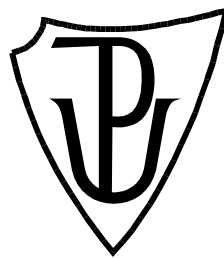


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv nanočástic stříbra na proces klíčení

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Válová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a pomoc při práci na praktické i teoretické části mé diplomové práce. Také děkuji za poskytnutí literatury a cenné rady a připomínky.

Děkuji RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za poskytnutí nanočástic stříbra.

Dále děkuji RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za spolupráci a pomoc při práci na konfokálním mikroskopu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Tereza Válová
Název práce	Vliv nanočástic stříbra na proces klíčení
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011

Abstrakt

Nanočástice stříbra (nano-Ag) jsou v posledních letech široce využívány pro svou antimikrobiální aktivitu, ačkoliv mechanismus jejich antimikrobiálního působení a ani interakce s ostatními biologickými systémy není ještě zcela známa. Podle nedávno publikovaných studií se na silné antibakteriální aktivitě nano-Ag podílí uvolňování iontového stříbra (Ag^+) a extra- nebo intracelulární akumulace reaktivních kyslíkatých radikálů (ROS). V obranných reakcích rostlin vyvolaných biotickým a abiotickým stresem hrají ROS důležitou roli. Ačkoliv existuje již několik studií o cytotoxickém vlivu nanočástic stříbra na savčí a lidské buněčné linie, o cytotoxickém či genotoxickém vlivu nanočástic na buňky rostlin je toho zatím známo jen málo. Oxid dusnatý (NO) byl intenzivně studován pro objasnění jeho role v procesech vývoje rostliny, metabolismu a odpovědi na stres. Řada studií potvrdila zapojení NO v hormonální odpovědi, programované buněčné smrti, indukované obranné reakci a signální transdukci.

V předložené práci byl jako modelový systém použit pyl z okurky (*Cucumis sativus*), spory smrže (*Morchella esculenta*) a patogenu (*Oidium neolycopersici*) pro studium zapojení ROS a NO v biologickém účinku iontového stříbra Ag^+ a nano-Ag na klíčení a růst pylových láček a klíčících vláken spor. Byl potvrzen inhibiční účinek Ag^+ na proces klíčení pylových zrn a spor. V případě nano-Ag závisí účinek na použité koncentraci. Při použití koncentrace 0,5-5 mg/l nano-Ag byl pozorován pozitivní vliv na proces klíčení. Histochemickými metodami byla lokalizována produkce NO a ROS v klíčícím pylovém zrně. U spor *M. esculenta* a *O. neolycopersici* se produkci NO nepodařilo lokalizovat. Histochemicky byla potvrzena vyšší produkce ROS po aplikaci nano-Ag v koncentraci 5 mg/l, kdy byl detekován pozitivní vliv na klíčení a vývoj pylové láčky.

Klíčová slova	nano-Ag, Ag^+ , ROS, NO, pyl, spory, <i>Cucumis sativus</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Oidium neolycopersici</i>
Počet stran	109
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Tereza Vállová
Title	The role of silver nanoparticles in a process of germination
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2011

Abstrakt

Silver nanoparticles (nano-Ag) has been widely used as antimicrobial agents in industrial and medical applications during last years, but neither the mechanisms of their antimicrobial action nor the interaction with other biological systems has been clearly elucidated. Recent studies suggested Ag^+ and extra- or intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation triggered by nano-Ag was responsible for observed strong baktericidal activity. Though there are few studies on cytotoxicity of nanoparticles on mammalian and human cell lines, there are hardly any reports on genotoxic and cytotoxic behavior of nanoparticles in plant cells. Nitric oxide (NO) functions in plant development, metabolism and stress response were intensively studied. The involvement of NO was confirmed by a number of reports in plant hormonal response, programmed cell death, induction defense reaction and signal transduction.

We used the model system of cucumber pollen (*Cucumis sativus*), spores of fungi (*Morchella esculenta*) and spores of pathogen (*Oidium neolycopersici*) to study the involvement of ROS and NO in biological effects of ionic silver (Ag^+) and nano-Ag to the process of pollen germination and growth. Inhibitory effect of Ag^+ to the process of germination of pollen grain and spores was confirmed. The effect of nano-Ag was dependant on used concentration. When nano-Ag was used at concentration of 0,5-5 mg/l, the positive effect at process of germination was observed. The production of NO and ROS were localized by histochemical methods in germinating pollen grains. The production of NO was not localized in spores of *O. neolycopersici* and *M. esculenta*. Higher production of ROS after application of nano-Ag at concetration 5 mg/l was confirmed by histochemical methods when a positive effect to the germination and pollen tube growth were indicated.

Keywords	nano-Ag, Ag^+ , ROS, NO, pollen, spores, <i>Cucumis sativus</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Oidium neolycopersici</i>
Number of pages	109
Number of appendices	0
Language	Czech

CÍLE PRÁCE	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1. Úvod	12
2. Výskyt stříbra a charakteristika nanočástic	12
3. Praktické aplikace stříbrných iontů a nanočástic stříbra	14
4. Mechanismus působení nano-Ag a Ag ⁺	15
5. Toxicita nano-Ag a Ag ⁺	17
5.1. Toxicita nano-Ag a Ag ⁺ - na živočichy	18
5.2. Toxicita nano-Ag a Ag ⁺ - na rostliny a mikroorganismy	18
6. Schopnost rostlin vázat těžké kovy	20
7. Vliv těžkých kovů na proces klíčení pylu	21
8. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ na proces klíčení spor	22
9. Produkce a úloha reaktivních forem kyslíku u rostlin	24
9.1. Úloha aktivních forem kyslíku při klíčení pylu	26
9.2. Úloha aktivních forem kyslíku při klíčení spor hub	27
10. Produkce a úloha reaktivních forem dusíku u rostlin	29
10.1. Úloha aktivních forem dusíku při klíčení pylu	31
10.2. Úloha aktivních forem dusíku při klíčení spor hub	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
11. Materiál a metody	36
11.1. Chemikálie	36
11.2. Přístroje a experimentální vybavení	36
11.3. Rostlinný materiál	36
11.4. Nano-Ag	37
11.5. Metody	38
11.5.1. Podmínky pro klíčení pylu	38
11.5.2. Podmínky pro klíčení spor <i>M. esculenta</i>	38
11.5.3. Podmínky pro klíčení spor <i>O. neolycopersici</i>	39
11.5.4. Stanovení klíčivosti pylových zrn pylových zrn resp. spor a měření délky pylových láček resp. klíčících vláken	39
11.5.5. Stanovení životnosti pylových zrn a spor	39
11.5.6. Lokalizace NO a H ₂ O ₂	40
11.5.7. Stanovení produkce RNS a ROS	42
12. Výsledky	43
12.1. Studium vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení pylu	43

12.1.1. Vliv Ag ⁺ , nano-Ag a jejich stabilizátorů na klíčení a životnost pylových zrn a vývoj pylové láčky	43
12.1.1.1. Vliv nano-Ag, Ag ⁺ a jejich stabilizátorů na klíčení pylových zrn	43
12.1.1.2. Vliv Ag ⁺ , nano-Ag a jejich stabilizátorů na vývoj pylové láčky	44
12.1.1.3. Vliv Ag ⁺ , nano-Ag a jejich stabilizátorů na životnost pylových zrn	45
12.1.1.4. Vliv stabilizátorů nano-Ag na klíčení a životnost pylových zrn a na vývoj pylové láčky	46
12.1.2. Celkové porovnání vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení a životnost pylových zrn a na vývoj pylové láčky	47
12.1.3. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na proces klíčení pylových zrn	49
12.1.3.1. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení pylových zrn v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS	49
12.1.3.2. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ na vývoj pylových láček v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS	51
12.1.3.3. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ na životnost pylových zrn v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS	53
12.1.4. Vliv Ag ⁺ a nano-Ag na produkci ROS a RNS	55
12.1.5. Histochemická studie vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na produkci ROS a RNS v procesu klíčení pylových zrn a vývoje pylové láčky	57
12.2. Studium vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení spor <i>M. esculenta</i>	60
12.2.1. Optimalizace podmínek pro klíčení spor <i>M. esculenta</i>	60
12.2.2. Testování vlivu zvyšující se koncentrace nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení spor <i>M. esculenta</i>	63
12.2.3. Vliv modulátorů koncentrace ROS a RNS v prostředí nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení spor	

<i>M.esculenta</i>	64
12.2.3.1. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na klíčivost spor <i>M. esculenta</i>	65
12.2.3.2. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na vývoj spor <i>M. esculenta</i>	67
12.2.3.3. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na životnost spor <i>M. esculenta</i>	70
12.2.4. Histochemická studie vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na produkci ROS a RNS v procesu klíčení spor <i>M. esculenta</i>	72
12.3. Studium vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení spor <i>O. neolycopersici</i>	75
12.3.1. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení spor <i>O. neolycopersici</i> v prostředí modulátorů koncentrací ROS a RNS	75
12.3.1.1. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na klíčivost spor <i>O. neolycopersici</i>	75
12.3.1.2. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na vývoj klíčního vlákna spor <i>O. neolycopersici</i>	77
12.3.1.3. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na životnost spor <i>O. neolycopersici</i>	78
12.3.2. Histochemická studie vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na produkci ROS a RNS v procesu klíčení spor <i>O. neolycopersici</i>	80
13. Diskuze	84
13.1. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení, životnost a vývoj klíčního vlákna pylových zrn <i>C. sativus</i> , spor <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	84
13.1.1. Pyl <i>C. sativus</i>	84
13.1.2. Spory <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	85
13.1.3. Porovnání vlivu nano-Ag a Ag ⁺ na klíčení, životnost a vývoj klíčního vlákna pylových zrn <i>C. sativus</i> a spor <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	86

13.2. Histochemické stanovení produkce ROS a RNS u pylových zrn <i>C. sativus</i> a spor <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	88
13.2.1. Pyl <i>C. sativus</i>	88
13.2.2. Spory <i>M. esculenta</i>	89
13.2.3. Spory <i>O. neolycopersici</i>	90
13.3. Vliv modulátorů koncentrace ROS a RNS na klíčivost, životnost a vývoj klíčnicích vláken pylu <i>C. sativus</i> a spor <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	90
13.3.1. Vliv modulátorů koncentrace ROS a RNS na proces klíčení pylových zrn <i>C. sativus</i> a spor <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	90
13.4. Vliv nano-Ag a Ag ⁺ v přítomnosti modulátorů koncentrace ROS a RNS na klíčivost, životnost a vývoj klíčnicích vláken pylu <i>C. sativus</i> a spor <i>M. esculenta</i> a <i>O. neolycopersici</i>	92
14. Závěr	94
LITERATURA	95
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	109

CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Vypracování literární rešerše na téma:

- Vliv Ag^+ a nano-Ag na živé organismy
- Vliv Ag^+ a nano-Ag na produkci RNS a ROS
- Role ROS a RNS v procesu klíčení pylu a spor

II. Experimentální část

Studium vlivu Ag^+ a nano-Ag na proces klíčení

- pylových zrn *Cucumis sativus*
- spor houby *Morchella esculenta*
- spor biotrofního patogenu *Oidium neolycopersici*

Studium vlivu Ag^+ a nano-Ag na proces klíčení po aplikaci modulátorů koncentrace ROS a RNS

- pylových zrn *Cucumis sativus*
- spor houby *Morchella esculenta*
- spor biotrofního patogenu *Oidium neolycopersici*

Teoretická část

1. Úvod

V posledních letech se nanotechnologie stala velmi rychle se rozvíjející oblastí výzkumu a možností použití. Chemicky jsou jednotlivé nanočástice velmi odlišné. Je odhadováno, že ze všech komerčně využívaných nanomateriálů, jsou nanočástice stříbra (nano-Ag) ty nejdůležitější (Henig, 2007).

Pro svůj antimikrobiální účinek jsou využívány jednomocné sloučeniny stříbra, především dusičnany. Tyto antimikrobiální vlastnosti mají i nano-Ag, se kterými se můžeme v současnosti prakticky setkat již v běžném životě, např. v různých podložkách z nanovláken (Melaiye *et al.*, 2005), v obvazech a mastech ošetřující zranění (Margaret *et al.*, 2006) apod. Dále se také nano-Ag využívají pro prevenci bakteriální kolonizace na různých materiálech, jako jsou např. protézy (Gosheger *et al.*, 2004) nebo šatstvo (Vigneshwaran *et al.*, 2007). Navzdory stále se zvyšujícímu používání nano-Ag v komerčních produktech je stále nedostatek informací týkajících se toxicity a buněčné odpovědi na působení nano-Ag.

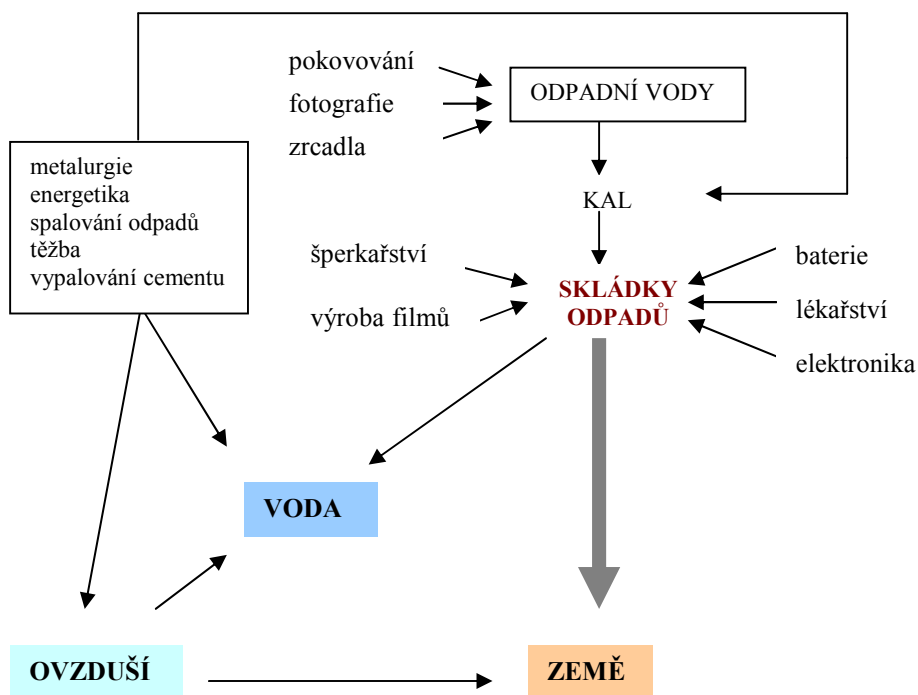
Všeobecně se předpokládá, že nanočástice jsou toxické pro svou schopnost indukovat aktivní formy kyslíku (ROS) a že hladina ROS závisí na chemii a struktuře nanočástic (Nel *et al.*, 2006). ROS a aktivní formy dusíku (RNS) hrají důležitou roli u mnoha degenerativních chorob a stárnutí. (Karakoti *et al.*, 2009). Proces tvorby ROS je spojen s mitotickou dráhou smrti buňky, a tak zvýšená hladina ROS v buňkách může vést k indukci apoptózy a nekróze buňky (Ott *et al.*, 2007; Ueda *et al.*, 2002). ROS mají duální funkci a mohou také vystupovat jako signální přenašeče.

