG | 134 | (Yang et al., 2020) |
| HNR_R | Reverse (5' → 3') | CTTGGAGGGTGTCTCGCATCT | | |

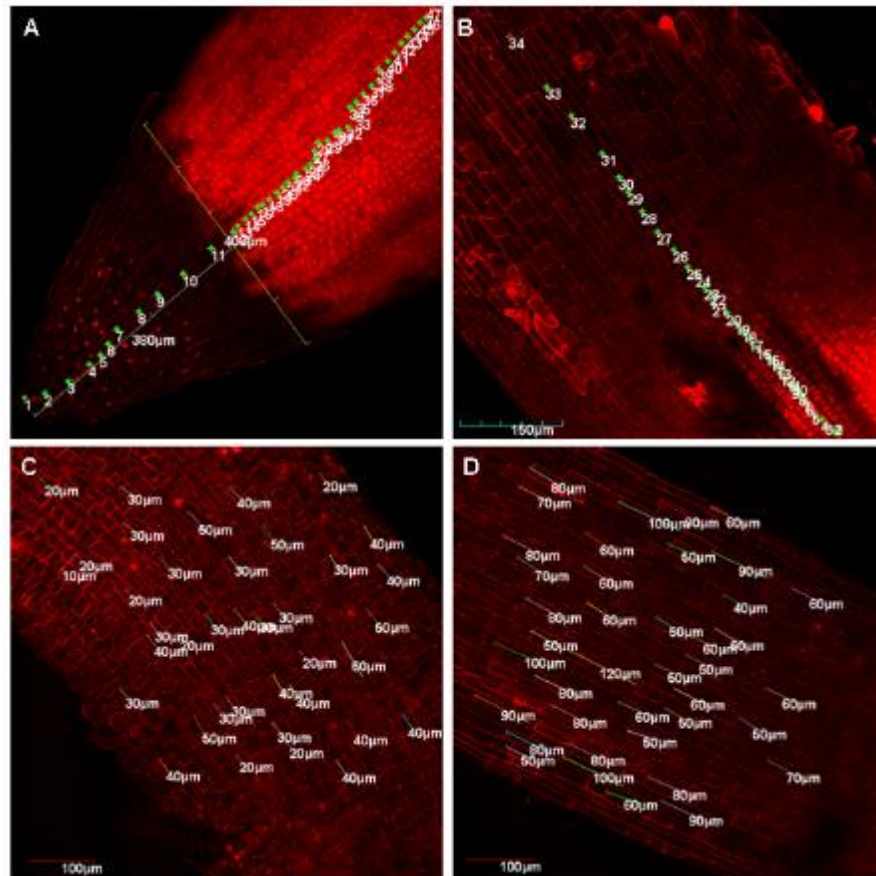


Figure S1. Examples of confocal images of *Avena sativa* root tips (UFRGS 17) at 15 DAG dipped in a 10 µg/ml Propidium Iodide (PI) and analyzed with Olympus Fluoview software to numbers root cell (**A**; **B**) and size cell root (**C**; **D**).



Figure S2. *Avena sativa* seedlings (UFRGS 17) at 15 DAG grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 µM); +Pi-Fe (0.5 mM/0 µM); +Pi++Fe (0.5 mM/200 µM); -Pi+Fe (0 mM/50 µM); -Pi-Fe (0 mM/0 µM) and -Pi++Fe (0 mM/200 µM).



Figure S3. *Avena sativa* seedlings (UFRGS 17) at 15 DAG grown in +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M). Plants purely illustrative chosen at random.

