

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv nanočástic stříbra na obrannou reakci
Solanum spp. v průběhu patogenese**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Horáková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Lenka Luhová, PhD.
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

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

V Olomouci dne 23.4. 2012

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Lence Luhové, PhD. za milé a svědomité odborné vedení, za poskytnutí literárních podkladů, za cenné rady, připomínky a za trpělivost při konečném zpracování mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Barboře Mieslerové, PhD. a Mgr. Janě Piterkové, PhD. za všestrannou pomoc a ochotu při zpracování experimentální části a všem pracovníkům Katedry biochemie a Katedry botaniky za vstřícný přístup při experimentální práci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Jana Horáková
Název práce: Vliv nanočástic stříbra na obrannou reakci *Solanum* spp. v průběhu patogenese
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Katedra biochemie
Vedoucí práce: Doc.RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt:

Antimykotické a antibakteriální účinky iontového stříbra a nano-Ag byly prokázány v mnoha studiích. Mechanismus působení nano-Ag není zatím zcela znám. Mezi dosud navrhované základní principy působení nano-Ag patří 1) absorpce volných stříbrných iontů, následné narušení produkce ATP a replikace DNA 2) produkce ROS působením stříbrných iontů nebo nano-Ag 3) poškození buněčných membrán. K tvorbě ROS dochází v normálních metabolických procesech a v reakci na abiotický a biotický stres. ROS jsou významné signální molekuly a hrají důležitou roli ve vyvolání HR u infikovaných rostlin.

K experimentální práci byl použit biotrofní patogen *O. neolycopersici* a tři genotypy *Solanum* spp. lišící se rozdílným stupněm rezistence k patogenu *O. neolycopersici* (*S. lycopersicum* cv. Amateur - vysoce náchylný, *S. chmielewskii* - středně rezistentní, *S. habrochaites* - vysoce rezistentní). Byl pozorován rozdílný vývoj patogena *O. neolycopersici* u tří genotypů *Solanum* spp. v souladu s jejich rezistentními vlastnostmi. Patogenní stres způsobil nárůst buněčné smrti u všech tří genotypů, nejintenzivější u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. U ostatních sledovaných parametrů rostlinné obranné reakce (peroxidasová aktivita, koncentrace HSP 70 a hladina primárních produktů lipidické peroxidace) byl zaznamenán výrazný vliv mechanického stresu, přičemž nejintenzivnější změny byly detekovány u genotypu *S. chmielewskii*. V přítomnosti nano-Ag a iontového stříbra u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* byla pozorována inhibice růstu a vývoje patogena, nižší intenzita buněčné smrti a nižší POX aktivity. U genotypu *S. habrochaites* měla aplikace obou forem stříbra naopak stimulační efekt na růst a vývoj patogena a byl zaznamenán zvýšený nárůst buněčné smrti a POX. Aplikace stříbra ve formě iontů a nanočástic zvýšila produkci HSP 70 u všech tří genotypů.

Klíčová slova: Ag, nano-Ag, ROS, HSP, patogenese, *Solanum* spp., *O. neolycopersici*
Počet stran: 86
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jana Horáková
Title	Effect of silver nanoparticles on the defensive reaction of <i>Solanum</i> spp. in the pathogenesis
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc.RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2012

Abstract

Antifungal and antibacterial effects of silver ions and nano-Ag have been demonstrated in many studies. The mechanism of action of nano-Ag is not completely understood yet. The previously proposed basic principles of nano-Ag activity include 1) absorption of free silver ions and subsequent disruption of ATP production and DNA replication, 2) generation of ROS by silver nanoparticle and silver ion; and 3) damage to cell membranes. The production of ROS occurs during normal metabolic processes and in responses to abiotic and biotic stresses. ROS are important signaling molecules and play an important role in the induction of hypersensitive response in infected plants.

For the experimental work was used biotrophic pathogen *O. neolyopersici* and three genotypes of *Solanum* spp. differing in the degrees of resistance to the pathogen (*S. lycopersicum* cv. Amateur - highly susceptible, *S. chmielewskii* - moderately resistant, *S. habrochaites* - highly resistant). We observed different development of the pathogen *O. neolyopersici* on three genotypes of *Solanum* spp. in accordance with their resistant properties. Pathogenic stress caused an increase of cell death in all three genotypes, with the most intense increase observed in *S. lycopersicum* cv. Amateur. For other studied parameters of plant defense reaction (peroxidase activity, the level of HSP 70 and the level of lipid peroxidation primary products), significant effect was found by mechanical stress, where the most intense changes were detected in genotype *S. chmielewskii*. In the presence of nano-Ag and ionic silver, the inhibition of growth and development of the pathogen, lower intensity of cell death and lower POX activity were observed on genotypes *S. lycopersicum* cv. Amateur and *S. chmielewskii*. In contrast, the application of both forms of silver showed stimulatory effect on growth and development of pathogen and higher cell death and POX activity in genotype *S. habrochaites*. The application in the form of silver ions and nanoparticles increased the production of HSP 70 in all three genotypes.

Keywords	Ag, nano-Ag, ROS, HSP, pathogenesis, <i>Solanum</i> spp., <i>O. neolyopersici</i>
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH:

CÍLE PRÁCE	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1 Stres rostlin	11
2 Těžké kovy	12
3 Stříbro	13
3.1 Toxicita stříbrných iontů	13
3.2 Vliv stříbrných iontů na živé organismy	14
3.3 Mechanismus působení stříbrných iontů na rostliny	15
3.4 Nanostříbro (nano-Ag)	17
3.4.1 Mechanismus působení nano-Ag a stříbrných iontů na bakteriální buňky	18
3.4.1.1 Eluce stříbrných iontů z nano-Ag	19
3.4.1.2 Produkce ROS vlivem nano-Ag	20
3.4.1.3 Poškození membrán vlivem nano-Ag	20
3.4.2 Vliv nano-Ag na rostliny	21
3.4.3 Antimykotický účinek nano-Ag	22
4 Patogen <i>Oidium neolycopersici</i>	23
4.1 Vývoj patogena <i>Oidium neolycopersici</i>	24
4.2 Geny rezistence vůči patogenu <i>Oidium neolycopersici</i>	26
4.3 Obrané reakce rostlin	27
4.3.1 ROS	28
4.3.1.1 Produkce ROS	29
4.3.1.2 Degradace ROS	30
4.3.1.3 ROS a HR	31
4.3.2 HSP	33
4.3.2.1 Syntéza HSP	33
4.3.2.2 Rozdělení HSP	35
4.3.2.3 Funkce HSP	36
4.3.2.4 smHSP	37
4.3.2.5 HSP 60	38
4.3.2.6 HSP 70	39
4.3.2.7 HSP 90	40
4.3.2.8 HSP 100	41

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
5. Materiál a metody	43
5.1 Chemikálie	43
5.2 Přístroje a experimentální vybavení	43
5.3 Rostlinný materiál, patogen	44
5.3.1 Příprava rostlinného materiálu	44
5.4 Metody	45
5.4.1 Příprava rostlinných extraktů pro detekci HSP 70	45
5.4.2 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení lipidické peroxidace	45
5.4.3 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení peroxidasové aktivity	45
5.4.4 Mikroskopické hodnocení vývoje patogenu <i>O. neolycopersici</i>	45
5.4.5 Detekce buněčné smrti	46
5.4.6 Stanovení peroxidasové aktivity	46
5.4.7 Stanovení lipidické peroxidace	46
5.4.8 Stanovení produkce HSP 70	47
6. Výsledky	48
6.1 Porovnání vývoje patogena <i>O. neolycopersici</i> a reakce rostlin <i>Solanum</i> spp. na infekci	48
6.1.1 Porovnání vývoje patogena <i>O. neolycopersici</i> u rozdílných genotypů <i>Solanum</i> spp.	48
6.1.2 Reakce rostlin <i>Solanum</i> spp. na infekci patogenem <i>O. neolycopersici</i>	49
6.2 Studium vlivu nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena <i>O. neolycopersici</i> a reakci rostlin <i>Solanum</i> spp. na infekci	52
6.2.1 Vliv nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena <i>O. neolycopersici</i>	52
6.2.2 Vliv nanočástic a iontového stříbra na reakci rostlin <i>Solanum</i> spp. po infekci patogenem <i>O. neolycopersici</i>	56
6.2.2.1 Vliv nanočástic a iontového stříbra na buněčnou smrt u rostlin <i>Solanum</i> spp. po infekci patogenem <i>O. neolycopersici</i>	57
6.2.2.2 Vliv nanočástic a iontového stříbra na peroxidasovou aktivitu u rostlin <i>Solanum</i> spp. po infekci patogenem <i>O. neolycopersici</i>	59
6.2.2.3 Vliv nanočástic a iontového stříbra na koncentraci primárních produktů lipidické peroxidace u rostlin <i>Solanum</i> spp. po infekci patogenem <i>O. neolycopersici</i>	61

6.2.2.4 Vliv nanočástic a iontového stříbra na koncentraci HSP 70 u rostlin <i>Solanum</i> spp. po infekci patogenem <i>O. neolycopersici</i>	63
7 Diskuze	65
7.1 Porovnání vývoje patogena <i>O. neolycopersici</i> a reakce rostlin <i>Solanum</i> spp. na infekci	65
7.2 Studium vlivu nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena <i>O. neolycopersici</i> a reakci rostlin <i>Solanum</i> spp. na infekci	69
8 Závěr	73
LITERATURA	74
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	85

CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Vypracování literární rešerše na téma:

- Vliv stříbra ve formě nanočástic a iontů na živé organismy se zaměřením na rostliny
- Obranné reakce rostlin v průběhu patogenese

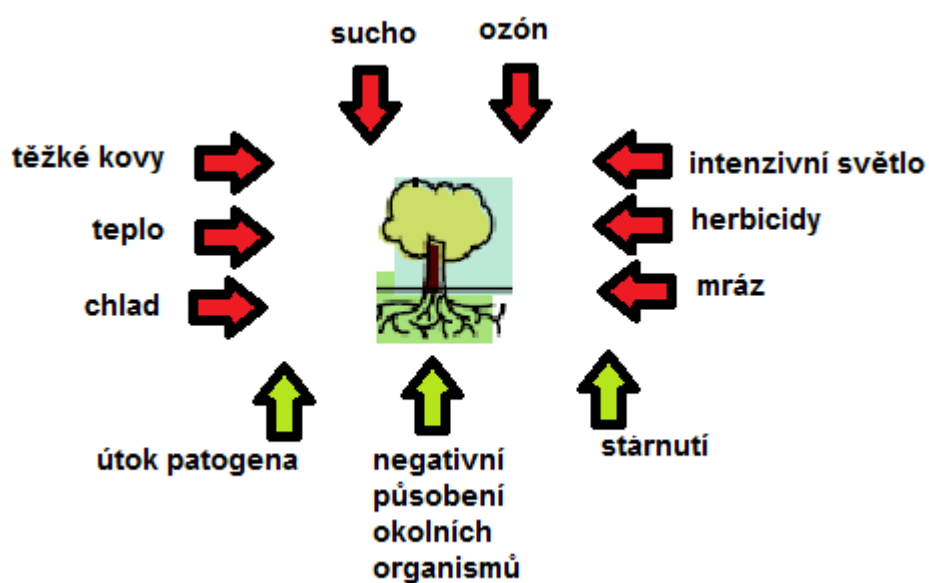
II. Experimentální část

- Porovnání vývoje patogena a reakce rostlin na infekci u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rozdílným stupněm rezistence k biotrofnímu patogenu *O. neolycopersici*
- Studium vlivu nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena a reakci rostlin na infekci u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rozdílným stupněm rezistence k biotrofnímu patogenu *O. neolycopersici*

TEORETICKÁ ČÁST

1 Stres rostlin

Proměnlivé podmínky vnějšího prostředí často negativně působí na rostliny a ty se tak ocitají ve stresu. Stresové faktory mohou být biotické (útok patogena, negativní působení okolních organismů, stárnutí) nebo abiotické (herbicide, intenzivní světlo, teplo, chlad, mráz, těžké kovy, sucho, ozón) (Mittler, 2002).



Obr. 1

Působení biotických (zeleně) a abiotických (červeně) stresových faktorů na rostliny (vypracováno dle informací z Mittler, 2002, Pastori & Foyer, 2002, Wojtazsek, 1997).

2 Těžké kovy

Těžké kovy jsou přirozenými složkami zemské kůry, avšak bezohledná lidská činnost výrazně změnila jejich geochemické cykly. Těžké kovy proto nyní řadíme ke skupině nebezpečných odpadů. Do ekosystému se dostávají hlavně díky zemědělství a průmyslu. Těžké kovy pronikají nejen do půdy či vody, ale nachází se i v ovzduší (Babula *et al.*, 2008).

Některé rostliny jsou schopné těžké kovy vázat ve velkém množství. V případě, že koncentrace těžkých kovů v biomase překračuje o jeden až dva řády hodnoty získané v běžných rostlinách jsou označovány jako hyperakumulátory. Dekontaminace životního prostředí pomocí těchto rostlin se nazývá fytořemediace (Salt *et al.*, 1998).



Obr. 2

Jednoduché schéma eliminace těžkých kovů z kontaminovaného životního prostředí (Babula *et al.*, 2008).

3 Stříbro

Stříbro je ušlechtilý kov. Nachází se v periodické soustavě prvků na pozici 47 a jeho atomová hmotnost je 107,4. V přírodě se stříbro vyskytuje jak v kovové formě, tak ve formě stříbrných rud, především argentitu a akantitu (Ag_2S), často společně se sulfidy jiných kovů. Stříbro se může vyskytovat v různých oxidačních stavech, ale nejčastěji jako elementární $\text{Ag}(0)$ nebo v oxidačním stavu $\text{Ag}(I)$ (Clement & Jarrett, 1994, Ellender & Ham, 1989).

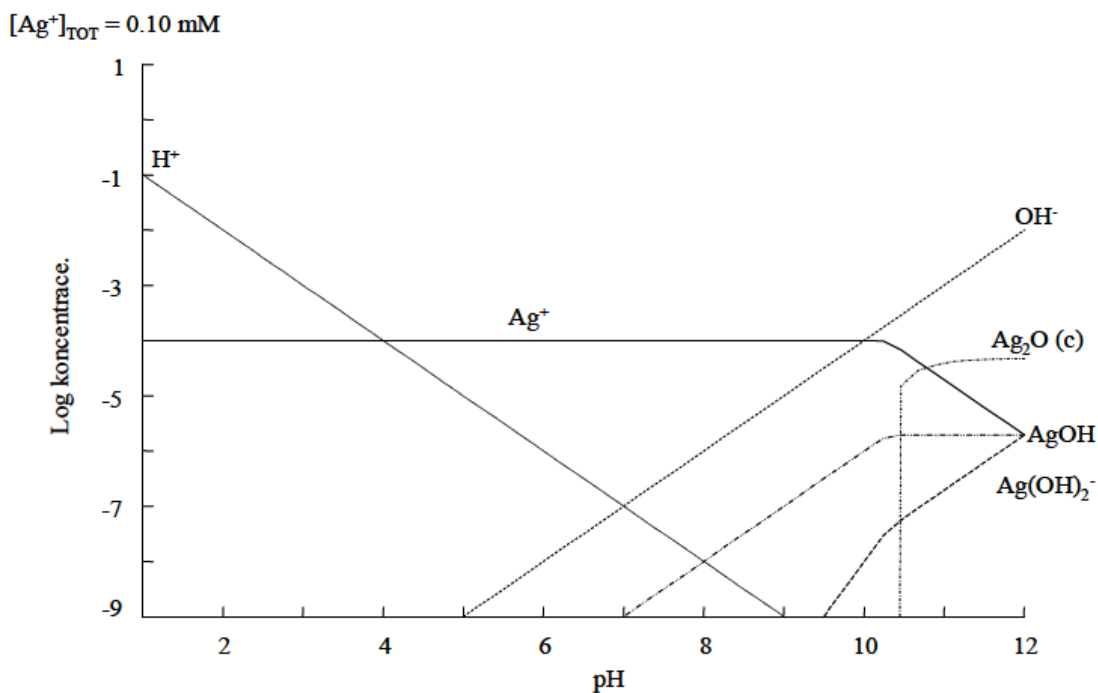
Z fyzikálního hlediska se čisté stříbro vyznačuje vysokou tepelnou a elektrickou vodivostí, nízkou kontaktní rezistencí a také vysokou poddajností a kujností (Křížková *et al.*, 2009).

Stříbro se běžně používá v průmyslových procesech, jako je např. fotografický průmysl, katalýza, výroba zrcadel, galvanické pokování, výroba alkalických baterií a šperkařství (Křížková *et al.*, 2009, Law *et al.*, 2008).

3.1 Toxicita stříbrných iontů

Působení těžkých kovů na organismus je obecně založeno na interakci s biopolymery (především proteiny nebo nukleovými kyselinami) a na indukci vzniku reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). (Koontz & Berle, 1980).

Toxicita těžkých kovů a jejich sloučenin závisí na jejich rozpustnosti ve vodě. Stříbro v iontové formě je jedním z nejtoxičtějších těžkých kovů. V životním prostředí však rychle přechází do nerozpustných sloučenin, proto nepatří k nejzávažnějším polutantům. Toxicita sloučenin stříbra se tedy liší v závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě viz. distribuční diagram (obr. 3) jednotlivých forem stříbrných iontů ve vodě v závislosti na pH (Křížková *et al.*, 2009).



Obr.3

Distribuční diagram iontů stříbra ve vodném prostředí (Křížková *et al.*, 2009).

3.2 Vliv stříbrných iontů na živé organismy

Stříbro je vysoce toxické pro ryby, řasy, některé rostliny, houby, korýše, bakterie a má také negativní dopad na zdraví člověka (Panyala *et al.*, 2008).

Stříbrné ionty a jeho sloučeniny se běžně používají v různých průmyslových odvětvích, lékařství či šperkařství. U lidí, kteří jsou bezprostředně v kontaktu se stříbrnými ionty nebo jeho sloučeninami, dochází k jejich vdechování nebo požití (Ellender & Ham, 1989). Otravy stříbrem se vyznačují popelavě šedým zabarvením kůže (argyria) nebo pigmentací očí (argyrosis). Histochemické studie naznačují, že břidlicově šedé zbarvení kůže vzniká ukládáním granulí sulfidu stříbrného. Při dlouhodobé expozici se může stříbro hromadit v játrech, ledvinách, rohovce, dásních, nehtech a slezině (Sue *et al.*, 2001).

Stříbrné ionty mohou mít také negativní vliv na sladkovodní ryby. U ryb vystavených stříbrným iontům dochází k nadměrné sekreci hlenu a zrychlenému povrchovému dýchání. Iontové stříbro se váže na epitel žaber, kde se hromadí. Tyto vazby vedou k inhibici sodnodraselné ATP-azové pumpy, přičemž aktivní sorpce sodíkových a chloridových iontů je inhibována. Tyto iontové regulační poruchy mohou být pro ryby smrtelné (Bilberg *et al.*, 2012).

Stříbrné ionty vykazují vysokou antibakteriální a antimykotickou schopnost. Antimykotický účinek stříbrných iontů byl studován např. u dvou rostlinných patogenních hub *Bipolaris sorokiniana* a *Magnaporthe grisea*. Ionty stříbra měly významný negativní vliv na tvorbu kolonií obou patogenů (Jo *et al.*, 2009). Antibakteriální účinek stříbrných iontů byl potvrzen např. ve studii, která se zabývala působením stříbrných iontů na gram-negativní bakterie *Escherichia coli* a gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Aplikace stříbrných iontů způsobila strukturální změny v bakteriální membráně a docházelo k úmrtí bakterií (Jung *et al.*, 2008). Díky svým antibakteriálním a antimykotickým vlastnostem mohou stříbrné ionty nacházet široké uplatnění v praxi (Jo *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2008).

3.3 Mechanismus působení stříbrných iontů na rostliny

Pro rostliny představují stříbrné ionty také významný stresový faktor. Jejich působení spouští v rostlinách obrannou reakci, dochází k biosyntéze obranných proteinů a obranných sloučenin za účelem detoxikace. Mezi detoxikační proteiny patří fytochelatiny a metalothioneinu podobné proteiny (Křížková *et al.*, 2009). Fytochelatiny jsou syntetizovány z glutathionu enzymem fytochelatinsynthasou. Aktivátory tohoto enzymu jsou ionty těžkých kovů. Aktivace fytochelatinsynthasy stříbrnými ionty byla prokázána např. ve studii Maitani *et al.*, 1996 na kořenech mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*) nebo na kulturách zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Howe & Merchant, 1992). Metalothioneiny a metalothioneinu podobné proteiny mají nízkou molekulovou hmotnost, vysoký obsah cysteinu a jsou schopné vázat ve své struktuře ionty těžkých kovů. Indukce exprese metalothioneinu podobného proteinu stříbrnými ionty byla potvrzena např. u houseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Murphy & Tiaz, 1995, Navabpour *et al.*, 2003). Po aplikaci stříbrných iontů u houseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla také prokázána indukce syntézy obranných proteinů jako jsou fytoalexiny (Tsuji *et al.*, 1992) a thioniny (Epple *et al.*, 1995).

Stříbrné ionty mohou významně ovlivnit aktivitu enzymů (inhibice). Tato inhibice byla objevena u 560 enzymů převážně bakteriálního původu. U enzymů rostlinného původu byla zjištěna téměř u 70 enzymů. Jedná se převážně o enzymy účastnící se biosyntézy polysacharidů, čímž může být vysvětlen zpomalující efekt stříbrných iontů na zrání plodů, a o enzymy sekundárních metabolitů (Kumar *et al.*, 2009, Křížková *et al.*, 2009).

Stříbrné ionty mohou mít také vliv na membránový potenciál a transport vody. U cévnatých rostlin je příjem vody zprostředkován pomocí transmembránových proteinů akvaporinů. Tyto proteiny jsou stříbrnými ionty inhibovány a dochází k blokování nebo stažení kanálů (Niemiets & Tyerman, 2002).

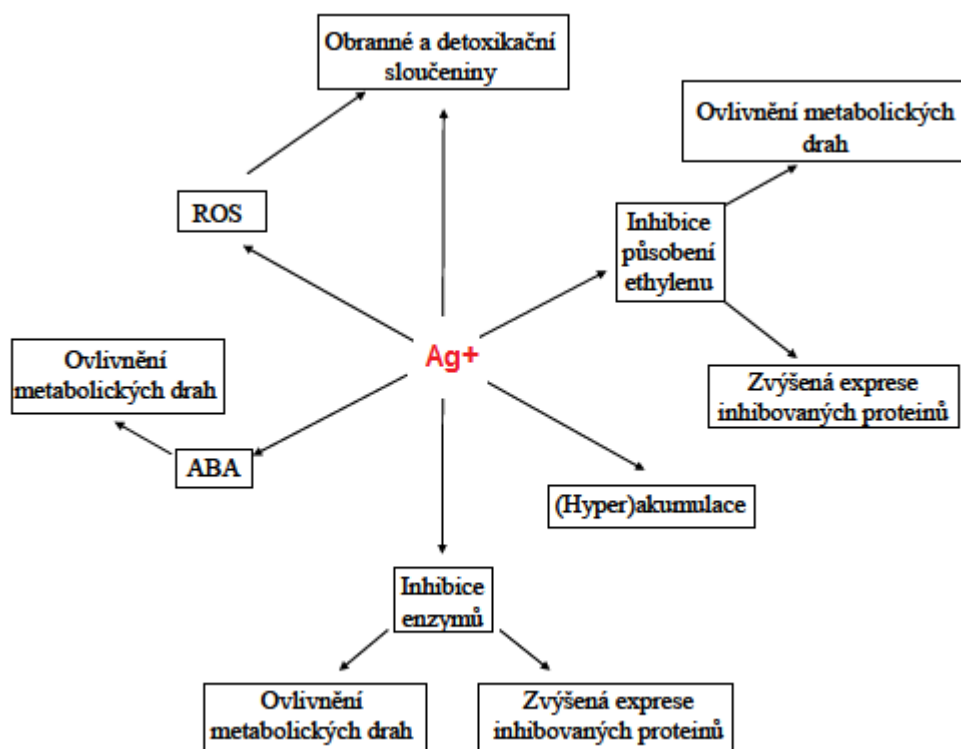
Dále mohou stříbrné ionty zasahovat také do rostlinné signalizace. Například byla prokázána inhibice působení ethylenu např. u etiolovaných rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*) bavlníku (*Gosypium hirsutum*) a u bílých květů orchideje (*Cattleya Louise Georgeianna*). U rostlin hrachu docházelo k inhibici dlouhivého růstu, druhotnému tloušťnutí hypokotylu a ztrátě gravitropismu. U bavlníku bylo pozorováno odvrácení abscise listů, květů a plodů a u květů orchideje docházelo k blokování senescence (Beyer, 1976).