Schopnost rostlin produkovat oxid dusnatý (NO) je dnes již dobře známa. U rostlin je NO zapojen v kontrole vývoje orgánů a v regulaci některých jejich fyziologických funkcí. Nedávno bylo prokázáno, že pyl generuje NO a jeho produkce byla změřena jak intercelulárně, tak také extracelulárně (Wilson, 2009).

2. Výskyt stříbra a charakteristika nanočástic

Stříbro patří mezi ušlechtilé kovy. V přírodě se obvykle vyskytuje ve sloučeninách, vzácně i jako ryzí kov. Obsah stříbra v povrchových vodách se pohybuje od 0,01 $\mu\text{g/l}$ (v nekontaminovaných oblastech) až po 0,1 $\mu\text{g/l}$ (v průmyslových oblastech). V půdě se průměrně vyskytuje stříbro v koncentraci 0,1 $\mu\text{g/l}$, ale v oblastech s výskytem stříbronosných rud byly zjištěny obsahy stříbrných iontů až nad 40 $\mu\text{g/l}$. Obsah stříbrných iontů v odpadních kalcích z chemických, průmyslových a těžebních provozů jsou relativně vysoké a mohou dosáhnout hodnoty až 900 $\mu\text{g/l}$, na rozdíl od velmi nízkých koncentrací v přirozeném životním prostředí

(Koontz & Berle, 1980). Do životního prostředí se stříbro dostává ve vyšší koncentraci z různých zdrojů, a to díky průmyslové výrobě, metalurgii a také fotografickému průmyslu. Stříbrné ionty se pak mohou šířit dál do celého ekologického systému (Obr. 1) (Gorsuch & Klaine, 1998; Hirsch, 1998).



Obr.1

Schéma toku stříbrných iontů v životním prostředí (upraveno podle Křížková *et al.*, 2009).

Nanočástice jsou atomové nebo molekulární agregáty s rozměry mezi 1 a 100 nm (Ball, 2002; Roco, 2003). V závislosti na původu lze rozlišit tři typy nanočástic: přírodní, vedlejší a umělé (vyrobené). Přírodní nanočástice existovaly již od počátku historie Země a stále se objevují v životním prostředí (sopečný prach, měsíční prach, minerální sloučeniny atd.). Vedlejší nanočástice, také definované jako odpad nebo antropogenní částice, jsou produkty lidských průmyslových procesů (výfukové plyny nafty, spalování uhlí, kouř ze sváření atd.). Posledním typem jsou uměle vyrobené nanomateriály, které mohou být rozděleny do čtyř skupin: 1) materiály složené z uhlíku, většinou obsahující fullereny, jednostěnné a mnohostěnné uhlíkové nanotrubičky; 2) materiály složené z kovu, např. nanozlato, nanozinek, nanohliník a oxidy kovu v nano rozměrech, jako je TiO_2 , ZnO a Al_2O_3 ; 3) polymery s nano rozměry vystavěné z větvených jednotek, které mohou mít specifické chemické funkce; 4) sloučeniny, které kombinují nanočástice s dalšími nanočásticemi (Lin & Xing, 2007) a tvoří rozmanité tvary, jako jsou koule, trubičky, tyčky a hranoly (Ju-Nam & Lead, 2008).

3. Praktické aplikace stříbrných iontů a nanočástic stříbra

V současnosti mohou být nanočástice vyrobeny z velkého množství rozmanitých materiálů a jejich působení závisí na chemické skladbě, velikosti a tvaru částic (Brunner *et al.*, 2006). Aplikační využití uměle vyrobených nanočástic (ENPs) s velikostí menší než 100 nm se rychle rozšiřuje v různých oblastech ekonomiky, jako je textilnictví, elektronika, farmacie, kosmetika a rovněž i při ozdravování životního prostředí (Borm, 2002; Guzman *et al.*, 2006). Možnou aplikací nanočástic je i cílená distribuce léčiv a diagnostických látek nebo peptidických fragmentů v organismu (Chomoucká *et al.*, 2010). Investice do nanotechnologií roste na celém světě (celosvětová investice do nanotechnologií byla v roce 2005 kolem 10 biliónů \$) (Harrison, 2007) a je odhadnuto, že každoroční obrat produktů týkající se nanotechnologií bude pro roky 2011 až 2015 až 1 trillion \$ (Roco, 2005). Protože jsou ENPs široce využívané v komerčních produktech, je očekáván i jejich vstup do atmosféry, do vodního i suchozemského prostředí, kde je jejich osud a chování zatím z velké části neznámé (Nowack & Bucheli, 2007).

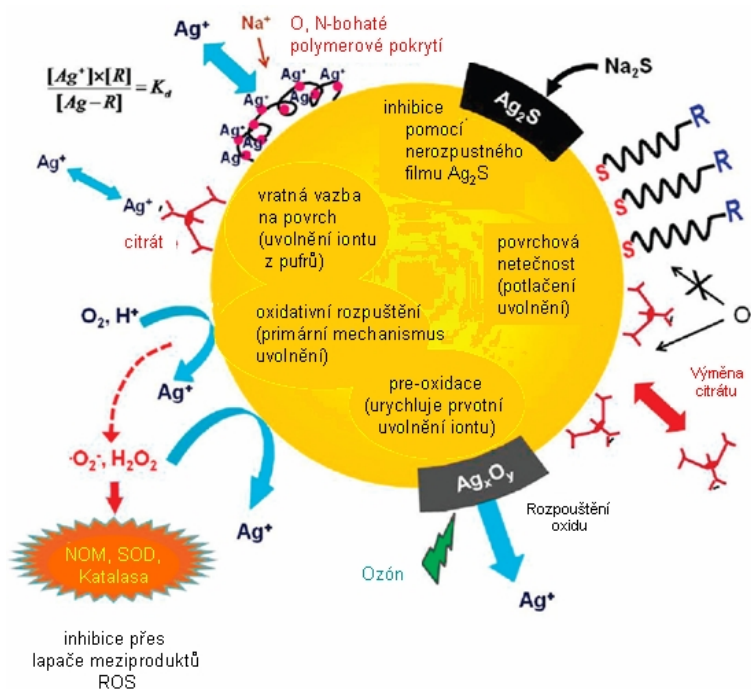
Nanotechnologie se uplatňují v mnoha oblastech lidské činnosti. Například nanočástice stříbra (nano-Ag) použité ve vodním filtru jsou odolné proti vymývání a mohou sloužit k odstranění bakterií z vody (Jain & Pradeep, 2005). Nano-Ag ve směsi s cementem vykazují vysokou antibakteriální aktivitu (Alt *et al.*, 2004). Dále jsou nano-Ag využívány v elektronice, textilním a potravinářském průmyslu, v malířství, kosmetice (krémy na opalování) a v lékařském odvětví (Ahamed *et al.*, 2010). Vývoj nano-Ag obnovil zájem i o antimikrobiální účinky kovů, který klesl s rozšiřujícím se využíváním moderních antibiotik (Kim *et al.*, 2009). Nano-Ag se také využívá k prevenci bakteriálních infekcí tak, že se přidávají do různých povrchů, např. do cévek (katetry) (Samuel & Guggenbichler, 2004), protéz (Gosheger *et al.*, 2004) a oblečení (Vigneshwaran *et al.*, 2007).

Baktericidní účinek stříbrných iontů je studován a využíván již řadu let (Russell & Hugo, 1994; Hwang *et al.*, 2007). Stříbrné ionty jsou díky svým vlastnostem a účinkům široce používány ve zdravotní péči pro kontrolu mikroorganismů. Bakteriostatický účinek stříbrných iontů je využíván mimo jiné pro dezinfekci vody, protože nemají nežádoucí vliv na barvu, chuť ani zápach vody (Yahya *et al.*, 1992), nebo při ošetření popálenin (Thurman & Gerba, 1988; Drake & Hazelwood, 2005; Silvestry-Rodriguez *et al.*, 2007).

4. Mechanismus působení nano-Ag a Ag^+

Stříbrné ionty jsou velmi reaktivní. Vedou k inhibici mikrobiální respirace a metabolismu. Nanotechnologie ještě zesiluje účinnost stříbrných částic jako antimikrobiálních činitelů, protože větší povrch stříbrných nanočástic zvyšuje jejich kontakt s mikroby a jejich schopnost vstupovat do buňky (Křížková *et al.*, 2009).

Mechanismus působení nanočástic zůstává z velké části neprozkoumán. Hlavní cesta biologické aktivity nano-Ag spočívá v uvolňování Ag^+ . Nedávné studie ukázaly, že největší množství Ag^+ pochází z oxidace částic Ag^0 , a to typickou reakcí s rozpuštěným kyslíkem (Lok *et al.*, 2007; Liu & Hurt, 2010). Existují různé chemické pochody (Obr. 2) umožňující uvolnění rozpustného biologicky aktivního stříbra z povrchu nanočástic (Liu *et al.*, 2010).

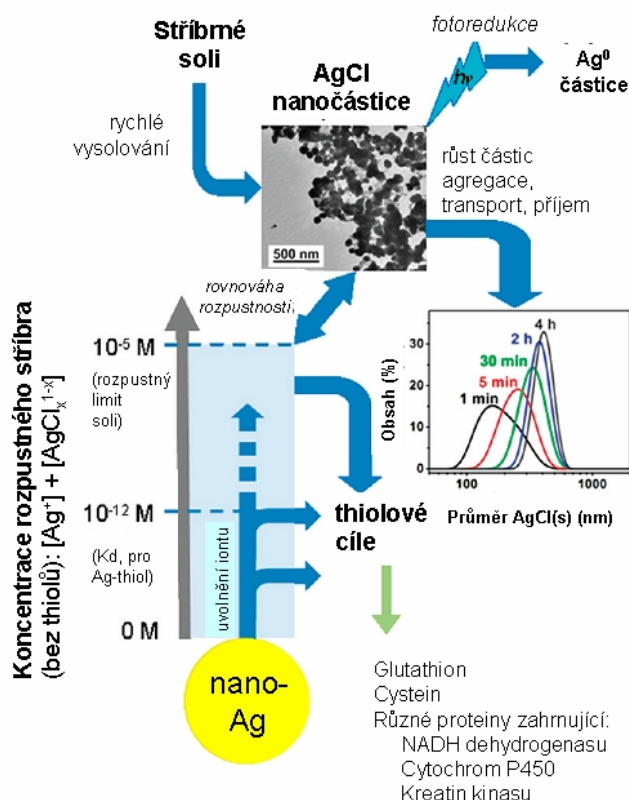


Obr. 2

Shrnutí chemických pochodů vedoucích k uvolnění biologicky aktivního stříbra z povrchu nano-Ag (upraveno podle Liu *et al.*, 2010).

Stříbrné ionty jsou schopny tvořit řadu komplexů nízkomolekulární i vysokomolekulární povahy. Jejich vazba na proteiny se uskutečňuje především pomocí thiolových skupin cysteinových zbytků proteinů s možnou následnou inaktivací jejich enzymatických funkcí (Liau *et al.*, 1997; McDonnel & Russell, 1999). Thioly hrají v živých systémech důležitou roli v antioxidačních reakcích, struktuře proteinů, signální transdukcii,

metabolismu xenobiotik a v imunitní reakci organismu. Proteiny, které obsahují thiolové skupiny, jsou proto hlavními cíly stříbrných iontů (Obr. 3) (Luoma, 2008; Chen *et al.*, 2008).



Obr. 3

Působení nano-Ag a stříbrných solí na biologické systémy.

Světle modrá oblast reprezentuje biologicky aktivní rozpustný Ag^+ a AgCl_x^{1-x} komplexy. Přídavek stříbrné soli do média (nahore) způsobuje rychlou precipitaci AgCl nanočástic. Precipitace nanočástic je následována dynamickou agregací, usazením, buněčným příjmem nebo dokonce fotoreduktivními procesy, které nebyly dostatečně definovány nebo studovány. Přídavek kovového nano-Ag (dole) vede k postupnému uvolňování iontů. Vysoká afinita vazby Ag na thioly. Obrázek z transmisního elektronového mikroskopu zobrazuje AgCl nanočástice, které vznikají smícháním odpovídajícího množství 0,2 mM AgNO_3 a roztoku NaCl (Liu *et al.*, 2010).

Ag^+ při vstupu do buňky interkalují do bakteriální DNA, což brání např. další proliferaci patogenu. V případě DNA může docházet k interakci Ag^+ s jednotlivými bazemi, především s N7 adeninu a guaninu (Arakawa *et al.*, 2001). Možná je i vazba stříbrných iontů na polysacharidy buněčné stěny (Hall, 2002).

Pokroky v nanotechnologii vedou k rychlému rozvoji nových materiálů. Povrchové vlastnosti ENPs mají vliv na jejich chování během shlukování a na jejich pohyblivost v

prostředí. Buňky rostlin, řas a hub mají buněčné stěny, které tvoří primární místo pro interakci a bariéru při vstupu ENPs, ale mechanismus procházení nanočástic přes buněčnou stěnu a membrány je stále málo znám. Uvnitř buněk mohou nanočástice vyvolat v rámci obranné reakce organismu změny ve struktuře cytoplazmatické membrány a v membránách ostatních buněčných struktur. Účinek nanočástic závisí na jejich chemických a fyzikálních vlastnostech a často bývá spojen s produkcí ROS (Navarro *et al.*, 2008).

Ag^+ vyvolávají u rostlin oxidativní stres, a ten má za následek poškození proteinů, nenasyčených mastných kyselin a také DNA, což může vést k nezvratnému poškození buňky a vyústit až v její smrt. Zvýšená koncentrace ROS se projevuje předčasnými příznaky senescence následovanými nekrotizací (Le Pape *et al.*, 2004; Yoshimaru *et al.*, 2006; Scragg & Bonnett, 2002).