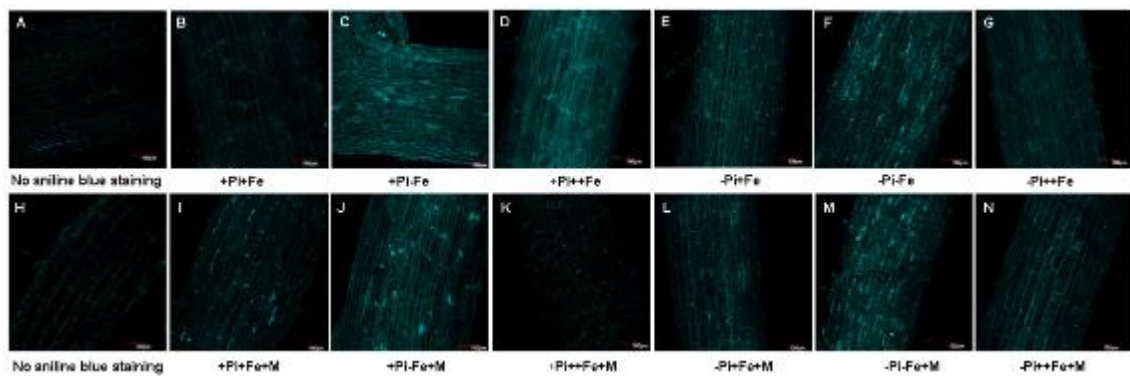


Figure S4. Callose deposition in the root developmental zones of *A. sativa*. Maturation zone (A-G) exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) + acid malic (200 μ M). n=3. Maturation zone (H-N). Roots stained with Aniline Blue dye (at pH 7.2).

Table S2. Root parameters evaluated in oat plants exposed to different phosphorus and iron conditions.

| | Treatments | | | | | |
|--|--------------------------------------|-------------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M) | +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M) | +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M) | -Pi+Fe (0 mM/50 μ M) | -Pi-Fe (0 mM/0 μ M) | -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) |
| Shoot dry weight(g) | 0.114a (\pm 0.02) | 0.058c (\pm 0.02) | 0.097b (\pm 0.02) | 0.052cd (\pm 0.01) | 0.050de (\pm 0.01) | 0.044e (\pm 0.01) |
| Root dry weight (g) | 0.032a (\pm 0.01) | 0.0198d (\pm 0.004) | 0.029b (\pm 0.01) | 0.025c (\pm 0.01) | 0.027b (\pm 0.01) | 0.022c (\pm 0.01) |
| Total length (cm) | 235.69a (\pm 50.18) | 209.24b (\pm 42.08) | 175.30c (\pm 32.83) | 179.34c (\pm 36.72) | 244.97a (\pm 59.76) | 161.70c (\pm 45.68) |
| Area (cm²) | 31.41a (\pm 6.10) | 21.81c (\pm 4.97) | 23.33bc (\pm 4.36) | 19.22d (\pm 3.33) | 25.09b (\pm 6.13) | 18.19d (\pm 4.45) |
| Volume (cm³) | 0.33a (\pm 0.07) | 0.18cd (\pm 0.05) | 0.25b (\pm 0.05) | 0.17d (\pm 0.04) | 0.20c (\pm 0.05) | 0.17d (\pm 0.05) |
| Tips number | 162a (\pm 35) | 152a (\pm 33) | 124b (\pm 18) | 72d (\pm 22) | 107c (\pm 25) | 68d (\pm 15) |
| Length with diameter between 0 – 0.5 mm | 175.50b (\pm 45.58) | 182.13b (\pm 42.70) | 129.98c (\pm 30.72) | 144.73c (\pm 30.94) | 208.74a (\pm 50.47) | 127.18c (\pm 39.24) |
| Length with diameter between 0.5 – 1.0 mm | 37.09a (\pm 6.86) | 23.69d (\pm 7.75) | 34.72ab (\pm 7.10) | 29.29c (\pm 5.89) | 34.93ab (\pm 11.35) | 31.09bc (\pm 12.10) |
| Length with diameter between 1 – 1.5 mm | 14.31a (\pm 5.26) | 2.41c (\pm 1.34) | 6.83b (\pm 3.79) | 1.83c (\pm 0.81) | 1.36d (\pm 0.71) | 1.27d (\pm 0.75) |

Table S3. Root parameters evaluated in oat plants exposed to different phosphorus and iron conditions + exogenous malate