Stříbrné ionty jsou schopné inhibovat i biosyntézu etylenu, což bylo dokázáno u rostlin rajčat (*Solanum* spp.), čekanky obecné (*Cichorium intybus*), pomeranče (*Citrus aurantiaca*), ředkve seté (*Raphanus sativus*). Děje se tak díky blokování regulační vazby mezi hladinou etylenu a jeho syntézou (Atta-Aly *et al.*, 1986).

Stříbrné ionty pravděpodobně ovlivňují i hladinu kyseliny abscisové (ABA). ABA je důležitá např. pro vývoj somatických embryí jehličnanů. U kultur somatických embryí smrku sivého (*Picea glauca*) přidavek stříbrných iontů zvyšoval hladinu ABA v embryích a urychlilo se jejich dozrávání. Pravděpodobně se zde spojuje efekt stříbrných iontů jako inhibitoru působení etylenu a působení stříbrných iontů jako stresového faktoru ovlivňujícího hladinu ABA (Kong & Yeung, 1994).

Stříbrné ionty mohou ovlivňovat také syntézu membránových lipidů. Těžké kovy indukují peroxidaci lipidů, která má za následek jejich degradaci nebo inhibici biosyntézy. Působení těžkých kovů může tedy způsobit změnu zastoupení membránových lipidů (Akermoun *et al.*, 2002, Quartacci *et al.*, 2001).

Účinky stříbrných iontů na rostlinný organismus jsou poměrně specifické, proto mohou sloužit pro porozumění rostlinné fyziologie (Křížková *et al.*, 2009). Obrázek 4 schematicky představuje shrnutí možného působení stříbrných iontů na rostlinný organismus.



Obr. 4

Působení stříbrných iontů na rostlinný organismus (Křížková *et al.*, 2009).

3.4 Nanostříbro (nano-Ag)

Nano-Ag jsou shluky atomů stříbra (Ag(0)). Velikost nano-Ag je 1-100 nm. Nanomateriály mají díky své velikosti výjimečnou vodivost, reaktivitu a optickou citlivost. Nano-Ag se dále vyznačuje silnými antibakterálními a antimykotickými vlastnostmi. Použití stříbra bylo přísně omezeno díky jeho toxicitě, ale nanotechnologie umožňují výrobu malých částic s velkým poměrem povrchu k objemu a vyšší účinností (Mishra & Kumar, 2009).

Stříbro je známé svými antibakteriálními vlastnostmi již od dob starověkého Řecka (Kolář *et al.*, 2001). Biologická aktivita nano-Ag byla intenzivně studována na počátku 20. Století. S objevem penicilinových antibiotik, studium antibakteriálních vlastností nano-Ag ustoupilo do pozadí. V současnosti je užívání antibiotik spojeno s tvorbou antibakteriální rezistence. Nano-Ag je proto díky svým antibakteriálním vlastnostem intenzivně studováno (Panáček *et al.*, 2008).

Nano-Ag tak nachází uplatnění v lékařství k potlačení infekcí, při léčbě popálenin (Ulkur *et al.*, 2005) či k omezení tvorby bakteriálního biofilmu na cévních náhradách

(Strathmann & Wingender, 2004), katetech (Rupp *et al.*, 2004) nebo protézách (Gosheger *et al.*, 2004). Nano-Ag vykazuje také značnou cytotoxicitu k buňkám nakaženým virem HIV (Elechiguerra *et al.*, 2005).

Nano-Ag nachází uplatnění nejen v medicíně, ale i v jiných odvětvích. Například v textilním průmyslu je nano-Ag přidáváno do ponožek či spodního prádla. Dále se používá k výrobě nerezavějících ocelových materiálů, nátěrových hmot nebo k čištění vody (Chen & Schluesener, 2007).

Přírodní nanočástice existují již od počátku Země a stále se vyskytují v životním prostředí jako sopečný prach, měsíční prach či minerální kompozity. Dále vznikají nanočástice jako vedlejší produkty antropogenní činnosti a průmyslových procesů (svařovací plyny, výfukové zplodiny,...) nebo jsou uměle syntetizovány (Ruffini & Cremonini, 2009). Nejčastější metoda výroby nano-Ag je chemická redukce stříbrných solí rozpuštěných ve vodě s redukčními činidly jako je NaBH₄, citrát, glukosa, hydrazin a askorbát (Marambio-Jones & Hoek, 2010). Použití některých redukčních činidel může být nebezpečné pro životní prostředí i živé organismy, proto roste zájem o méně nebezpečné syntézy (Panáček *et al.*, 2006). Tyto syntézy se zakládají na použití polysacharidů, polyfenolů, Tollensova činidla, ozáření, biologické redukce a polyoxometalátu (Sharma *et al.*, 2009).

Vzhledem k širokému využití nanočástic se předpokládá jejich průnik do životního prostředí, kde je jejich působení zatím do značné míry neznámé (Ruffini & Cremonini, 2009).

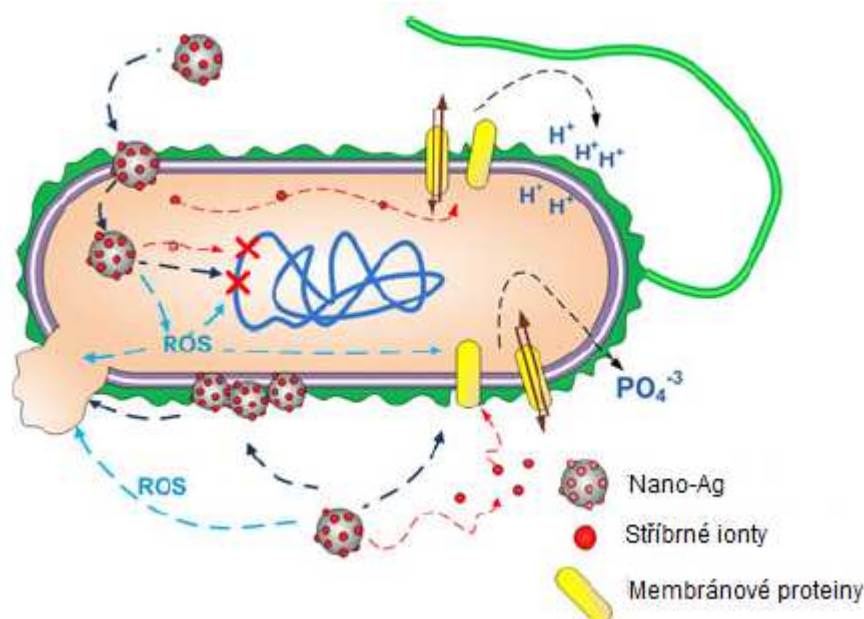
3.4.1 Mechanismus působení nano-Ag a stříbrných iontů na bakteriální buňky

Stříbrné ionty jsou vysoce toxické k široké paletě organismů včetně bakterií. Antibakteriální efekt stříbrných iontů je pravděpodobně způsoben sorpcí stříbrných iontů na záporně nabitou bakteriální buněčnou stěnu, dochází k deaktivaci buněčných enzymů, narušení propustnosti membrány a to vše nakonec vede k lýze buňky (Dibrov *et al.*, 2002).

Ve srovnávací studii nano-Ag, dusičnanu stříbrného a chloridu stříbrného byl detekován vyšší antibakteriální účinek nano-Ag než stříbrných iontů. To dokazuje, že antibakteriální účinek nano-Ag není závislý pouze na eluci stříbrných iontů (Choi *et al.*, 2008).

Mechanismus působení nano-Ag na bakterie není zatím zcela znám. Mezi dosud navrhované základní principy působení nano-Ag patří 1) absorpce volných stříbrných iontů, následné narušení produkce ATP a replikace DNA 2) produkce ROS působením

stříbrných iontů nebo nano-Ag 3) poškození buněčných membrán (Marambio-Jones & Hoek, 2010).



Obr. 5

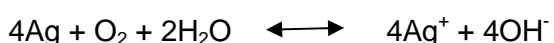
Schéma interakce nano-Ag s bakteriální buňkou. Nano-Ag může uvolňovat stříbrné ionty a aktivovat produkci ROS. Dále nano-Ag interaguje s membránovými proteiny a ovlivňuje jejich funkci nebo se může akumulovat v buněčné membráně a měnit její propustnost. Uvnitř buňky dochází k produkci ROS, uvolnění stříbrných iontů a také k poškození DNA. Vznikající ROS a stříbrné ionty uvnitř buňky mohou také poškozovat DNA a membránové proteiny (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

3.4.1.1 Eluce stříbrných iontů z nano-Ag

Stříbrné ionty jsou z nano-Ag uvolňovány uvnitř i vně buňky. První navrhovaný mechanismus spočívá v oxidačním rozpouštění nano-Ag. Tento mechanismus by mohl fungovat na mitochondriální nebo bakteriální membráně (Asharani *et al.*, 2009).



Druhý způsob produkce stříbrných iontů spočívá v oxidaci nano-Ag za přítomnosti kyslíku (Choi *et al.*, 2008).



Uvolňované stříbrné ionty jsou částečně odpovědné za antimikrobiální aktivitu nano-Ag. Stříbrné ionty mohou interagovat s enzymy dýchacího řetězce jako je NADH-dehydrogenasa, což vede k narušení buněčné respirace a produkce ATP. Stříbrné ionty se také mohou vázat na transportní proteiny, následně dochází k úniku protonů a zániku protonového gradientu. Interakce stříbrných iontů s dýchacími a transportními

proteiny je způsobena vysokou afinitou stříbrných iontů k thiolovým skupinám, které se nachází v cysteinových reziduích těchto proteinů (Dibrov *et al.*, 2002).

U bakteriálních buněk vystavených působení stříbrných iontů bylo pozorováno odtržení buněčné stěny od cytoplazmatické membrány, kondenzace DNA, degradace buněčné stěny a docházelo k úniku intracelulárního obsahu. Fyziologické změny nastávají společně s morfologickými. Takto ošetřené bakteriální buňky již nejsou schopny růstu ani replikace (Jung *et al.*, 2008).

3.4.1.2 Produkce ROS vlivem nano-Ag

Nano-Ag katalyzuje reakce s kyslíkem, což vede k nadměrné produkci ROS. Nano-Ag blokuje antioxidační obranu interakcí přímo s glutathionem (GSH), GSH-reduktasou nebo jinými antioxidačními enzymy. To by mohlo snížit poměr GSH/GSSG a následně zvýšit hladinu ROS v buňce (Carlson *et al.*, 2008).

Za tvorbu ROS mohou být také odpovědné stříbrné ionty uvolněné z nano-Ag a to narušením enzymů dýchacího řetězce nebo enzymů degradujících superoxidový radikál např. superoxidismutasy (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

Produkce ROS vyvolaná působením nano-Ag a stříbrných iontů může být také indukována fotokatalyticky, nicméně nebyla zaznamenána korelace mezi antibakteriálním účinkem a koncentrací fotokatalytických ROS (Choi & Hu, 2008).

Následkem oxidačního stresu dochází k poškození proteinů, nenasycených mastných kyselin a DNA, což vede k nezvratnému poškození buňky a může vyústit až v její smrt (Navabpour *et al.*, 2003).

Studie o toxických účincích různých forem stříbra na nitrifikační bakterie dokazují zvýšenou tvorbu intracelulárních ROS. Vyšší toxicita nano-Ag oproti stříbrným iontům naznačuje, že i jiné faktory hrají důležitou roli v celkové toxicitě nano-Ag (Choi *et al.*, 2008).

3.4.1.3 Poškození membrán vlivem nano-Ag

Mechanismus vstupu nano-Ag do buňky se liší v závislosti na typu buněk. Buď může jít o pasivní nespecifický mechanismus anebo o rozsáhlou fagocytózu shluků nano-Ag (Carlson *et al.*, 2008). U savčích buněk je nano-Ag přijímáno endocytózou a makropinocytózou (Asharani *et al.*, 2009).

Toxicita nano-Ag závisí na velikosti a tvaru částic, protože malé nanočástice (do 10 nm) mohou projít přes buněčnou membránu a hromadit se uvnitř buněk (Choi *et al.*, 2008). Transmisní elektronová mikroskopie dokazuje, že po interakci nano-Ag s

bakteriální membránou *E.coli* je schopné nano-Ag pronikat do buněk a také vyvolat tvorbu jamek nepravidelného tvaru v membráně (Choi *et al.*, 2008, Smetana *et al.*, 2008). Do intracelulárního prostoru bakteriálních buněk však pronikají nano-Ag i o větší velikosti než 10 nm. U bakterií *Pseudomonas aeruginosa* byly uvnitř buněk zaznamenány i nano-Ag o velikosti do 80 nm (Xu *et al.*, 2004).

Interakce nano-Ag s bakteriální cytoplasmatickou membránou není zatím zcela jasná. Pravděpodobně se nejedná o elektrostatickou interakci jako u stříbrných iontů, ale spíše jde o vazbu nano-Ag s thiolovými skupinami proteinů. Dochází tak k poškození membránových proteinů a změnám propustnosti membrány (Lok *et al.*, 2006). Podobně jako u stříbrných iontů dochází k narušení protonového gradientu a destabilizaci membrány, ale koncentrace, při níž k tomu dojde, je při použití nano-Ag nižší (Dibrov *et al.*, 2002, Lok *et al.*, 2006).

Míra antibakteriálního účinku do značné míry závisí také na druhu bakterií. Ve studii Kim *et al.*, 2007 byl srovnáván vliv nano-Ag na modelové mikroorganismy *E.coli* a *S.aureus*. Antibakteriální aktivita nano-Ag byla u *S.aureus* nižší než u *E.coli*, což pravděpodobně souvisí s rozdílnou tloušťkou polyglykanu v membránové struktuře grampozitivních a gramnegativních bakterií (Kim *et al.*, 2007).

3.4.2 Vliv nano-Ag na rostliny

Toxické účinky nano-Ag byly prokázány nejen u bakterií, ale i u řas, virů, hub, zvířat, savčích buněk a vyšších rostlin. Vliv nano-Ag by studován např. na kořenovém systému jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum*). Byl detekován inhibiční účinek nano-Ag na růst sazenic ve větší míře než při aplikaci stříbrných iontů. Vyšší inhibiční vliv nano-Ag byl pozorován při použití nano-Ag o velikosti 6 nm oproti nano-Ag s větším rozměrem (25 nm). Vlivem nano-Ag docházelo nejen k inhibici růstu, ale také k inhibici vývoje kořenových vlásků. Vakuoly kortikálních buněk, epidermis a kořenové čepičky byly narušeny. Inhibici růstu a poškození buněk lze přičíst buď samotnému nano-Ag nebo schopnosti nano-Ag dodávat rozpuštěné stříbro kritickým biotickým receptorům (Yin *et al.*, 2011).

Další studie se zabývala vlivem nano-Ag na buněčný cyklus buněk kořenové špičky cibule (*Allium cepa*). Při aplikaci nano-Ag docházelo ke snížení mitotického indexu. Při nižších koncentracích nano-Ag byl narušen buněčný cyklus v metafázi, což mohlo být způsobeno poškozením mitotického vřetenka. Navíc při vyšších koncentracích nano-Ag byly detekovány chromozomální zlomy a dále pak úplný rozklad buněčných stěn (Kumari *et al.*, 2009).

Rostliny jsou důležitou složkou životního prostředí a ekologických systémů. Tyto objevy naznačují, že nanočástice mohou mít negativní dopad na ekosystémy (Kumari *et al.*, 2009).

3.4.3 Antimykotický účinek nano-Ag

Mnoho studií prokázalo antibakteriální účinky nano-Ag, ale vliv nano-Ag na houbové organismy není zatím zcela jasný. Antimykotické účinky nano-Ag byly zkoumány např. u kmenů *Trichophyton mantagrophytes* a druhů *Candida*. Výsledky prokázaly silný negativní vliv nano-Ag na tyto kožní plísně, který byl srovnatelný s účinkem amfotericinu B, což je fungicidní látka široce užívaná při systémových infekcích (Keuk-Jun *et al.*, 2008).

V další studii byla sledována antimykotická aktivita nano-Ag u ambrosiových hub *Raffaelea* spp., které jsou odpovědné za úhyn velkého množství dubů v Koreji. Nano-Ag výrazně inhibovalo růst těchto patogenů, mělo negativní dopad na houbové hyfy a také na klíčení konidií (Kim *et al.*, 2009).

4 Patogen *Oidium neolycopersici*

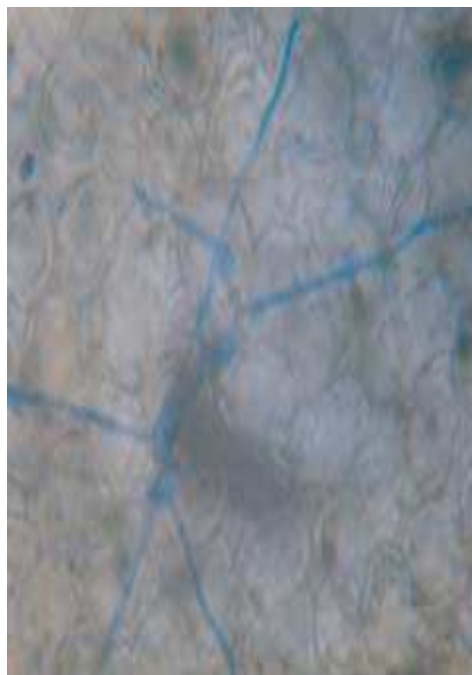
Onemocnění rostlin, způsobené různými patogeny, jako jsou viry, bakterie a plísně, může vést k velmi závažným ztrátám výnosu zemědělských plodin (Heitefuss, 2001).

O. neolycopersici je vysoce polyfágní houba, která infikuje rajčata. Způsobuje bílé prachové léze na povrchu listů rajčete (Jones *et al.*, 2001). Infekce se nejprve projeví na horní straně listu, přechází na řapík a kalichy. Kolonie *O. neolycopersici* jsou zpočátku malé 3 - 10 mm v průměru, později se zvětšují a mohou pokrýt celý povrch listu. U silně napadených rostlin dochází k infekci i na spodní straně listu, ale nikdy není infikován plod (Meislerová *et al.*, 2000).

A)



B)



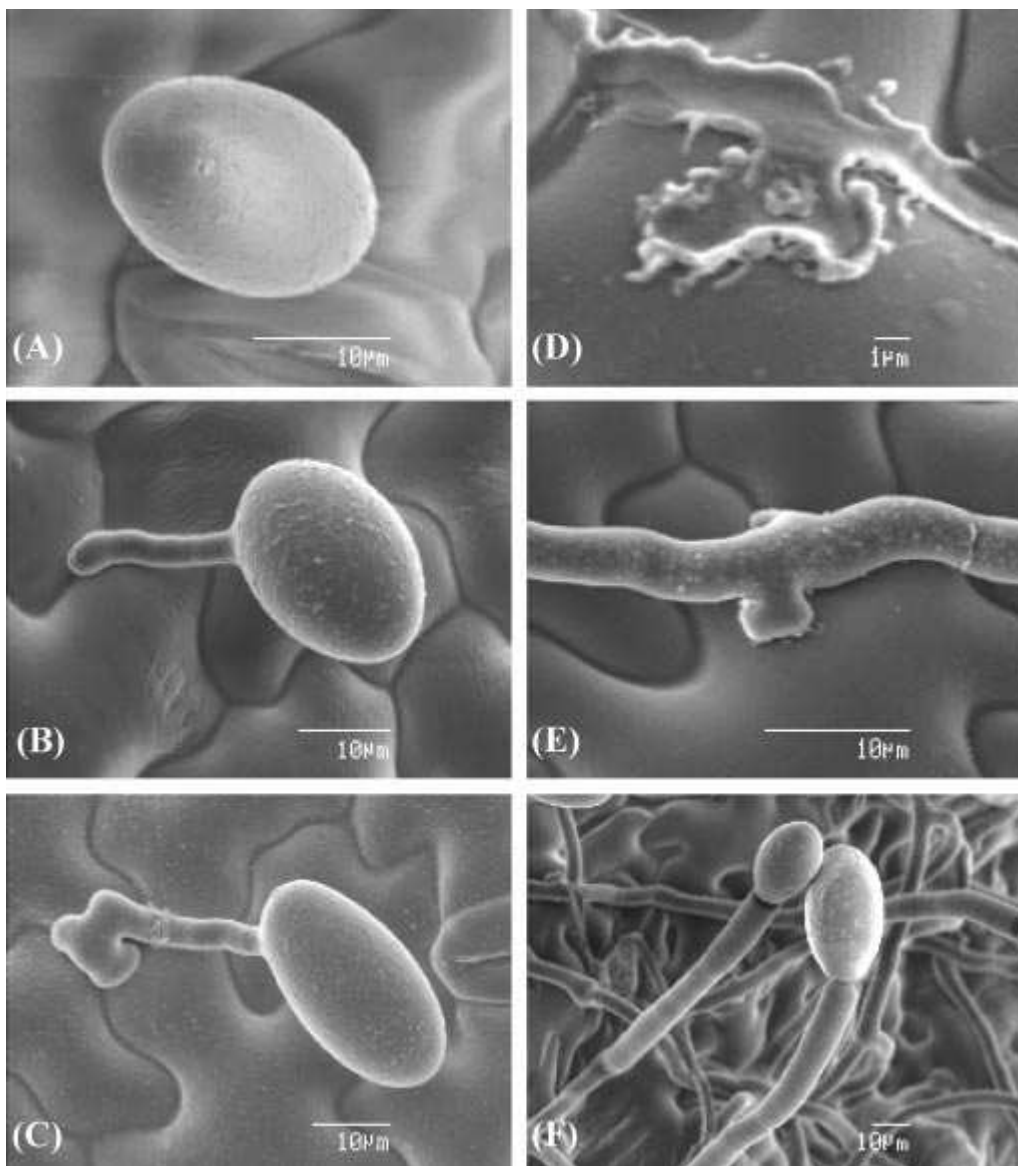
Obr. 6

Oidium neolycopersici na rostlině rajčete *Solanum* spp., prachové bílé léze, plody zůstávají neinfikovány (A) (Jones *et al.*, 2001). Mikroskopický pohled na patogen *Oidium neolycopersici* 5 dní po inokulaci (B) (Achuo *et al.*, 2004).

4.1 Vývoj patogena *Oidium neolycopersici*

Konidie patogena *O. neolycopersici* mohou vyklíčit během 3 až 5 h, tvoří apresoria do 6 až 8 h a k penetraci do hostitelské buňky dochází do 11 h (Jacob *et al.*, 2008).

Elipsoidní výtrusy *O. neolycopersici* jsou velké přibližně 30x50 μm . Konidiální povrch je nepravidelně páskový (Obr. 7A), klíční vlákna, vyrůstající z těla konidia, jsou hladké (Obr. 7B). Klíční vlákno tvoří laločnatou čtyřlístkovou strukturu apresorium. Apresorium se obvykle objeví na křižovatce tří epidermálních buněk (Obr. 7C). Následně apresorium proniká do hostitelské buňky. Velikost penetračního póru je asi 0,2 μm (Obr. 7D). Dochází k rychlé kolonizaci hostitelské rostliny. Sekundární hyfy vybíhají z konidiálních těl a primárních apresorií. Sekundární apresoria se tvoří samostatně nebo ve dvojicích (Obr. 7E) z rozvětvených hyf. Nepohlavní životní cyklus je zakončen tvorbou konidiospor, které se tyčí kolmo k povrchu hostitelských buněk (Obr. 7F). V meristematické zóně jsou nezralá konidia a na vrcholu válcové nohy se nachází jedno zralé konidium (Jones *et al.*, 2001).



Obr. 7

Elipsoidní konidium *O. neolycopersici* šikmo ležící na povrchu buněk hostitelské rostliny *Solanum* spp. (A). 5 h po inokulaci (hpi) se objevilo první klíčící vlákno (B), 10 hpi se vyvinulo primární apresorium (C). Následující záběry zachycují tvorbu penetračního póru (D), párování hyfálních apresorií (E), dvě konidiosporální ložiska a zralé elipsoidní konidie (F) (Jones *et al.*, 2001).