5. Toxicita nano-Ag a Ag^+

Toxicita těžkých kovů a jejich sloučenin je závislá na jejich rozpustnosti ve vodě. Rovněž akutní toxicita jednotlivých sloučenin stříbra se výrazně liší v závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě. Většina stříbrných iontů tvoří nerozpustné sloučeniny (především sulfidy a chloridy). Z tohoto důvodu stříbro, přes svůj výrazný toxický účinek v iontové formě, nepatří k nejzávažnějším polutantům z řad těžkých kovů (Koontz & Berle, 1980; Wood *et al.*, 1999). Ve sloučeninách se stříbro vyskytuje hlavně v oxidačním stavu Ag^+ , možné jsou i Ag^{2+} a Ag^{3+} . Sloučeniny dvojmocného stříbra Ag^{2+} jsou nestálé a mají silné oxidační schopnosti. Stříbro Ag^{3+} je nutné z důvodu jeho nestálosti stabilizovat velkými anionty. Pro ryby a jiné vodní organismy je stříbro mimořádně toxické a již při koncentraci Ag^+ 15 $\mu\text{g/l}$ dochází k úhynu nejcitlivějších druhů (Křížková *et al.*, 2008). Toxický účinek stříbra byl potvrzen i u nižších organismů (Hiriart-Baer *et al.*, 2006; Perrein-Ettajani *et al.*, 1999; Wang, 1992; Naumann *et al.*, 2007).

Od té doby, co společnost začala široce používat nanomateriály, začal růst zájem, zda neznámé riziko ENPs, přesněji jejich dopad na zdraví a životní prostředí, nepřeváží jejich výhody pro společnost. Proto je důležité zhodnotit i jejich potenciální toxicitu (Chomoucká *et al.*, 2010). Přestože jsou nanočástice v posledních letech stále více všestranně používány, jejich toxicita není zatím dobře prozkoumána. Nejsou známy jejich dlouhodobé účinky, bioakumulace a vlivy na struktury látek. Nanočástice mohou také ovlivňovat toxicitu jiných sloučenin, a to tak, že působí jako nanonosiče různých kontaminantů (Chomoucká *et al.*, 2010). Nanočástice mohou díky svým velmi malým rozměrům snadno pronikat buněčnými stěnami, ale z organismu se naopak mohou obtížně vylučovat. Dále mohou za určitých podmínek vytvářet nové samovolně rostoucí struktury, které mají neznámé vlastnosti (Chomoucká *et al.*, 2010).

Částice s nano velikostí vykazují speciální toxicitu a jsou většinou více toxické než většina materiálů větších velikostí (Donaldson *et al.*, 2002). Když jsou inhalovány samostatné částice, mající v průměru méně než 50 nm, bylo prokázáno, že jsou vysoce toxické (Oberdörster, 1996). Toxicita nanočástic úzce souvisí s chemickým složením, strukturou, velikostí a povrchem nanočástic a lze ji odvodit dvěma způsoby: Z chemické toxicity na základě chemického složení (např. uvolnění toxických iontů) a ze stresu nebo podnětů způsobených povrchem, velikostí a nebo tvarem částic (Chomoucká *et al.*, 2010).

5.1. Toxicita nano-Ag a Ag⁺ - na živočichy

Cytotoxicita nano-Ag byla zaznamenána *in vitro* u savčích buněk (Hussain, 2005), kde byla prokázána inhibice segregace chromosomů (Nallathamby & Xu, 2010). Genotoxicita, zahrnující poškození DNA a chromosomové aberace, byla pozorována u lidských buněk glioblastomů ošetřených nano-Ag (Hussain *et al.*, 2005). Nanočástice, jako jsou fullereny, uhlíkové trubičky a oxidy kovů, jsou pro lidské buňky a hlodavce toxické (Brunner *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2005).

Ag⁺ rozptýlené ve vodném prostředí je extrémně toxické pro některé organismy, jako jsou ryby a fytoplankton (Luoma, 2008; Navarro *et al.*, 2008).

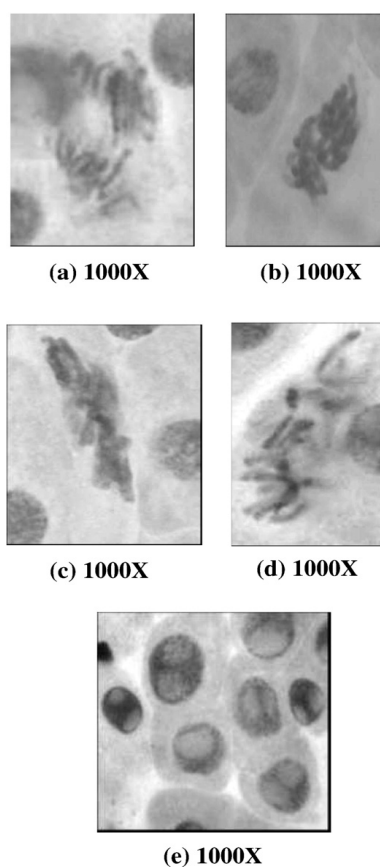
5.2. Toxicita nano-Ag a Ag⁺ - na rostliny a mikroorganismy

Před širokým komerčním použitím nanočástic je nutné ověřit a zvážit jejich dopad na zdraví a životní prostředí. Ačkoliv existuje již několik studií o cytotoxickém vlivu nanočástic na savčí a lidské buněčné linie, o cytotoxickém či genotoxickém vlivu nanočástic na buňky rostlin je toho zatím známo jen málo. Rostliny, protože tvoří důležitou složku ekosystému, je nutné zahrnout do celkového hodnocení toxikologického dopadu nanočástic na životní prostředí. Pro studium genotoxicity a cytotoxicity nanočástic u rostlin se jako indikátory toxicity využívají buňky na vrcholku kořenů. Negativní vliv nanomateriálů na růst a vývoj rostlin byl prokázán v řadě studií (Handy *et al.* 2008; Ju-Nam & Lead 2008). Publikované výsledky jsou založené na testech navržených USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1996), která vzala v úvahu studie účinku nanočástic na klíčivost a prodlužování kořene, doprovázené stanovením změny biomasy, a anatomicko-histologické studie použitelné pro doložení *in situ* příznaků možné toxicity nanočástic (Lin & Xing, 2007). V práci Barrena (2009) byla toxicita nanočástic

zkoumána s použitím standardních testů, jako je klíčení (okurky a salátu), bioluminiscence (*Photobacterium phosphoreum*) a anaerobní testy toxicity.

V případě suchozemských rostlin bylo zjištěno, že rostliny jsou nejcitlivější na působení stříbra ve stadiu klíčení, kde byly negativní efekty pozorovány již při koncentraci Ag^+ 750 $\mu\text{g/l}$ u salátu hlávkového (*Lactuca sativa*) a 7 500 $\mu\text{g/l}$ u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) a dalších testovaných rostlin (Ratte, 1999).

Ve studii Kumari *et al.* (2009), realizované na vrcholové části kořenů *Allium cepa*, byl studován vliv čtyř rozdílných koncentrací (20, 25, 75 a 100 ppm) nano-Ag (s rozměry menšími než 100 nm) na změnu mitotického indexu, rozptylu buněk v mitotické fázi a různé typy chromosomových aberací. Ze získaných výsledků lze usuzovat, že nano-Ag mohou proniknout do rostlinného systému, kde v závislosti na koncentraci snižují mitotický index, indukují chromosomové aberace, a tak negativně ovlivňují buněčné dělení (Obr. 4) (Kumari *et al.*, 2009).

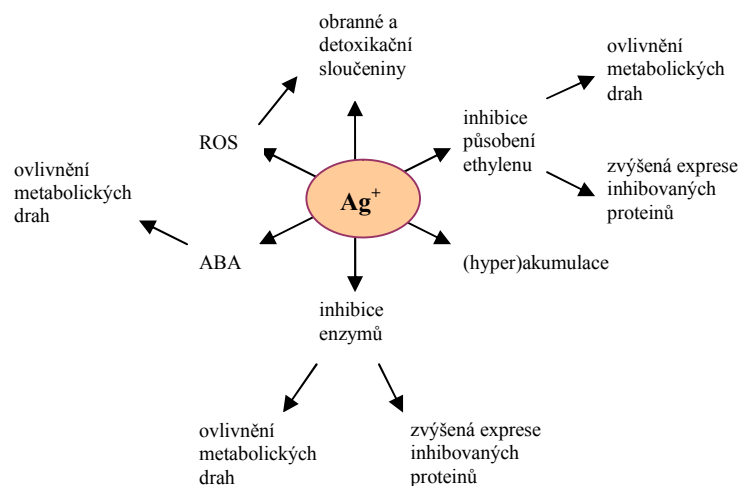


Obr. 4

Nano-Ag indukují u vrcholových buněk kořenů *A. cepa* chromosomové aberace.

A) Chromatinový můstek, B) lepivost, C) rozrušená metafáze, D) četné chromosomové zlomy, E) rozpad buněčné stěny. Zvětšeno 1000X (Kumari *et al.*, 2009).

Experimentálně bylo prokázáno, že stříbro ovlivňuje v rostlinách celou řadu procesů, z nichž nejznámější je inhibice působení ethylenu (senescence), ovlivnění permeability membrán, a tím příjmu vody a minerálů, inhibice různých enzymů a vzniku ROS (Obr. 5) (Křížková *et al.*, 2009).



Obr. 5

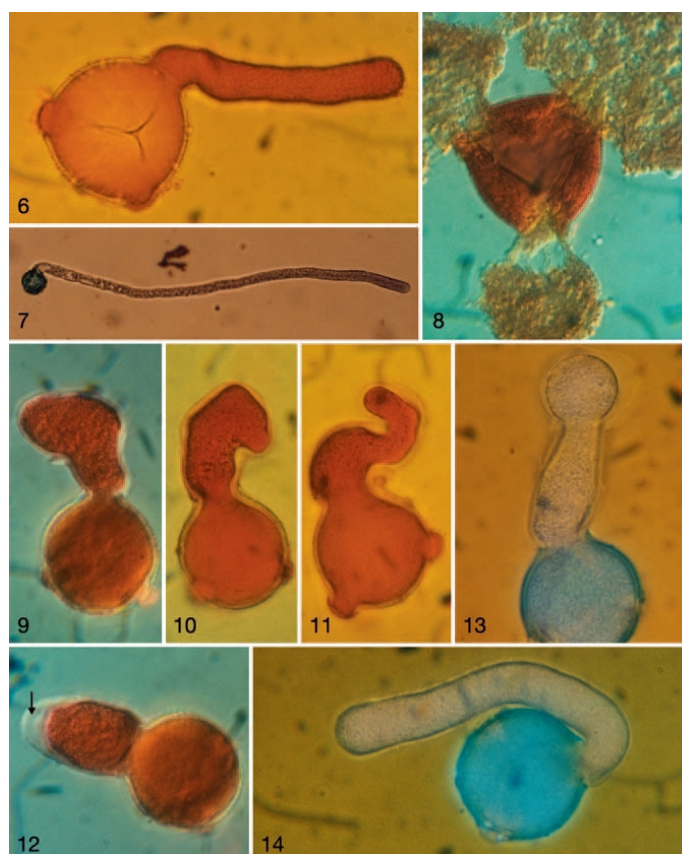
Působení Ag^+ na rostlinný organismus (upraveno podle Křížková *et al.* 2009).

6. Schopnost rostlin vázat těžké kovy

Některé rostlinné druhy jsou schopny vázat vysoké koncentrace těžkých kovů. Pokud se jedná o hodnoty, které jsou vyšší než 0,1 hm. % v sušině, v případě většiny kovů - s výjimkou zinku (1 hm. % v sušině), kadmia (0,01 hm. % v sušině) a zlata (0,0001 hm. % v sušině) - je tento jev označován jako hyperakumulace (Brooks *et al.*, 1998). Nedávno bylo prokázáno, že rostliny mohou sloužit rovněž jako „výrobci kovových nanočástic“ (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005; Harris & Bali, 2008). Hyperakumulaci stříbra rostlinami je také možné využít pro výrobu nano-Ag (Harris & Bali, 2008).

7. Vliv těžkých kovů na proces klíčení pylu

Během posledních desetiletí drasticky vzrostlo znečištění životního prostředí těžkými kovy, které mohou mít negativní vliv na člověka, zvířata a rostlinné organismy (Nedelkoska & Doran, 2000). Pyl je velmi citlivý na různé polutanty a klíčení pylu a růst pylových láček je inhibováno v přítomnosti různých těžkých kovů, hlavně v přítomnosti kadmia. Senzitivní standardní systém využitelný pro studium biologické aktivity různých toxických kovů na buněčné úrovni poskytla kultivace pylových láček v kultuře *in vitro* (Kristen *et al.* 1993; Gur & Topdemir 2005). Během posledních dvou desetiletí byly použity pylové láčky různých rostlinných druhů ke zjištění cytotoxického efektu environmentálních polutantů (Xiong & Peng 2001; Gur & Topdemir 2005). Byl studován vliv těžkých kovů na klíčení pylu a růst pylové láčky u *Lilium longiflorum* (Sawidis & Reiss 1995; Sawidis, 2008) a v případě kadmia byl prokázán vysoký toxický efekt na klíčení pylu a růst pylové láčky v závislosti na koncentraci těžkého kovu (Obr. 6).



Obr. 6

Vliv aplikace kadmia u pylu *Nicotiana tabacum*.

6) Dvě hodiny po začátku klíčení pylu tabáku na mediu bez kovu. 7) Tři hodiny po začátku klíčení pylu tabáku na mediu bez kovu. 8) Pylová zrna kultivovaná ve vysoké koncentraci

kadmia (10^{-2} M) po dobu 1 h. Prasknutí pylového zrna. 9-11) Rozdílné formy nerovnoměrného růstu pylových láček 2 h po začátku klíčení na mediu s koncentrací kadmia 10^{-4} M. Růst pylových láček je téměř zastaven a láčky vykazují proměnné morfologické odezvy. 12) Ztloustnutí buněčné stěny ve vrcholové oblasti pylové láčky (šipka) 2 h po začátku klíčení na mediu s koncentrací kadmia 10^{-4} M. 13) Zduřelá vrcholová oblast 2,5 h po začátku klíčení na mediu s koncentrací kadmia 10^{-5} M. 14) Poškození láčky bylo lokalizováno na straně, kde se pylová láčka ohnula přes pylové zrno, 3 h po začátku klíčení na mediu s koncentrací kadmia 10^{-5} M (Sawidis, 2008).