| | Treatments | | | | | |
|--|--|--|--|---|--|--|
| | +Pi+Fe-M (0.5 mM/50 μ M/0 μ M) | +Pi+Fe+M (0.5 mM/50 μ M/200 μ M) | +Pi-Fe-M (0.5 mM/0 μ M/ 0 μ M) | +Pi-Fe+M (0.5 mM/0 μ M/200 μ M) | +Pi++Fe-M (0.5 mM/200 μ M/200 μ M) | +Pi++Fe+M (0.5 mM/200 μ M/200 μ M) |
| Shoot dry weight(g) | 0.101 b (\pm 0.02) | 0.109 a (\pm 0.02) | 0.071 c (\pm 0.02) | 0.038 f (\pm 0.04) | 0.095 b (\pm 0.02) | 0.096 b (\pm 0.03) |
| Root dry weight (g) | 0.031 a (\pm 0.006) | 0.030 ab (\pm 0.01) | 0.019 d (\pm 0.005) | 0.010 e (\pm 0.003) | 0.027 b (\pm 0.007) | 0.028 ab (\pm 0.01) |
| Total length (cm) | 262.44 b (\pm 53.6) | 314.04 a (\pm 66.37) | 147.03 e (\pm 39.2) | 113.29 f (\pm 28.53) | 201.41 c (\pm 48.8) | 303.31 a (\pm 92.39) |
| Longer root length (cm) | 7.3 i (\pm 1.6) | 16.2 d (\pm 2.5) | 12.1 f (\pm 1.9) | 9.3 h (\pm 1.9) | 11.0 g (\pm 1.6) | 17.4 c (\pm 2.1) |
| Area (cm²) | 35.17 a (\pm 7.0) | 34.63 a (\pm 8.33) | 18.44 de (\pm 4.9) | 13.28 f (\pm 3.56) | 28.53 b (\pm 7.9) | 36.50 a (\pm 13.26) |
| Volume (cm³) | 0.38 a (\pm 0.08) | 0.32 b (\pm 0.08) | 0.19 e (\pm 0.05) | 0.12 g (\pm 0.03) | 0.31 b (\pm 0.09) | 0.35 b (\pm 0.12) |
| Tips number | 329 a (\pm 82) | 299 a (\pm 71) | 198 cd (\pm 52) | 139 e (\pm 32) | 288 b (\pm 80) | 220 c (\pm 61) |
| Length with diameter between 0 – 0.5 mm | 193.46 b (\pm 42.3) | 245.54 a (\pm 54.96) | 115.90 d (\pm 31.5) | 92.27 e (\pm 20.82) | 149.67 c (\pm 39.8) | 232.93 a (\pm 73.03) |
| Length with diameter between 0.5 – 1.0 mm | 49.84 bc (\pm 10.5) | 57.84 ab (\pm 17.57) | 24.82 g (\pm 8.1) | 17.76 h (\pm 6.56) | 39.25 e (\pm 12.6) | 61.94 a (\pm 19.77) |
| Length with diameter between 1 – 1.5 mm | 15.27 a (\pm 5.54) | 7.70 c (\pm 3.91) | 4.70 d (\pm 2.57) | 1.34 g (\pm 0.74) | 11.56 b (\pm 5.49) | 6.05 d (\pm 4.06) |

Cont. Table S3. Root parameters evaluated in oat plants exposed to different phosphorus and iron conditions + exogenous malate

| | Treatments | | | | | |
|--|--|--|---|---|--|--|
| | -Pi+Fe-M (0 mM/50 μ M/0 μ M) | -Pi+Fe+M (0 mM/50 μ M/200 μ M) | -Pi-Fe-M (0 mM/0 μ M/0 μ M) | -Pi-Fe+M (0 mM/0 μ M/200 μ M) | -Pi++Fe-M (0 mM/200 μ M/0 μ M) | -Pi++Fe+M (0 mM/200 μ M/200 μ M) |
| Shoot dry weight(g) | 0.048e (\pm 0.01) | 0.059d (\pm 0.01) | 0.040ef (\pm 0.01) | 0.041ef (\pm 0.01) | 0.047e (\pm 0.01) | 0.043ef (\pm 0.01) |
| Root dry weight (g) | 0.023c (\pm 0.005) | 0.027b (\pm 0.01) | 0.017d (\pm 0.005) | 0.017d (\pm 0.01) | 0.020d (\pm 0.004) | 0.029ab (\pm 0.01) |
| Total length (cm) | 172.36d (\pm 62.3) | 184.52cd (\pm 48.49) | 139.84e (\pm 49.5) | 111.55f (\pm 31.91) | 125.09ef (\pm 41.9) | 248.57b (\pm 70.61) |
| Longer root length (cm) | 12.2f (\pm 2.4) | 18.4b (\pm 1.4) | 13.1d (\pm 2.6) | 13.2d (\pm 2.5) | 8.5fg (\pm 1.3) | 28.74a (\pm 2.5) |
| Area (cm²) | 20.12cd (\pm 6.5) | 22.02c (\pm 5.01) | 16.37ef (\pm 5.1) | 14.78f (\pm 4.87) | 15.19f (\pm 4.3) | 27.16b (\pm 7.46) |
| Volume (cm³) | 0.18e (\pm 0.04) | 0.21d (\pm 0.04) | 0.15f (\pm 0.04) | 0.15f (\pm 0.05) | 0.15f (\pm 0.04) | 0.23c (\pm 0.05) |
| Tips number | 116f (\pm 48) | 104fg (\pm 31) | 83g (\pm 28) | 81g (\pm 21) | 91g (\pm 32) | 181d (\pm 51) |
| Length with diameter between 0 – 0.5 mm | 146.73c (\pm 67.1) | 143.29c (\pm 43.58) | 118.05d (\pm 48.1) | 85.10e (\pm 28.48) | 98.07de (\pm 38.2) | 194.34b (\pm 57.62) |
| Length with diameter between 0.5 – 1.0 mm | 30.01f (\pm 7.9) | 46.70cd (\pm 13.83) | 22.81g (\pm 8.7) | 26.29g (\pm 12.02) | 23.33g (\pm 6.1) | 43.94de (\pm 18.12) |
| Length with diameter between 1 – 1.5 mm | 1.60fg (\pm 1.01) | 1.01h (\pm 0.62) | 0.94h (\pm 0.72) | 1.00h (\pm 0.57) | 2.22e (\pm 0.87) | 1.74f (\pm 0.73) |