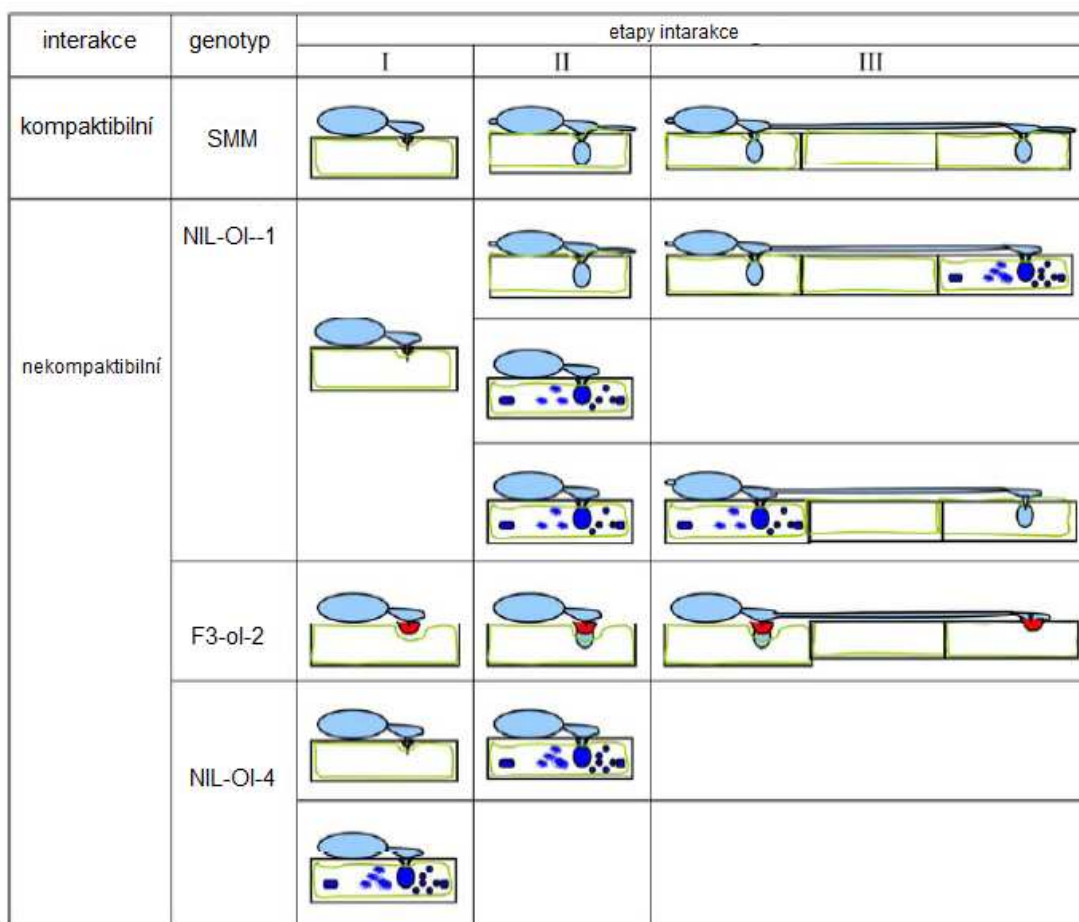
Na vývoj padlí mají vliv nejen vnější podmínky, ale i genotyp hostitele. Vliv prostředí je obtížné posoudit samostatně, protože změna životních podmínek ovlivňuje i vývoj hostitelké rostliny (Meisslerová & Lebeda, 2010).

Nicméně bylo zjištěno, že u vysoce citlivého genotypu *Solanum lycopersicum* je optimální teplota pro tvorbu konidií *O. neolycopersici* 20 - 25°C a optimální intenzita

osvětlení cca $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Při nižších intenzitách a ve tmě docházelo k potlačení vývoje patogena (Meisslerová & Lebeda, 2010).

4.2 Geny rezistence vůči patogenu *Oidium neolycopersici*

Řada studií se zabývala mapováním genů rezistence druhů *Solanum* spp.. Mezi dominantní geny rezistence patří OI-1, OI-3, OI-4, OI-5, OI-6 umístěné na šestém chromozomu a uspořádané do tří genetických lokusů. Jiné dominantní OI-geny produkují blízké izogenetické linie (NIL). Mechanismus rezistence způsobený OI-dominantními geny bývá spojen s hyperseznitivní reakcí (HR), která se mění v závislosti na odlišných detailech OI-genu v NIL. Zatímco mechanismus rezistence řídí recesivní gen OI-2 na čtvrtém chromozomu, který je spojován s formováním papil (Bai *et al.*, 2005).



Obr. 8

Schéma hlavních etap kompaktibilní a nekompatibilní obranné interakce rajčete proti padlí *Oidium neolycopersici*. V první etapě jsou tvořena primární apresoria, která

mohou být spojena s tvorbou papily (buněčná stěna je narušena v místě penetrace) - F3-ol-2. Napadené hostitelské buňky zůstávají živé nebo nastupuje nekrotická reakce HR (buňky označené modrými částicemi) - NIL-OI-4. V druhé etapě vznikají primární haustoria v epidermálních buňkách, které mohou následně podstoupit HR stejně jako u NIL-OI-4 a NIL-OI-1. Ve třetí etapě vznikají sekundární haustoria v epidermálních buňkách a mohou vyvolat HR - NIL-OI-1. Tvorba sekundárních apresorií je spojována s tvorbou papil-F3-ol-2 (Li *et al.*, 2007).

4.3 Obrané reakce rostlin

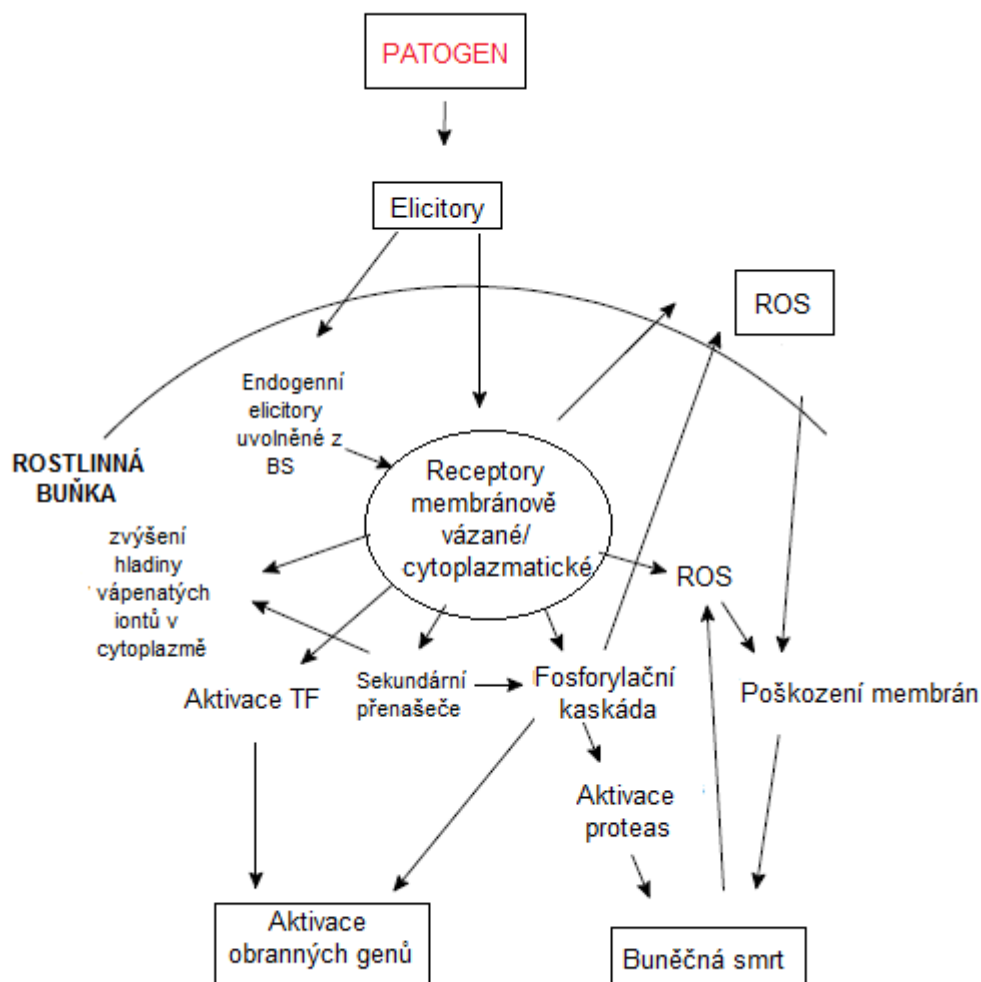
Rostlina se může bránit infekci patogenem různými způsoby. Pasivní princip zahrnuje strukturální a chemické vlastnosti rostlin, bez ohledu na přítomnost nebo útok patogena (např. tloušťka pokožky, přítomnost inhibičních látek nebo omezená dostupnost živin). Aktivní princip spočívá ve spuštění reakcí a aktivaci mechanismů v hostitelské buňce v důsledku invaze patogenu, což vede k vyloučení, inhibici nebo eliminaci patogena (Heitefuss, 2001).

Aktivní způsob obrany rostlin proti patogenům je tvořen dvouvrstevným imunitním systémem. První linií obrany je primární vrozená imunita. Je tvořena souborem membránových receptorů rostlin, které rozpoznávají patogenní motiv. Dochází pak k aktivaci řady základních obranných mechanismů. Nicméně některé patogenní mikroorganismy mohou potlačit tuto primární vrozenou imunitu, která zahrnuje rozeznání patogenů receptory díky vylučování patogenních elicitorů. Na obranu proti těmto patogenům, které získali schopnost překonat bazální obranu, vyvinuly rostliny druhou obrannou linii. Jde o sekundární vrozenou imunitu, která má více specializovaný mechanismus a je také označovaná jako efekty spouštěná imunita. Tato imunita je založena na přímém nebo nepřímém rozpoznání elicitorů patogena produkty genů rezistence rostlin (Li *et al.*, 2007).

Jedna z prvních reakcí rostliny na infekci patogenem je tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Enzymy účastníci se vzniku peroxidu vodíku a superoxidových radikálů jsou úzce spojeny s obrannou reakcí rostlin. ROS mohou mít přímý negativní vliv na patogenní organismus (Romero *et al.*, 2008).

Rostlinné buňky dále reagují na útok patogena zvýšením hladiny cytoplazmatického vápníku, aktivací transkripčních faktorů a aktivací obranných genů (Heitefuss, 2001). Dochází tak k syntéze obranných proteinů. Mezi tyto proteiny patří např. b-1,3-glukanasa nebo chitinasa, které přímo hydrolyzují buněčnou stěnu patogena. Dále je významně posílena buněčná stěna infikované rostliny syntézou kalosy a ligninu, za což je zodpovědná syntéza enzymů kalosasyntasa a fenylalaninamoniumlyasa (PAL).

Enzym PAL je také zapojen v syntéze dalších cenných látek včetně fytoalexinů, derivátů fenyylpropanoidů s antimikrobiální aktivitou, kyseliny salicylové, signální molekuly, která je důležitá pro místní a systémovou rezistenci (Romero *et al.*, 2008).



Obr. 9

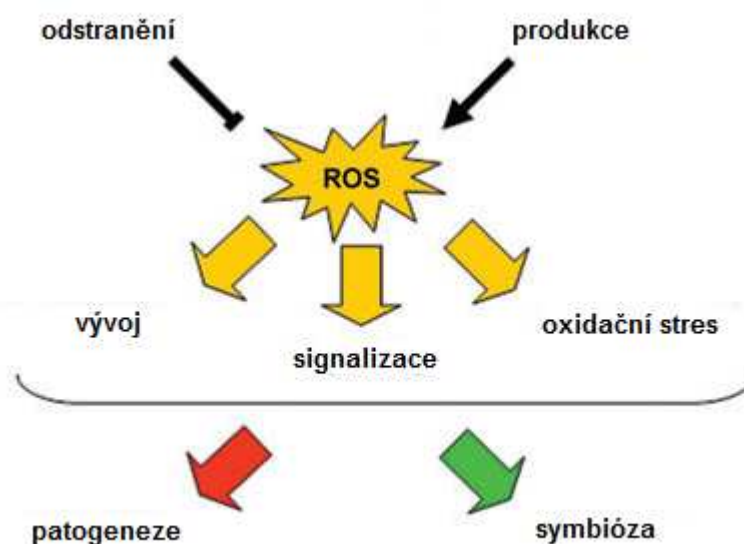
Procesy v rezistentní rostlinné buňce po infekci patogenem vedoucí k HR (Heitefuss, 2001).

4.3.1 ROS

Mezi ROS patří singletový kyslík, superoxidový anion, hydroxylový radikál, hydroxylový ion, perhydroxylový radikál a peroxid vodíku (Wojtaszek, 1997). Za normálních růstových podmínek je produkce ROS v buňce nízká. Působí-li na rostlinu stresové faktory, které narušují její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení koncentrace ROS (Mittler, 2002).

ROS vznikají průběžně jako vedlejší produkty v normálních metabolických procesech jako je např. fotosyntéza a glykolýza. K tvorbě ROS dochází také v reakci na abiotický a biotický stres. ROS jsou nejen toxické produkty aerobního metabolismu, ale také významné signální molekuly. ROS vznikají v první fázi napadení rostliny patogenem a také hrají důležitou roli ve vyvolání HR u infikovaných rostlin (Nanda *et al.*, 2010). ROS indukující buněčnou smrt způsobují oxidační procesy jako je peroxidace membránových lipidů, oxidace proteinů, inhibice enzymů, poškození DNA a RNA (Mittler, 2002).

Vzhledem k tomu, že ROS jsou toxické, potřebuje rostlina různé mechanismy, které regulují intracelulární koncentraci ROS. První mechanismus využívá ROS pro signalizační účely a druhý slouží k detoxifikaci nadměrného ROS, zejména při stresu. Tvorba a degradace ROS se mění v závislosti na fyziologickém stavu rostliny a integraci v různém prostředí, vývojových a biochemických stimulech (Mittler, 2002).



Obr. 10

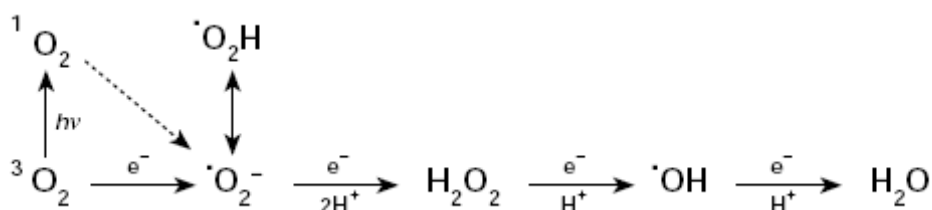
Schématické znázornění regulace hladiny ROS a hlavních funkcí ROS v interakci rostlin a mikroorganismů (Nanda *et al.*, 2010).

4.3.1.1 Produkce ROS

Kyslík v atmosféře Země (21% O₂) je tvořen v průběhu fotosyntézy kyanobakteriemi a rostlinami (Scandalios, 1993). Molekulární kyslík je poměrně málo reaktivní. K celkové redukci molekulárního kyslíku na vodu je potřeba čtyř elektronů a je vždy doprovázena postupnou jedna až tři elektronovou redukcí, kdy dochází k tvorbě ROS.

Reakční řetězec vyžaduje iniciaci v prvním kroku, zatímco následné kroky jsou exotermní a mohou probíhat samovolně (Vranová *et al.*, 2002).

Mezi nejznámější enzymy produkující ROS patří xantinoxidasa, dihydroorotátdehydrogenasa nebo tryptofanoxygenasa. Díky těmto enzymům dochází k tvorbě superoxidového radikálu. Dalším možným zdrojem ROS je reakce katalyzovaná lipoxygenasou, oxalátoxidasou a aminoxidasou. Vzniká tak peroxid vodíku či peroxyderiváty. Do skupiny redukující molekulární kyslík přímo bez tvorby superoxidu patří prostaglandinsynthasa, guanylátcyklasa, glukosaoxidasa, D- a L-AKoxidasa (Blokhina *et al.*, 2003).



Obr. 11

Schéma vzniku ROS (Wojtaszek, 1997)

4.3.1.2 Degradace ROS

V rostlinných buňkách k detoxifikaci ROS slouží různé enzymy a redoxní metabolity. Mezi důležité enzymy napomáhající degradaci ROS patří superoxoddismutasa (SOD), přeměňující superoxid na peroxid vodíku, katalasa (CAT), dismutující peroxid vodíku na kyslík a vodu, askorbátperoxidasa (APX), redukující peroxid vodíku na vodu s využitím askorbátu (ASC) jako donoru elektronů. Toto jsou hlavní enzymatické systémy chránící rostlinné buňky před oxidačním poškozením. Aktivita těchto enzymů je geneticky regulována v závislosti na životním prostředí a vývojových změnách rostliny. Rovnováha aktivity těchto enzymů je rozhodující pro hladinu superoxidu a peroxidu vodíku v buňce (Tommasi *et al.*, 2001).

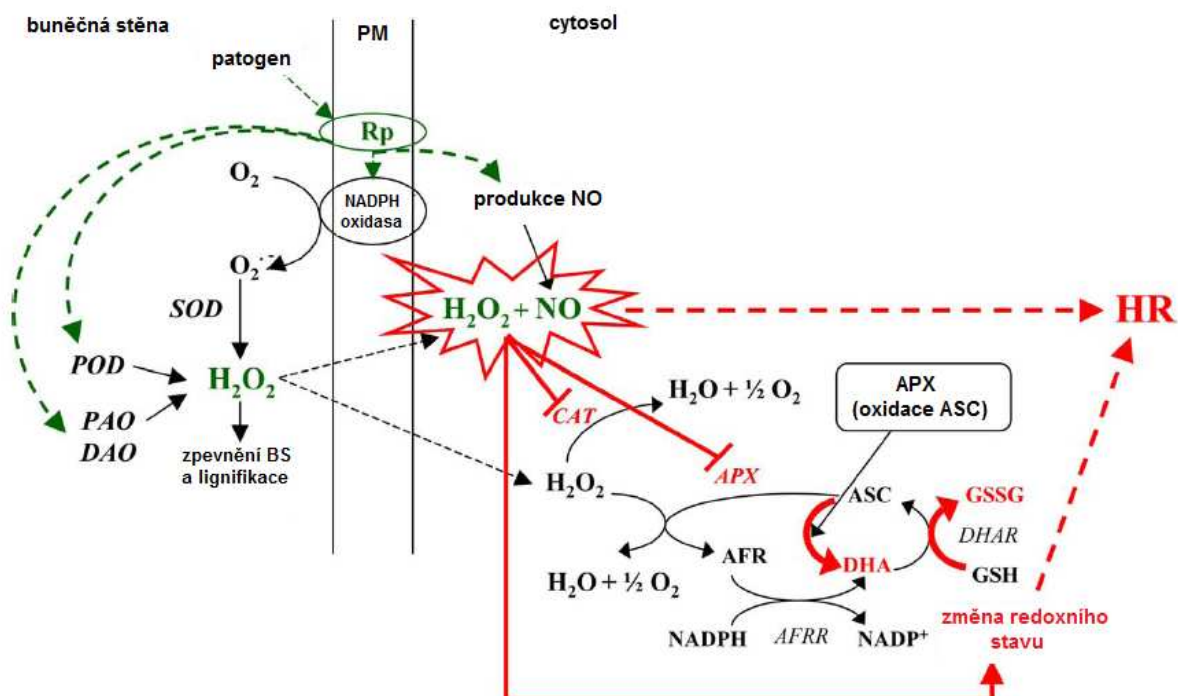
Rostlinné buňky chrání před ROS také redoxní metabolity jako je ASC a tripeptid glutathion (GSH). Buď přímo odstraní ROS nebo blokují oxidační řetězové reakce vyvolané ROS (Tommasi *et al.*, 2001).

4.3.1.3 ROS a HR

Během několika minut po útoku patogena dochází ke vzniku ROS. Tato slabá a přechodná produkce ROS je způsobena biologickou nespecifickou reakcí na útok patogena. Po několika hodinách nastává masivní a dlouhodobá produkce ROS tzv. oxidační stres. Tato kinetika vzniku ROS je typická pro nekompaktibilní interakci rostlinných patogenů (De Gara *et al.*, 2003).

ROS mohou mít přímý negativní dopad na patogenní organismus nebo reakce peroxidu vodíku s přechodnými kovy vyvolává produkci velmi reaktivních hydroxylových radikálů, které mají devastační účinek na biomolekuly. Kromě toho také peroxid vodíku brání pronikání mikroorganismů do rostlinných pletiv, protože přispívá ke zpevnění buněčné stěny (Bareló, 1997).

Zvýšení mechanické odolnosti rostlinných buněk zpomaluje penetraci patogena, ale vyžaduje více času k aktivaci. Peroxid vodíku je signální molekula, která snadno prochází přes membrány a je schopná aktivovat obranné reakce. V důsledku útoku patogena dochází také ke zvýšené produkci oxidu dusnatého, který může sloužit také jako signální molekula obranných reakcí (De Gara *et al.*, 2003).

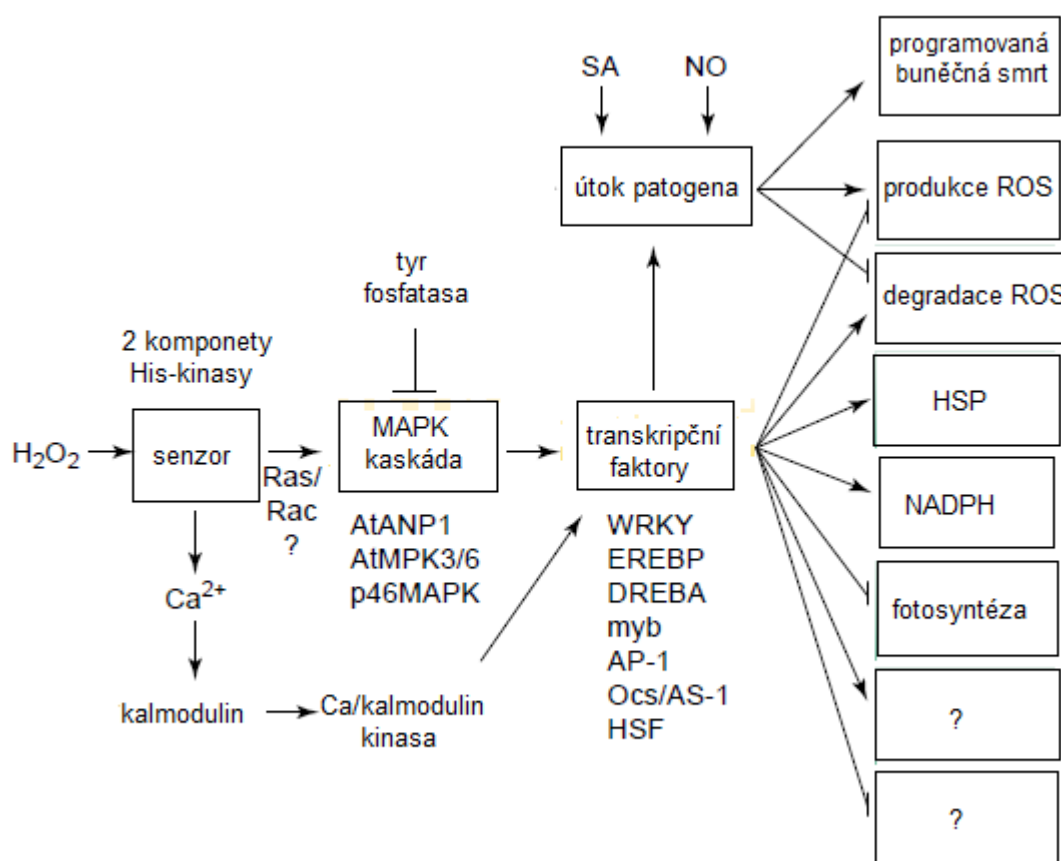


Obr. 12

Antioxidační změny vyvolané během HR. Útok patogena vyvolá v rostlinné buňce produkci ROS a reaktivních forem dusíku. Tyto reaktivní formy, které brání penetraci

patogena, také působí jako signální molekuly pro aktivaci obranné reakce vedoucí k HR. Suprese enzymů degradujících ROS (APX, CAT) přispívá k oxidačnímu stresu. Útok patogena aktivuje enzymy produkující ROS. Nerovnováha redoxních párů (ASC/DHA a GSH/GSSG) je také součástí nitrobuněčných dějů spoštějící HR (De Gara *et al.*, 2003).

APX - askorbátperoxidasa, AFR - volné radikály askorbátu, AFFR - reduktasa AFR, CAT - katalasa, DAO - diaminoxidasa, DHA - dehydroaskorbová kyselina, DHAR - reduktasa radikálů DHA, GSH - glutathion, GSSH - disulfid glutathionu, NO - oxid dusnatý, PAO - polyaminoxidasa, PM - plasmatická membrána, POD - sekreční peroxidasa, Rp - proteinové receptory, SOD - superoxoddismutasa.



Obr. 13

Model aktivace signálních drah během oxidačního stresu rostlin. Peroxid vodíku je detekován buněčným receptorem nebo senzorem, což vede k aktivaci mitogenní proteinkinasové kaskády (MAPK) a skupiny transkripčních faktorů, které řídí různé buněčné děje. Peroxid vodíku je také spojován se změnami hladiny vápenatých iontů a kalmodulinu, aktivací nebo indukci Ca/kalmodulinkinasy, které mohou rovněž aktivovat

nebo potlačovat aktivitu transkripčních faktorů. Regulace genové exprese transkripčními faktory indukuje různé obranné mechanismy jako je degradace ROS, tvorba heat shock proteinů (HSP), potlačení některých mechanismů produkujících ROS a fotosyntéza. Díky útoku patogena dochází také ke změnám regulace produkce a degradace ROS nebo také k buněčné smrti. Signální hormony oxid dusnatý a kyselina salicylová (SA) jsou klíčové regulátory této reakce (Mittler, 2002).