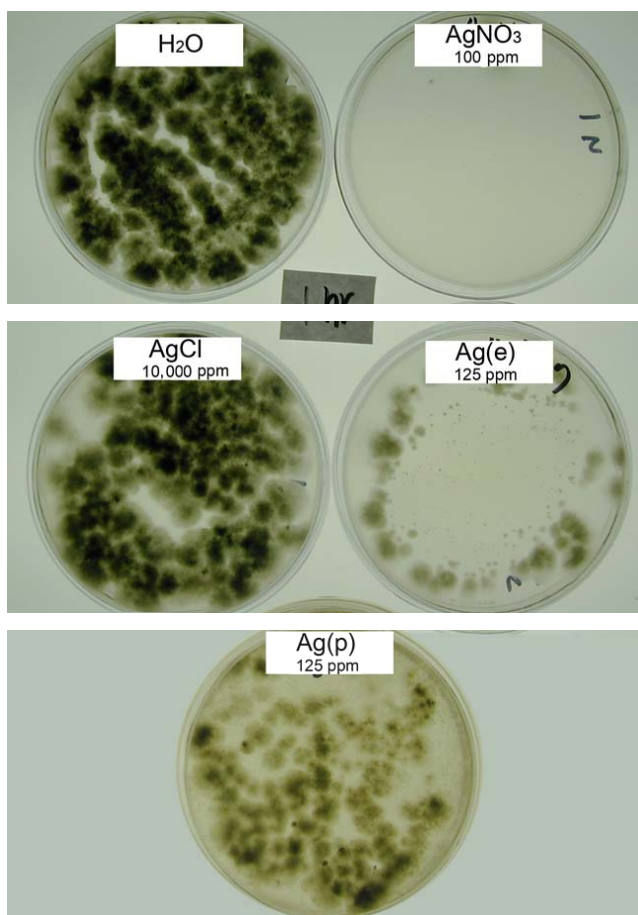
Koncentrace kadmia nad 10^{-2} M kompletně zastavila klíčení pylu a pylové zrno vykazovalo zvyšující se tendenci k praskání. Při nízkých koncentracích způsobuje kadmium mírnou stimulaci klíčení pylu a prodlužování láčky v počáteční fázi vývoje láčky. Porovnáním studií na dvou rostlinách bylo kadmium více toxické pro pyl *Nicotiana tabacum* než pro pyl *Lilium longiflorum*. Pylové láčky vykazovaly velké množství silných morfologických abnormalit, charakterizovaných nestejným nebo odchýleným růstem, zahrnující vrcholové větvení nebo nabobtnání láčky na vrcholku. Rozrušení buněčné stěny na vrcholku nebo v jeho blízkosti bylo zaznamenáno na vnitřní straně. Zvýšením koncentrace kadmia (10^{-3} – 10^{-2} M) poklesl nebo byl kompletně zastaven cytoplazmatický tok. Vesikulární apikální zóna byla velmi silně redukována a vesikuly byly rozptýleny v subapikálním regionu. Viditelné ultrastrukturální změny v buněčných organelách nebyly pozorovány (Sawidis, 2008).

8. Vliv nano-Ag a Ag^+ na proces klíčení spor

Nano-Ag a Ag^+ jsou pro svou vysokou antimikrobiální aktivitu široce využívány např. pro různé sterilizační účely, zahrnující např. lékařské materiály a zlepšení kvality vody. Co se týká využití stříbra při napadení patogeny, existuje pouze několik studií (Kim *et al.* 2009; Jo *et al.*, 2009).

Byl testován vliv nano-Ag a Ag^+ na rostlinné houbové patogeny *Bipolaris sorokiniana* a *Magnaporthe grisea*. *In vitro* kvantitativní rozbor v Petriho miskách indikoval, že Ag^+ a nano-Ag mají významný vliv na formaci kolonií těchto dvou zkoumaných patogenů (Obr. 7). Efektivní koncentrace, kdy byla z 50 % inhibována formace kolonie (EC50) v čase od 1 do 6 h po ošetření konidií stříbrem u *B. sorokiniana*, byla od 1,2 do 2,2 ppm pro AgNO_3 , od 4,8 do 8,8 ppm pro $\text{Ag}(p)$ (nanočástice) a od 6,1 do 8,4 ppm pro $\text{Ag}(e)$ (elektrochemické stříbro). EC50 pro *M. grisea* byla vždy nižší než u *B. sorokiniana* a pohybovala se od 0,8 do 1,0 ppm pro

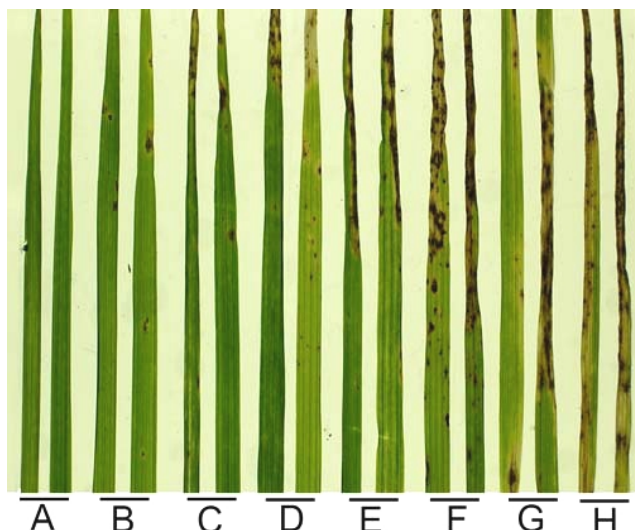
AgNO₃, od 3,9 do 4,7 ppm pro Ag(p), a od 5,6 do 6,8 ppm pro Ag(e) v čase od 1 do 6 h po ošetření stříbrem.



Obr. 7

Utváření kolonie *Bipolaris sorokiniana* na bramborovém dextrosovém agaru 1 h po ošetření spor vodou, AgNO₃, AgCl, nano-Ag [Ag(p)] a elektrochemickým stříbrem [Ag(e)]. Zobrazení byla pořízena po inkubaci kultur po 6 dnech při 25 °C (Jo *et al.*, 2009).

Při studiu vlivu Ag⁺ a nano-Ag na vývoj rostlinného patogenu byly pozorovány změny v projevu a rozvoji nemoci způsobené patogenními houbami na listu rostliny. V rostlině byla účinnost stříbrných iontů i nano-Ag mnohem větší v případě preventivní aplikace, což je pravděpodobně dáno přímým kontaktem stříbra se sporami a klíčovými vlákny (Obr. 8) (Jo *et al.*, 2009).



Obr. 8

Symptomy nemoci listů jílku vytrvalého 7 dní po naočkování spory *Bipolaris sorokiniana*.

Tři hodiny před naočkováním sporami byly rostliny ošetřeny: A) elektrochemickým stříbrem [Ag(e), 50 ppm], B) nano-Ag [Ag(p), 200 ppm], C) AgNO₃ (50 ppm), D) Ag(e) (50 ppm) + NaCl, E) Ag(p) (200 ppm) + NaCl, F) AgNO₃ (50 ppm) + NaCl, G) AgCl (200 ppm) a H) voda (Jo *et al.*, 2009).

9. Produkce a úloha aktivních forem kyslíku u rostlin

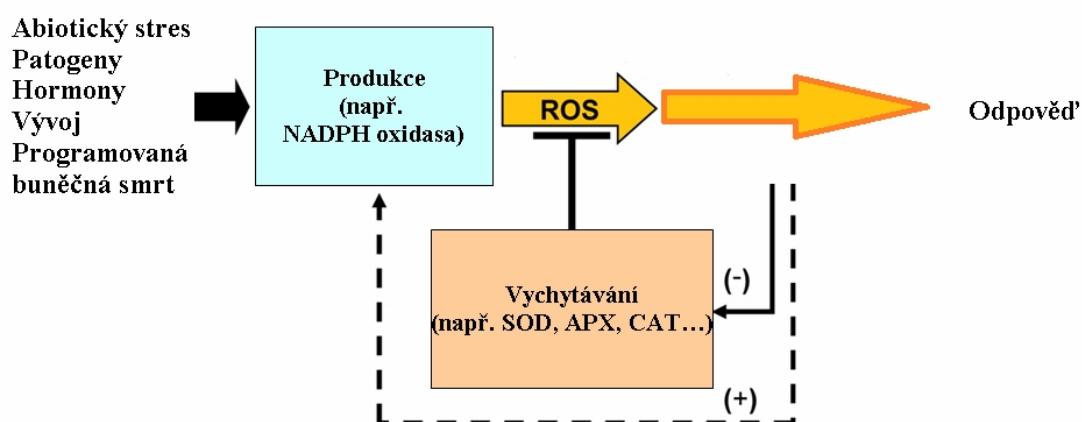
Aktivní formy kyslíku (ROS) tvoří skupinu krátce existujících reaktivních oxidantů, zahrnující např. superoxidový radikál (O₂⁻), hydroxidový radikál (•OH), peroxid vodíku (H₂O₂) a singletový kyslík. Peroxid vodíku má nejdelší poločas rozpadu, a hraje tak významnou roli v odpovědi rostlin na působení stresových faktorů (Polle, 2001). V plazmatické membráně je lokalizovaná NADPH oxidasa (NOx) katalyzující tvorbu extracelulárního O₂⁻ z molekulárního kyslíku (Reevers *et al.*, 2002). Největší množství kyslíkatých radikálů se u rostlin tvoří zejména v chloroplastech. Dále jsou ROS produkovány v mitochondriích a dalších membránových systémech a v buněčné stěně.

U všech rostlin se tvoří ROS i za normálních fyziologických podmínek (např. v chloroplastu byla detekována rychlost produkce O₂⁻ 240 μmol s⁻¹ a koncentrace H₂O₂ 0,5 μM). Působením stresových faktorů na rostlinu dochází k narušení buněčné homeostázy. V tomto případě se koncentrace kyslíkatých radikálů může výrazně zvýšit (např. v chloroplastu rychlost produkce až na 720 μmol s⁻¹ O₂⁻ a koncentrace H₂O₂ (5-15 μM) (Polle, 2001). Oxidativní stres je výsledkem nerovnováhy mezi generací ROS a buněčných obranných mechanismů zahrnující řadu antioxidačních systémů. Oxidativní stres pak

vede k poškození proteinů, DNA a peroxidaci lipidů (Sies, 1991). Vlivem působení řady stresových faktorů dochází k výraznému zvýšení koncentrace H_2O_2 , který může mít funkci signální molekuly nebo je v dané koncentraci pro buňku již toxický. Řadou antioxidantních mechanismů, a to jak enzymatickou, tak neenzymatickou cestou, je H_2O_2 odstraňován z buněk (Neill *et al.*, 2002).

V obranných reakcích rostlin vyvolaných biotickým a abiotickým stresem hrají ROS důležitou roli. Například vysoké hladiny ROS, které byly detekovány v odpovědi rostliny na napadení patogenem, se podílí na hypersensitivní buněčné smrti infikovaných buněk s cílem zabránit šíření patogenu (Mur *et al.*, 2008). Bylo také zjištěno, že ROS jsou důležitými regulátory rostlinného vývoje, kde hrají roli v procesech, jako je hormonální transdukce signálu a modulační polymerové struktury buněčné stěny (Muller *et al.*, 2009).

Signalizace je kontrolována produkcí a vychytáváním ROS v dané oblasti (Obr. 9). Ačkoliv enzymy zapojené ve vychytávání ROS jsou velmi dobře definované, ještě mnoho je nepochopeno v oblasti zahájení signalizace ROS, v mechanismu odpovědi organismu a v tom, jak je kontrolována rovnováha mezi produkcí a vychytáváním ROS (Bailey-Serres & Mittler, 2006).



Obr. 9

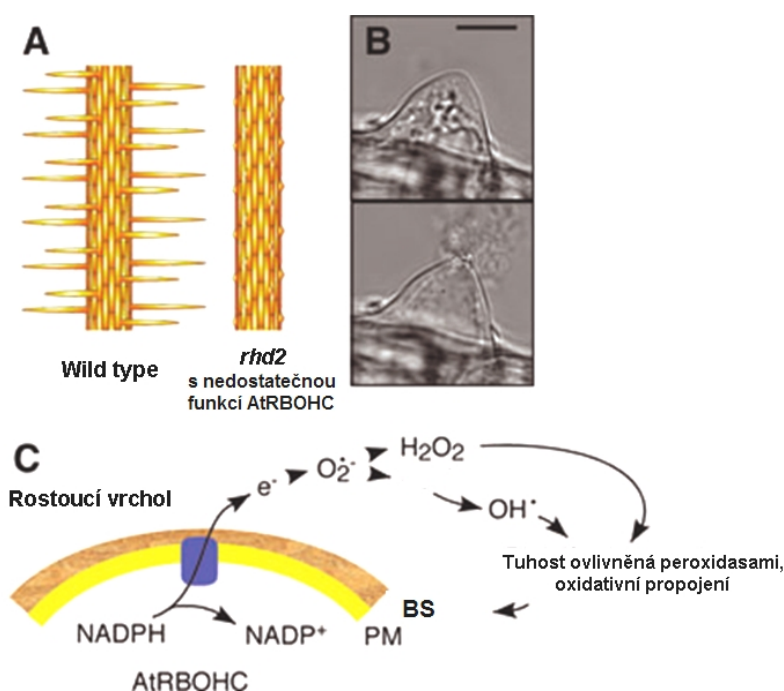
Signální dráhy aktivních kyslíkových forem.

Vychytávání ROS umožňují enzymy, jako jsou superoxid dismutasa (SOD), askorbát peroxidasa (APX) a katalasa (CAT) (upraveno podle Bailey-Serres & Mittler, 2006).

9.1. Úloha aktivních forem kyslíku při klíčení pylu

ROS jsou dnes známy jako důležité regulátory rostlinného vývoje. Nedávné studie vrcholového růstu buněk kořenů prokázaly centrální roli NOx v produkci ROS. Cytosolické ROS se u vrcholově rostoucích buněk podílí např. na uzavírání iontových kanálků. ROS produkované v apoplastu moduluje vlastnosti buněčné stěny. Koordinace produkce ROS a jejich působení je důležitá pro růst a vývoj rostlinných buněk (Swanson, 2009).

GTPasy a jejich regulátory, ROS a fosfolipidy, hrají hlavní roli v kontrole vrcholového růstu pylových láček a kořenových vlásků (Obr. 10, 11). Jsou často lokalizovány v apikálním rostoucím regionu buněk, kde jsou jejich funkce těsně propojené s cytoskeletální přestavbou a polárním transportem váčků, které se účastní vrcholového růstu, stejně tak jako ovlivňují tvorbu a výživu apikálního rostoucího regionu (Lee *et al.*, 2008). Vrcholový růst je spojen se zakládáním nové buněčné stěny a membrány na vrcholu prodlužující se buňky (Swanson, 2009).