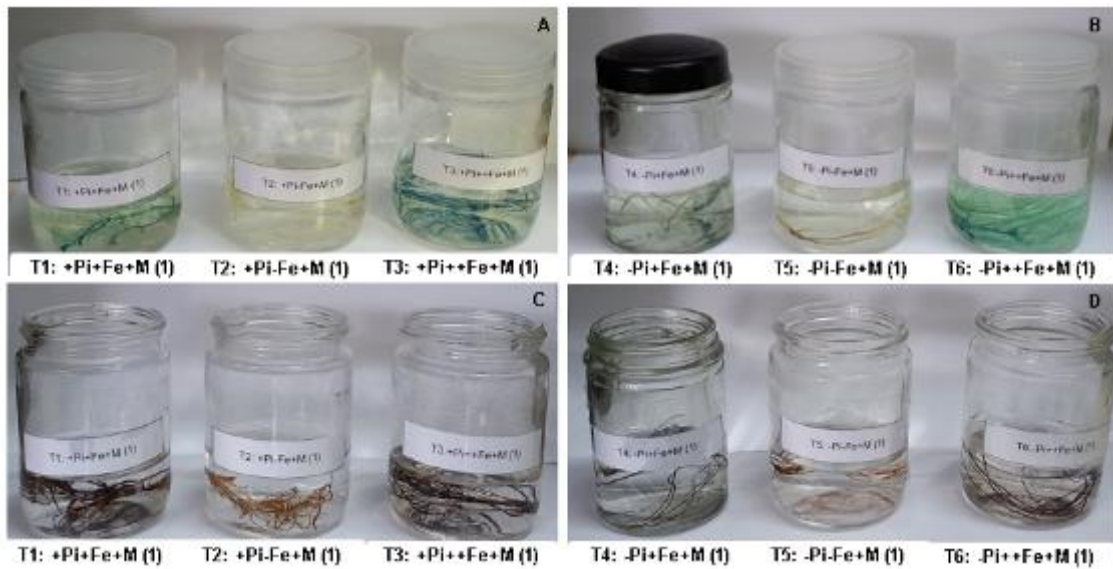


Figure S5. Perls/DAB staining in *Avena sativa* roots growth in +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) + acid malic (200 μ M). (A-B) Roots after only Perls staining. (C-D) Roots after Perls/DAB staining.

