

VPLYV NÍZKEHO pH A HLINÍKA NA EXUDÁCIU ORGANICKÝCH KYSELÍN A FLAVONOIDOV V *LOTUS* *JAPONICUS*

EFFECT OF LOW pH AND ALUMINIUM ON EXUDATION OF ORGANIC ACIDS AND FLAVONOIDS IN *LOTUS JAPONICUS*

*Kristína TRUŠ¹ – Mária KADUCOVÁ-KRÁLIKOVÁ¹ – Lenka KUKUČKOVÁ¹ –
Peter PALOVE-BALANG^{1*}*

ABSTRACT

Aluminium is the most abundant metal in the Earth's crust, but its availability depends on soil pH reaching toxic levels at pH lower than 5.0. Root-cells plasma membrane, particularly of the root apex, seems to be a major target of aluminium toxicity. Organic acids with Al-chelating ability play an important role in the detoxification of aluminium both externally and internally. Aluminium is detoxified externally by the secretion of organic acids such as citric, oxalic, and /or tartaric acids from the root apex. In the present work, the response of *Lotus japonicus* to aluminium (Al) exposure was examined, focusing specifically on low molecular mass organic compounds in roots and exudates. Increased content of citric and oxalacetic acid was found in root exudates after Al-treatment, while the concentration of tartaric and fumaric acid in the medium remained unchanged. Only very little amount of kaempferol glycoside and vestitol was found in root exudates, regardless to the presence of Al, neither they accumulated in the root tissue after Al-treatment. The presented results suggested that oxalate could be a key compound in *Lotus japonicus*, which detoxifies Al³⁺ externally and internally.

KEYWORDS

aluminium, organic acids, secondary metabolites, roots, phytotoxicity

ÚVOD

Rastliny si počas evolučného vývoja tvoria sériu adaptívnych mechanizmov, ktoré im umožňujú prispôbiť sa podmienkam životného prostredia. Jedným z významných faktorov pôdneho prostredia je obsah hliníka. Hliník (Al) je jeden z najbežnejších prvkov v zemskej kôre, v pôdach môže celkové množstvo Al dosiahnuť až 7% (MARSCHNER, 1995). Napriek tomu sa Al nepovažuje za prvok potrebný pre minerálnu výživu rastlín. V neutrálnom alebo mierne kyslom pôdnom prostredí existuje Al vo forme organicko-minerálnych komplexov. V prípade okyslenia pôdy sa Al zmení na rozpustnú formu $[Al(H_2O)_6]^{3+}$, ktorá je najviac toxická pre rastliny (MATSUMOTO 2000). Toxicita hliníka je jedným z hlavných faktorov, ktoré obmedzujú rast rastlín v kyslých pôdach. Kyslé pôdy sa vyznačujú nadbytkom H^+ , Mn^{2+} , Al^{3+} , a súčasným nedostatkom alkalických kovov, ale najmä kovov alkalických zemín (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Fytotoxický účinok hliníka sa prejavuje v poškodení bunkovej ultraštruktúry, ktorá zahŕňa zloženie, fyzikálno-chemické vlastnosti,

1 Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach, Mánesova 23, SK – 04001 Košice, Slovensko; e-mail: kristinkakohut@gmail.com, maja.kaducova@gmail.com, lenkakukuckova13@gmail.com, peter.palove-balang@upjs.sk

štruktúru plazmatickej membrány (ZHANG a kol., 1997; ISHIKAWA a WAGATSUMA, 1998), peroxidáciu lipidov (YAMAMOTO, 2003), taktiež negatívne vplyva na absorpciu iónov Ca^{2+} (RYAN a kol., 1997; LIU a LUAN, 2001), udržiavanie rovnováhy vápnika a normálne fungovanie signalizačných systémov (KIDD a kol., 2001; RENGEL a ZHANG, 2003), dynamické zmeny cytoskeletu, štruktúru DNA alebo mitózu (PINTRO a TAYLOR, 2004; SIVAGURU a kol., 2003).

Najznámejším prejavom toxického účinku hliníka je inhibícia rastu koreňov, ktorá je detekovateľná už po 30 minútach aj pri mikromolárnych koncentráciách hliníka (LIU a LUAN, 2001). Hliník ovplyvňuje rast a vývin buniek rastovej zóny koreňového vrcholu a koreňových vláskov (SIVAGURU a HORST, 1998).