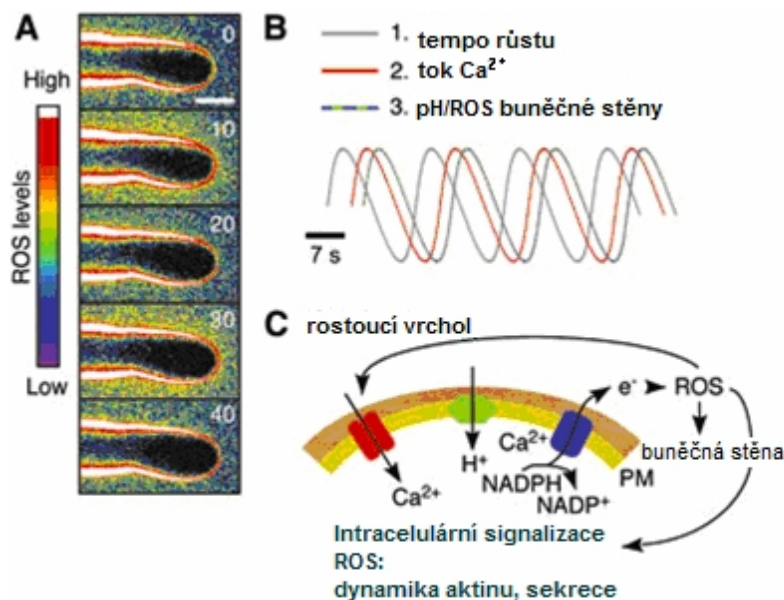


Obr. 10

Vliv aktivních forem kyslíku na vrcholový růst.

A) Kořenové vlásky u wild-type *Arabidopsis* a u mutantu *rhd2* (root hair defective), u kterého nedochází k tvorbě kořenových vlásků z důvodů neschopnosti tvořit ROS. B) Detailní foto kořenových vlásků (mutant *rhd2* - dole). AtRBOHC (respiratory burst oxidase homolog C u *Arabidopsis*) je analogem pro katalytickou podjednotku savčí NADPH oxidasy. Bez přesné funkce AtRBOHC se nemůže správně udržovat integrita buněčné stěny na vrcholku a buňka

praská. C) Model ukazující zapojení AtRBOHC ve vrcholovém růstu kořenových vlásků (upraveno podle Swanson, 2009).



Obr. 11

Oscilace aktivních forem kyslíku, Ca²⁺, pH buněčné stěny a tempo růstu kořenových vlásků.

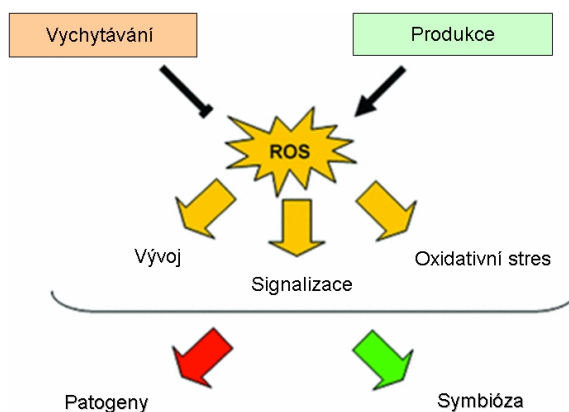
A) Zobrazení hladiny ROS během růstu kořenových vlásků. Extracelulární hladina ROS dosáhne maxima přibližně třikrát za minutu. Čas je v sekundách. Měřítka = 10 μm. Zobrazení bylo převzato od Monshausen *et al.*, 2007. B) Schéma dočasné separace tempa růstu, toku Ca²⁺ a pH/ROS buněčné stěny u rostoucích kořenových vlásků. C) Model procesů během růstu na vrcholku kořenových vlásků. Červená je pro tok Ca²⁺ přes aktivovaný vápenatý kanálek. Zelená zobrazuje H⁺ transportéry na plazmatické membráně. Modrá je pro AtRBOHC a vede k produkci ROS. ROS se podílí na tvorbě buněčné stěny (hnědě) a intracelulární signalizaci pro přesný vývoj kořene (upraveno podle Swanson, 2009).

9.2 Úloha aktivních forem kyslíku při klíčení spor hub

Aktivní formy kyslíku jsou neustále produkovány jako výsledek aerobního metabolismu a také v odpovědi na biotický a abiotický stres. Zvýšená produkce ROS se v případě interakcí mezi rostlinou a patogenem následně podílí na hypersenzitivní reakci vedoucí

k buněčné smrti. Zdá se, že tato druhá vlna ROS není přítomna během symbiotických interakcí (Nanda *et al.*, 2010).

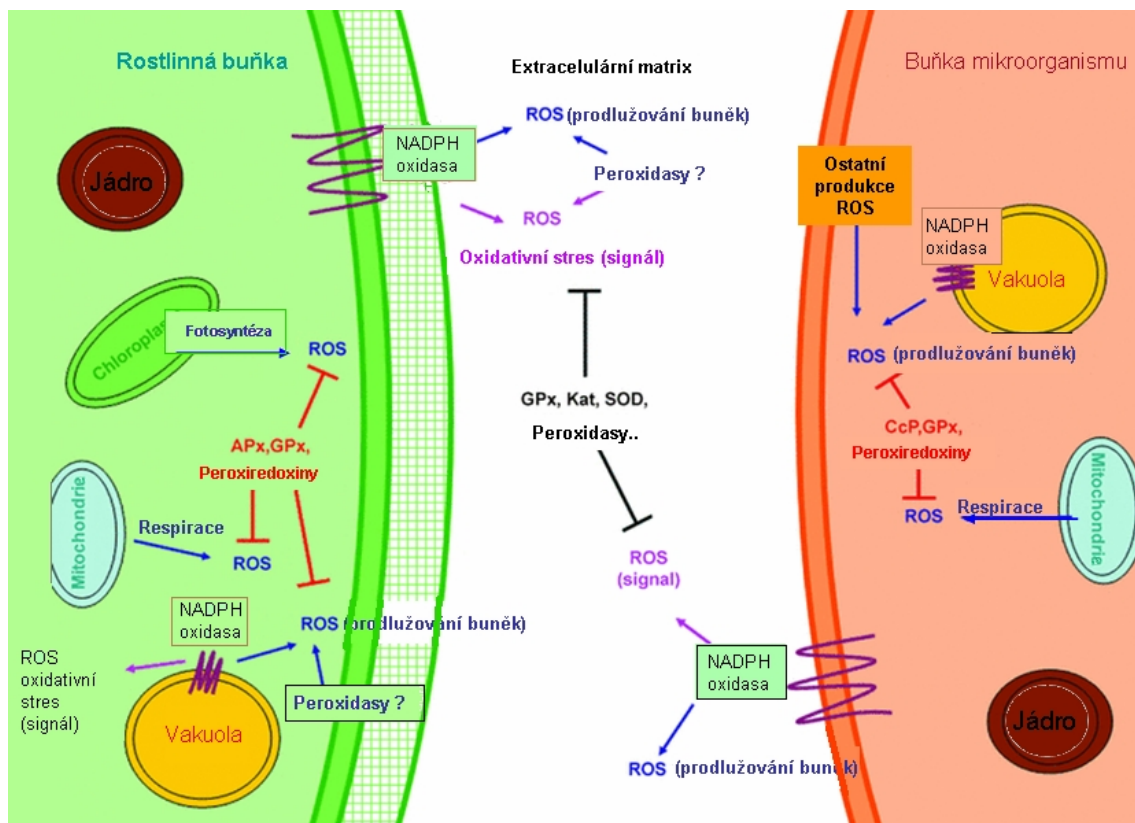
Oxidativní stres, který se často pojí s prvním stádiem interakce, hraje hlavní roli v obraně rostlin (Obr. 12). Aby infikující organismy mohly úspěšně růst, musí mít schopnost vychytávání ROS nebo schopnost pozastavit u rostlin systémy produkující ROS. Zvýšená produkce ROS je po infekci rostliny detekována zejména v apoplastu (Nanda *et al.*, 2010).



Obr. 12

Schéma reprezentující dvojitou roli regulace hladiny ROS (produkce a vychytávání) a hlavní funkce ROS související s interakcemi mezi rostlinami a mikroorganismy (Nanda *et al.*, 2010).

Oxidativní stres se liší v intenzitě a délce v závislosti, zda se jedná o interakci mezi rostlinou-patogenem nebo rostlinou-symbiontem. Možnost existence rozdílných regulačních systémů v případě interakce rostliny s patogenem nebo symbiontem potvrzují i práce zaměřené na studium zapojení NOx v obranné reakci rostlin (Obr. 13). Rozdíl může být specifickým signálem pro přesné vymezení odpovědi hostitele na mikroorganismus. Bylo prokázáno, že během interakcí rostliny a patogenu hraje NOx důležitou roli v oxidativním stresu (Nanda *et al.*, 2010).



Obr. 13

Regulace ROS během vývoje a interakce mezi rostlinou a patogenem.

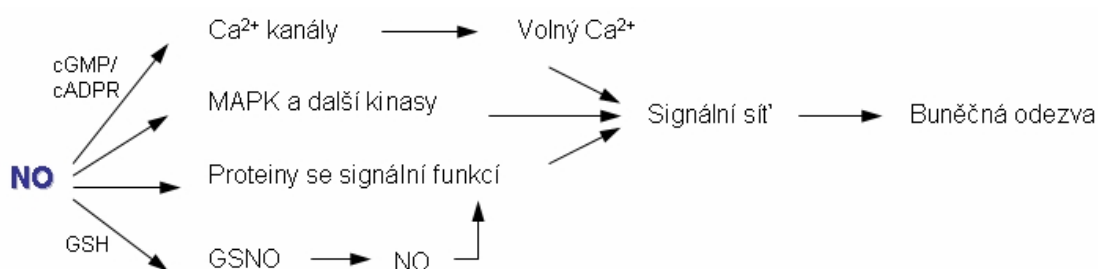
Růžové linie platí pro ROS zapojené v interakcích mezi rostlinami a mikroorganismy. Modré linie platí pro ROS zapojené ve vývoji rostliny (upraveno podle Nanda *et al.*, 2010).

10. Produkce a úloha aktivních forem dusíku u rostlin

Oxid dusnatý (NO) byl intenzivně studován pro objasnění jeho role v procesech vývoje rostliny, metabolismu a odpovědi na stres. Řada studií potvrdila zapojení NO v hormonální odpovědi, programované buněčné smrti, indukované obranné reakci a signální transdukci (Crawford & Guo, 2005).

Několik přenosových kaskád zprostředkovaných NO, které jsou známy u živočichů, bylo identifikováno také u rostlin (Obr. 14). Sekundárními přenašeči mohou být cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklická adenosindifosfát ribosa (cADPR) vedoucí ke změnám množství cytosolického vápníku. Signální funkce NO je také zprostředkována díky kovalentní modifikaci proteinů, jako je nitrace tyrosinů, nitrosylace cysteinů a fosforylace prostřednictvím MAP kinas. NO specificky ovlivňuje expresi genů, které kódují proteiny mající vztah k různým obranným reakcím organismu, transportu, signalizaci, metabolismu a buněčné

detoxifikaci, homeostázi železa, ale i ke kvetení a biosyntéze ligninu (Piterková *et al.*, 2008; Parani *et al.*, 2004).



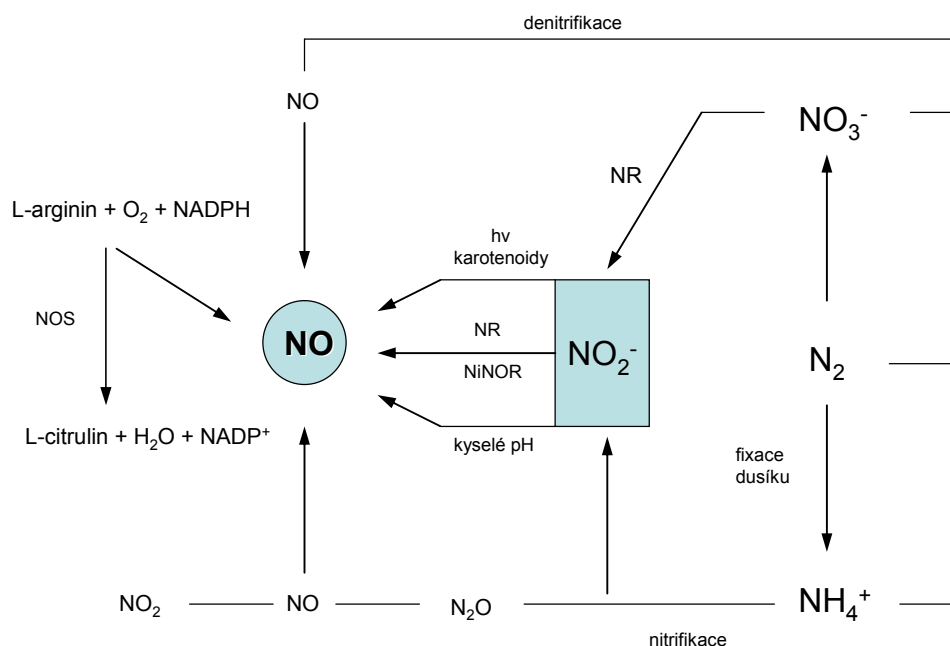
Obr. 14

Signální dráhy NO u rostlin.

Primární cíle NO zahrnují mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) a Ca^{2+} kanály regulované prostřednictvím změny hladiny cGMP a cADPR. NO moduluje aktivitu proteinů nitrosylací thiolových skupin. Metabolit S-nitrosoglutathion (GSNO) může sloužit jako přenašeč signálu NO (upraveno podle Piterková *et al.*, 2008).

V savčích buňkách je NO produkován oxidací guanidinového dusíku L-argininu enzymy nazývanými NO synthasy (NOS, EC 1.14.13.39). Produkty této reakce jsou L-citrulin a NO. Kromě kalmodulinu je pro katalytický mechanismus NOS nutná současná účast dalších kofaktorů, zahrnujících flavinadeninindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), hem a tetrahydrobiopterin. V současné době bylo popsáno celkem šest enzymů, které mohou katalyzovat syntézu NO v rostlinných buňkách (Crawford, 2006).

Ke vzniku NO v rostlinách může vést také řada dalších neenzymových reakcí vycházejících z anorganických sloučenin dusíku (Obr. 15) (Piterková *et al.*, 2008). Nízké pH v apoplastu podporuje neenzymovou redukci dusitanu, kdy dusitan dismutuje na NO a dusičnan (Stohl & Ullrich, 2002). Při fyziologických hodnotách pH může být dusitan také chemicky redukován kyselinou askorbovou na NO a kyselinu dehydroaskorbovou (Yamasaki, 2000). Další neenzymový mechanismus, navržený pro tvorbu NO v membránách chloroplastů, je světlem zprostředkovaná přeměna NO_2 na NO katalyzovaná karotenoidy (Cooney *et al.*, 1994).



Obr. 15

Schématické znázornění zdroje NO v rostlinách.