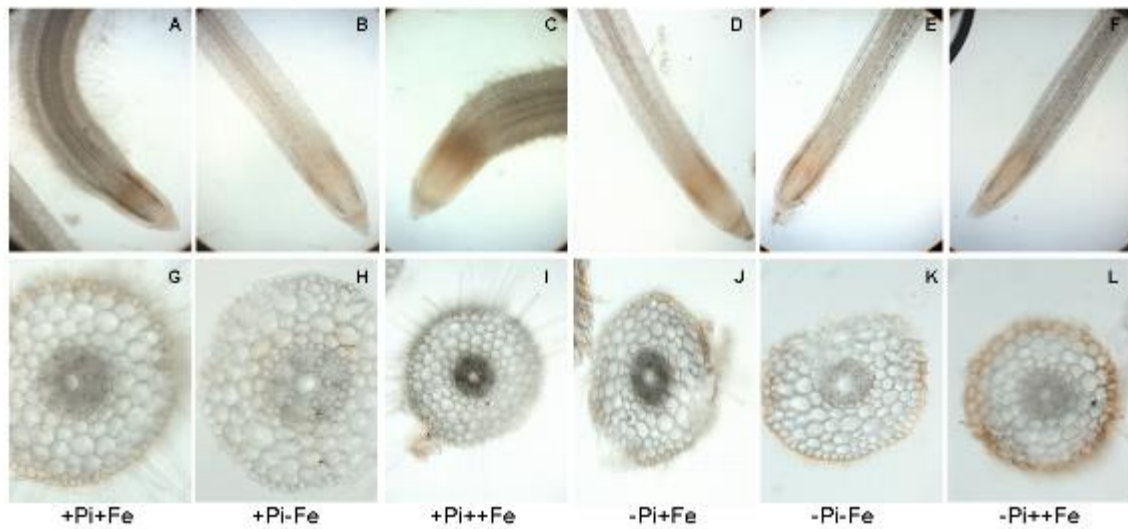


Figure S6. Perls/DAB technical control in roots of *A. sativa*. Roots (A-F) and transversal sections (G-L) of plants submitted to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0mM/0 μ M); -Pi++Fe (0mM/200 μ M) concentrations without Pearls/DAB staining.

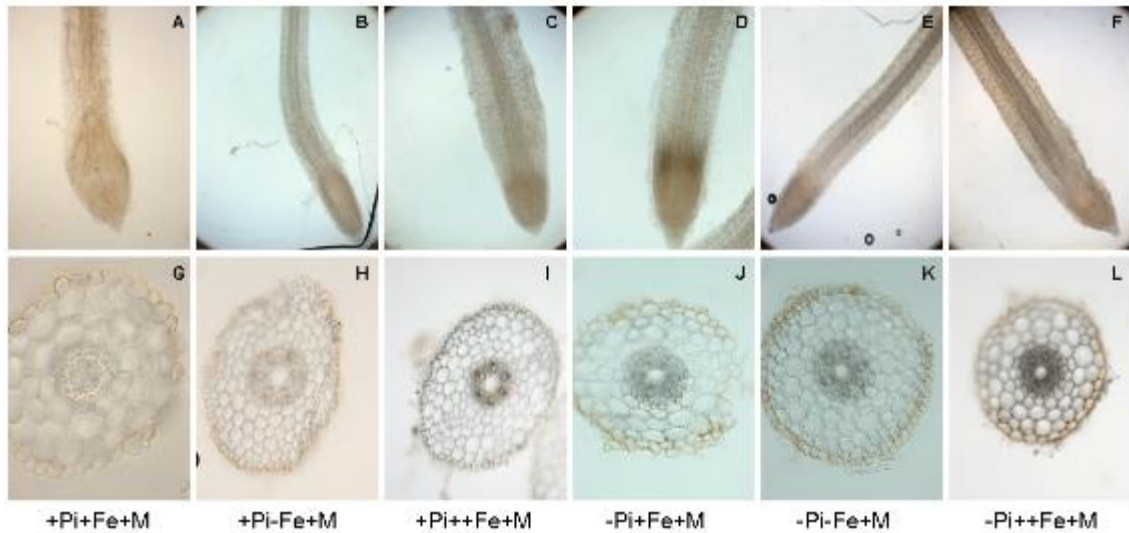


Figure S7. Perls/DAB technical control in roots of *A. sativa* with exogenous malate. Roots (A-F) and transversal sections (G-L) of plants submitted to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) concentrations + acid malic (200 μ M) without Perls/DAB staining.