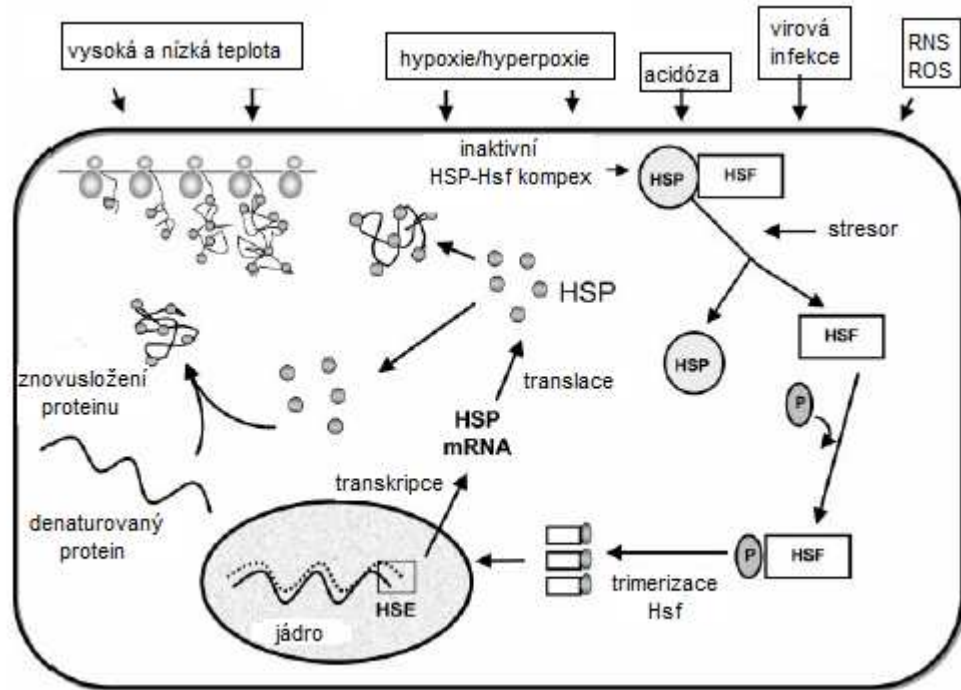
4.3.2 HSP

HSP byly objeveny v roce 1962 a byly popsány jako proteiny, které jsou exprimovány díky tepelnému šoku nebo jinému stresu. Následně bylo prokázáno, že HSP jsou zapojeny do mnoha regulačních drah a chovají se jako molekulární chaperony pro další buněčné proteiny (Kregel, 2002).

Stresové podmínky způsobují dysfunkci proteinů. Pro přežití buněk ve stresu je zvláště důležité udržovat proteiny v jejich funkční konformaci a zabránit hromadění nefunkčních proteinů. HSP/chaperony jsou zodpovědné za skládání proteinů, jejich translokaci a degradaci. V mnoha normálních buněčných procesech stabilizují proteiny a membrány a hrají klíčovou roli při ochraně rostlin proti stresu tím, že obnovují normální proteinovou konformaci (Wang *et al.*, 2004).

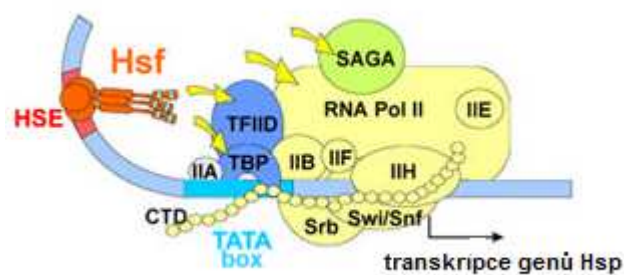
4.3.2.1 Syntéza HSP

Vnější stresové podmínky způsobí aktivaci transkripčního faktoru HSP (Hsf). Hsf jsou v cytosolu udržovány v neaktivním stavu a vlivem stresu dochází k jejich aktivaci. Hsf jsou postranlačně modifikovány a oligomerizovány, poté vstupují do jádra a vážou se na HSE (regulační oblast genu HSP), čímž spouští transkripci. Přepsaná mRNA opustí jádro a v cytosolu dochází k syntéze HSP (Kregel, 2002).



Obr. 14

Schéma aktivace Hsf a následné syntézy Hsp 70. Stresové faktory jako je vysoká a nízká teplota, hypoxie/hyperoxie, acidóza, virová infekce, ROS či reaktivní formy dusíku (RNS) způsobí oddělení Hsf od HSP. Hsf jsou fosforylovány proteinkinasou a tvoří v cytosolu trimery. Tyto komplexy vstupují do jádra a vzbou na HSE regulační oblast aktivují transkripci (Kregel, 2002).



Obr. 15

Interakce Hsf s prvky základního transkripčního komplexu (žlutě) u *Arabidopsis thaliana* složené z RNA-polymerasy II, transkripčních faktorů TF IIA, IIB, IID, IIE, IIH a TBB a koaktivátorů Srb, Swi/SNF a SAGA (Baniwal *et al.*, 2003).

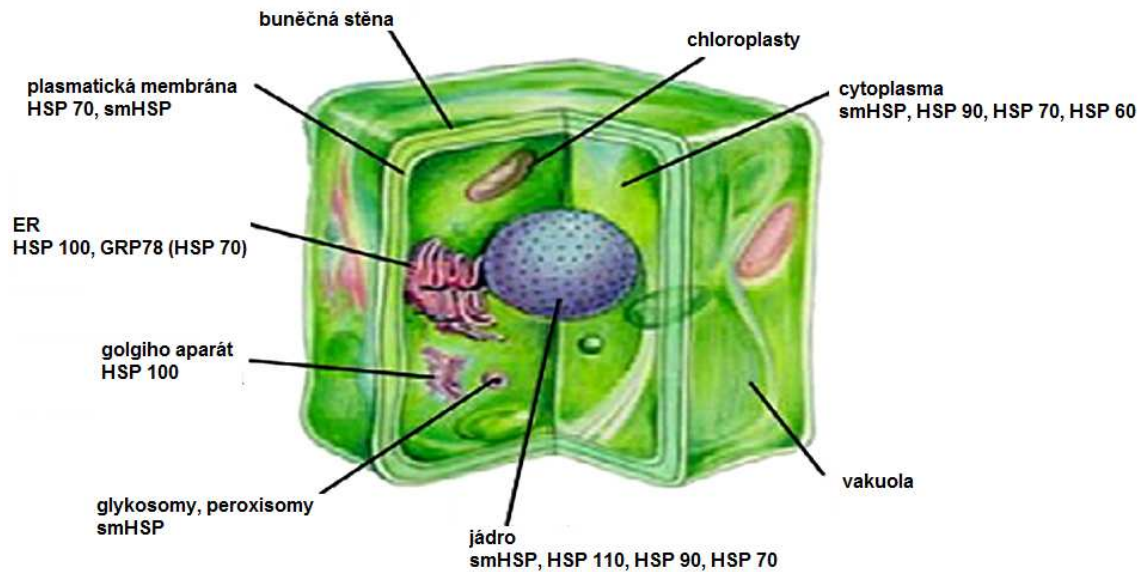
4.3.2.2 Rozdělení HSP

HSP se vyskytují ve všech organismech od bakterií, kvasinek, rostlin až po člověka. HSP mohou mít různé formy a jsou rozděleny do několika rodin na základě molekulové hmotnosti (Wang *et al.*, 2004).

Tab. 1

Rozdělení HSP na základě molekulové hmotnosti, jejich lokalizace a funkce u savců (Kregel, 2002).

HSP rodina	buněčná lokalizace	funkce
HSP 27 (smHSP)	cytosol, jádro	stabilizace mikrofilament, antiapoptóza
HSP 60	mitochondrie	znovuskládání proteinů, prevence agregace denaturovaných proteinů, proapoptóza
HSP 70		antiapoptóza
- HSP 72 (Hsp 70)	cytosol, jádro	skládání proteinů, cytoprotekce
- HSP 73 (Hsc 70)	cytosol, jádro	molekulární chaperony
- HSP 75 (MHsp 70)	mitochondrie	molekulární chaperony
- HSP 78 (GRP 78)	ER	molekulární chaperony, cytoprotekce
HSP 90	cytosol, ER, jádro	regulace receptorů steroidních hormonů, translokace proteinů
HSP 110/104	cytosol	skládání proteinů



Obr. 16

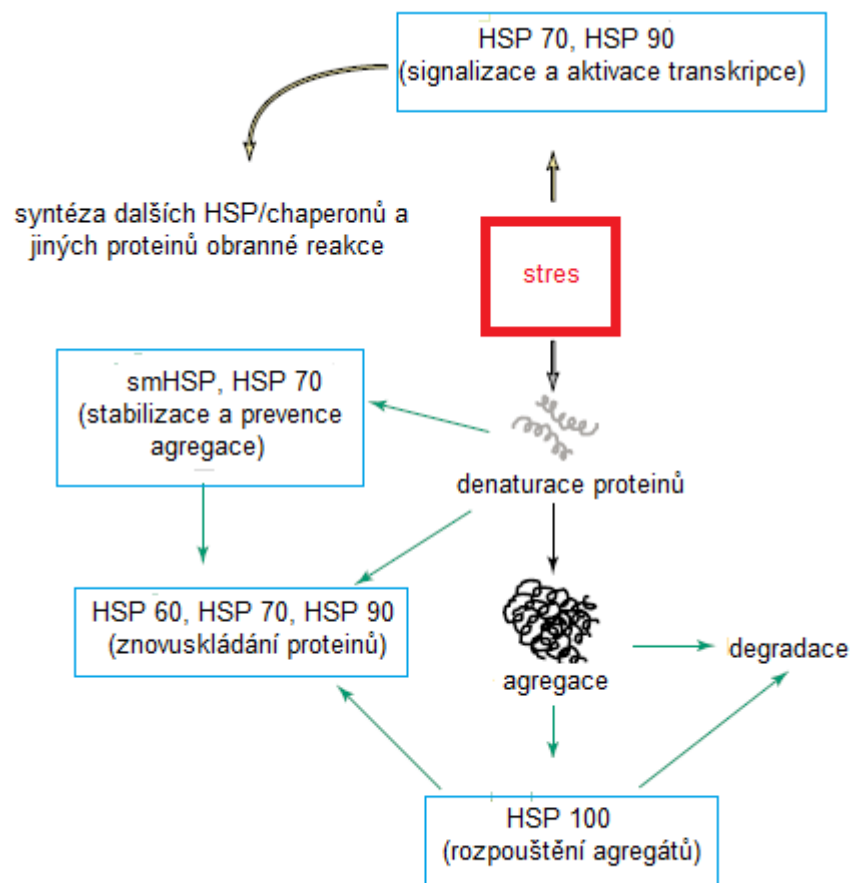
Lokalizace HSP v rostlinné buňce (Timperio *et al.*, 2008).

4.3.2.3 Funkce HSP

Při stresu je negativně ovlivněna struktura a funkce některých enzymů a strukturních proteinů. Různé třídy HSP/chaperonů spolupracují při ochraně buněčných proteinů proti stresu udržováním proteinů v jejich funkční konformaci a odstraněním nefunkčních ale potenciálně škodlivých polypeptidů. Někdy se jejich role při ochraně proteinů překrývají (Wang *et al.*, 2004).

In vivo bylo prokázáno, že se smHSP váží na poškozené proteiny, brání jejich agregaci a tím zajistí snadný přístup HSP 70 a HSP 100 pro následné znovusložení proteinů do správné konformace (Sun *et al.*, 2002).

HSP 100 hrají důležitou roli při rozpouštění proteinových agregátů. Rozpuštěné proteiny jsou pak následně skládány do správné konformace díky HSP 70. Získávání funkční konformace proteinů může být doplněna členy rodiny HSP 60 (GroEL - GroES) (Wang *et al.*, 2004).



Obr. 17

Vzájemná spolupráce různých HSP při stresu. Některé HSP (např. smHSP a HSP 70) stabilizují konformaci proteinu, brání agregaci a udržují protein v příslušném stavu pro jeho znovusložení jinými HSP (např. HSP 60, HSP 70 a HSP 90). Když poškozené proteiny agregují, jsou rozpouštěny za účasti HSP 100 a následně skládány do funkční konformace nebo jsou degradovány proteasou. Některé HSP (např. HSP 70 a HSP 90) doprovázejí transdukci signálu, dochází k aktivaci transkripce a syntéze dalších HSP/chaperonů a jiných proteinů obranné reakce (např. antioxidantů) (Wang *et al.*, 2004).

4.3.2.4 smHSP

SmHSP mají nízkou molekulovou hmotnost (12-40 kDa) a tvoří rozmanitou rodinu HSP/chaperonů. SmHSP jsou syntetizovány ve všech prokaryotních a eukaryotních buňkách v různých fázích vývoje nebo jako reakce na stres (Sun *et al.*, 2002).

SmHSP nejsou sami schopné skládat proteiny do jejich funkční konformace, ale mají vysokou schopnost vázat nesložené proteiny přes hydrofobní interakce, stabilizovat je

a zabránit jejich agregaci, čímž usnadní jejich znovusložení ATP-dependentními chaperony (Sun *et al.*, 2002).

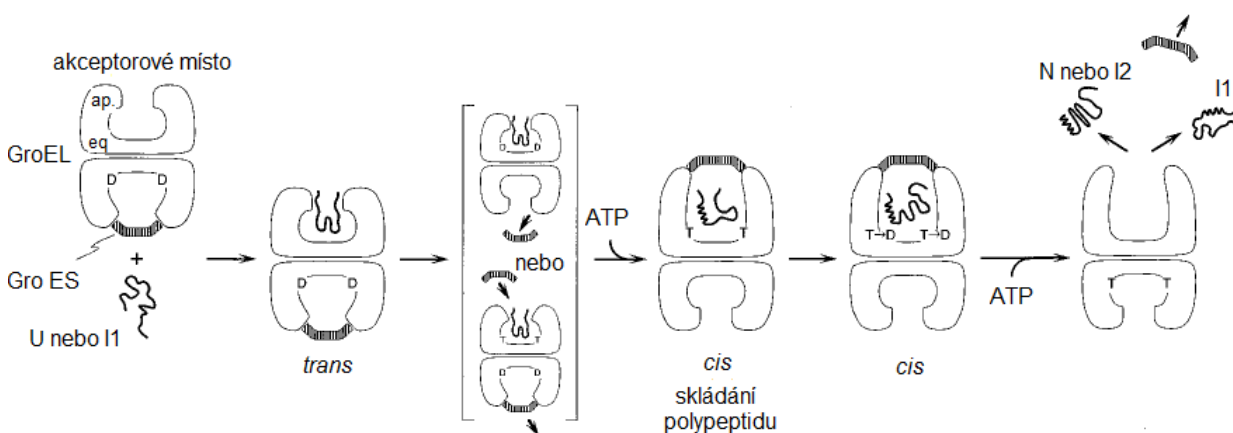
Z pěti hlavních HSP rodin jsou v rostlinách smHSP nejvíce zastoupeny. Dělí se do šesti tříd na základě intracelulární lokalizace a sekvenční podobnosti (Waters *et al.*, 1996). Vysoká rozmanitost smHSP u rostlin odráží molekulární adaptaci na stresové podmínky, která je pro rostliny jedinečná (Sun *et al.*, 2002).

4.3.2.5 HSP 60

Chaperoniny (HSP 60) jsou molekulární chaperony, které se nachází v prokaryotních buňkách a v plastidech a mitochondriích eukaryotních buněk (Bukau & Horwich, 1998).

Hlavní skupinu tvoří chaperonin GroEL, který se vyskytuje v cytoplazmě eubakterií a ekvivalentní Hsp 60 v mitochondriích a plastidech eukaryotních buněk. Chaperoniny se dále dělí na dvě podčeledi. První skupinu tvoří GroE, které se nacházejí u bakterií, v mitochondriích a chloroplastech. Do druhé skupiny patří CCT chaperoniny vyskytující se v *Archea* a v cytosolu eukaryot (Bukau & Horwich, 1998).

Chaperoniny hrají klíčovou roli při tvorbě nativní formy proteinů při jejich translokaci nebo syntéze *de novo* (Bukau & Horwich, 1998).



Obr. 18

Asymetrický GroEL-GroES komplex v *trans* konformaci (ap.-apikální doména, eq.-ekvatoriální doména) váže nesložené polypeptidy (U) nebo kineticky zachycené složené meziproducty (I1). Komplex je vysoce dynamický. Vazbou ATP na GroES doménu vzniká *cis* konformace. Hlavní konformační změny probíhají na GroEL doméně. Dochází k uvolnění polypeptidu z apikálního místa a jeho skládání. Hydrolyza ATP oslabuje GroEL-GroES interakci a GroES se připravuje na uvolnění polypeptidu.

Vazba ATP umožňuje polypeptid vychýlit. Uvolněný polypeptid je nativní (N), částečně složený (I2) nebo se jedná o kineticky zachycený složený meziprodukt (I1), který se může vázat do stejného nebo jiného GroEL-GroES komplexu a podstoupit další skládání. V komplexech D = ADP, T = ATP, T-D = hydrolyza ATP (Bukau & Horwich, 1998).

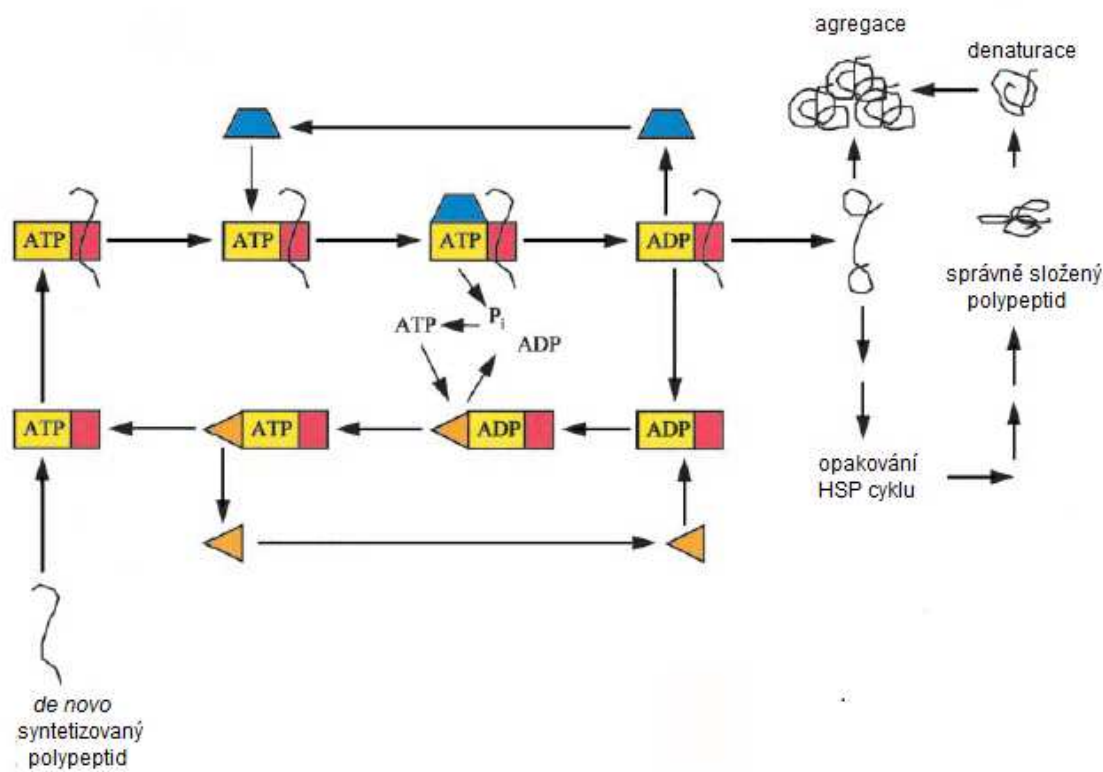
4.3.2.6 HSP 70

Základní funkcí HSP 70/chaperonů a jejich kochaperonů (DnaJ/Hsp40 a GrpE) je prevence agregace a pomoc při znovuskládání proteinů v normálních a stresových stavech. Podílejí se také na transportu proteinů, při translokačních procesech a při degradaci nestabilních proteinů, které směřují do lysosomů nebo proteasomů (Zhang & Glaser, 2002).

Některé HSP 70 jsou označovány jako Hsc 70, které napomáhají skládání *de novo* syntetizovaných polypeptidů a podílejí se na importu a translokaci prekursorových proteinů. Ostatní členové rodiny HSP 70 jsou exprimovány v případě, že je organismus vystaven stresovým podmínkám. Navíc některé HSP 70 působí jako represory transkripčního faktoru Hsf (Bukau & Horwich, 1998). V mitochondriích HSP 70 fungují jako molekulární motor při importu proteinů. 97% proteinů transportovaných do mitochondrií má vazebné místo pro HSP 70. Podobnou funkci mají HSP 70 také při importu chloroplastových proteinů. 82,5% proteinů transportovaných do chloroplastů obsahuje HSP 70 vazebné místo (Zhang & Glaser, 2002).

Struktura HSP 70 se skládá z vysoce konzervované N-terminální ATPasové domény (42 kDa) a C-terminální domény s vazebným místem pro polypeptid (25kDa) (Miernyk & Hayman, 1996).

Konkrétní role HSP 70 jsou pravděpodobně dány jejich buněčnou lokalizací, diferenciální expresí v různých fázích vývoje (Miernyk , 1999) nebo interakcí se specifickými HSP 70 asociovanými proteiny (May & Soll, 2000).



Obr. 19

Schématické znázornění cyklu HSP 70. N-terminální doména ATPasy (žlutě), C-terminální doména (červeně). Nově syntetizovaný polypeptid se váže na C-terminální doménu HSP 70. Tento binární komplex je rozpoznán chaperonovým aktivačním proteinem (modře), který stimuluje hydrolýzu ATP. HSP 70 má po hydrolýze ATP nízkou afinitu k polypeptidu a je z HSP 70 uvolněn. Na HSP 70 se potom váže nukleotidový výměnný faktor (oranžový trojúhelník), který podporuje záměnu ADP za ATP a HSP 70 je připraven k dalšímu cyklu. Pokud je polypeptid špatně složen nebo podlehl denaturaci a agregaci vstupuje do dalších HSP cyklů (Miernyk , 1999).

4.3.2.7 HSP 90

HSP 90 hrají významnou úlohu při správném skládání proteinů, ale také v signální kaskádě, řízení buněčného cyklu a degradaci proteinů. Slouží také jako regulátory receptorů steroidních hormonů (Sangster & Queitsch, 2005).

HSP 90 tvoří 1-2% všech buněčných proteinů. Je známo téměř 100 proteinů, které řídí činnost HSP 90. HSP 90 mají ATPasovou doménu a hydrolýza ATP způsobuje konformační změny HSP 90, které jsou nutné pro změnu konformace proteinového substrátu. Ve steroidních hormonech vyvolávají konformační změny HSP 90 odkrytí

steroidního vazebného místa. HSP 90 mohou tvořit heterokomplexy s dalšími proteiny a regulují také některé proteinkinasy a transkripční faktory (Pratt & Toft, 2003).

4.3.2.8 HSP 100

HSP 100 se vyskytují ve všech organismech. Existují dvě hlavní podtřídy HSP 100. Členové první třídy mají dvě ATP-vazebná místa a členové druhé třídy pouze jedno ATP-vazebné místo (Agarwal *et al.*, 2002).

HSP 100 byly intenzivně studovány jako podjednotky ATP-dependentní kaseinproteasy (CLP). CLP se skládá ze 2 podjednotek: ClpP je skutečná proteasa a Clp chaperonové podjednotky určující cílovou specifitu (Boston *et al.*, 1996). HSP 100 využívají hydrolýzy ATP ke konformačním změnám při skládání proteinů. V rostlinných buňkách jsou HSP 100 lokalizovány v cytoplasmě nebo v organelách (mitochondrie a plastidy) (Agarwal *et al.*, 2002).