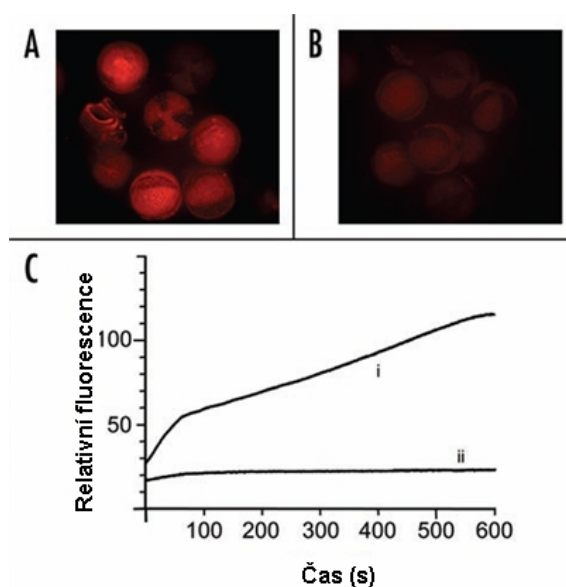
NO je produkován činností nitrátoreduktasy (NR), NO synthasy (NOS) a nitrit: NO reduktasy (NiNOR). Dalšími generátory NO mohou být neenzymové reakce NO_2^- , jakými jsou redukce za kyselého pH a světlem poháněná redukce v přítomnosti karotenoidů. NO může vznikat také jako vedlejší produkt denitrifikace, respirace nebo nitrátové asimilace (upraveno podle Píterková *et al.*, 2008).

10.1. Úloha aktivních forem dusíku při klíčení pylu

NO byl rozpoznán jako signální molekula před 20 lety, ale jeho role v kontrole buněčné aktivity není ještě zcela dobře pochopena. U rostlin je NO zahrnut do mnoha biologických procesů, jako je klíčení, růst a zavírání stomat, gravitropismu kořenů, a je také známo, že ovlivňuje genovou expresi (Grun *et al.*, 2006). Mnoho rostlinných buněk generuje zvýšenou koncentraci NO během stresu a po poranění (Huang *et al.*, 2004).

Pro zahájení produkce NO rostlinnými tkáněmi je běžně potřebná určitá forma specifické stimulace, například taková, která se objevuje buď během patogeneze (Wendehenne *et al.*, 2004), nebo během zavírání průduchů (Desikan *et al.*, 2002). Nedávno byla navržena hypotéza, že NO hraje roli v interakci pylového zrna s bliznou (McInnis *et al.*, 2006; Hiscock & Allen, 2008). V poslední době bylo zjištěno, že NO se v pylu tvoří intra- i extracelulárně (Obr. 16) (Wilson, 2009). Intracelulární generace NO může ovlivnit vnitřní biochemii pylových zrn a pestíku. Produkce NO v pylu může mít vliv i na ostatní tkáň, jako je blizna, na kterou se

pylová zrna přichycují během opylení. Pro demonstraci, že pylová zrna uvolňují NO do svého okolí, byla využita fluorescenční NO próba, diaminofluorescein (DAF-2) s negativní kontrolou realizovanou aplikací lapače NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxid). Zajímavým zjištěním při pokusech v *in vitro* podmínkách bylo, že před tím, než byl prokázán vývoj NO, byla nutná rehydratace pylu (analogie regulované hydratace pylu na blizně) (Wilson, 2009).



Obr. 16

Detekce intracelulárního a extracelulárního oxidu dusnatého.

Pro detekci intra- a extracelulárního NO, který byl produkován pylem, bylo použito barvení pomocí diaminorhodaminu: DAR4M-AM - vstupuje do buňky a DAR4M – nevstupuje do buňky. Vodná suspenze pylu *Brassica napus* sp. byla inkubována 15 min při pokojové teplotě (A) s DAR4M-AM (B) s lapačem NO (cPTIO). Po odstranění nadbytku barvy a resuspenzaci pylu v 10% glycerolu byl detekován signál i bez přítomnosti pylových zrn. Extracelulární akumulace fluorescenčního signálu pro NO v mediu pomocí barvení s DAR4M byla stanovena spektrofotometricky (C). Fluorescence vodné suspenze pylu (Ci) v 10 μ M DAR4M (Cii) s cPTIO byla monitorována po 10 min při pokojové teplotě. Výstupní signál fluorescence v závislosti na čase je prezentován v relativních jednotkách (upraveno podle Wilson, 2009).

V regulaci růstu pylových láček byla prokázána úloha NO. Pylové láčky musí být uvnitř vaječníku přesně orientovány ve směru přijetí spermatické buňky. Byla vyslovena hypotéza možné funkce NO v rámci procesu správné orientace vznikající pylové láčky (Prado *et al.*, 2004). Mechanismus, který navádí pylovou láčku uvnitř pestíku a ovlivňuje její zacílení, je

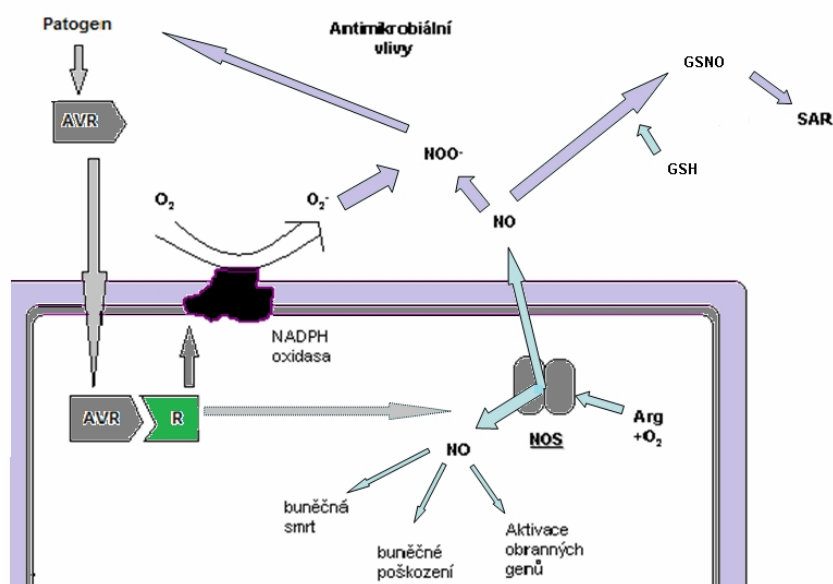
dosud stále neznámý. Předchozí studie *in vitro* u lilie (*Lilium longiflorum*) prokázaly, že NO funguje jako negativní chemotropický podnět pro růst pylové láčky (Wilson, 2009).

10.2. Úloha aktivních forem dusíku při klíčení spor hub

Důležitá role NO v signálním a obranném mechanismu infikovaných rostlin byla dokumentována jejich interakcemi s viry (Durner *et al.*, 1998; Danci *et al.*, 2009), bakteriemi (Delledonne *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008), oomycety (Sedlářová *et al.*, 2010) a houbami (Tada *et al.*, 2004; Prats *et al.*, 2005; Piterková *et al.*, 2009). NO je nepostradatelný pro zahájení a postup rostlinné hypersenzitivní odpovědi, modifikaci genové exprese a syntézy s patogenezí souvisejících proteinů (Obr. 17) (Wendehenne *et al.*, 2004; Zeier *et al.*, 2004; Mur *et al.*, 2006; Zaninotto *et al.*, 2006).

Navzdory intenzivnímu výzkumu je původ a funkce NO u rostlin při fyziologických a stresových podmínkách dosud neznámá a stále čeká na objasnění (Planchet *et al.*, 2006; Neill *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008).

V práci z nedávné doby Piterková *et al.* (2010) demonstrovali potřebu NO pro signalizaci u vývoje plísně, rozpoznání patogenu hostitelskou rostlinou a expresi obranných mechanismů. Nicméně je zapotřebí dalších experimentů pro pochopení rovnováhy mezi NO, ROS a dalšími faktory, které usnadňují klíčení houbového patogenu a umožní hypersenzitivní odpověď hostitelské rostliny.



Obr.17

Hypotetický model, jak může NO ovlivňovat odpověď rostlinné obrany.

Rostlina rozpozná infikující patogen přes přímou nebo nepřímou interakci mezi patogenem kódovaným avirulentním faktorem (AVR) a produktem hostitelského kódovaného restistentního genu (R). Tato interakce aktivuje kaskádu signální transdukce, která vede k produkci ROS. Superoxid [O_2^-] je pravděpodobně generován NADPH oxidasou a NO je produkován podobným enzymem, jako je NOS. ROS a NO spolupracují na destrukci patogenu přes formování peroxynitritu ($ONOO^-$), který je velmi toxický. Intracelulární vliv NO zahrnuje aktivaci transkripce obranných genů, poškození buňky hostitele a indukci hypersenzitivní reakce a smrt (apoptózu). Intra- a extracelulární NO reaguje s glutathionem (GSH) a formuje nitroso glutathion (GSNO), který může sloužit jako signál na dlouhou vzdálenost pro vývoj druhotné systémové obrany (SAR) (upraveno podle Durner & Klessig, 1999).

Experimentální část

11. Materiál a metody

11.1. Chemikálie

Agar (Duchefa, Holandsko), sacharosa (La Chema, Česká republika), askorbová kyselina (Duchefa, Holandsko), DPI (Sigma, USA), chlorid vápenatý (La chema, Česká republika), imidazol (Sigma, USA), kyselina trihydroboritá (La chema, Česká republika), SNP (Fluka, Švýcarsko), peroxid vodíku (Lachema, Česká republika), cPTIO (Sigma, USA), AgNO₃ (Sigma, USA), H₂DCF-DA (Axxora, USA), DAF-FM DA (Axxora, Švýcarsko), FDA (Sigma, USA),

11.2. Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy, Sartorius, Německo

Automatické pipety, Eppendorf, Německo

Digitální chlazená kamera, Olympus DP70, Japonsko

Digitální předvážky, KERN, Německo

Flowbox, Helios 48, Itálie

Konfokální laserový řadkový mikroskop Fluoview 1000, Olympus Optical, Japonsko

Světelný a fluorescenční mikroskop, Olympus BX60, Japonsko

Spektrofotometr Reader Synergy HT, BIO-TEK, Anglie

Termostat, SUB6 Grand Instruments, Anglie

Vortex STUART, Anglie

11.3. Rostlinný materiál

Pro studium vlivu nano-Ag a iontového stříbra na klíčení pylu a růst pylové láčky a na růst klíčnicích vláken u spor byl použit jako rostlinný materiál:

1. Pyl z okurky seté (*Cucumis sativus* L. cv. Marketer).

Semena rostlin byla vyseta do perlitu a po dvou týdnech byly semenáčky rostlin přesazeny do květináčů se zahradnickým substrátem (objem 3 l). Rostliny byly pěstovány ve fytotronu při fotoperiodě 14/10 h, teplotě 26 °C/18 °C (den/noc) po

dobu 7-8 týdnů. Rostliny byly poskytnuty Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty Palackého Univerzity v Olomouci, Česká republika.

2. Spory smrže obecného (*Morchella esculenta*). ZEB, *Morchella esculenta*, „Žebračka“ NPR 49°28'4.266" N, 17°28'13.029"E, Polčák 3.5. 2008.

Smrže nepravidelně produkují asexuální spory (konidie nebo také konidiospory), které vznikají na konidioforech. Tyto spory mají stejnou genetickou determinaci jako mycelium, ze kterého vznikly. Nejsou dormantní, okamžitě klíčí při kontaktu s vlhkým prostředím. Spory smrže, které byly použity v diplomové práci, pochází z genofondové kolekce jedlých hub, založené a udržované ing. P. Havránkem, CSc. na oddělení zelenin a speciálních plodin VÚRV, v.v.i. První položky této sbírky vznikly v r. 2006 za přispění amatérských houbařů z českých mykologických kroužků (Olomouc, Přerov, Praha) jako pracovní kolekce izolátů domácích jedlých hub. Kolekce byla pod názvem „Genofondová sbírka zahradnický významných hub“ (dále jen GS) od r. 2008 evidenčně zařazena do Národního programu genetických zdrojů mikroorganismů hospodářského významu ČR. Nejpočetněji zastoupenou skupinou hub v této kolekci jsou smržovité houby (Morchellaceae).

3. Spory *Oidium neolycopersici*.

Pro experimenty byl použit izolát padlí rajčatového *Oidium neolycopersici* (C-2), získaný z rajčete (cv. Lucy), pěstovaného ve skleníku Státní rostlinolékařské správy, Olomouc. Izolát byl udržován na 2-3 měsíce starých rostlinách vysoce náchylného genotypu rajčete *L. esculentum*, cv. Amateur, které byly kvůli zabránění volnému šíření konidií přikryty igelitovými kryty. Tyto rostliny byly umístěny ve fytotronu při teplotě 20 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc). Ve dvoutýdenních intervalech bylo padlí rajčatové přeinkulovááno na nové zdravé rostliny.

11.4. Nano-Ag

Nanočástice stříbra v koncentraci 100 mg/l byly poskytnuty mgr. Alešem Panáčkem, Ph.D. z Katedry fyzikální chemie. Pro stabilizaci nanočástic (100 mg/l) byl použit 0,05% kasein a 0,05% želatina a 0,1% Tween.

11.5. Metody

11.5.1. Podmínky pro klíčení pylu

Medium pro studium klíčení pylových zrn *C. sativus* obsahovalo 0,01% H₃BO₃, 0,06% CaCl₂, 8% sacharosu v 1% agarose. K mediu byly přidány:

1. Modulátory koncentrace reaktivních forem dusíku (RNS) kyslíku (ROS) GSNO, cPTIO, H₂O₂, askorbát, DPI a kombinace cPTIO + DPI, cPTIO + askorbát, GSNO + askorbát ve výsledné koncentraci v mediu 0,1 mM; v případě askorbátu byly testovány dvě koncentrace 0,1 a 1 mM.
2. Koloidní nebo iontové stříbro ve výsledné koncentraci v mediu - 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 20; 30; 40 a 50 mg/l.
3. K doplnění pokusů studia klíčení pylových zrn byly použity koncentrace nano-Ag nebo iontového stříbra ve výsledné koncentraci v mediu - 5 a 50 mg/l, v kombinaci s modulátory koncentrace aktivních forem dusíku (RNS) nebo kyslíku (ROS).

Medium bylo rozpipetováno po 1 ml na podložní sklíčka umístěná ve vlhké komůrce (velká Petriho miska s proužky vlhké buničiny po obvodu misky).

11.5.2. Podmínky pro klíčení spor *M. esculenta*

Klíčení spor *M. esculenta* bylo realizováno na podložních sklech s nanesenou 1% agarosou (1 ml agarosy na sklo), umístěných ve vlhké komůrce.

Spory *M. esculenta* byly odebrány bakteriologickou kličkou a přidány do mikrozkuhavky obsahující 50 µl destilované vody, do které byly dále aplikovány modulátory koncentrace RNS, ROS do celkového objemu 100 µl (výsledné koncentrace byly stejné jako v případě studia klíčení pylových zrn) a nano-Ag a Ag⁺ (výsledné koncentrace byly 0,5; 5 a 0,5 mg/l). Na připravená podložní skla s agarosou bylo napipetováno 25 µl roztoku se sporymi *M. esculenta* s nebo bez modulátorů koncentrace RNS a ROS a nano-Ag nebo Ag⁺. Spory klíčily při teplotě 25 °C po dobu 8 h. V každé sadě měření byly vždy stanoveny parametry pro kontrolní vzorek obsahující pouze spory *M. esculenta* rozsuspendované v destilované vodě.