Zvýšená odolnosť rastlín voči nadmerným množstvám hliníka v pôde je spojená s aktívnym uvoľňovaním organických kyselín koreňovým systémom, ktoré majú schopnosť chelátovať Al, pričom tvoria stabilné a netoxické komplexy (BRUNNER a SPERISEN, 2013). Uvoľňovanie organických kyselín sa zvyšuje pridaním exogénneho hliníka, ku ktorej prispieva aktivácia transporterov pre kyselinu jablčnú (ALMT) alebo citrónovú (MATE) (FUKURAWA a kol., 2007; DELHAIZE a kol., 2007). Bola zistená dobrá korelácia medzi rýchlosťou exudácie a rezistencie v rôznych genotypoch v rámci rovnakého druhu, pričom sa predpokladá dôležitá úloha organických kyselín pri zmiernení toxicity Al^{3+} (KINRAIDE a kol., 1998). Koreňový systém rastlín odolných voči zvýšenej koncentrácii hliníka uvoľňuje viac organických kyselín ako koreňové systémy rastlín citlivých na hliník. V prípade pšenice výsledky experimentov potvrdili až 8 násobné zvýšenie exudácie kyseliny citrónovej (AKESON a MUNNS, 1990). Rastliny, ktoré produkujú viac malátu, hromadia menej hliníka v koreňovom vrchole (DELHAIZE a kol., 1993). V pletivách koreňového systému môže dochádzať ku chelatacii Al aj pomocou tanínov, pričom vzniknuté komplexy sa akumulujú vo vakuolách. Aj iné fenolové zlúčeniny, ktoré obsahujú katecholové skupiny majú schopnosť chelátovať ióny Al a mohli by prispievať k detoxikácii Al už v malých množstvách, prípadne pôsobiť proti oxidatívne stresu vyvolanému hliníkom. Tvorba komplexov organických kyselín zabraňuje prieniku hliníka do cytoplazmy koreňových buniek (BOJORQUEZ-QUINTAL a kol., 2017).

Keďže na ochranu pred fyto toxickým účinkom hliníka si rôzne rastlinné druhy vyvinuli podobné mechanizmy, ktoré sú založené na schopnosti chelatačných činidiel tvoriť komplexné zlúčeniny s hliníkom, v našej práci sme sa zamerali na vplyv Al na tvorbu malých organických kyselín a sekundárnych metabolitov, najmä fenolových látok v modelovej rastline pre čelad' bôbovité (*Fabaceae*).

MATERIÁL A METÓDY

Rastlinný materiál a podmienky rastu

V našich experimentoch sme používali modelovú rastlinu *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, ekotyp Gifu (B-129-S9). Rastliny sme získali z 5 cm dlhých stonkových odrezkov, ktoré sme pestovali 30 dní v hydroponii, pri osvetlení $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, svetelnom cykle^c, 16/8 hodín, teplote 22°C a relatívnej vlhkosti vzduchu 70%. Ako médium sme použili 10x zriedený Hornum (HANDBERG a STOUGAARD,

1992) s malými modifikáciami niektorých zložiek (1 mM CaCl_2 ; 0,5 mM KNO_3 ; 0,5 mM NH_4NO_3 a 0,5 mM KCl). Médium sme vymieňali každé tri dni. Na začiatku pokusu sme korene rastlín opláchli destilovanou vodou a preniesli do nádob s objemom 1 liter. Hliník sme aplikovali do roztoku vo forme AlCl_3 s finálnou koncentráciou 0,5 mM. Hodnota pH bola upravená pomocou HCl na hodnotu 5,5 (kontrola) alebo 4,2 (pre rastliny ovplyvnené nízkym pH a hliníkom) a ďalej bolo pH udržiavané tak, aby sa od uvedených hodnôt neodchýľilo o viac než 0,2. Na vyhodnotenie rastu boli prírastky dĺžky koreňov vyhodnotené po 5 dňoch a vyjadrené ako priemerný prírastok dĺžky koreňa v cm za deň.