HSP 100 jsou exprimovány v průběhu vývoje nebo působením stresových podmínek jako je teplo, chlad, vysoký obsah solí, těžké kovy,...) (Agarwal *et al.*, 2002).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Materiál a metody

5.1 Chemikálie

Akrylamid (Sigma, USA), bisakrylamid (Sigma, USA), bromfenolová modř (Lachema, ČR), butylovaný hydroxytoluen (Sigma, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR), ethanol (Lach-Ner, ČR), Evansova modř (Fluka, Švýcarsko), fosforečnan draselný (Lachema, ČR), glycerol (Sigma, USA), glycin (Sigma, USA), guajakol (Sigma, USA), chlorid hořečnatý (Lachema, ČR), chlorid sodný (Lach-Ner, ČR), kumenhydroperoxid (Acros Organics, Belgie), kyselina sírová (Lach-Ner, ČR), merkaptoethanol (Sigma, USA), methanol (Sigma, USA), NBT-BCIP (Sigma, USA), monoklonální Anti-HSP 70 Ab produkovaná v myších (Sigma, USA), načástice stříbra (Katedra fyzikální chemie UP v Olomouci), *n*-butanol (Lach-Ner, ČR), peroxid vodíku (Lach-Ner, ČR), persíran amonný (Fluka, Švýcarsko), SDS (Sigma, USA), protilátka proti myším Ab produkovaná imunizací kozy značená alkalickou fosfatase (Anti-mouse IgG) (Sigma, USA), síran amono-železnatý (Sigma, USA), standard HSP 70 (Sigma, USA), dusičnan stříbrný (Katedra fyzikální chemie UP v Olomouci), TEMED (Fluka, Švýcarsko), TRIS (MP Biomedicals, Francie), TRITON-X 100 (Sigma, USA), Tween 20 (Sigma, USA), xylenová oranž (Acros Organics, Belgie), želatina (Sigma, USA)

5.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy, Sartorius, Německo

Automatické pipety, Eppendorf, Německo

Digitální pH metr WTW 526, inoLab, Německo

Digitální předvážky, Kern, Německo

Elektrický zdroj POWER PAC 300, BioRad, USA

Chladicí box, Fnoice, UK

Chlazená centrifuga 5415R, Eppendorf, Německo

Inkubátor INCUBAT, Melag, Německo

Inkubační lázeň, Major Science, Taiwan

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT, Bio-Tek, USA

Minitřepačka IKA M53 basic Vibrax, Brazílie

Třepačka IKA VXR basic Vibrax, Brazílie

5.3 Rostlinný materiál, patogen

Pro experimenty byly vybrány tři genotypy *Solanum* spp. lišící se rozdílným stupněm rezistence k biotrofnímu patogenu *O. neolycopersici*:

S. lycopersicum cv. Amateur - vysoce náchylný

S. chmielewskii - středně rezistentní

S. habrochaites - vysoce rezistentní

Semena *Solanum* spp. byla vyseta do perlitu a po plném vyvinutí děložních listů byly rostliny přemístěny do plastových květináčů se zahradnickým substrátem. Pro experimenty byly použity rostliny stáří cca 8-12 týdnů. Rostliny byly poskytnuty Katedrou botaniky Univerzity Palackého v Olomouci.

Pro experimenty byl použit patogen padlí rajčatové *O. neolycopersici* získaný z rajčete (cv. Lucy) ze skleníku Státní rostlinářské správy v Olomouci. Patogen byl udržován na 2-3 měsíce starých rostlinách vysoce náchylného genotypu rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateurum, které byly pěstovány pod igelitovými kryty, aby bylo zabráněno šíření konidií patogena. Tyto rostliny byly umístěny ve fytotronu při teplotě 20°C se světelným režimem 12/12h (den/noc). Padlí bylo ve dvoutýdenních intervalech přeinokulováno na nové zdravé rostliny.

5.3.1 Příprava rostlinného materiálu

Experimenty byly realizovány na listových discích. Na dno Petriho misek byly umístěny 3 vrstvy buničiny a 1 kolečko filtračního papíru. Do každé Petriho misky bylo napipetováno 10 ml destilované vody nebo 10 ml testované látky (5 mg/l nebo 50 mg/l nano-Ag a 5 mg/l nebo 50 mg/l iontového stříbra). Z listů rostlin byly korkovrtem vyříznuty disky o průměru 12 mm a do každé Petriho misky bylo vloženo 16 disků.

Inokulace listových disků byla prováděna metodou otisku infikovanými listy *S. lycopersicum* cv. Amateur, které byly z 80-100% pokryty čerstvým sporulujícím myceliem. Kontrolní a infikované disky byly kultivovány ve fytotronu při teplotě 20°C a fotoperiodě 12/12h (den/noc). Vzorky byly odebírány ve zvolených časových intervalech po inokulaci (24; 48 a 72 hpi).

5.4 Metody

5.4.1 Příprava rostlinných extraktů pro detekci HSP 70

Extrakce byla realizována ve třecích miskách chlazených ledem. Pro přípravu rostlinných extraktů byl použit R roztok v poměru 1:2 (w/v) (rostlinný materiál : R roztok) o složení: 1 díl 0,1 M TRIS HCl pH 7, 1 díl vzorkovacího pufru pro SDS elektroforézu a 1 díl 10% (w/v) SDS. Vzorkovací pufr pro SDS elektroforézu byl připravován z 0,125 M TRIS HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerolu, 5% (v/v) mekaptoethanolu a 0,02% (w/v) bromfenolové modři.

Extrakt byl cetrifugován 10 min při 16 000 g při teplotě 4°C. Supernatant byl odebrán a zamražen při -80°C. Před vlastní aplikací do jamky byly extrakty po rozmražení 10 min inkubovány při 100°C a poté byly centrifugovány 5 min při 16 000 g při teplotě 4°C.

5.4.2 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení lipidické peroxidace

Extrakce byla prováděna ve třecích miskách chlazených ledem. K rostlinnému materiálu byl přidáván extrakční pufr v poměru 1:2 (w/v) (rostlinný materiál : pufr) o složení: 0,1 M K-fosfátový pufr pH 7, 1% (v/v) TRITON-X 100 a 0,01% (w/v) butylovaný hydroxytoluen.

Extrakt byl centrifugován 20 min při 16 000 g při teplotě 4°C. Supernatant byl poté odebrán a zamražen při -80°C.

5.4.3 Příprava rostlinných extraktů pro stanovení peroxidasové aktivity

Extrakce byla realizována ve třecích miskách chlazených ledem. Pro přípravu rostlinných extraktů byl použit 0,1 M TRIS HCl, pH 7 v poměru 1:2 (w/v) (rostlinný materiál : pufr).

Extrakt byl centrifugován 10 min při 16 000 g při teplotě 4°C. Supernatant byl poté odebrán a zamražen při -80°C.

5.4.4 Mikroskopické hodnocení vývoje patogenu *O. neolycopersici*

Odběry disků z Petriho misek byly prováděny v čase 24, 48 a 72 hpi. Vždy 4 disky byly na 48 h vloženy do vialky s ledovou kyselinou octovou pro odbarvení chlorofylu a zastavení vývoje patogena. Pak byly disky uchovávány ve vialkách s glycerolem.

Listové disky byly obarvené 0,1% Evansovou modří a vlastní vývoj patogenu byl pozorován pomocí světelného mikroskopu s vestavěným měřítkem. Byla stanovena délka jednotlivých klíčnicích vláken patogenu a zastoupení konidií s jedním, dvěma nebo třemi klíčnicími vlákny. Pro každou variantu experimentu byl vyhodnocen vývoj patogenu na 4 listových discích a na každém disku bylo proměřeno 50 konidií.

5.4.5 Detekce buněčné smrti

Z Petriho misek byly odebírány vždy 4 listové disky v čase 24, 48 a 72 hpi. Disky byly inkubovány 15 min s 0,05% Evansovou modří při laboratorní teplotě. Poté byly listové disky důkladně promyty destilovanou vodou a inkubovány 30 min při 50°C v 50% methanolu s 1% SDS. Do jamky mikrodestičky bylo napipetováno 200 µl tohoto roztoku a byla proměřena absorbance při 600 nm.

5.4.6 Stanovení peroxidasové aktivity

Peroxidasová aktivita byla stanovena spektrofotometricky modifikovanou metodou s guajakolem. Po oxidaci guajakolu vzniká žlutohnědý tetraguajakolchinon (Koduri & Tien, 1995).

Do jamky mikrodestičky bylo napipetováno 100 µl 0,1 M K-fosfátového pufru pH 6, 40 µl 50 mM guajakolu, 100 µl vzorku naředěného 0,1 M TRIS HCl pH7 v poměru 1:9 (extrakt:pufr). Reakce byla startována 50 µl 10 mM peroxidu vodíku. Byl měřen nárůst absorbance při 436 nm po 1 min při 30°C. Stanovení bylo prováděno v duplikátu.

5.4.7 Stanovení lipidické peroxidace

Primární produkty lipidické peroxidace byly stanovovány spektrofotometricky metodou FOX2 na základě jejich interakce s přebytkem železnatých iontů v kyselém prostředí v přítomnosti xylenové oranže (Griffiths *et al.*, 2000).

Zkumavky s 20 µl vzorku a 5 µl methanolu byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Do zkumavek bylo napipetováno 200 µl roztoku FOX2, který byl připraven smícháním činidla A a činidla B v poměru 1:9. Činidlo A obsahovalo 250 mM kyselinu sírovou, 1 mM xylenovou oranž a 2,5 mM síran amono-železnatý a činidlo B 4,4 mM BHT v methanolu. Zkumavky byly inkubovány dalších 30 min při laboratorní teplotě a poté byly centrifugovány 5 min při 15 000 g při pokojové teplotě. Do jamky mikrodestičky bylo pipetováno 80 µl supernatantu ve dvojnásobném opakování a absorbance

byla měřena při 560 nm. Pro stanovení kalibrační křivky byly použity roztoky kumenhydroperoxidu o koncentracích 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150 μ M.

5.4.8 Stanovení produkce HSP 70

Pro detekci HSP 70 byla použita metoda Western blot. Nejprve byly proteiny rozděleny SDS elektroforézou na 7% dělicím a 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu. Pro přípravu dělicího gelu byl použit 1,5 M TRIS HCl pH 8,8 a pro přípravu zaostřovacího gelu 0,5 M TRIS HCl pH 6,8. Elektrodový pufr pH 8,3 obsahoval 0,025 M TRIS, 0,192 M glycin a 0,1% SDS. Při difundování proteinů přes zaostřovací gel bylo zvoleno napětí 120 V a po přechodu proteinů do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Proteiny byly z polyakrylamidového gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu blotováním, které probíhalo 2 hodiny. Blotovací pufr pH 8,3 obsahoval 0,025 M TRIS, 0,192 M glycin a 20% (v/v) methanol. Potom byla membrána přes noc inkubována v 3% želatíně v TBS, aby došlo k blokaci nespecifických vazebných míst na membráně. Pro přípravu TBS pH 7,5 byl použit 0,02 M TRIS a 0,5 M chlorid sodný. Další den byla membrána inkubována 2 hodiny s primární monoklonální myší protilátkou anti-HSP 70 v 1% želatíně v TBS. Poté byla promyta v roztoku Tweenu 20 v TBS a inkubována další 2 hodiny se sekundární myší protilátkou IgG konjugovanou s alkalickou fosfátasou v 1% želatíně v TBS. Po promytí roztokem Tweenu 20 v TBS byla provedena vizualizace chromogenním roztokem NBT-BCIP, která trvala cca 10 min. Pufr pro vizualizaci obsahoval 0,1 M TRIS, 0,1 M chlorid sodný a 0,005 M chlorid hořečnatý. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programu UVP pro analýzu a zpracování programu.

6. Výsledky

6.1 Porovnání vývoje patogena *O. neolycopersici* a reakce rostlin *Solanum* spp. na infekci

V první části experimentální práce byl studován vývoj patogena *O. neolycopersici* a reakce rostlin na infekci u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rozdílným stupněm rezistence vzhledem k *O. neolycopersici*. Vývoj patogena *O. neolycopersici* byl vyhodnocen na základě mikroskopického stanovení délky klíčnicích vláken *O. neolycopersici* a zastoupení konidií s jedním, dvěma, třemi a více klíčními vlákny.

Pro charakterizaci reakce vybraných genotypů *Solanum* spp. na infekci patogenem *O. neolycopersici* byla stanovena intenzita buněčné smrti, hladina primárních produktů lipidické peroxidace, změny v peroxidasové aktivitě a produkci HSP 70.

6.1.1 Porovnání vývoje patogena *O. neolycopersici* u rozdílných genotypů *Solanum* spp.

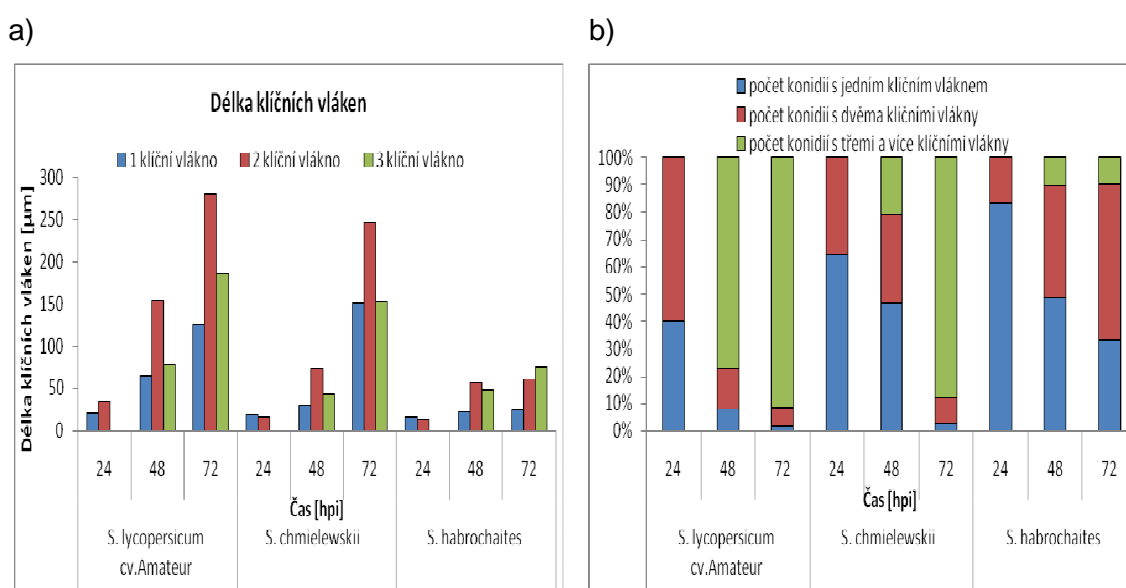
Pro vyhodnocení vývoje patogena byl použit světelný mikroskop s vestavěným měřítkem. Odběry listových disků pro stanovení délky klíčnicích vláken a procentuálního zastoupení patogenních struktur byly prováděny v časech 24, 48 a 72 h po inokulaci (hpi).

K nejrychlejšímu růstu klíčnicích vláken patogena *O. neolycopersici* docházelo u vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. V případě středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* byl pozorován v čase 48 hpi významně pomalejší vývoj patogena v porovnání s vývojem citlivého genotypu *S. lycopersicum*. 72 hpi růst patogena na obou hostitelských rostlinách *S. lycopersicum* i *S. chmielewskii* byl srovnatelný. Naopak u vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl vývoj klíčnicích vláken výrazně potlačen a to i v čase 72 hpi (Graf 1a).

Výsledky procentuálního zastoupení patogenních struktur korelují s vyhodnocením délek klíčnicích vláken patogena po inokulaci na testovaných genotypech *Solanum* spp.. V čase 24 hpi byly detekovány pouze konidie s jedním nebo dvěma klíčními vlákny. U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur převažuje zastoupení konidií s dvěma klíčními vlákny. Naopak u vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* je zastoupení konidií s jedním klíčním vláknem více než 80%. V čase 48 a 72 hpi dochází u genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur k markantnímu nárůstu počtu konidií se třemi klíčními vlákny. Zastoupení konidií se třemi klíčními vlákny je v

čase 48 hpi cca 75% a v čase 72 hpi dokonce 95%. U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* sledujeme podobný nárůst zastoupení konidií s třemi klíčními vlákny až v čase 72 hpi (cca 90%). U vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* převažují konidie s jedním nebo dvěma klíčními vlákny v čase 48 i 72 hpi. V čase 72 hpi dosahuje zastoupení konidií se třemi klíčními vlákny pouze 10 % (Graf 1b).

Patogen *O. neolycopersici* se nejrychleji vyvíjí na listových discích rostlin vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* lze pozorovat v průběhu prvních 48 hpi zpomalení vývoje v porovnání s vývojem na citlivém genotypu. U vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* je vývoj patogena *O. neolycopersici* jednoznačně potlačen.



Graf 1

Délka klíčních vláken (a) a procentuální zastoupení patogenních struktur (b) patogena *O. neolycopersici* na listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* v čase 24, 48 a 72 hpi.

6.1.2 Reakce rostlin *Solanum* spp. na infekci patogenem *O. neolycopersici*

Pro studium reakce rostlin *Solanum* spp. na infekci patogenem *O. neolycopersici* byly rostlinné disky připravené ve dvou sadách. Kontrolní disky bez patogenního organismu a infikované disky, které byly inokulovány patogenem *O. neolycopersici*. Odběry disků byly prováděny v časech 24, 48, 72 h. Vzhledem k tomu, že byl experiment realizován na listových discích, docházelo ke kombinaci patogenního a mechanického stresu. Působení stresových faktorů může u rostlin vyvolat oxidační

stres, který je charakterizován prudkým nárůstem ROS. ROS nejsou pouze toxické produkty, ale vystupují také jako signální molekuly kontrolující obranné procesy rostlinného organismu. ROS hrají důležitou roli ve vyvolání buněčné smrti tzv. hypersenzitivní reakce (HR) v rámci obranných procesů v průběhu patogeneze (Nanda *et al.*, 2010).

Mechanický stres v čase 24 h neměl významně rozdílný vliv na buněčnou smrt u testovaných tří genotypů *Solanum* spp.. V čase 48 a 72 h docházelo k nepatrnému zvýšení buněčné smrti, způsobené mechanickým stresem, avšak nebyl pozorován příliš velký rozdíl mezi genotypy. Pokud byly listové disky infikované patogenem *O. neolycopersici* docházelo k výraznému postupnému nárůstu buněčné smrti u vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*, avšak zde nebyl nárůst tak razantní jako v případě *S. lycopersicum* cv. Amateur. U vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl detekován pouze velmi malý nárůst buněčné smrti po inokulaci patogenem (Graf 2a).

ROS mají přímý toxický účinek na patogenní organismus a podílejí se na strukturálním zesílení rostlinné buněčné stěny. V nadměrných koncentracích však mohou být ROS pro buňku toxické. Ochranu před oxidačním poškozením organismu zajišťuje řada antioxidantních obranných systémů. Do katabolismu peroxidu vodíku je zapojena katalasa a peroxidasy (POX) (Tommasi *et al.*, 2001).

Mechanický stres, ke kterému dochází při přípravě listových disků, vyvolal postupné zvýšení peroxidasové aktivity u všech tří genotypů. Intenzita změny peroxidasové aktivity byla nejnižší u citlivého genotypu. V čase 72 h nejvýraznější zvýšení peroxidasové aktivity bylo zaznamenáno u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* a to, jak u kontrolních disků, tak i u disků inokulovaných patogenem. V případě infikovaných disků byl detekován 72 hpi větší nárůst POX aktivity u *S. lycopersicum* a *S. chmielewskii* v porovnání s kontrolními neinfikovanými disky, pouze v případě *S. habrochaites* byl zaznamenán nižší nárůst POX aktivity. Vliv patogeneze na změnu POX aktivity v případě diskového uspořádání experimentu není příliš výrazný (Graf 2b).

ROS indukující buněčnou smrt způsobují oxidační procesy, jako je peroxidace membránových lipidů, oxidace proteinů, inhibice enzymů, poškození DNA a RNA. Nevratné poškození membrán úzce souvisí s jejich peroxidací (Mittler, 2002).

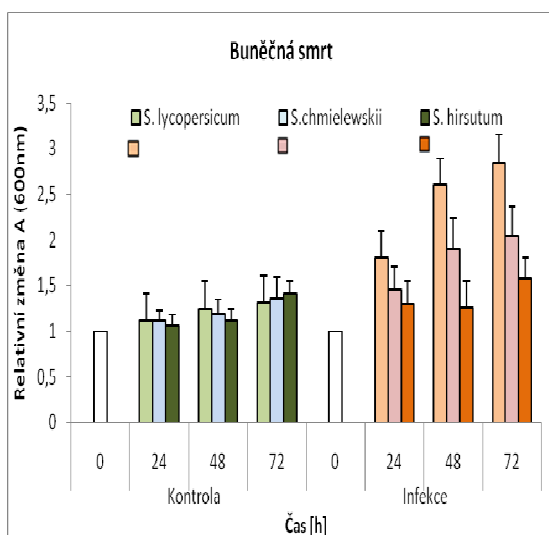
Vliv mechanického a patogenního stresu na lipidickou peroxidaci byl u všech tří genotypů obdobný jako v případě stanovení změn peroxidasové aktivity. Výrazné zvýšení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace způsobené mechanickým stresem i kombinací mechanického a patogenního stresu bylo zaznamenáno u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* a to především v čase

72 h. U genotypů *S. lycopersicum* cv. *Amateur* a *S. habrochaites* bylo zvýšení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace vyvolané pravděpodobně pouze mechanickým stresem. Po inokulaci patogenem nebyly zaznamenány významné změny v produkci primárních produktů lipidické peroxidace v porovnání s kontrolními vzorky vystavenými pouze mechanickému stresu (Graf 2c).

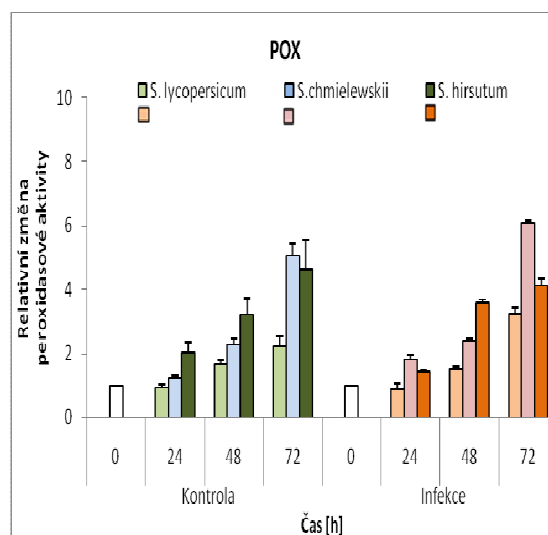
Stresové podmínky způsobují dysfunkci proteinů. Pro přežití buněk ve stresu je zvláště důležité udržovat proteiny v jejich funkční konformaci a zabránit hromadění nefunkčních proteinů. HSP/chaperony jsou zodpovědné za skládání proteinů, jejich translokaci a degradaci a hrají klíčovou roli při ochraně rostlin proti stresu tím, že obnovují normální proteinovou konformaci (Wang *et al.*, 2004).

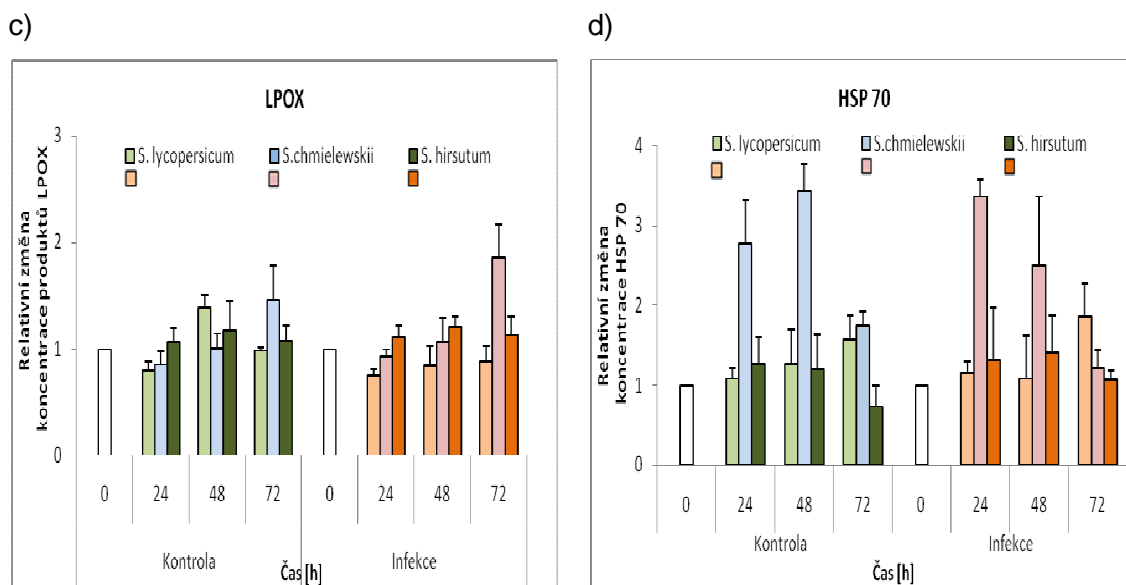
U všech tří genotypů byly zaznamenány změny v koncentraci HSP 70 v průběhu experimentu. K nejintenzivnějšímu zvýšení produkce HSP 70 docházelo u disků genotypu *S. chmielewskii*. Maximální zvýšení produkce HSP 70 u *S. chmielewskii* bylo detekováno 48 h po aplikaci mechanického stresu (příprava disků) a v případě kombinace mechanického a patogenního stresu bylo maximum zaznamenáno již 24 hpi. Pokles HSP 70 zpět na původní hodnotu byl detekován v čase 72 h u *S. chmielewskii* a *S. habrochaites*. Pouze u citlivého genotypu *S. lycopersicum* byl pozorován po dobu experimentu (0-72h) postupný nárůst koncentrace HSP 70 u kontrolních i infikovaných disků (Graf 2d).

a)



b)





Graf 2

Detekce buněčné smrti (a), peroxidase aktivity (b), stanovení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace (c) a HSP 70 (d) na infikovaných (po inokulaci patogenem *O. neolyopersici*) a kontrolních (bez patogenního organismu) listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* v čase 24, 48, 72 h a hpi. Změna hodnot testovaných parametrů (relativní změna) v průběhu experimentu je vztažena ke kontrolnímu vzorku (neinfikované čerstvě připravené disky daného genotypu *Solanum* spp. = 1).