11.5.3. Podmínky pro klíčení spor *O. neolycopersici*

Klíčení spor *O. neolycoeperici* bylo realizováno na podložních sklech s nanesenou 1% agarosou (1 ml agarosu na sklo), umístěných ve vlhké komůrce. Spory byly metodou otisku přeneseny na podložní skla obsahující agarosu s nebo bez modulátorů koncentrace RNS, ROS (výsledné koncentrace byly stejné jako v případě studia klíčení pylových zrn) a nano-Ag a Ag⁺ (výsledné koncentrace byly 0,5; 5 a 0,5 mg/l). Spory klíčily při teplotě 25 °C po dobu 8 h. V každé sadě měření byly vždy stanoveny parametry pro kontrolní vzorek obsahující pouze spory *O. neolycoeperici* rozsuspendované v destilované vodě.

11.5.4. Stanovení klíčivosti pylových zrn resp. spor a měření délky pylových láček resp. klíčících vláken

Pro stanovení klíčivosti pylových zrn a spor a stanovení délky pylových láček a klíčících vláken byl použit mikroskop Olympus BX60. Vyhodnocení bylo provedeno:

1. po 2h inkubaci pylových zrn *C. sativus*,
2. po 8h inkubaci spor *M. esculenta*,
3. po 24h inkubaci spor *O. neolycoeperici*

na podložním mikroskopickém skle s růstovým médiem ve vlhké komůrce.

Délka pylových láček a klíčících vláken byla měřena pomocí mikrometrického okuláru při zvětšení mikroskopu 100x (pyl) a 200x (spory). V každém experimentu bylo vyhodnoceno minimálně 50 pylových zrn nebo spor. Hodnocení bylo provedeno ve dvou nezávislých opakováních.

11.5.5. Stanovení životnosti pylových zrn a spor

Pro stanovení životnosti pylových zrn *C. sativus*, spor *M. esculenta* a *O. neolycoeperici* byla použita fluorescenční metoda s využitím fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60. Životnost byla stanovena metodou s fluorescein diacetátem (FAD), který proniká do buněk a je působením esteráz v živých buňkách přeměňován na fluorescein vykazující zelenou fluorescenci. 50 µl roztoku FDA (o koncentraci 0,1 mg/ml bylo aplikováno na podložní mikroskopická skla s daným růstovým médiem:

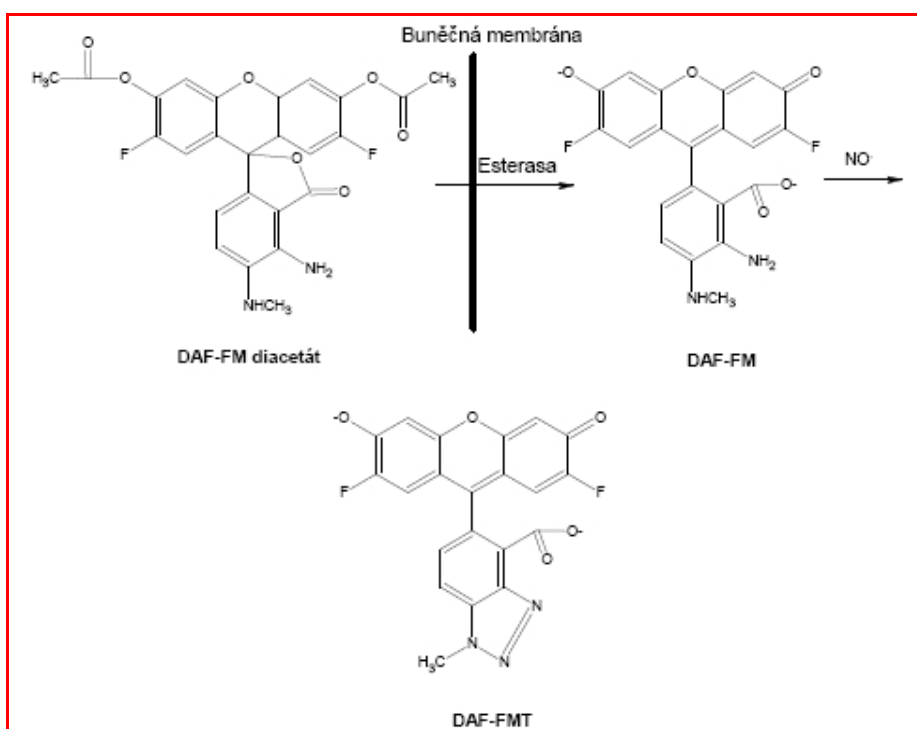
1. po 2h inkubaci pylových zrn *C. sativus*,
2. po 8h inkubaci spor *M. esculenta*,
3. po 24h inkubaci spor *O. neolycopersici*.

Životnost pylových zrn byla stanovena po 10 min inkubaci. V každém experimentu bylo vyhodnoceno 6 zorných polí s celkovým počtem minimálně 50 pylových zrn nebo spor. Hodnocení životnosti bylo provedeno ve dvou nezávislých opakováních.

11.5.6. Lokalizace NO a H₂O₂

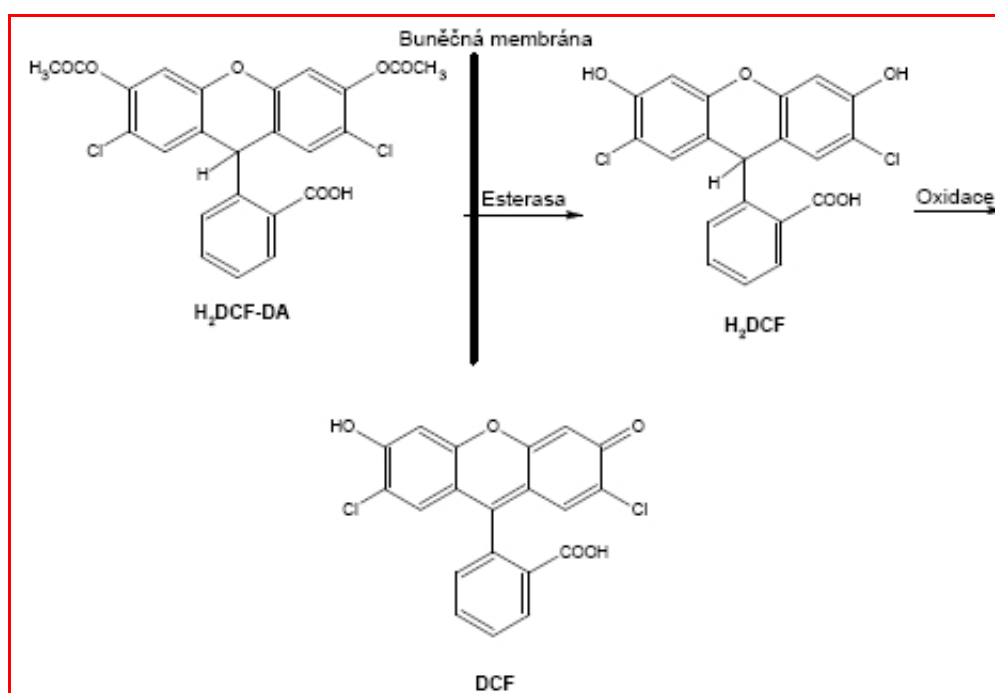
Lokalizace NO v klíčících pylových zrnech *C. sativus* a sporech *M. esculenta* a *O. neolycopersici* byla detekována pomocí fluorescenční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) s využitím konfokálního mikroskopu Fluoview 1000. Sonda lehce prochází přes membránu, kde je deacetylována pomocí esterasy na DAF-FM (Obr. 18), který se po reakci s NO mění na vysoce fluorescenční produkt DAF-FMT ($\lambda_{exc} = 495$, $\lambda_{em} = 515$ nm). Detekční limit pro NO je cca 3 nM (Kojima *et al.*, 1999).

Pro detekci produkce ROS byla použita fluorescenční sonda 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF-DA). Sonda má schopnost procházet přes buněčnou membránu, kde esterasy přeměňují H₂DCF-DA na H₂DCF, který se následně oxiduje pomocí H₂O₂, HO·, ROO·, NO a NOO· na fluorescenční DCF (Obr. 19). Po reakci s ROS je detekován fluorescenční signál ($\lambda_{exc} = 498$, $\lambda_{em} = 522$ nm) (Kojima *et al.*, 1998).



Obr. 18

Reakce fluorescenční sondy DAF-FM DA.



Obr. 19

Reakce fluorescenční sondy H₂DCF-DA.

50 μ l 10 μ M H₂DCF-DA, případně 50 μ l 20 μ M DAF-FM DA, bylo aplikováno na podložní sklíčko obsahující dané koncentrace nano-Ag nebo Ag⁺ po 2h inkubaci pylových zrn *C. sativus*, 8h inkubaci spor *M. esculenta* a 24h inkubaci spor *O. neolyopersici* na mediu ve vlhké komůrce. Po 20-35 minutách byl detekován zelený fluorescenční signál (v případě fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60 byl použit fluorescenční hranol U-MWB2). Kontrolní experiment při stanovení NO byl realizován po dobu 20 min v prostředí 0,2 mM 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1oxyl-3oxidu (cPTIO – lapač NO). Při detekci ROS byl kontrolní experiment proveden v prostředí 1 mM askorbátu (pyl) a 1 mM imidazolu (spory). Pro vizualizaci Nomarsky DIC metody byla použita excitace pomocí UV diodového laseru (405 nm)

Pro porovnání produkce ROS a NO bylo použito měření distribuce intenzity signálu v pylových láčkách. Byly použity oddělené přibližně ploché pylové láčky s průměrnou délkou 150-200 μ m. Pro jednu variantu bylo pořízeno devět 3D mikrofotografií (3 objekty na mikroskopickém sklíčku, 3 opakování) a pomocí FV 1000 softwaru (Olympus, Japonsko) byly podél pylové láčky vyhodnoceny změny intenzity signálu buď DAF-FM DA, nebo H₂DCF DA.

Pro každou mikrofotografii (obsahující 4-8 sekcí v Z ose) a pro každou počítanou vzdálenost od pylového zrna (od 0 do 180 μm , po 20 μm úsecích) byla ze sekce vybrána nejsilnější intenzita signálu. Hodnoty byly vyhodnoceny jako procenta maximální intenzity signálu a představovaly průměr devíti měření. Pro přehledné znázornění byly vynechány směrodatné odchylky.

11.5.7. Stanovení produkce RNS a ROS

Příprava suspenze pylových zrn: Prašníky z 10 květů *C. sativus* byly přeneseny do 600 μl media obsahujícího 0,01% H_3BO_3 , 0,06% CaCl_2 a 8% sacharosu. Po protřepání na vortexu byly prašníky odstraněny pinzetou.

Stanovení produkce ROS a RNS: 5 μl 200 μM DAF-FM DA (detekce NO) nebo H_2DCF DA (detekce ROS) bylo přidáno ke 100 μl pylové suspenze. Fluorescenční signál byl detekován pomocí spektrofotometrického readeru okamžitě po přidavku sondy a následně po 1h inkubaci za tmy v termostatu při teplotě 27 $^\circ\text{C}$. (Blank: 5 μl 200 μM DAF-FM DA nebo H_2DCF DA bylo aplikováno ke 100 μl media obsahujícího 0,01% H_3BO_3 , 0,06% CaCl_2 a 8% sacharosu.)

LITERATURA

Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MK. (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. **411**, 1841-48.

Alt SJ. (2004) Liability insurance premiums on bariatric surgery soar. *Health Care Strateg Manage*. **22**, 18-19.

Arakawa H, Neault JF, Tajmir-Riahi HA. (2001) Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by Fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis. *Biophys J*. **81**, 1580-87.

Bailey-Serres J, Mittler R. (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*. **141**, 311.

Ball P, Baquero F, Cars O, File T, Garau J, Klugman K, Low DE, Rubinstein E, Wise R; Consensus Group on Resistance and Prescribing in Respiratory Tract Infection. (2002) Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother*. **49**, 31-40.

Barrena R, Casals E, Colón J, Font X, Sánchez A, Puntès V. (2009) Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*. **75**, 850-57.

Brooks RR, Chambers MF, Nicks LJ, Robinson BH. (1998) Phytomining. *Trends Plant Sci*. **3**, 359-62.

Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ. (2006) In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*. **40**, 4374-81.

Borm PJ. (2002) Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal Toxicol*. **14**, 311-24.

Buettner GR, Jurkiewicz BA. (1996) Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. *Radiat Res*. **145**, 532-41.

Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA. (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect.* **102**, 460-62.

Crawford NM, Guo FQ. (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* **10**, 195-200.

Crawford NM. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot.* **57**, 471-78.

Danci O, Kolbert Z, Danci M, Bartha B, Erdei L. (2009) Relationship between virus traffic and nitric oxide (NO) production in tobacco roots. *Acta Biol Szeged.* **53**, 17-20.

De Gara L, de Pinto MC, Tommasi F. (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 863-70.

Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. (2002) The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med.* **15**, 213-20.

Drake PL, Hazelwood KJ. (2005) Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg.* **49**, 575-85.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-88.

Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 16314-18.

Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 10328-33.

Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Xavier S, Citrin D, Vitek MP, Wink DA. (2002) A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species. *Ann NY Acad Sci.* **962**, 195-206.

Galeano B, Korff E, Nicholson WL. (2003) Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an

antimicrobial silver- and zinc-containing zeolite formulation. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 4329-31.

Gardea-Torresdey JL, de la Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Cruz-Jimenez G, Cano-Aguilera I. (2005) Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch Environ Contam Toxicol.* **48**, 225-32.

Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA. (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry* **72**, 1091-1109.

Goldstein S, Russo A, Samuni A. (2003) Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, and $\text{O}^{2-\cdot}$. *J Biol Chem.* **278**, 50949-55.

Gorsuch JW, Klaine SJ. (1998) Toxicity and fate of silver in the environment. *Environ. Toxicol Chem.* **17**, 537-38.

Gosheger G, Harges J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Gonsel A, Kemper FH, Winkelmann W, Von EC. (2004) Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model—an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* **25**, 5547–56.

Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot.* **57**, 507-16.

Gur, N, Topdemir A. (2005) Effects of heavy Metals (Cd^{++} , Cu^{++} , Pb^{++} , Hg^{++}) on Pollen Germination and Tube Growth of Qince (*Cydonia oblonga* M.) and Plum (*Prunus domestica* L.). *Fresen Environ Bullet.* **14**, 36-39.