Determinácia organických kyselín v exudátoch a v pletivách koreňov

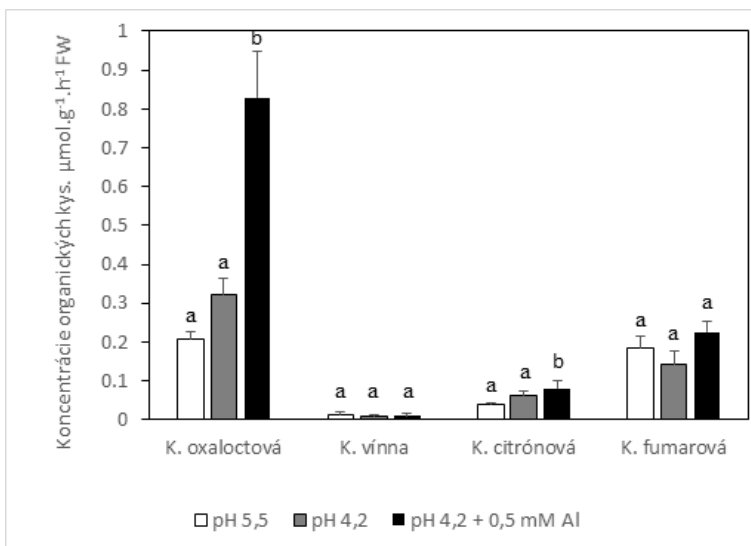
Korene rastlín sme opláchli destilovanou vodou a preniesli do 15 ml 0,2 mM roztoku KCl (bez prítomnosti hliníka) na 3 hodiny. Z roztoku sme odobrali 5 ml a nechali pretiecť cez kolónu naplnenú DOWEX-om AG 1-X8 (100-200 mesh). Organické kyseliny vyplavené z náplne sme vysušili rotačným vákuovým odparovačom pri teplote 60 °C a opätovne rozpustili v 0,5 ml ultračistej vody. Použité korene sme odvážili na analytických váhach. Potom sme korene vysušili za 24 hodín pri teplote 60 °C a nechali v exikátore. Na analýzu sme navážili 0,05 g vzorky, ktorú sme homogenizovali a extrahovali v 1 ml ultračistej vody. Vzorky sme centrifugovali 5 minút pri 4000 ot./min a prefiltrovali cez 2 μm membránu. Na analýzu extraktov pletív ako aj vzoriek exudátov sme použili HPLC zostavu obsahujúcu pumpu ECOM LCD 3001, detektor Hewlett Packard HP 1050, kolónu Kromasil C18 250x4,6 mm 5 μm . Analýza prebiehala izokraticky s mobilnou fázou 25 mM KH_2PO_4 , pH 2,5, pri prietoku 0,7 ml/min. Látky boli detegované pri vlnovej dĺžke 210 nm. Na identifikáciu sme použili štandardy kyseliny oxaloctovej, vínnej, fumarovej a citrónovej (Sigma-Aldrich).

Determinácia flavonoidov v exudátoch a pletivách koreňov

Korene rastlín sme opláchli destilovanou vodou a preniesli do 15 ml 0,2 mM roztoku KCl (bez prítomnosti hliníka) na 3 hodiny. Z roztoku sme odobrali 5 ml a nechali pretiecť cez SPE kolónu STRATA C18, odkiaľ sme flavonoidy vyplavili metanolom. Vzorky sme odparili rotačným vákuovým odparovačom pri teplote 60 °C a opätovne rozpustili v 1 ml metanolu. Použité korene sme odvážili na analytických váhach. Potom sme korene vysušili za 24 hodín pri teplote 60 °C a nechali v exikátore. Na analýzu sme navážili 0,05 g vzorky, ktorú sme homogenizovali a extrahovali v 1,5 ml 80% metanolu. Vzorky sme odcentrifugovali 5 minút pri 4000 ot./min a prefiltrovali cez 2 μm membránu. Na analýzu extraktov pletív ako aj vzoriek exudátov sme použili HPLC zostavu Agilent 1260 Infinity s DAD detektorom a kolónou Kromasil C18 250x4,6 mm 5 μm . Použili sme gradientový program s dvoma mobilnými fázami, 5% acetonitrilom s 3% trifluoroctovou kyselinou (A) a 80% acetonitrilom (B). Program bol: 0 min. 90:10 (A/B), 5 min. 86:14, 30 min. 76:24, 35 min. 60:40, 50 min. (0:100), 55 min. (0:100), 60 min. (90:10). Látky boli detegované pri vlnových dĺžkach 220 a 350 nm. Na identifikáciu boli použité štandardy kvercetínu (Sigma-Aldrich) a vestitolu (Biorbit). Identifikácia glykozidov kempferolu prebehla na základe ich charakteristického UV-spektra porovnaním so štandardom kempferol-3-O-glukozidu (Extrasynthese) alebo kempferol-3-O-glukozyl-7-O-rhamnozidu, ktorý bol predtým izolovaný a identifikovaný pomocou NMR (García-Calderón a kol. 2015).