6.2 Studium vlivu nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena

O. neolyopersici a reakci rostlin *Solanum* spp. na infekci

Vliv nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena a reakci rostlin na infekci byl studován u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rozdílným stupněm rezistence vzhledem k *O. neolyopersici*. K experimentům byl vybrán vysoce náchylný genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur, středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii* a vysoce rezistentní genotyp *S. habrochaites*.

6.2.1 Vliv nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena *O. neolyopersici*

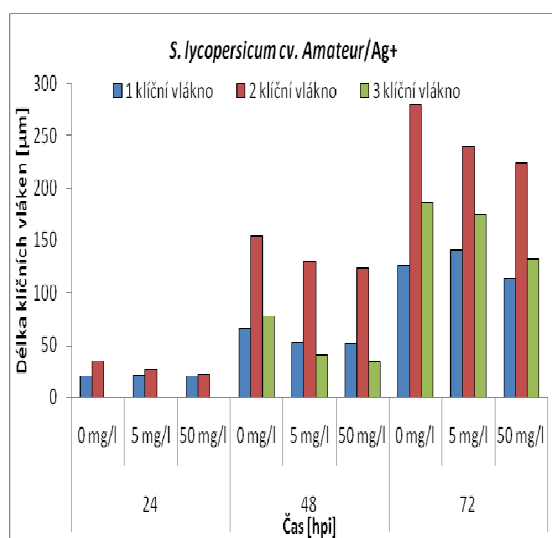
Ke studiu vlivu nano-Ag a iontového stříbra na vývoj patogena *O. neolyopersici* bylo použito mikroskopické vyhodnocení délky klíčnicích vláken *O. neolyopersici* a zastoupení konidií s jedním, dvěma, třemi a více klíčními vlákny.

U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. *Amateur* v čase 24, 48 a 72 hpi docházelo k inhibici růstu klíčních vláken působením iontového stříbra i nano-Ag. Pouze v přítomnosti nano-Ag o koncentraci 50 mg/l byl v čase 72 hpi pozorován mírný stimulační efekt na růst klíčních vláken (Graf 3a,b).

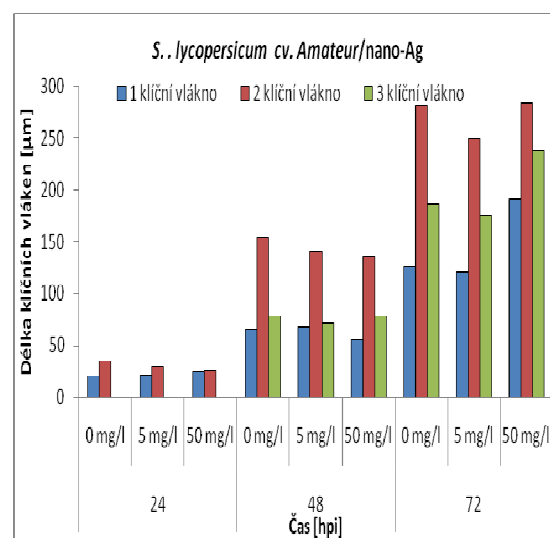
U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* bylo pozorováno v čase 48 hpi urychlení růstu klíčních vláken vlivem obou koncentrací iontového stříbra i nano-Ag. Při použití nano-Ag v koncentraci 50 mg/l není stimulace růstu příliš výrazná. V čase 72 hpi byla naopak zaznamenána inhibice růstu klíčních vláken působením stříbra ve formě nanočástic a iontů. Tato inhibice byla nejintenzivnější při aplikaci nano-Ag o koncentraci 5 mg/l (Graf 3c,d).

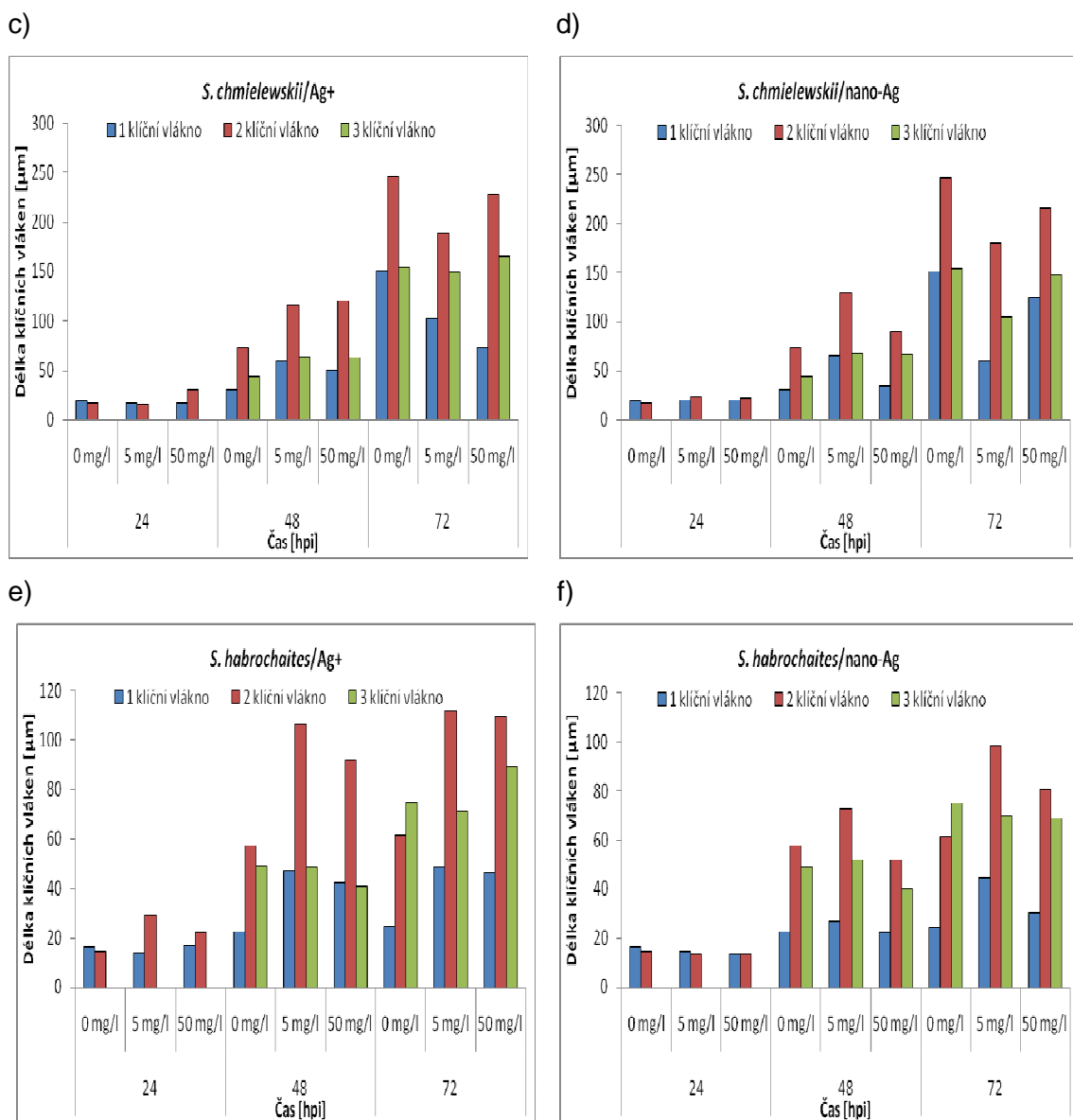
V čase 48 a 72 hpi byla detekována výrazná stimulace růstu klíčních vláken vlivem obou forem stříbra u vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites*. Nejintenzivnější stimulace vývoje patogena byla v čase 48 hpi po aplikaci iontového stříbra o koncentraci 5 mg/l. Podobně při aplikaci nano-Ag bylo pozorováno urychlení růstu klíčních vláken především u koncentrace 5 mg/l (Graf 3e,f).

a)



b)





Graf 3

Vliv nanočástic a iontového stříbra na délku klíčících vláken *O. neolycopersici* na listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* v čase 24, 48 a 72 hpi.

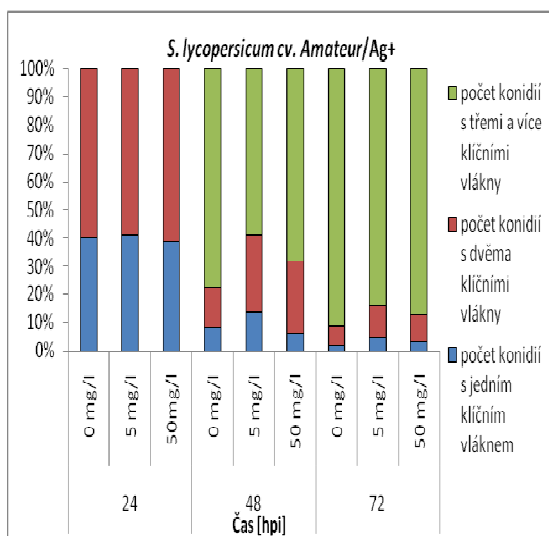
U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur v čase 24 hpi bylo detekováno snížení počtu konidií se dvěma klíčními vlákny pouze po aplikaci nano-Ag o koncentraci 50 mg/l. V čase 48 a 72 hpi byl snížený počet konidií se třemi klíčními vlákny zaznamenán po aplikaci iontového stříbra i nano-Ag (Graf 4a,b).

U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* vzrostl počet konidií se dvěma klíčními vlákny v čase 24 hpi vlivem iontového stříbra i nano-Ag. V čase 48 hpi byla zaznamenána výraznější stimulace vývoje patogena *O. neolycopersici* po aplikaci

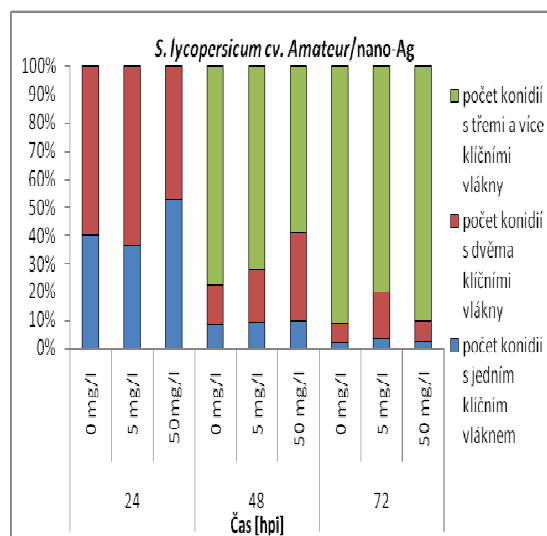
iontového stříbra. Při porovnání vlivu koncentrace byl vývoj více stimulován při koncentraci 5 mg/l nano-Ag a iontového stříbra. Naopak v čase 72 hpi je pozorováno nižší zastoupení konidií se třemi klíčovými vlákny po aplikaci nano-Ag a iontového stříbra v porovnání s kontrolními vzorky. 72 hpi byl zaznamenán inhibiční vliv iontového i nano-Ag na vývoj patogena (Graf 4c,d).

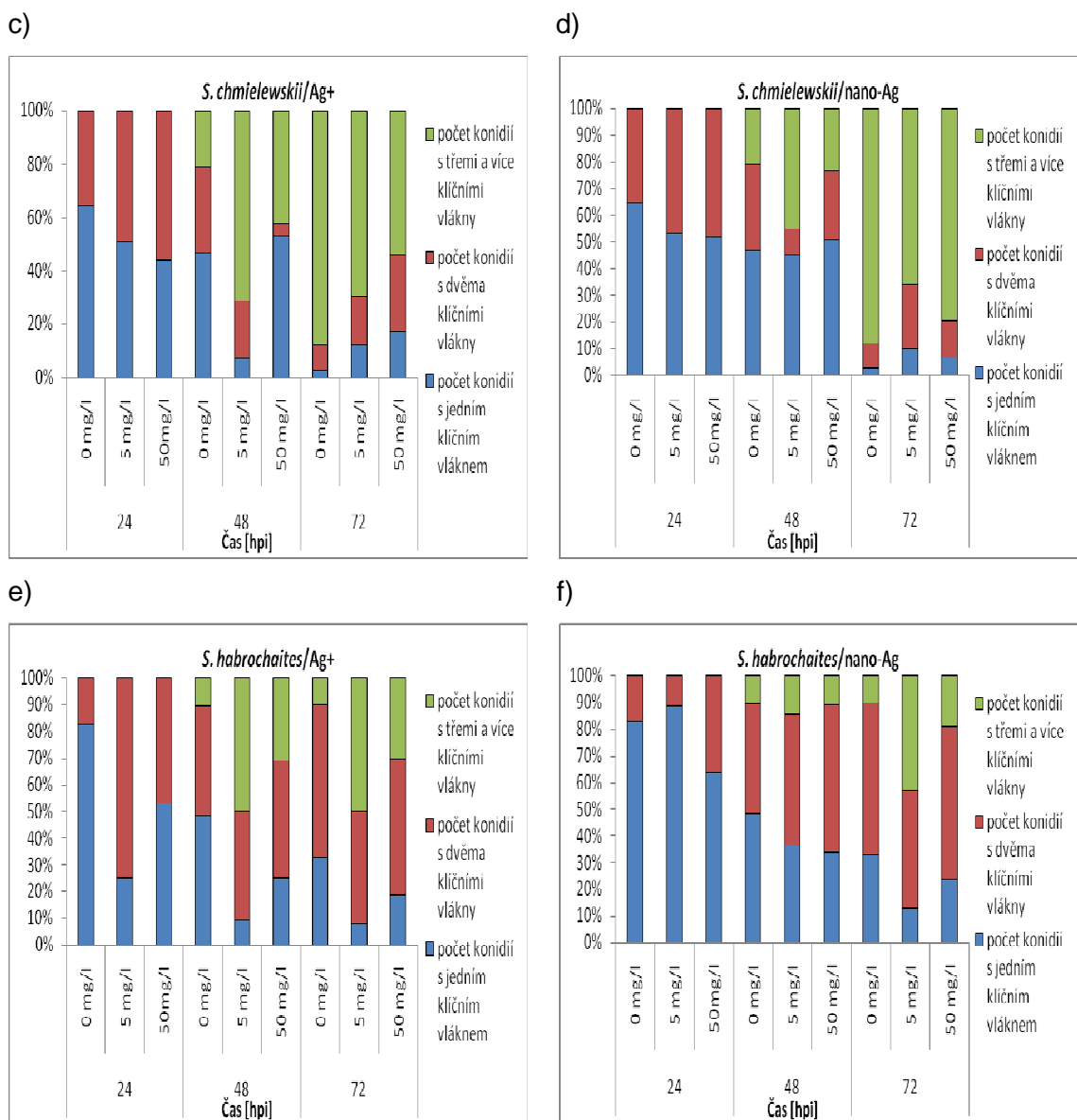
U vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* docházelo vlivem iontového stříbra v čase 24 hpi k nárůstu počtu konidií se dvěma klíčovými vlákny a to především po aplikaci iontového stříbra o koncentraci 5 mg/l. Stimulace vývoje patogenu *O. neolycoopersici* byla detekována také po použití nano-Ag, ale pouze o koncentraci 50 mg/l. Po aplikaci iontového stříbra byl v čase 48 a 72 hpi zaznamenán významný nárůst počtu konidií se třemi klíčovými vlákny, který byl intenzivnější při použití iontového stříbra o koncentraci 5 mg/l. V případě nano-Ag docházelo v čase 48 a 72 hpi také ke stimulaci vývoje patogenu *O. neolycoopersici*, která byla nejvýraznější v čase 72 hpi po aplikaci nano-Ag o koncentraci 5 mg/l (Graf 4e,f).

a)



b)





Graf 4

Vliv nanočástic a iontového stříbra na procentuální zastoupení patogenních struktur *O. neolycopersici* na listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur (a,b), *S. chmielewskii* (c,d) a *S. habrochaites* (e,f) v čase 24, 48 a 72 hpi.

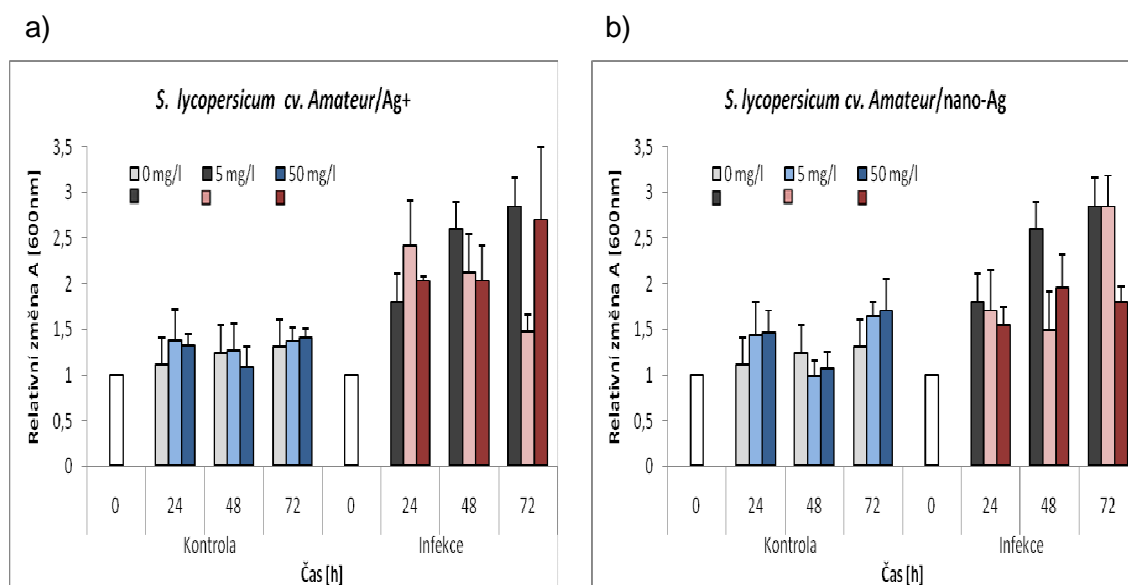
6.2.2 Vliv nanočástic a iontového stříbra na reakci rostlin *Solanum* spp. po infekci patogenem *O. neolycopersici*

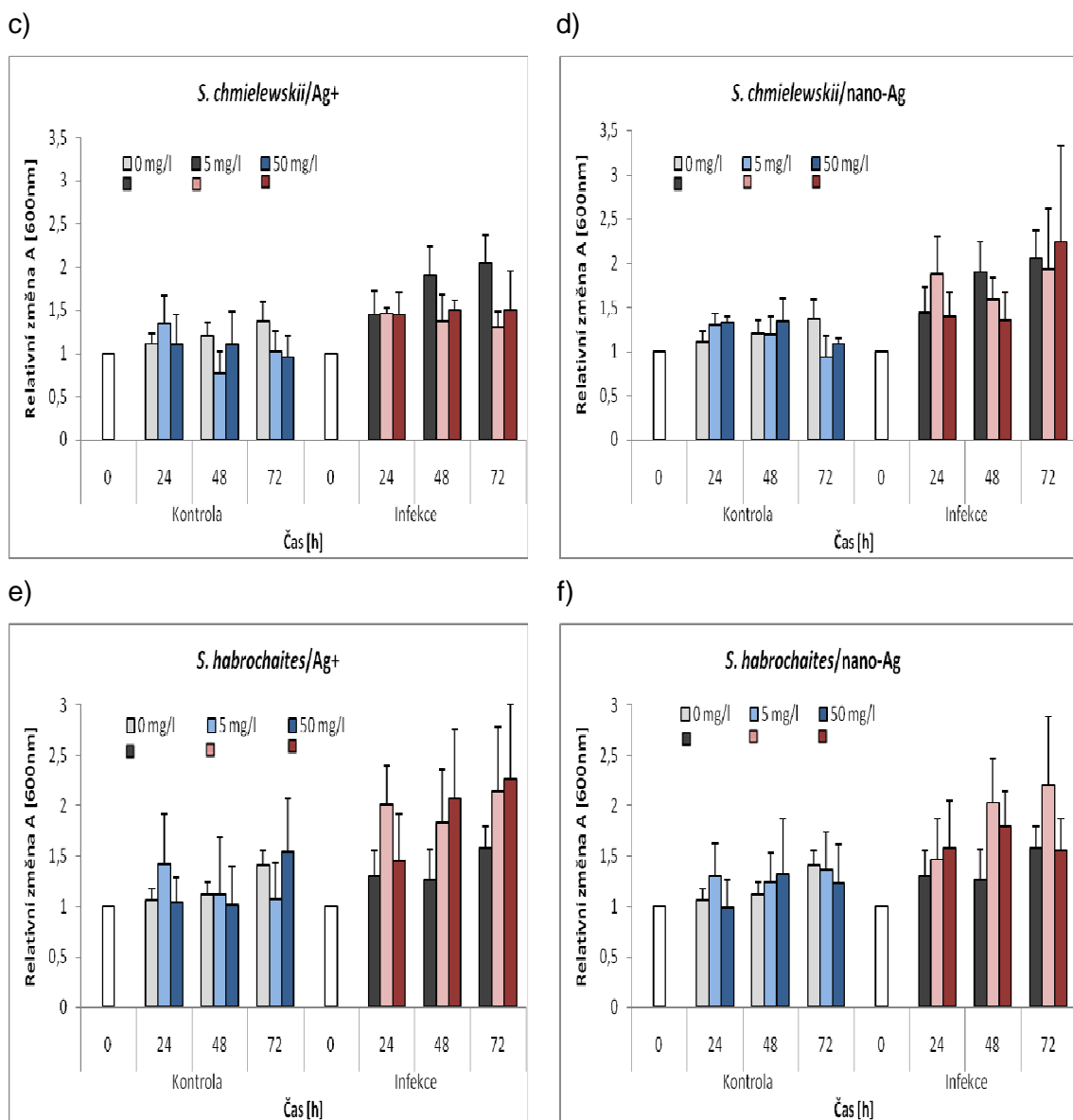
Při studiu vlivu nano-Ag a iontového stříbra na vývoj patogena *O. neolycopersici* na vybraných genotypech *Solanum* spp. byly detekovány parametry charakterizující reakci rostlin: detekce buněčné smrti, změna peroxidase aktivity, stanovení koncentrace HSP 70 a primárních produktů lipidické peroxidace.

6.2.2.1 Vliv nanočástic a iontového stříbra na buněčnou smrt u rostlin *Solanum* spp. po infekci patogenem *O. neolycopersici*

Mechanický stres v porovnání s vlivem patogenezise způsobil pouze mírné zvýšení buněčné smrti. Aplikace iontového stříbra neměla výrazný vliv na buněčnou smrt u neinfikovaných listových disků vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur, v případě nano-Ag bylo pozorováno mírné zvýšení buněčné smrti. U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* 72 h po aplikaci iontového i nano-Ag nebyly pozorovány změny v intenzitě buněčné smrti v porovnání s kontrolními čerstvě připravenými disky. Iontové stříbro a nano-Ag neovlivnilo intenzitu buněčnou smrti u neinfikovaných listových disků genotypu *S. habrochaites*. (Graf 5).

Po inokulaci listových disků patogenem *O. neolycopersici* docházelo k významnému nárůstu buněčné smrti v porovnání s neinfikovanými disky. V prostředí iontového i nano-Ag nebyl nárůst buněčné smrti po inokulaci genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* tak výrazný, s výjimkou působení iontového Ag v koncentraci 50 mg/l a nano-Ag v koncentraci 5 mg/l u *S. lycopersicum* a nano-Ag u *S. chmielewskii* 72 hpi (Graf 5a-d). U infikovaných listových disků vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl v přítomnosti obou forem stříbra zaznamenán zvýšený nárůst buněčné smrti v porovnání s infikovanými disky kultivovanými v prostředí bez Ag (Graf 5e,f).