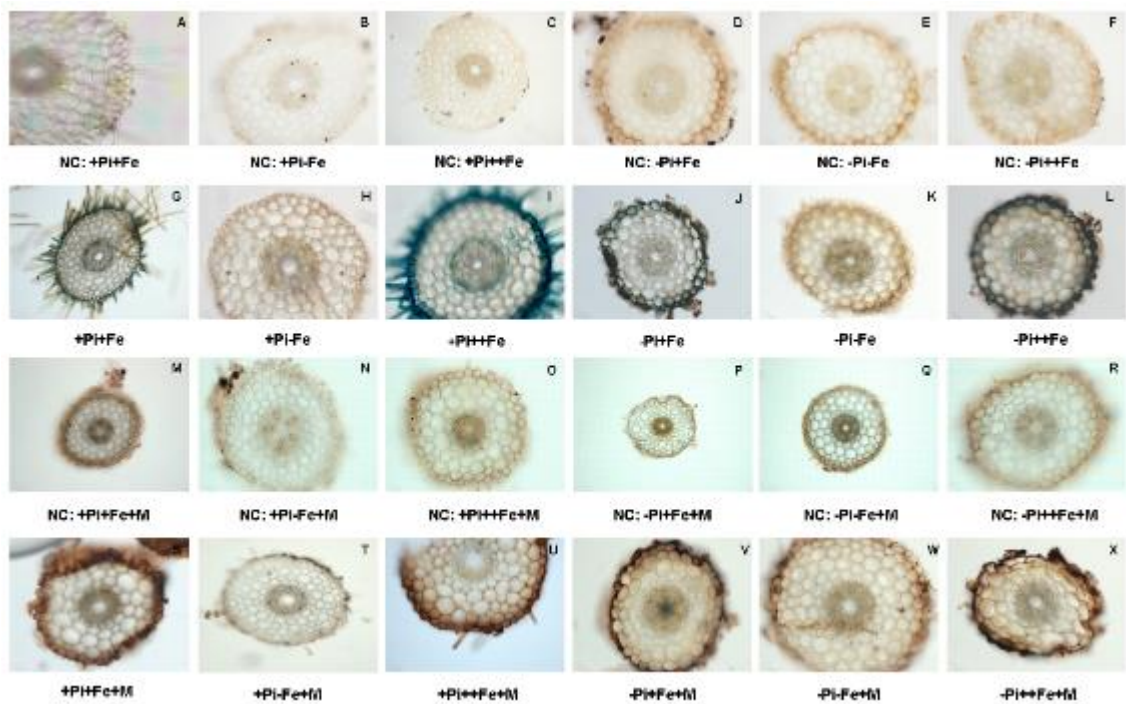


Figure S8. Fe accumulation in transversal sections roots of *A. sativa*. Roots exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) concentrations. n=3. (A-F) Negative control (NC). Roots submitted the DAB staining, but without ferrocyanide of Perls staining. (G-L) Roots submitted to Perls/DAB staining. (M-R) Negative control (NC) to malate treatment (M). Roots submitted the DAB, but without ferrocyanide of Perls staining. (S-X) Roots of malate treatment (M) submitted to Perls/DAB staining.

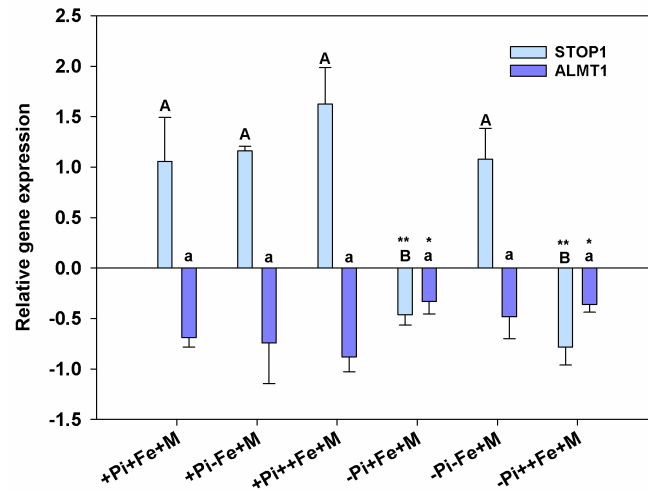


Figure S9. Relative expression of *STOP1* and *ALMT1*. Tips roots of *A. sativa* plants exposed to +Pi+Fe (0.5 mM/50 μ M); +Pi-Fe (0.5 mM/0 μ M); +Pi++Fe (0.5 mM/200 μ M); -Pi+Fe (0 mM/50 μ M); -Pi-Fe (0 mM/0 μ M); -Pi++Fe (0 mM/200 μ M) concentrations + acid malic (M) (200 μ M). Data are presented in relation to the reference genes *Ubiquitin (UBC21)* and *Elongation Factor (Efl-a)* using the efficiency method ($-\Delta\Delta C_t$). Different letters indicate significant differences among the treatments by ANOVA test with Tukey post-test ($p \leq 0.05$). Asterisks represents statistically significant differences in relation to the control by Student's t-test (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Error bars indicate standard deviation (SD). $n=3$ (each replicate consisted in a pool of ten plants).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema radicular é um órgão complexo e muito variável, necessitando de análises robustas de fenotipagem a fim de encontrar as melhores características que se relacionem ao estresse abiótico que se deseja pesquisar. Neste estudo, os parâmetros radiculares que se mostraram capazes de diferenciar os tratamentos aplicados foram, principalmente, biomassa de parte aérea e de raiz, comprimento total de raízes, comprimento da maior raiz, número de ramificações, volume e área superficial.