VÝSLEDKY

Lotus japonicus sme sledovali v troch rôznych podmienkach pri pH 5,5, pH 4,2 a pH 4,2 s 0,5 mM AlCl₃. Za kontrolné pH sme považovali pH 5,5, pri ktorom skúmaný druh vykazuje výrazný rast (s prírastkom 0,47 ± 0,04 cm/deň) v podmienkach hydroponie so stabilnou hladinou pH. Pri pH 6,5 dochádzalo pri tomto druhu k nestabilitám hodnoty pH v živnom médiu bez prítomnosti tmivého roztoku. Pri pH 4,2 (s prírastkom 0,36 ± 0,035 cm/deň) sme sledovali iba vplyv toxicity nadmerného množstva protónov, aby sme ho odlišili od toxicity hliníka. Po vystavení rastlín nízkemu pH a vysokým koncentráciám hliníka rástli korene signifikantne menej ako v kontrole (s prírastkom 0,23 ± 0,03 cm/deň). V týchto podmienkach sme pozorovali zmeny v hladinách jednotlivých organických kyselín a flavonoidových zlúčenín v koreňových exudátoch a v pletivách koreňa. Pri analýze exudátov z koreňov *L. japonicus* sme identifikovali štyri organické kyseliny, a to kyselinu oxaloctovú a kyselinu fumarovú, ktoré boli zastúpené vo väčšej miere a v menších množstvách aj kyselinu vínnu a kyselinu citrónovú. Aplikácia hliníka najviac ovplyvnila koncentráciu kyseliny oxaloctovej, ktorej exudácia mierne narástla aj vplyvom nízkého pH, ale vplyvom hliníka sa zvýšila až približne štvornásobne (obrázok 1).

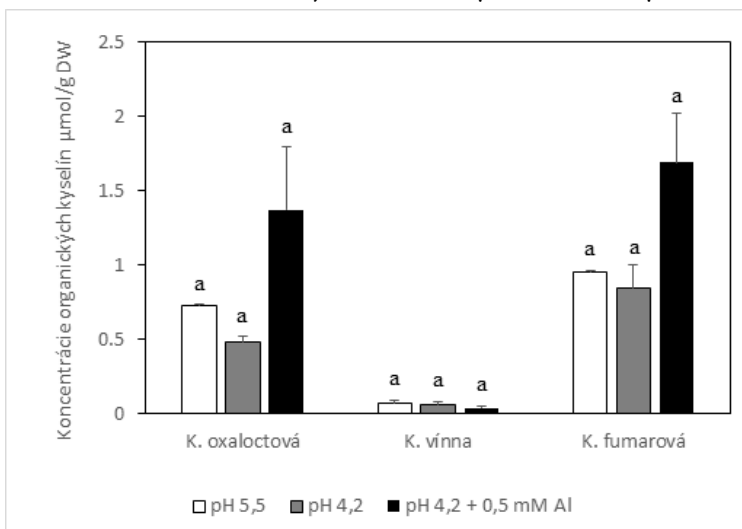


Obrázok 1. Vplyv nízkého pH a hliníka na rýchlosť uvoľňovania organických kyselín z koreňov. Zobrazené hodnoty sú priemery troch biologických opakovaní + stredná chyba priemeru. Symboly písmen označujú výsledky signifikancie ($P < 0.05$, ANOVA s post hoc Tukey testom).

Figure 1. Effect of low pH and aluminium on the organic acids exudation rate from roots. The values are the means of three biological replicates + standard error. Letter symbols indicate significance ($P < 0.05$, ANOVA with post hoc Tukey test).

Naopak v porovnaní s kyselinou oxaloctovou hladina kyseliny fumarovej uvoľnenej z koreňov nebola výraznejšie ovplyvnená hliníkom. Hladina kyseliny citrónovej vplyvom Al signifikantne stúpla na približne dvojnásobnú hodnotu v porovnaní s kontrolnými podmienkami, na druhej strane celkové množstvo kyseliny citrónovej bolo oveľa menšie než kyseliny oxaloctovej a fumarovej (obrázok 1). V exudátoch sme v stopových množstvách zaznamenali aj kyselinu vínnu, ktorej obsah sa vo všetkých podmienkach menil minimálne.

V pletivách koreňa sme sa snažili nájsť rovnaké látky ako v koreňových exudátoch.



Obrázok 2. Vplyv nízkeho pH a hliníka na akumuláciu organických kyselín v pletivách koreňa. Zobrazené hodnoty sú priemery troch biologických opakovaní + stredná chyba priemeru. Symboly písmen označujú výsledky signifikancie ($P < 0.05$, ANOVA s post hoc Tukey testom).