Guzman KA, Taylor MR, Banfield JF. (2006) Environmental risks of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000–2004. *Environ Sci Technol.* **40**, 1401–07.

Hall JL. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.*, **53**, 1-11.

Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E. (2008) The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology.* **17**, 315-25.

Harris AT, Bali R. (2008) On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *J Nanopart Res.* **10**, 691-95.

Harrison P. (2007) Emerging challenges: nanotechnology and the environment. GEO Year Book 2007. *United Nations Environment Programme (UNEP)*. pp 61–68.

Henig RM. (2007) Our silver-coated future. *Onearth Fall.* **29**, 22–29.

Hiriart-Baer VP, Fortin C, Lee DY, Campbell PG. (2006) Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella sub-capitata*, grown under continuous culture conditions: influence of thiosulphate. *Aquat Toxicol.* **78**, 136-48.

Hirsch WR. (1998) Compliance: the medical group perspective. *J Oncol Manag.* **7**, 13-4.

Hiscock SJ, Allen AM. (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* **179**, 286-317.

Huang C, Groot T, Meijer-Dekens F, Niks R, Lindhout P. (1998) Hypersensitivity is the major mechanism of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 399-407.

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro.* **19**, 975-83.

Hwang MG, Katayama H, Ohgaki S. (2007) Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation of the bactericidal ability of silver cations. *Water Res.* **41**, 4097-104.

Chen M, Yan L, He H, Chang Q, Yu Y, Qu J. (2007) Catalytic sterilization of *Escherichia coli* K 12 on Ag/Al₂O₃ surface. *J Inorg Biochem.* **101**, 817-23.

Chettri MK, Sawidis T. (1997) Impact of heavy metals on water loss from lichen thalli. *Ecotoxicol Environ Saf.* **37**, 103-211.

Chomoucká J, Drbohlavová J, Hubálek J, Babula P, Adam V, Kizek R. (2010) Toxicita nanočástic pro rostliny *Listy Cukr a Řep.* **126**, 11.

Jain P, Pradeep T. (2005) Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng.* **90**, 59-63.

Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y, Guo X. (2005) Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol.* **39**, 1378-83.

Jo Y-K, Kim BH, Jung G. (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis.* **93**, 1037-43.

Ju-Nam Y, Lead JR. (2008) Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ.* **400**, 396-414.

Karakoti AS, Singh S, Kumar A, Malinska M, Kuchibhatla SV, Wozniak K, Self WT, Seal S. (2009) PEGylated nanocerium as radical scavenger with tunable redox chemistry. *J Am Chem Soc.* **131**, 14144-55.

Kim SW, Kim KS, Lamsal K, Kim YJ, Kim SB, Jung M, Sim SJ, Kim HS, Chang SJ, Kim JK, Lee YS. (2009) An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *J Microbiol Biotechnol.* **19**, 760-64.

Kiss L, Cook RTA, Saenz GS, Cunnington JH, Takamatsu S, Pascoe I, Bardin M, Nicot PC, Sato Y, Rosman AY. (2001) Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolyopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycol. Res.* **105**, 684-97.

Koontz HV, Berle KL. (1980) Silver uptake, distribution, and effect on calcium, phosphorus, and sulfur uptake. *Plant Physiol.* **65**, 336-39.

Kim SW, Kim KS, Lamsal K, Kim YJ, Kim SB, Jung M, Sim SJ, Kim HS, Chang SJ, Kim JK, Lee YS. (2009) An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *J Microbiol Biotechnol.* **19**, 760-64.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem.* **70**, 2446-53.

- Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. (1999) Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew Chem Int Ed.* **38**, 3209-12.
- Kristen P, Kaesemann H, Dostert M, Caffier H. (1993) [DNA content of ovarian tumors: correlation to established prognostic parameters and clinical course]. *Gynakol Geburt Rundsch.* **33**, 204-05.
- Křížková S, Adam V, Kizek R. (2009) Fytotoxicita stříbrných iontů. *Chem. Listy* **103**, 559-68.
- Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N. (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci Total Environ.* **407**, 5243-46.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL. (2006) A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol.* **36**, 189-217.
- Lazar EE, Wills RBH, Ho BT, Harris AM, Spohr LJ. (2008) Antifungal effect of gaseous nitric oxide on mycelium growth, sporulation and spore germination of the postharvest horticulture pathogens, *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium italicum*. *Lett Appl Microbiol.* **46**, 688-92.
- Le Pape H, Solano-Serena F, Contini P, Devillers C, Maftah A, Leprat P. (2004) Involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of activated carbon fibre supporting silver; Bactericidal activity of ACF(Ag) mediated by ROS. *J Inorg Biochem.* **98**, 1054-60.
- Lebeda A, Mieslerová B. (2002) Variability in pathogenicity of *Oidium neolycopersici* on *Lycopersicon* species. *J Plant Dis Protect.* **109**, 129-41.
- Lee YJ, Yang Z. (2008) Tip growth: signaling in the apical dome. *Curr Opin Plant Biol.* **11**, 662-71.
- Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol.* **25**, 279-83.
- Lin D, Xing B. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut.* **150**, 243-50.

- Liu HL, Dai SA, Fu KY, Hsu SH. (2010) Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *Int J Nanomedicine*. **5**, 1017-28.
- Liu J, Hurt RH. (2010) Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environ Sci Technol*. **44**, 5649–54.
- Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. (2007) Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*. **12**, 527-34.
- Luoma PV. (2008) Cytochrome P450 and gene activation--from pharmacology to cholesterol elimination and regression of atherosclerosis. *Eur J Clin Pharmacol*. **64**, 841-50.
- Margaret IP, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A. (2006) Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med. Microbiol*. **55**, 59–63.
- Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. (2003) Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol*. **69**, 4278-81.
- McDonnell G, Russell AD. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. **12**, 147-79.
- McInnis SM, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ. (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytol*. **172**, 221-28.
- Melaiye A, Sun Z, Hindi K, Milsted A, Ely D, Reneker DH, Tessier CA, Youngs WJ. (2005) Silver(I)-imidazole cyclophane gem-diol complexes encapsulated by electrospun terephthalic nanofibers: formation of nanosilver particles and antimicrobial activity. *J Am. Chem. Soc*. **127**, 2285–91.
- Messner KR, Imlay JA. (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **274**, 10119-28.

- Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhaes JR, Salgado I. (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* **579**, 3814-20.
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S. (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* **21**, 2341-56.
- Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszakay A, Leubner-Metzger G. (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* **150**, 1855-65.
- Mur LA, Carver TL, Prats E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot.* **57**, 489-505.
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot.* **59**, 501-20.
- Mur LA, Santosa IE, Laarhoven LJ, Holton NJ, Harren FJ, Smith AR. (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant. Physiol.* **138**, 1247-58.
- Nallathamby PD, Xu XH. (2010) Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells. *Nanoscale.* **2**, 942-52.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C. (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol.* **52**, 195-204.
- Naumann JC, Young DR, Anderson JE. (2007) Linking leaf chlorophyll fluorescence properties to physiological responses for detection of salt and drought stress in coastal plant species. *Physiol Plant.* **131**, 422-33.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R. (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol.* **42**, 8959-64.

- Nedelkoska TV, Doran PM. (2000) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng.* **67**, 607-15.
- Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I. (2008) Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot.* **59**, 25-35.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 13-16.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622–27.
- Nowack B, Bucheli TD. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut.* **150**, 5-22.
- Oberdörster G. (1996) Effects of ultrafine particles in the lung and potential relevance to environmental particles. *Aerosol inhalation*. pp. 165.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* **12**, 913–22.
- Panstruga R. (2003) Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* **6**, 320-26.
- Parani M, Rudrabhatla S, Myers R, Weirich H, Smith B, Leaman DW, Goldman SL. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotech. J.* **2**, 359-66.
- Perrein-Ettajani H, Amiard JC, Haure J, Renaud C. (1999) Effets des métaux (Ag, Cd, Cu) sur la composition biochimique et compartimentation de ces métaux chez deux microalgues *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*. *Can J Fish Aquat Sci.* **56**, 1757–65.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L. (2008) Signalling Pathways of Nitric Oxide in Plants. *Chem Listy* **102**, 410-16.

- Piterková J, Petřivalský M, Luhová L, Mieslerová B, Sedlářová M, Lebeda A. (2009) Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 201-13.
- Piterková J, Hoffman J, Mieslerová B, Sedlářová M, Luhová L, Lebeda A, Petřivalský M. (2010) Dual role of nitric oxide in *Solanum* spp. - *Oidium neolycopersici* interactions. *Environ Exp Bot J.* In press.
- Planchet E, Sonoda M, Zeier J, Kaiser WM. (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein induced hypersensitive response - a critical re-evaluation. *Plant Cell Environ.* **29**, 59-69.
- Polle A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Phisiol.* **126**, 445-62.
- Potocký M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnoff N, Žárský V. (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol.* **174**, 742-51.
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA. (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development.* **131**, 2707-14.
- Prats E, Mur LAJ, Sanderson R, Carver TLW. (2005) Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 65-78.
- Ratte HT. (1999) Bioaccumulation and toxicity of silver compounds. *Environ Toxicol Chem.* **18**, 89-108.
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CGM, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416**, 291–97.
- Roco MC. (2003) Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol.* **14**, 337-46.

- Roco MC. (2005) Environmentally responsible development of nanotechnology. *Environ Sci Technol.* **39**, 106-12.
- Russell AD, Hugo WB. (1994) Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem.* **31**, 351-70.
- Samuel U, Guggenbichler JP. (2004) Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents.* **23**, 75-78.
- Sawidis T. (2008) Effect of cadmium on pollen germination and tube growth in *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma.* **233**, 95-106.
- Sawidis T, Reiss H-R. (1995) Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma.* **185**, 113-22.
- Scragg AH, Bonnett C. (2002) Inhibition of microalgal growth by silver nitrate. *Biotechnol Lett.* **24**, 169-72.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Academic Press, New York.* 213-43.
- Silvestry-Rodriguez N, Sicairos-Ruelas EE, Gerba CP, Bright KR. (2007) Silver as a disinfectant. *Rev Environ Contam Toxicol.* **191**, 23-45.
- Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon EA. (1992) Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta.* **1180**, 113-22.
- Sedlářová M, Petřivalský M, Piterková J, Kočířová J, Luhová L, Lebeda A. (2010) Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca* spp. *Eur J Plant Pathol.*, In press.
- Stamets P. (2005) Mycelium running: How mushrooms can help save the world. *Ten Speed Press, Berkeley.* 339 str.
- Stöhr C, Ullrich WR. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot.* **53**, 2293-303.

Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Garza KM, Murr LE. (2005) Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *J Nanopart Res* **2**, 31-32.

Swanson S, Gilroy S. (2009) ROS in plant development. *Physiol Plant*. **138**, 384-92.

Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S. (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defence response of oat. *Mol. Plant Microbe Interact*. **17**, 245-53.

Takai K, Ohtsuka T, Senda Y, Nakao M, Yamamoto K, Matsuoka J, Hirai Y. (2002) Antibacterial properties of antimicrobial-finished textile products. *Microbiol Immunol*. **46**, 75-81.

Thurman RB, Gerba CP. (1988) Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. *Adv Appl Microbiol*. **33**, 75-105.

Torres MA, Dangl JL, Jones JDG. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**, 517–22.

Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. (2002) Redox control of cell death. *Antioxid. Redox. Signal*. **4**, 405–414.

USEPA (2007) Nanotechnology white paper. Document Number EPA 100/B-07001, www.epa.gov/osa

USEPA (1996) Ecological effects test guidelines. Seed Germination Root Elongation Toxicity Test. Available from: <http://www.epa.gov/publications>.

Van Camp W., Capiou K., Van Motagu M., Inze D., Slooten L. (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol*. **112**, 1703-14.

Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RH. (2007) Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *J Nanosci. Nanotechnol*. **7**, 1893–97.

- Wang E. (1992) Are all nonproliferating cells similar? *Exp Gerontol.* **27**, 419-23.
- Wang J, Higgins VJ. (2005) Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Gen. Biol.* **42**, 284-92.
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol.* **7**, 449-55.
- Wilson ID, Hiscock SJ, James PE, Hancock JT. (2009) Nitric oxide and nitrite are likely mediators of pollen interactions. *Plant Signal Behav.* **4**, 416-18.
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 622-31.
- Wood CM, Playle RC, Hogstrand C. (1999) Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environ Toxicol Chem.* **18**, 71-83.
- Xiong ZT, Peng YH. (2001) Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special reference to low concentration exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* **48**, 51-55.
- Yahya MT, Straub TM, Gerba CP. (1992) Inactivation of coliphage MS-2 and poliovirus by copper, silver, and chlorine. *Can J Microbiol.* **38**, 430-35.
- Yamasaki H. (2000) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **355**, 1477-88.
- Yoshimaru T, Suzuki Y, Inoue T, Niide O, Ra C. (2006) Silver activates mast cells through reactive oxygen species production and a thiol-sensitive store-independent Ca²⁺ influx. *Free Radic Biol Med.* **40**, 1949-59.
- Zaninotto F, La Camera S, Polverari A, Delledonne M. (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141**, 379-83.
- Zeier J, Delledonne M, Mishina T, Severi E, Sonoda M, Lamb C. (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signalling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**, 2875-88.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ag (e)	elektrochemické stříbro
Ag (p)	nano-Ag
APF	(aminofenylfluorescein, 2-[6-(4'-amino)fenoxy-3H-xanten-3-on-9-yl] benzoová kyselina)
APX	askorbát peroxidasa
ATP	adenosintrifosfát
AVR	avirulentní faktor
H ₂ DCF-DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
cADPR	cyklická adenosindifosfátrisosa
CAT	katalasa
cPTIO	2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DAF2-DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DPI	diphenylen iodonium
ENPs	uměle vyrobené nanočástice
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadeninmononukleotid
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
GSH	glutathion
GSNO	S-NO-glutathion
H ₂ DCF-DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HPF	(hydroxyfenylfluorescein, 2-[6-(4'-hydroxy)fenoxy-3H-xanten-3-on-9-yl]benzoová kyselina)
hROS	vysoce reaktivní kyslíkové formy
MAPkinasy	mitogenem aktivované proteinkinasy
nano-Ag	nanočástice stříbra
NAD(P)H	redukováný nikotinamiddinukleotid(fosfát)
NiNOR	nitrit: NO reduktasa
NO	oxid dusnatý
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NO _x	NADPH oxidasa
NR	nitrát reduktasa

PM	plazmatická membrána
PTIO	2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
<i>rhd2</i>	root hair defective
R	produkt rezistentního genu
ROS	aktivní formy kyslíku
RNS	aktivní formy dusíku
SAR	druhotná systémová obrana
SOD	superoxiddismutasa
SNP	nitroprusid sodný
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicilinamin
USEPA	U.S. Environmental Protection Agency
UV	ultrafialové záření