Graf 5

Detekce buněčné smrti po aplikaci nanočástic a iontového stříbra na infikovaných (po inokulaci patogenem *O. neolyopersici*) a kontrolních (bez patogenního organismu) listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur (a,b), *S. chmielewskii* (c,d) a *S. habrochaites* (e,f) v čase 24, 48 a 72 h a hpi. Změna intenzity buněčné smrti (relativní změna) v průběhu experimentu je vztažena ke kontrolnímu vzorku (neinfikované čerstvě připravené disky daného genotypu *Solanum* spp. = 1).

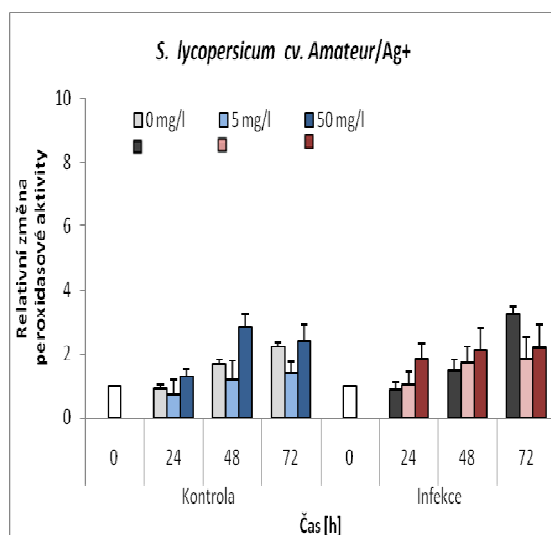
6.2.2.2 Vliv nanočástic a iontového stříbra na peroxidasovou aktivitu u rostlin *Solanum* spp. po infekci patogenem *O. neolycopersici*

Postupný nárůst peroxidasové aktivity byl detekován v průběhu experimentu u kontrolních neinfikovaných listových disků i u listových disků, které byly inokulovány patogenem *O. neolycopersici*.

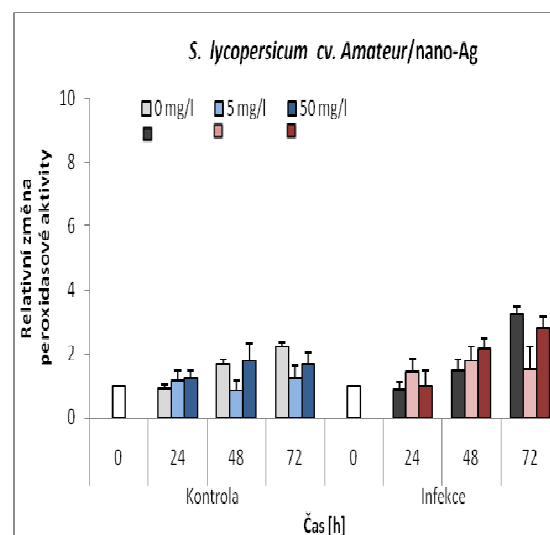
U kontrolních i infikovaných disků *S. lycopersicum* a *S. chmielewskii* 72 h po zahájení experimentu byly detekovány nižší změny v peroxidasové aktivitě po aplikaci obou forem stříbra v porovnání s listovými disky bez přítomnosti Ag (Graf 6a-d). Naopak v případě *S. habrochaites* u kontrolních i inokulovaných disků aplikace iontového stříbra a zejména nano-Ag způsobila nárůst POX aktivity v průběhu sledovaných 72 h (Graf 6e,f).

U listových disků *S. lycopersicum* cv. Amateur infikovaných patogenem *O. neolycopersici* bylo detekováno v čase 24 a 48 hpi mírné zvýšení peroxidasové aktivity po aplikaci obou forem stříbra, podobně jako v případě aplikace nano-Ag na disky *S. chmielewskii*. Naopak u kontrolních neinfikovaných disků obou genotypů byly pozorovány v přítomnosti iontového i nano-Ag nižší změny POX aktivity v průběhu 48 h experimentu (s výjimkou aplikace iontového Ag v koncentraci 50 mg/l u *S. lycopersicum*) (Graf 6a-d).

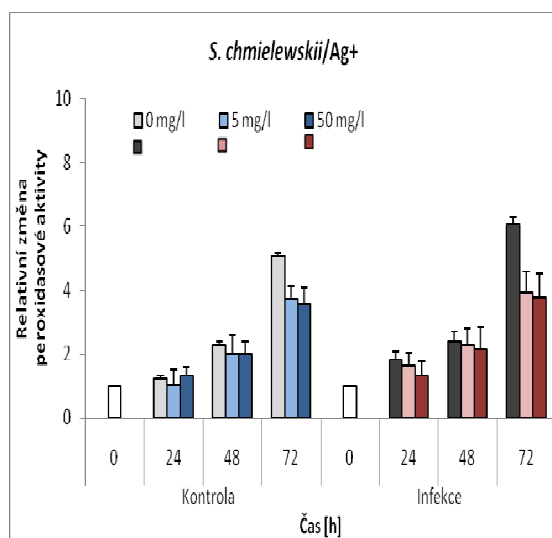
a)



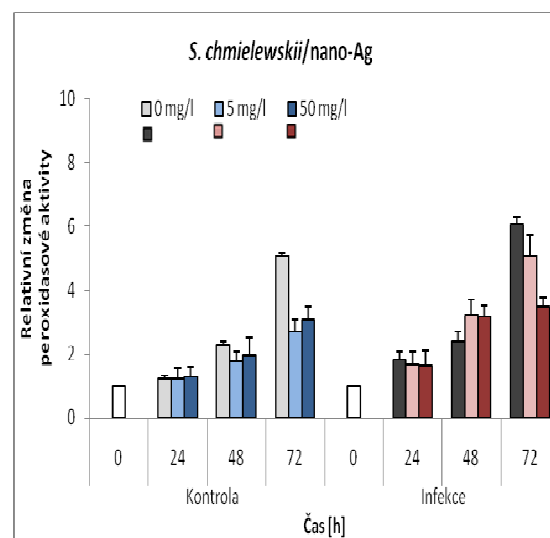
b)



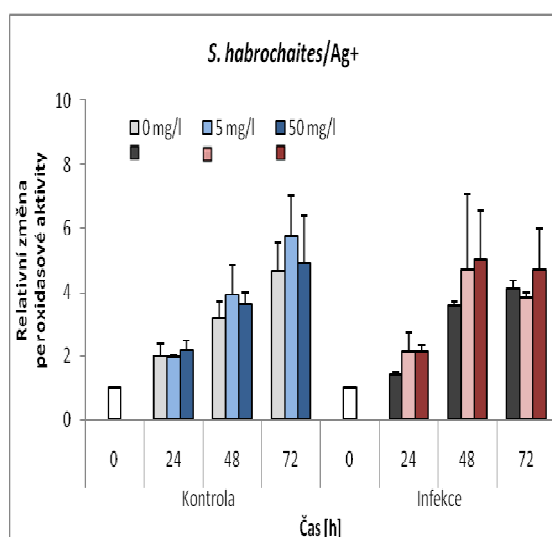
c)



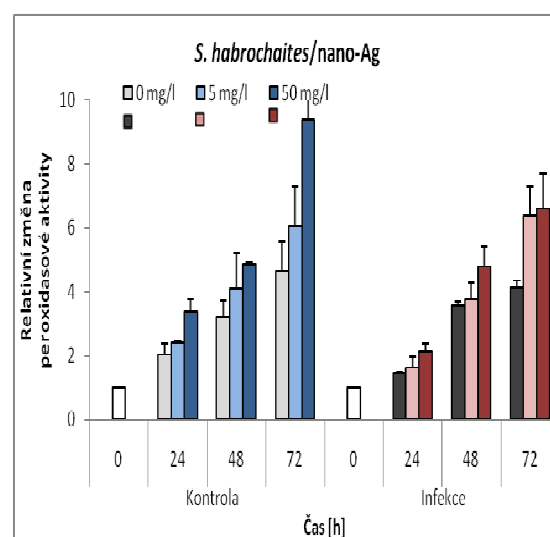
d)



e)



f)



Graf 6

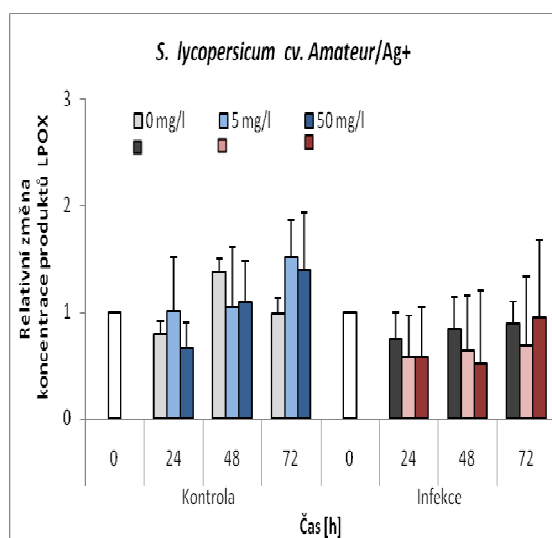
Stanovení peroxidase aktivity po aplikaci nanočástic a iontového stříbra na infikovaných (po inokulaci patogenem *O. neolyopersici*) a kontrolních (bez patogenního organismu) listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur (a,b), *S. chmielewskii* (c,d) a *S. habrochaites* (e,f) v čase 24, 48 a 72 h a hpi. Změna peroxidase aktivity (relativní změna) v průběhu experimentu je vztažena ke kontrolnímu vzorku (neinfikované čerstvě připravené disky daného genotypu *Solanum* spp. = 1).

6.2.2.3 Vliv nanočástic a iontového stříbra na koncentraci primárních produktů lipidické peroxidace u rostlin *Solanum* spp. po infekci patogenem *O. neolycopersici*

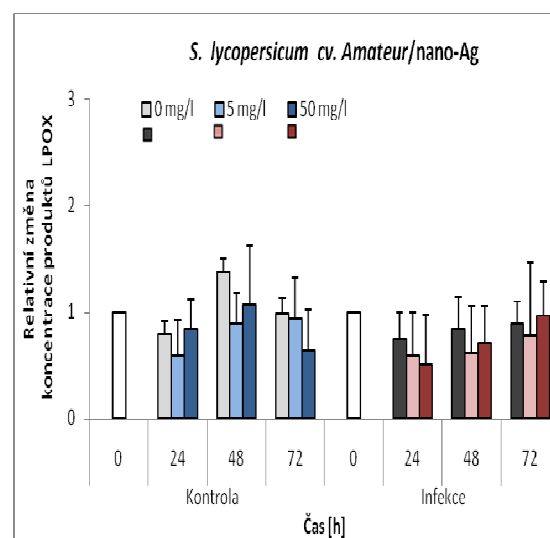
Zvýšení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace bylo v průběhu experimentu detekováno nejen u listových disků, které byly inokulovány patogenem *O. neolycopersici*, ale i u kontrolních neinfikovaných listových disků.

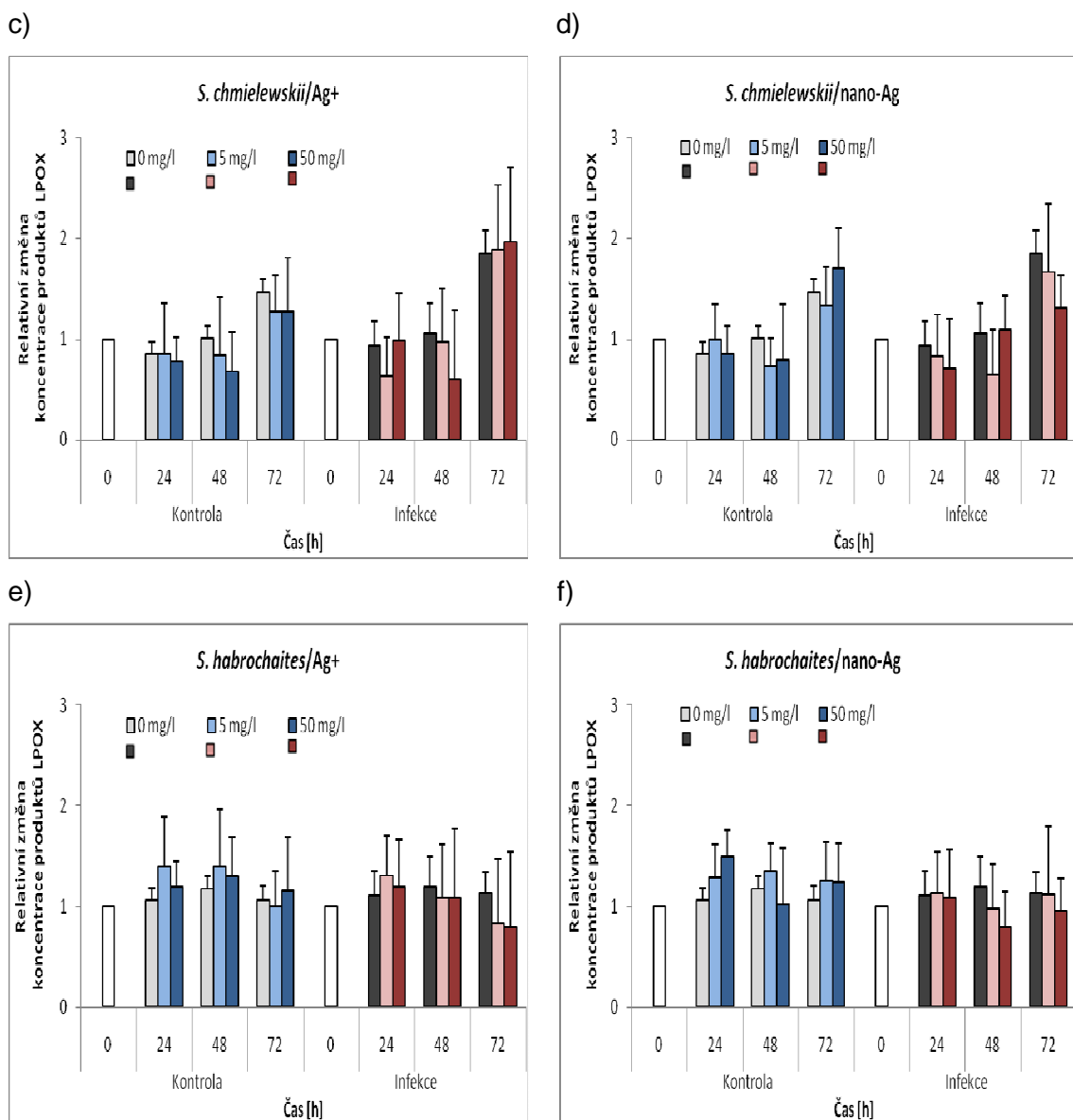
Změny v lipidické peroxidaci po aplikaci iontového stříbra nebo nano-Ag jsou neprůkazné vzhledem k poměrně velkému chybovému zatížení výsledků stanovení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace (vysoké hodnoty směrodatné odchylky) u všech tří genotypů (Graf 7a-f). Obecně lze konstatovat, že aplikace iontového a nano-Ag mírně snížila intenzitu lipidické peroxidace téměř ve všech experimentech s výjimkou neinokulovaných listových disků *S. habrochaites* a v případě neinokulovaných listových disků *S. lycopersicum* 72 h po aplikaci iontového Ag (Graf 7a-f).

a)



b)





Graf 7

Stanovení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace po aplikaci nanočástic a iontového stříbra na infikovaných (po inokulaci patogenem *O. neolycopersici*) a kontrolních (bez patogenního organismu) listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur (a,b), *S. chmielewskii* (c,d) a *S. habrochaites* (e,f) v čase 24, 48 a 72 h a hpi. Změna koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace (relativní změna) v průběhu experimentu je vztažena ke kontrolnímu vzorku (neinfikované čerstvě připravené disky daného genotypu *Solanum* spp. = 1).

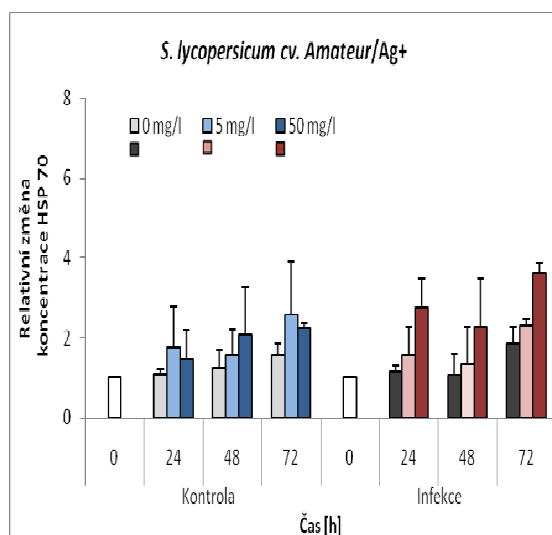
6.2.2.4 Vliv nanočástic a iontového stříbra na koncentraci HSP 70 u rostlin *Solanum* spp. po infekci patogenem *O. neolycopersici*

V experimentálním uspořádání na discích se výrazně na produkci HSP 70 podílí mechanický stres. Přítomnost nano-Ag i iontového stříbra u listových disků vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur významně stimulovala produkci HSP 70 u kontrolních i inokulovaných disků. Nejvýraznější změny byly detekovány po aplikaci nano-Ag a iontového stříbra v koncentraci 50 mg/l u inokulovaných disků (Graf 8a,b).

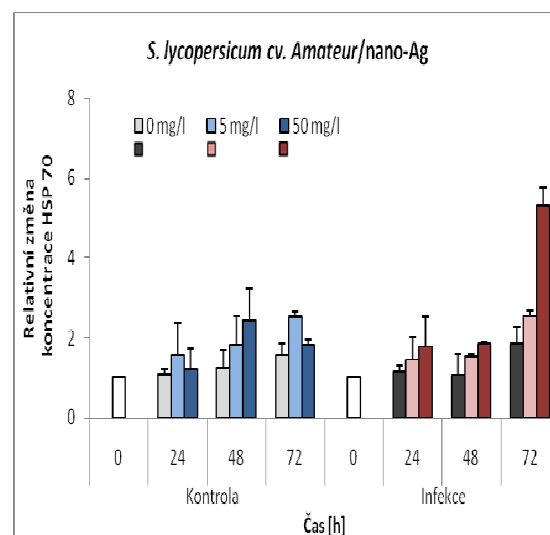
U neinfikovaných listových disků středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* docházelo pouze k minimálním změnám produkce HSP 70 vlivem iontového stříbra. Po aplikaci nano-Ag nebyl pozorován nárůst produkce HSP 70 vyvolaný mechanickým stresem (příprava disků) v čase 24 a 48 h. V čase 72 hpi byl detekován u infikovaných disků vliv iontového stříbra i nano-Ag na zvýšení produkce HSP 70. (Graf 8c,d).

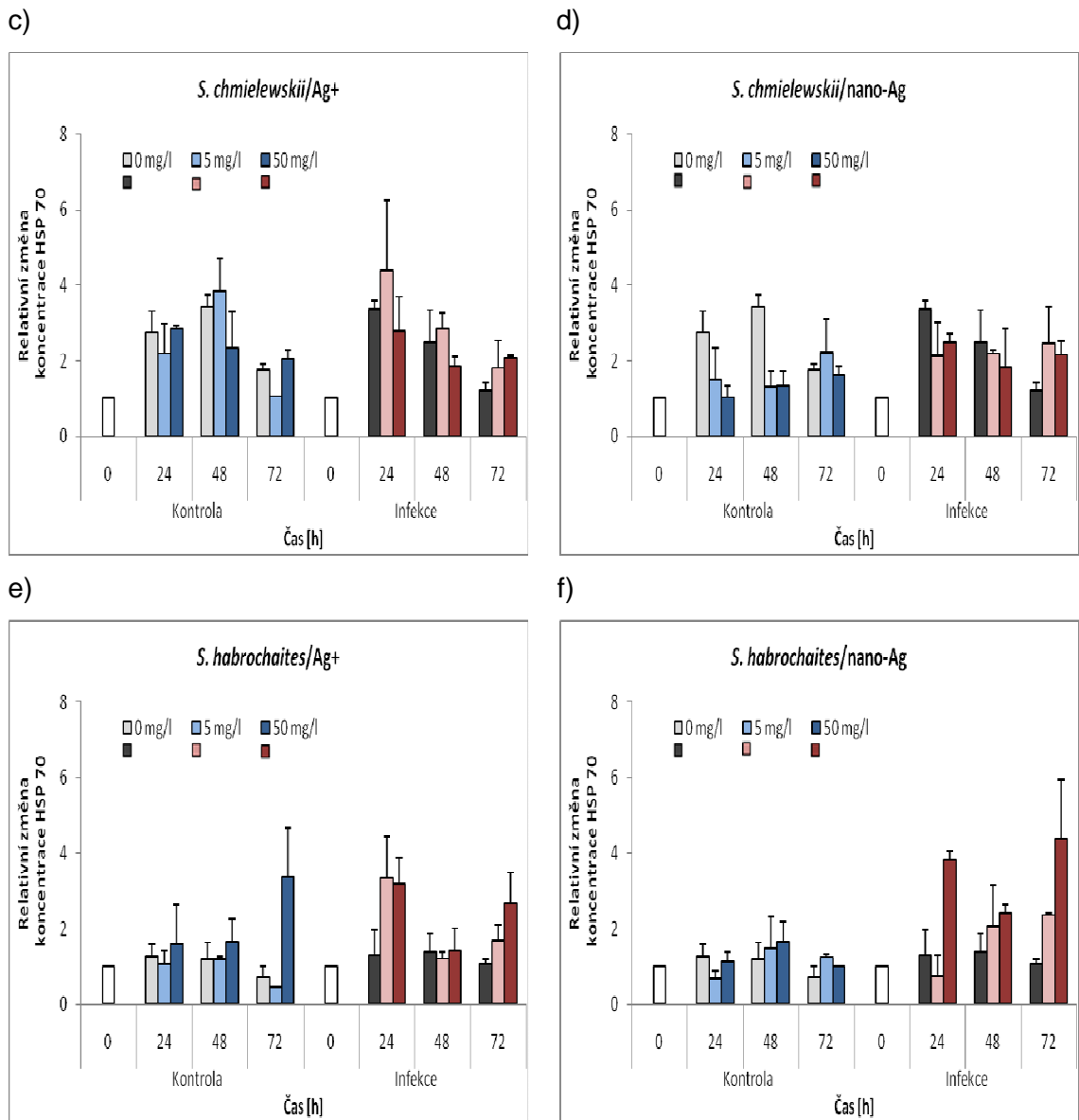
Výrazný nárůst produkce HSP 70 u neinfikovaných listových disků vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl zaznamenán po aplikaci iontového stříbra o koncentraci 50 mg/l. U infikovaných disků genotypu *S. habrochaites* bylo detekováno zvýšení hladiny HSP 70 vlivem nano-Ag a iontového stříbra. V případě nano-Ag byl pozorován výraznější vliv na produkci HSP 70 (Graf 8e,f).

a)



b)





Graf 8

Stanovení koncentrace HSP 70 po aplikaci nanočástic a iontového stříbra na infikovaných (po inokulaci patogenem *O. neolyopersici*) a kontrolních (bez patogenního organismu) listových discích *S. lycopersicum* cv. Amateur (a,b), *S. chmielewskii* (c,d) a *S. habrochaites* (e,f) v čase 24, 48 a 72 h a hpi. Změna koncentrace HSP 70 (relativní změna) v průběhu experimentu je vztažena ke kontrolnímu vzorku (neinfikované čerstvě připravené disky daného genotypu *Solanum* spp. = 1).

7 Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce bylo studium vlivu nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena a reakci rostlin různých genotypů *Solanum* spp. po infekci patogenem *O. neolycopersici*.

7.1 Porovnání vývoje patogena *O. neolycopersici* a reakce rostlin *Solanum* spp. na infekci

Vývoj patogena *O. neolycopersici* byl vyhodnocen na základě mikroskopického stanovení délky klíčících vláken *O. neolycopersici* a zastoupení konidií s jedním, dvěma, třemi a více klíčovými vlákny. Konidie patogena *O. neolycopersici* klíčí během 3 až 9 hpi. Do 6 až 12 hpi tvoří apresoria a do 12 až 24 hpi haustoria. K intenzivnímu vývoji a větvení patogena *O. neolycopersici* dochází 48 až 72 hpi (Mlíčková *et al.*, 2004). Odběry listových disků k mikroskopickému vyhodnocení vývoje patogena byly realizovány v časových intervalech 24, 48 a 72 hpi.