A partir das análises realizadas neste trabalho, foi possível observar que o modelo desenvolvido da redução do crescimento radicular e da maior formação de raízes laterais em resposta à baixa disponibilidade de fósforo que ocorre em *Arabidopsis thaliana* não ocorre em monocotiledôneas como na espécie *Avena sativa* L. Embora haja ocorrência de acúmulo de ferro em tecidos de raízes de aveia expostas à deficiência de fósforo, não é possível afirmar que esse metal seja o responsável pelas modificações do sistema radicular sob tal estresse.

A adição de malato exógeno promove um incremento na biomassa do sistema radicular de plantas de aveia, independentemente do tipo de estresse nutricional realizado neste estudo. Os genes *STOP1* e *ALMT1* podem ser modulados pela ausência de fósforo, acúmulo de ferro e presença de malato exógeno nos ápices radiculares de raízes de aveia. Contudo, não necessariamente fazem parte da via de sinalização à deficiência de fósforo *per se* que desencadeará modificações radiculares, como alteração no comprimento. É possível que uma indução significativa de tal via ocorra a partir do estresse de deficiência de fósforo proveniente da sua associação com o alumínio; elemento capaz de induzir respostas morfológicas nos ápices em poucas horas.

A habilidade que um genótipo possui de manter ou até mesmo aumentar o comprimento radicular é uma estratégia importante para melhorar a eficiência de captação de fósforo. O genótipo UFRGS 17, também caracterizado pela sua tolerância ao alumínio tóxico, mostrou possuir um bom alongamento radicular, mas com poucas ramificações, o que dificultaria a captação de fósforo em uma maior área de camadas subsuperficiais. Trabalhos futuros de

diferenciação radicular de diversos genótipos do Programa de Melhoramento de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul devem ser realizados de modo a identificar genótipos com características de tolerância à deficiência de Pi e eficiência de captação deste nutriente.

5 VITA

Jacqueline Flores Schmitz é filha de Sônia Batista Flores e Roberto Schmitz. Nasceu em 21 de junho, 1987, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Coursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual de Ensino Fundamental Visconde do Rio Grande e o Ensino Médio/Curso Normal no Centro Estadual de Formação de Professores General Flores da Cunha, escolas públicas. Em 2007, iniciou o Curso Técnico em Biotecnologia na antiga Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, atual Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, concluindo seu estudo em 2010. Em 2008, ingressou no seu Bacharelado em Agronomia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o curso, atuou como bolsista de iniciação científica na área de fitopatologia no Departamento de Fitossanidade sob orientação do professor Dr. Valmir Duarte. Ganhou dois destaques (2009 e 2010) e o prêmio Jovem Pesquisador das Ciências Agrárias (2009) no Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Foi bolsista de iniciação científica na área de fisiologia e manejo no Departamento de Plantas de Lavoura, sob orientação do professor Dr. Christian Bredemeier. Atuou como monitora acadêmica na disciplina de apicultura, auxiliando em análises no mel sob orientação do professor M.e. Aroni Satler. Recebeu o título de Engenheira Agrônoma em 2013, com excelência em Zootecnia pelo desempenho acadêmico na área de produção animal. Atuou como técnica de laboratório na área de Biotecnologia na empresa Ecocerta Análises Ambientais em Caxias do Sul. Em 2014, ingressou como primeira colocada para o mestrado na área de Biotecnologia Vegetal na Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação do professor Dr. Marcio Alves-Ferreira, obtendo em 2016 o prêmio bolsista mestrado nota 10 da FAPERJ. Obteve seu título de Mestre em Ciências no início de 2017. Neste mesmo ano, atuou como analista de laboratório na empresa Analitus (FOODCHAIN ID) em Caxias do Sul. Em 2019, iniciou seu doutorado em Fitotecnia com ênfase em Melhoramento de Plantas, Recursos Genéticos e Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da professora Dra. Carla Andrea Delatorre e com suporte financeiro pela CAPES.