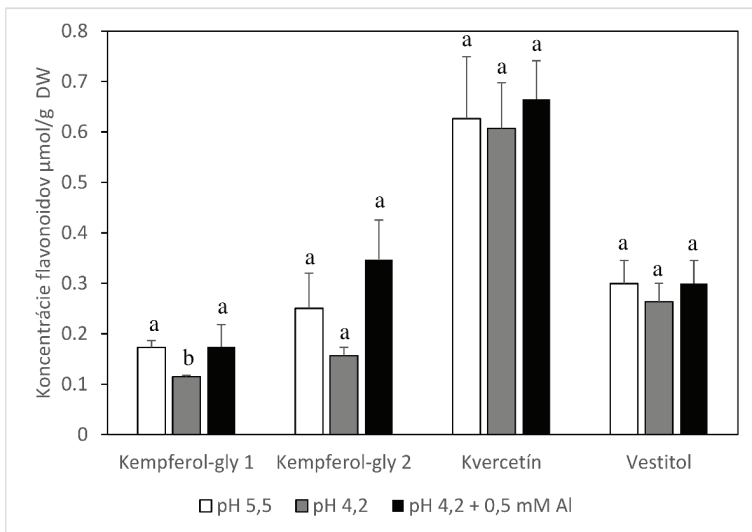
Figure 2. Effect of low pH and aluminium on the accumulation of organic acids in root tissue. The values are the means of three biological replicates + standard error. Letter symbols indicate significance ($P < 0.05$, ANOVA with post hoc Tukey test).

V porovnaní s exudátmi sme v koreni vôbec nezaznamenali akumuláciu kyseliny citrónovej v kontrolných ani v stresových podmienkach. Po pôsobení hliníka na korene rastlín sa koncentrácie kyseliny oxaloctovej a fumarovej mierne zvýšili, ale tento nárast nebol signifikantný (obrázok 2).

Kyselina vínna bola prítomná v pletivách koreňov, podobne ako aj v exudátoch, len v malom množstve a jej obsah sa signifikantne nemenil.

Okrem organických kyselín sme sa v exudátoch snažili identifikovať aj flavonoidy. Z flavonoidov sme v exudátoch našli len jeden glykozid a to kempferol-3-O-glukozyl-7-O-ramnozid, ktorého sa z koreňov uvoľnilo len približne $0,7 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a vplyvom nízkeho pH a Al nemenilo. Vestitol, patriaci medzi izoflavonoidy, sa v kontrolných podmienkach z koreňov neuvolňoval, ale objavil sa v stopovom množstve v exudátoch

z rastlín vplyvom nízkeho pH v množstve $0,41 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a vplyvom Al v množstve $0,46 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. V podobnom množstve sa uvoľňovala z koreňov ešte jedna látka s UV spektrom veľmi podobným ako má vestitol.



Obrázok 3. Vplyv nízkeho pH a hliníka na akumuláciu flavonoidových zlúčenín v pletivách koreňa. Kempferol-gly 1 a 2 označujú bližšie neurčené glykozidy kempferolu. Zobrazené hodnoty sú priemery troch biologických opakovaní + stredná chyba priemeru. Symboly písmen označujú výsledky signifikancie ($P < 0,05$, ANOVA s post hoc Tukey testom).

Figure 3. Effect of low pH and aluminium on the accumulation of flavonoid compounds in root tissue. Kempferol-gly 1 and 2 refer to unspecified keampferol glycosides. The values are the means of three biological replicates + standard error. Letter symbols indicate significance ($P < 0,05$, ANOVA with post hoc Tukey test).

V koreňových pletivách sme hľadali látky štrukturálne podobné látkam, ktoré sme identifikovali v exudátoch. Zaznamenali sme prítomnosť dvoch kempferolových glykozidov, aglykónu kvercetínu a vestitolu. Hliník obsah týchto látok v pletivách výrazne neovplyvňoval. Nízke pH spôsobilo skôr ich pokles (obrázok 3), ktorý však bol signifikantný oproti kontrole len v prípade jedného z dvoch identifikovaných glykozidov kempferolu.

DISKUSIA

Toxicita hliníka je dôležitý faktor, ktorý obmedzuje rast rastlín najmä v kyslých pôdach pri pH 5,0 alebo nižšom. V rastlinách sa prejavuje jasne identifikovateľnými morfológickými a fyziologickými symptómami (ROUT a kol., 2000). Existujú dva spôsoby tolerancie rastlín voči hliníku. Jeden je založený na zabráňovaní vstupu hliníka do apexu koreňa a druhý umožňuje rastlinám tolerovať akumuláciu hliníka

v pletivách (TAYLOR, 1991). Mnohé štúdie potvrdili, že Al – tolerantné genotypy pšenice, kukurice, sóje a fazule sú schopné vylučovať organické kyseliny do prostredia koreňa, ktoré dokážu chelátovať hliník (LOPÉZ – BUCIO a kol., 2000; MA, 2000; LI a kol. 2000; WATANABE a OSAKI, 2002). Produkcia organických kyselín je súčasťou mechanizmu detoxikácie hliníka. Z organických kyselín má najvyššiu väzbovú afinitu ku hliníku kyselina citrónová, schopnosťou viazať hliník sa ďalej vyznačujú aj kyselina jablčná a kyselina oxaloctová, prípadne aj kyselina jantárová (HUE a kol., 1986; BRUNNER a SPERISEN, 2013). Na zmiernenie Al toxicity špecificky uvoľňujú kyselinu citrónovú napríklad korene ryže (YANG a kol., 2006), korene kukurice (PINEROS a KOCHIAN, 2001) a tiež strukovín (YANG a kol., 2000). V prípade pšenice dochádza k exudácii kyseliny jablčnej (ZHANG a kol., 2001), kyselina oxaloctvá je exudovaná napr. koreňmi rastlín *Fagopyrum esculentum* (MA a kol., 1997) a tiež *Colocasia esculenta* (MA a MIYASAKA, 1998). Komplexy kyseliny citrónovej a oxaloctovej s Al boli tiež nájdené v xyléme a v pletivách koreňov čajovníka (MORITA a kol., 2004; MORITA a kol., 2008). Po aplikácii hliníka na korene rastlín *Lotus corniculatus* bol zaznamenaný signifikantný nárast exudácie kyseliny citrónovej aj kys. oxaloctovej, ale miera exudácie kyseliny citrónovej bola výrazne vyššia ako oxaloctovej (PAEOVE-BALANG a kol., 2012). V prípade blízko príbuzného modelového druhu *L. japonicus*, ktorému sme sa venovali v tejto práci, sme zaznamenali prítomnosť viacerých organických kyselín v pletivách aj v exudátoch koreňov, a to najmä kyseliny oxaloctovej a kyselín fumarovej a citrónovej. Vplyvom hliníka dochádzalo v *L. japonicus* k oveľa výraznejšiemu zvýšeniu exudácie kyseliny oxaloctovej ako kyseliny citrónovej. Na rozdiel od *L. corniculatus* sme v *L. japonicus* zaznamenali v exudátoch aj väčšie množstvo kyseliny fumarovej, hoci jej koncentrácia sa vplyvom Al nemenila. V *L. japonicus* má zrejme v obrane voči vysokým koncentráciám hliníka najvýznamnejšiu úlohu kyselina oxaloctová, naopak v druhu *L. corniculatus* kyselina citrónová.

Stresové faktory, medzi ktoré patrí aj vplyv ťažkých kovov na rastliny, vyvolávajú v rastlinách podobný typ odpovede, a tou je tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS) (MITTLER a kol., 2004; MITTLER, 2006), ktoré poškadzujú bunky. Akumulácia flavonoidov sa považuje za významný spôsob obrany proti ROS. Je známych viacero flavonoidov s výraznou antioxidantnou schopnosťou, ako aj schopnosťou chelátovať ióny toxických kovov (BROWN a kol., 1998; MELIDOU a kol., 2005; HERNANDEZ a kol., 2009; AGATI a TATTINI, 2010). Výborné antioxidantné schopnosti majú fenolové zlúčeniny s dihydroxy-substituovanými aromatickými kruhmi ako sú kyselina kávová a kvercetinové alebo luteolínové glykozidy (AGATI a kol., 2012).

KIDD a kol. (2001) vo svojej štúdií uviedli, že kukuričné rastliny ošetrované kremíkom uvoľňujú pätnásťkrát viac fenolových zlúčenín (katechínu a kvercetínu) ako neošetrované rastliny kukurice. Tieto fenolové zlúčeniny tiež vykazovali silnú schopnosť chelátovať ióny Al a mohli by potenciálne detoxikovať Al. V koreňoch kukurice sa ukázalo, že pôsobenie hliníka môže vyvolávať zvýšenú akumuláciu taxifolínu a v tolerantnej odrode aj pentahydroxyflavonolu a katechínu, pričom ochranná úloha týchto látok je pripisovaná ich schopnosti viazať Al a antioxidantným účinkom (TOLRÁ a kol., 2009). V našom prípade sme veľké zmeny v hladinách fenolových zlúčenín v exudátoch

aj v pletivách koreňov *L. japonicus* po aplikácii Al nezaznamenali. Výraznejší vplyv na akumuláciu fenolov malo skôr nízke pH, pri ktorom sa koncentrácie zlúčenín znižovali. Nepotvrdilo sa teda, že by identifikované flavonoidy mohli mať väčší význam v obrane voči Al toxicite. V príbuznom druhu *L. corniculatus* dochádza ku chelátovaniu Al pomocou tanínov a následnému ukladaniu týchto komplexov do vakuol (STOUTJESDIJK a kol. 2001; PA'OVE – BALANG a kol., 2012). *L. japonicus* však produkuje taníny len v stopových množstvách, ktoré boli na hranici detegovateľnosti (P. PA'OVE-BALANG, nepublikované výsledky). V tomto druhu významnejšiu úlohu zohrávajú pravdepodobne organické kyseliny, z ktorých sa uvoľňuje najmä kyselina oxalocitrová. Uvedená kyselina bude mať zrejme hlavnú úlohu v chelatacii Al vo vonkajšom prostredí, kde zabráňuje vstupu Al do koreňa, prípadne môže mať podobnú funkciu aj vo vnútri pletív koreňov.

LITERATÚRA

- AGATI, G. – AZARELLO, E. – POLLASTRI, S. – TATTINI, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.*, 196: 67-76.
- AGATI, G. – TATTINI, M., 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.*, 186: 4.
- AKESON, M.A. – MUNNS, D.N., 1990. Uptake of aluminum into root cytoplasm; predicted rates for important solution complexes. *J. Plant Nutrition*, 13: 467-484.
- BOJORQUEZ – QUINTAL, E., ESCALANTE – MAGAÑA, C., ECHERRIA – MACHADO, I., MARTINEZ – ESTÉVEZ, M., 2017. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front. Plant Sci.*, 8: Article 1767.
- BROWN, J. E. – KHODR, H. – HIDER, R. C. & RICE – EVANS, C. A., 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implication for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.
- BRUNNER, I. – SPERISEN, CH., 2013. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Front. Plant Sci.*, 8: Article 172.
- DELHAIZE, E. – CRAIG, S. – BEATON, C. D. – BENNET, R. J. – JAGADISH, V. C. – RANDALL, P. J., 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.*, 103: 685-693.
- DELHAIZE, E. – GRUBER, B. D., – RYAN, P. R., 2007. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett.*, 581: 2255-2262.
- FURUKAWA, J. – YAMAJI, N. – WANG, H. – MITANI, N. – MURATA, Y. – SATO, K., 2007. An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.*, 48: 1081-1091.
- GARCÍA-CALDERÓN, M. – PONS-FERRER, T. – MRÁZOVÁ, A. – PA'OVE-BALANG, P. – VILKOVÁ, M. – PÉREZ-DELGADO, C.M. – VEGA, J.M. – ELIÁŠOVÁ, A. – REPČÁK, M. – MÁRQUEZ, A.J. – BETTI M., 2015. Modulation of phenolic metabolism under stress conditions in a *Lotus japonicus* mutant lacking plastidic glutamine synthetase. *Front. Plant Sci.*, 6: 760.
- HANDBERG, K. – STOUGAARD, J., 1992. *Lotus japonicus*, an autonomous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.*, 2: 487-496.
- HERNANDEZ, I. – ALEGRE, L. – VAN BREUSEGEM, F. – MUNNÉ-BOSCH, S., 2009. How relevant are flavonoids as antioxidant in plants? *Trends Plant Sci.*, 14: 125-132.
- HUE, N. V. – CRADDOCK, G. R. – ADAMS, F., 1986. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoil. *Soil Sci.Soc.Am J.*, 50: 28-34.
- ISHIKAWA, S. – WAGATSUMA, T., 1998. Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant Cell Physiol.*, 39: 516-525.
- KIDD, P. – LLUGANY, M. – POSCHENRIEDER, C. GUNSE, B. – BARCELÓ, J., 2001. The role of root exudates in aluminum resistance and silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in tree varieties of

- maize (*Zea mays* L.) J. Exp. Bot., 52: 1339 – 1352.
- KINRAIDE, T.B. – YERMIYAHU, U. – RYTWO, G., 1998. Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes. Correspondence to published zeta potentials from diverse plant source. Plant Physiol., 118: 505–512.
- LI, X. F. – MA, J. F. – HIRADATE, S. – MATSUMOTO, H., 2000. Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. Physiol. Plantarum, 108: 152–160.
- LIU, K. – LUAN, S., 2001. Internal aluminium block of plant inward K⁺ channels. Plant Cell, 13: 1453–1465.
- LOPÉZ – BUCIO, J. – NIETO-JACOBO, M.F. – RAMIREZ-RODRIGUEZ, V. – HERRERA-ESTRELLA, L., 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Sci., 160: 1–13.
- MA, J. F., 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. Plant Cell, 41: 383–390.
- MA, Z. – MIYASAKA, S. C., 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al. Plant Physiol., 118: 861–865.
- MATSUMOTO H., 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. International Review of Cytology, 200: 1–47.
- MARSCHNER, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. – London: Acad. Press, 889.
- MELIDOU, M. – RIGANAKOS, L. – GALARIS, D., 2005. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. Free Radic. Biol. Med., 39: 1591–1600.
- MITTLER, R. – VANDERAUWERA, S. – GOLLERY, M. – VAN BREUSEGEM, F., 2004. The reactive oxygen gene network in plants. Trends Plant Sci., 9(10): 490–498.
- MITTLER, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends Plant Sci., 11(1): 15–19.
- MORITA, A. – HORIE, H. – FUJII, Y. – TAKATSU, S. – WATANABE, H. – YAGI, A. – YOKOTA, H., 2004. Chemical forms of aluminum in xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.). Phytochemistry. 65: 2775–2780.
- MORITA, A. – YANAGISAWA, O. – MAEDA, S. – HIRADATE, S., 2008. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). Phytochemistry. 69: 147–153.
- PAĽOVE-BALANG, P. – ČIAMPOROVÁ, M. – ZELINOVÁ, V. – PAVLOVKIN, J. – GURINOVÁ, E. – MISTRÍK, I., 2012. Cellular responses of two Latin-American cultivars of *Lotus corniculatus* to low pH and Al stress. Cent. Eur. J. Bot., 7(6): 1046 – 1054.
- PINEROS, M. A. – KOCHIAN, L. V., 2001. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al⁽³⁺⁾-induced anion channels. Plant Physiol., 125: 292–300.
- PINTRO, J.C. – TAYLOR, G.J., 2004. Effects of aluminum toxicity on wheat plants cultivated under conditions of varying ionic strength. J. Plant Nutr., 27(5): 907–919.
- RENGEL, Z. – ZHANG, W., 2003. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum toxicity syndrome. New Phytol., 159: 295–314.
- ROUT, G. – SAMANTARAY, S. – DAS, P., 2001. Aluminium toxicity in plants: a review. Agronomie, EDP Sciences, 21(1): 3 – 21.
- RYAN, P.R. – SKERRETT, M. – FINDLAY, G.P. – DELHAIZE, E. – TYERMAN, S.D., 1997. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94: 6547–6552.
- SIVAGURU, M. – BALUSKA, F. – VOLKMANN, D. – FELLE, H.H. – HORST, W.J., 1999. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short term effects on the distal part of the transition zone. Plant Physiol., 119: 1073–1082.
- SIVAGURU, M. – HORST, W.J., 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminum sensitive apical root zone of maize. Plant Physiol., 116: 155–163.
- SIVAGURU, M. – PIKE, S. – GASSMANN, W. – BASKIN, T., 2003. Aluminium rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. Plant Cell Physiol., 44: 667–675.

- STOUTJESDIJK, P.A. – SALE, P.W., LARKIN, P.J., 2001. Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28: 1063-1074.
- TAYLOR, G. J., 1991. Current views of the aluminum stress response; the physiological basis of tolerance. *J. Plant Biochem. Physiol.*, 10: 57 – 93.
- TOLRÀ, R. P. – BARCELÓ, J. – POSCHENRIEDER, C., 2009. Constitutive and aluminium-induced patterns of phenolic compounds in two maize varieties differing in aluminium tolerance. *J. Inorg. Biochem.*, 103: 1486-1490.
- VITORELLO, V. – CAPALDI, F. – STEFANUTO, V., 2000. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17: 129–143.
- WATANABE, T. & OSAKI, M. 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: A review. *Commun. Soil Sci. Plan.*, 33:1247–1260.
- YAMAMOTO, Y. – KOBAYASHI, Y. – DEVI S.R. – RIKIISHI, S. – MATSUMOTO, H., 2003. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255: 239–243.
- YANG, J. L. – ZHENG, S. J. – HE, Y. F. – YOU, J. F. – ZHANG, L. – YU, X. H., 2006. Comparative studies on the effect of a protein-synthesis inhibitor on aluminium induced secretion of organic acids from *Fagopyrum esculentum* Moench and *Cassia tora* L. roots. *Plant, Cell Environ.*, 29: 240–246 .
- YANG, Z.M. – SIVAGURU, M. – HORST, W.J. – MATSUMOTO, H., 2000. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.*, 110: 72-77.
- ZHANG, G.C. – ŚLASKI, J.J. – ARCHAMBAULT, D.J. – TAYLOR, G. J., 1997. Alteration of plasma membrane lipids in aluminum resistant and aluminum sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Plant Physiol.*, 99: 302–308.
- ZHANG, W. – RYAN, P. – TYERMAN, S., 2001. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat root roots. *Plant Physiol.*, 125: 1459–1472.