K experimentům byl vybrán vysoce náchylný genotyp *S. lycopersicum* cv. Amateur, středně rezistentní genotyp *S. chmielewskii* a vysoce rezistentní genotyp *S. habrochaites*. Citlivost řady vybraných genotypů *Solanum* spp. vůči patogenu *O. neolycopersici* byla stanovena ve studii Mieslerová *et al.*, 2000. V rámci předložené diplomové práce bylo pomocí mikroskopického vyhodnocení prokázáno, že patogen *O. neolycopersici* se nejrychleji vyvíjel na listových discích rostlin vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* bylo pozorováno v průběhu prvních 48 hpi zpomalení vývoje v porovnání s vývojem na citlivém genotypu. U vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl vývoj patogena *O. neolycopersici* jednoznačně potlačen. Dosažené výsledky jsou ve shodě s daty publikovanými ve studii Mieslerová *et al.*, 2000, Mlíčková *et al.*, 2004.

Rostlina se může bránit infekci patogenem různými způsoby. Pasivní princip zahrnuje strukturální a chemické vlastnosti rostlin, bez ohledu na přítomnost nebo útok patogena (např. tloušťka pokožky, přítomnost inhibičních látek nebo omezená dostupnost živin). Aktivní princip spočívá ve spuštění reakcí a aktivaci mechanismů v hostitelské buňce v důsledku invaze patogena, což vede k vyloučení, inhibici nebo eliminaci patogena (Heitefuss, 2001). Jedna z prvních reakcí rostliny na infekci patogenem je tvorba ROS (Romero *et al.*, 2008). V pozdějších fázích patogeneze může v rámci obranných procesů docházet k hypersenzitivní reakci (HR), která je často spojena se vznikem hnědých nekrotických skvrn obsahujících odumřelé rostlinné buňky v

místě penetrace patogena (Nanda *et al.*, 2010). HR po inokulaci patogenem *O. neolycopersici* nebyla detekována u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* resp. rezistentního genotypu *S. habrochaites* HR na základě mikroskopického vyhodnocení vykazovalo 10% penetrovaných buněk již 48 hpi a 45% resp. 50% po 72 hpi (Mlíčková *et al.*, 2004). Změna v intenzitě buněčné smrti stanovené pomocí metody s Evansovou modří po inokulaci intaktních listů byla minimální v případě citlivého genotypu. V případě středně rezistentního resp. rezistentního genotypu byl detekován významný nárůst buněčné smrti již po 24 hpi resp. 48 hpi (Tománková *et al.*, 2006).

V případě předložené studie byl experiment zrealizován na listových discích na rozdíl od intaktních rostlin ve studii Mlíčková *et al.*, 2004 a Tománková *et al.*, 2006. U listových disků studovaných genotypů *Solanum* spp., které byly infikované patogenem *O. neolycopersici* docházelo k postupnému nárůstu intenzity buněčné smrti stanovené pomocí metody s Evansovou modří u všech tří studovaných genotypů. Na rozdíl od studie Tománková *et al.*, 2006 byl nejvýraznější nárůst buněčné smrti detekován u vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur. U středně rezistentního genotypu, nebyly změny intenzity buněčné smrti tak výrazné a v případě rezistentního genotypu byly detekovány jen velmi malé změny v porovnání s kontrolními neinfikovanými disky. Změny intenzity buněčné smrti vyvolané mechanickým stresem spojeným s přípravou listových disků všech studovaných genotypů nebyly významné ve srovnání se změnami po inokulaci listových disků a nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Lze předpokládat, že rozdíl v intenzitě buněčné smrti v případě experimentálního uspořádání na listových discích v porovnání s realizací na intaktních rostlinách bude ovlivněn kombinací obranné reakce na mechanický stres a následné infekce patogenem.

Produkce ROS je lokální a přísně kontrolovaná. V prvních fázích obranné reakce na patogenní útok dochází k mírnému nárůstu produkce ROS. K masivní tvorbě ROS dochází v až pozdějších fázích patogeneze, což souvisí s nástupem HR (Nanda *et al.*, 2010). V místě patogenní invaze působí peroxid vodíku jako antimikrobiální látka a hraje důležitou roli v indukci buněčné smrti. Peroxid vodíku se nepodílí jen na vzniku HR, ale vystupuje také jako signální molekula aktivující geny kódující enzymy, které chrání buňku před oxidačním poškozením (Romero *et al.*, 2008). Mnoho studií potvrdilo zvýšení POX aktivity v průběhu patogeneze (Mlíčková *et al.*, 2004, Tománková *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2011). POX aktivita souvisí s nescifickými změnami po inokulaci patogenem, obecnou obrannou reakcí rostlin a HR. Izoformy POX hrají multifunkční roli v obranných reakcích rostlin. POX se podílí na různých fyziologických procesech jako

je zesíťování buněčné stěny a oxidace alkoholů cinnamylu před jejich polymerací při tvorbě ligninu a suberinu (Xu *et al.*, 2011).

Ve studiích Mlíčková *et al.*, 2004 a Tománková *et al.*, 2006 byla zvýšená POX aktivita detekována guajakolovou metodou u všech tří genotypů *Solanum* spp. v průběhu patogeneze. POX aktivita nejintenzivněji vzrůstala u rezistentních genotypů *S. chmielewskii* a *S. habrochaites* v čase 72-120 hpi (Mlíčková *et al.*, 2004, Tománková *et al.*, 2006). V předložené práci při realizaci experimentu na listových discích byl zaznamenán významný nárůst POX aktivity již u kontrolních neinokulovaných disků způsobený reakcí rostlinných buněk na mechanický stres. Změny POX aktivity po inokulaci listových disků v porovnání s kontrolními disky byly minimální. A v případě *S. habrochaites* byla POX aktivita 72 hpi nižší než u kontrolního neinokulovaného disku. V souladu s výsledky Mlíčková *et al.*, 2004 a Tománková *et al.*, 2006 byly nejmenší změny POX aktivity detekovány u citlivého genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur jak v důsledku mechanického stresu, tak i v kombinaci mechanického stresu a patogeneze. Z výsledků je zřejmé, že zvýšení POX aktivity je spojeno s obrannou reakcí rostlin na mechanický stres i patogenezi.

Zvýšená produkce ROS v důsledku působení stresových faktorů může vyvolat peroxidaci nenasycených mastných kyselin biologických membrán. Produkty lipidické peroxidace mají antibakteriální vlastnosti a signalizační funkci. Produktem lipidické peroxidace jsou např. malondialdehyd a těžké uhlovodíky, což jsou prekurzory kyseliny jasmonové. Kyselina jasmonová je důležitou signální molekulou pro expresi genů obranné reakce rostlin (Thaler *et al.*, 2004). V průběhu HR je lipidická peroxidace pozdním procesem, který nastává ve stejné době jako nekroza pletiv. Lipidická peroxidace je iniciována buď neenzymaticky pomocí ROS nebo enzymově činností lipoxygenas. Při peroxidaci lipidů dochází během HR ke ztrátě integrity a funkčnosti membrán (Rustérucci *et al.*, 1999).

Vliv mechanického stresu a patogeneze na lipidickou peroxidaci byl u všech tří genotypů obdobný jako v případě stanovení změn peroxidase aktivity. Výrazné zvýšení koncentrace primárních produktů lipidické peroxidace bylo zaznamenáno u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* a to především v čase 72 h. Pouze v případě tohoto genotypu byla pozorována zvýšená lipidická peroxidace po inokulaci listových disků. U genotypů *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. habrochaites* se neprojevil vliv inokulace listových disků na koncentraci primárních produktů lipidické peroxidace. Ve studii Tománková *et al.*, 2006 bylo v souladu s předloženými výsledky detekováno zvýšení lipidické peroxidace u všech tří genotypů *Solanum* spp. v pozdních fázích patogeneze, což koreluje s nástupem HR (Mlíčková *et al.*, 2004). V případě uspořádání na listových discích u rezistentního genotypu *S. habrochaites*, jsme

detekovali významné rozdíly v prorovnění se změnami stanovovaných parametrů v případě intaktních listů (Mlíčková *et al.*, 2004, Tománková *et al.*, 2006). Lze předpokládat účinné zapojení již nastartovaných obranných mechanismů v důsledku mechanického stresu i v procesu patogenese.

HSP 70 hrají důležitou roli v odolnosti rostlin vůči biotickému a abiotickému stresu. Základní funkcí HSP 70/chaperonů je prevence agregace a pomoc při znovuskládání proteinů v normálních a stresových stavech. Podílejí se také na transportu proteinů, při translokačních procesech a při degradaci nestabilních proteinů, které směřují do lysosomů nebo proteasomů (Zhang & Glaser, 2002).

V odpovědi na mechanický stres i patogenesi byl zaznamenán významný rozdíl v produkci HSP 70 u jednotlivých genotypů. K nejintenzivnějšímu zvýšení produkce HSP 70 docházelo u genotypu *S. chmielewskii* 48 h po aplikaci mechanického stresu a v případě kombinace mechanického a patogenního stresu bylo maximum zaznamenáno již 24 hpi. Pokles HSP 70 zpět na původní hodnotu byl detekován v čase 72 h. V případě rezistentního genotypu byly změny vyvolané mechanickým stresem i patogenesí minimální a opět 72 h byl pozorován pokles na původní hodnoty. Pouze v případě *S. lycopersicum* cv. Amateur byl detekován postupný nárůst HSP 70 zvýšený po inokulaci patogenem. V diplomové práci Matulková, 2009 byla sledována produkce HSP 70 po aplikaci kombinace mechanického, patogenního a teplotního stresu u vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*. U obou genotypů byl zaznamenán nejvyšší nárůst produkce HSP 70 8 h po zahájení experimentu. První odběr pro detekci HSP 70 v předložené práci byl realizován až 24 h po zahájení experimentu. Nelze vyloučit, že časné změny v produkci HSP 70 jsme nezachytili. V diplomové práci (Matulková, 2009) byl po 72 h detekován v souladu s našimi výsledky pokles obsahu HSP 70.

Vliv mechanického stresu na produkci HSP 70 byl také zaznamenán např. u rostlin tabáku (*Nicotiana attenuata*) (Hamilton & Coleman, 2001) a u rostlin houseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Cheong *et al.*, 2002). U houseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byli identifikovány geny odpovídající mechanickému poranění a bylo zjištěno, že velká část z nich je důležitá při obraně rostlin vůči patogennímu stresu (Cheong *et al.*, 2002).

7.2 Studium vlivu nanočástic a iontového stříbra na vývoj patogena

O. *neolycopersici* a reakci rostlin *Solanum* spp. na infekci

Antimykotické a antibakteriální účinky iontového stříbra a nano-Ag byly prokázány v mnoha studiích (Jo *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2008, Dibrov *et al.*, 2002, Choi *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2007, Keuk-Jun *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2009). Antimykotický účinek stříbrných iontů byl detekován např. u dvou rostlinných patogenních hub *Bipolaris sorokiniana* a *Magnaporthe grisea* (Jo *et al.*, 2009) a antimykotické účinky nano-Ag byly zkoumány např. u kmenů *Trychophyton mantagrophytes*, druhů *Candida* (Keuk-Jun *et al.*, 2008) a u ambrosiových hub *Raffaelea* spp. (Kim *et al.*, 2009). Mezi základní principy působení iontového stříbra a nano-Ag na patogenní organismy patří 1) absorpce volných stříbrných iontů, následné narušení produkce ATP a replikace DNA 2) produkce ROS působením stříbrných iontů nebo nano-Ag 3) poškození buněčných membrán (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

Stříbro však nemá vliv pouze na patogenní organismy. Také pro rostliny představují stříbrné ionty významný stresový faktor. Jejich působení spouští v rostlinách obrannou reakci, dochází k biosyntéze obranných proteinů a obranných sloučenin (Howe & Merchant, 1992, Murphy & Tiaz, 1995, Navabpour *et al.*, 2003, Tsuji *et al.*, 1992, Epple *et al.*, 1995). Stříbrné ionty u rostlin způsobují inhibici enzymů (Kumar *et al.*, 2009, Křížková *et al.*, 2009), ovlivňují membránový potenciál a transport vody (Niemietz & Tyerman, 2002) a také syntézu membránových lipidů (Akermoun *et al.*, 2002, Quartacci *et al.*, 2001). Dále mohou zasahovat do rostlinné signalizace ethylenem (Beyer, 1976, Atta-Aly *et al.*, 1986) a pravděpodobně ovlivňují i hladinu kyseliny abscisové (Kong & Yeung, 1994).

V diplomové práci Válová, 2011, kde byl studován vliv stříbra rozsuspendovaného v agarose na klíčivost, životnost a délku klíčícího vlákna patogena *O. neolycopersici*, byl prokázán inhibiční vliv stříbra na patogenní organismus (Válová, 2011). Aplikace stříbra ve formě nanočástic a iontů měla odlišný vliv na vývoj patogena na hostitelských rostlinách lišících se rozdílným stupněm rezistence vůči padlí *O. neolycopersici*. U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. *Amateur* byla pozorována inhibice růstu a vývoje patogena. U středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* byl detekován inhibiční vliv stříbra na růst a vývoj patogena *O. neolycopersici* až v pozdější fázi (72 hpi). Je zajímavé, že naopak u vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* měla aplikace obou forem stříbra stimulační efekt na růst a vývoj patogena. Při porovnání vlivu nano-Ag a iontového stříbra na vývoj patogena *O. neolycopersici* byl po aplikaci nano-Ag zaznamenán mírně vyšší inhibiční účinek u genotypu *S. chmielewskii* a nižší stimulační vliv u genotypu *S.*

habrochaites. Srovnávací studie o toxických účincích různých forem stříbra na nitrifikační bakterie dokazuje vyšší toxicitu nano-Ag oproti stříbrným iontům (Choi *et al.*, 2008). Pro objasnění detekované rozdílné reakce vlivu obou forem stříbra na vývoj patogena na rozdílných hostitelských rostlinách je nutné zrealizovat detailnější studii.

K potlačení vývoje patogena u *S. lycopersicum* cv. Amateur mohlo dojít indukci exprese nebo aktivací obranných proteinů a obranných sloučenin. Například v klíčcích rostlinkách houseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla zaznamenána zvýšená transkripce genů kódujících fytoalexiny 3 h po aplikaci stříbrných iontů v 0,1 mM koncentraci (Epple *et al.*, 1995, Tsuji *et al.*, 1992). Fytoalexiny jsou látky schopné inhibovat růst některých hub a bakterií.

Stimulační vliv stříbra na vývoj patogena u rezistentního genotypu mohl být způsoben narušením rezistentních vlastností např. poškozením membrán vlivem aplikace stříbra, inhibicí enzymů podílejících se na metabolismu ROS (Cheng *et al.*, 2007). Nano-Ag jsou schopné vazby na thiolové skupiny proteinů a mohou tak měnit propustnost membrány (Lok *et al.*, 2006). Dále působí těžké kovy jako významný stresový faktor, který může způsobit peroxidaci membránových lipidů (Akeroun *et al.*, 2002). Poškození membrán bývá indukováno také zvýšenou hladinou ROS, což souvisí s obrannou odpovědí organismu (Rustérucchi *et al.*, 1999).

V diplomové práci Válková, 2011 byl studován vliv stříbra a modulátorů ROS na patogena *O. neolyopersici*. Společná aplikace stříbra a ROS (peroxidu vodíku) měla pozitivní vliv na vývoj spor *O. neolyopersici* (Válková, 2011). Jednou z možností stimulace vývoje patogena *O. neolyopersicum* u rezistentního genotypu může být zvýšená produkce ROS, typická pro rezistentní genotyp *S. habrochaites* (Tománková *et al.*, 2006). V souladu s výše uvedenými výsledky je i prokázána snížená produkce ROS u patogena *O. neolyopersici* pěstovaného na agarose po aplikaci obou forem stříbra projevující se inhibicí vývoje patogena (Válková, 2011).

Aplikace stříbra ve formě nanočástic a iontů neměla významný a jednoznačný vliv na životnost buněk u kontrolních neinfikovaných disků všech genotypů. U infikovaných listových disků vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* byla pozorována nižší úroveň buněčné smrti po aplikaci obou forem stříbra. V případě vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* byl v přítomnosti obou forem stříbra naopak zaznamenán zvýšený nárůst buněčné smrti v porovnání s infikovanými disky kultivovanými v prostředí bez Ag. Tento výsledek naznačuje možnost, že „stimulační vliv stříbra na vývoj patogena u rezistentního genotypu by mohl být způsoben poškozením membrán hostitelské rostliny po aplikaci stříbra“.

U kontrolních i infikovaných listových disků *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. chmielewskii* byla v přítomnosti nano-Ag a iontového stříbra 72 h po zahájení experimentu detekována nižší POX aktivita. Naopak v případě *S. habrochaites* u kontrolních i inokulovaných disků aplikace iontového stříbra a zejména nano-Ag způsobila nárůst POX aktivity v průběhu sledovaných 72 h.

Aplikace nano-Ag a iontového stříbra způsobovala minimální změny v intenzitě lipidické peroxidace u kontrolních a infikovaných listových disků všech tří genotypů, které byly neprůkazné vzhledem k poměrně velkému chybovému zatížení výsledků. Obecně lze konstatovat, že aplikace obou forem stříbra snížila intenzitu lipidické peroxidace téměř ve všech experimentech s výjimkou neinokulovaných listových disků *S. habrochaites*.

U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a u vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* bylo detekováno zvýšení koncentrace HSP 70 po aplikaci stříbra ve formě nanočástic a iontů. Vlivem iontového stříbra byl zaznamenán nárůst produkce HSP 70 také u infikovaných disků středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*. Po aplikaci nano-Ag bylo zvýšení koncentrace HSP 70 u genotypu *S. chmielewskii* pozorováno až v čase 72 h a hpi. Podobně vliv těžkých kovů na zvýšení hladiny HSP 70 byl prokázán ve studii Tukaj et al., 2011 u okřehku malého (*Lemna minor*). Produkce HSP 70 byla sledována v čase 4 h a 7 dnů po expozici stresových faktorů, kdy už byl detekován pokles hladiny HSP 70 (Tukaj et al., 2011).

ROS ve vyšších koncentracích působí toxicky a způsobují poškození či zánik buňky. Vlivem ROS dochází k peroxidačnímu poškození membránových lipidů, což vede k úniku buněčného obsahu a následné buněčné smrti. ROS mohou dále inaktivovat enzymy, oxidovat proteiny, poškozovat DNA a RNA, čímž indukují buněčnou smrt (Rustérucci et al., 1999). Peroxidaci lipidů mohou indukovat těžké kovy, což má za následek jejich degradaci nebo inhibici biosyntézy. Bylo zjištěno, že stříbrné ionty inhibují např. aktivitu lyso-PCacyltransferasy, která hraje důležitou roli při biosyntéze membránových lipidů (Akeroun et al., 2002). Stříbrné ionty mohou působit také jako enzymové inhibitory, jak u eukaryotních tak i v prokaryotních organismech. Inhibiční vliv stříbra byl objeven u 560 enzymů převážně bakteriálního původu, u enzymů rostlinného původu byl zjištěn téměř u 70 enzymů. (Kumar et al., 2009, Křížková et al., 2009). Byl prokázán vliv stříbra na inhibici enzymů podílejících se na produkci ROS. U houbového organismu *Phanerochaete chrysosporium* byl zaznamenán inhibiční vliv stříbra na enzym glukosaoxidasa, který katalyzuje redukci molekulárního kyslíku za tvorby peroxidu vodíku (Kelley & Reddy, 1986). U kvasinek *Candida boidinii* byla detekována inhibice vlivem Ag u enzymu D-aminokyselinoxidasa, který také redukuje molekulární kyslík za vzniku peroxidu vodíku (Yurimoto et al., 2001). Inhibiční vliv

stříbra na aktivitu enzymu xanthinoxidasa byl prokázán u gramnegativních bakterií *Enterobacter cloacae*. Při katalytické oxidaci xanthinu na kyselinu močovou se uvolňuje superoxidový radikál, který podléhá redukci za tvorby peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu (Machida & Nakanishi, 1981). Inhibiční vliv Ag byl zaznamenán také u dalších enzymů podílejících se na metabolismu ROS jako např.: NADH-peroxidasa u *Streptococcus faecalis* (Dolin, 1957), cytochrom-c-peroxidasa u *Thiobacillus thiooxidans* (Tano *et al.*, 1957), mangan-peroxidasa u *Schizophyllum* sp. (Cheng *et al.*, 2007) a peroxidasa u pšenice seté (*Triticum aestivum*) (Lai *et al.*, 2006). V diplomové práci Válková, 2011 bylo zaznamenáno snížení produkce ROS u patogena *O. neolycopersici* po aplikaci nano-Ag a iontového stříbra.

Závěrem lze konstatovat, že i když nano-Ag a iontové stříbro vykazují inhibiční vliv při přímé aplikaci na vývoj patogena (Válková, 2011), na reálném modelovém systému rostlina x patogen je ovlivněn účinek nano-Ag a iontového stříbra vlastnostmi hostitelské rostliny. Je zajímavé, že v případě hostitele s rezistentními vlastnostmi byl po aplikaci zaznamenán stimulační účinek na vývoj patogena, doprovázený zvýšenou buněčnou smrtí a peroxidasovou aktivitou. Lze předpokládat, že stříbrné ionty mohou působit jako enzymové inhibitory a může se uplatnit vliv stříbra na inhibici enzymů podílejících se na produkci ROS, případně se nano-Ag a iontové stříbro podílí na poškození buněčných membrán hostitele. Reakce bude závislá na vlastnostech rostlinného organismu disponující určitou škálou obranných mechanismů, které může aplikaci nano-Ag nebo iontového stříbra inhibovat případně zesilovat.

8 Závěr

1. Byla vypracována literární rešerše se zaměřením na obranné reakce rostlin a mechanismus působení stříbra ve formě nanočástic a iontů na živé organismy.
2. Pomocí mikroskopického vyhodnocení realizovaného na listových discích byl potvrzen rozdílný vývoj patogena *O. neolycopersici* u tří genotypů *Solanum* spp. lišících se rozdílným stupněm rezistence vzhledem k patogenu.
3. Patogenní stres způsobil nárůst buněčné smrti u všech tří genotypů. Nejintenzivější změny v uspořádání na listových discích na rozdíl od intaktních rostlin byly pozorovány u vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur.
4. U ostatních parametrů rostlinné reakce (peroxidasová aktivita, koncentrace HSP 70 a primárních produktů lipidické peroxidace) byl zaznamenán výrazný vliv mechanického stresu, přičemž nejintenzivnější změny byly detekovány u středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii*.
5. U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* (72 hpi) byla pozorována inhibice růstu a vývoje patogena po aplikaci obou forem stříbra. U vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* měla aplikace stříbra naopak stimulační efekt na růst a vývoj patogena.
6. U vysoce náchylného genotypu *S. lycopersicum* cv. Amateur a středně rezistentního genotypu *S. chmielewskii* po infekci patogenem byl pozorován nižší nárůst buněčné smrti, menší změny v POX aktivitě po aplikaci obou forem stříbra. Naopak zvýšená POX aktivita byla zaznamenána v případě vysoce rezistentního genotypu *S. habrochaites* v přítomnosti obou forem stříbra.
7. Lze předpokládat významnou roli ROS v reakci rostlin a patogenu na přítomnost nano-Ag a iontového Ag, která se může projevit i formou poškození buněčných membrán hostitele.

Literatura:

Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Grover A. (2002) Plant Hsp100 proteins: structure, function and regulation. *Plant Sci.* **163**, 397-405.

Achuo E.A., Audenaert K., Meziane H., Hofte M. (2004) The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathol.* **53**, 65-72.

Akermoun M., Testet E., Cassagne C., Bessoule J.-J. (2002) Inhibition of the plastidial phosphatidylcholine synthesis by silver, copper, lead and mercury induced by formation of mercaptides with the lyso-PC acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1581** (1-2), 21-28.

Alta V., Becherth T., Steinruckeb P., Wagenerc M., Seideld P., Dingeldeind E., Domanne E., Schnettlera R. (2004) An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* **25**, 4383-4391.

Asharani P. V., Mun G. L. K., Hande M. P., Valiyaveetil S. (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**, 279-290.

Atta-Aly M.A., Saltveit M.E., Hobson G.E. (1987) Effect of Silver Ions on Ethylene Biosynthesis by Tomato Fruit Tissue. *Plant Physiol.* **83**, 44-48.

Babula P., Adam V., Opatřilová R., Zehnálek J., Havel L., Kizek R. (2008) Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ. Chem. Lett.* **6**, 189–213.

Bai Y., van der Hulst R., Bonnema G., Marcel T.C., Meijer-Dekens F., Niks R.E., Lindhout P. (2005) Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: Dominant *OI* genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive *ol-2*. *MPMI* **18** (4), 354–362.

Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.D., Tripp J., Weber Ch., Zielinski D., Koskull-Döring P. (2004)

Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29** (4), 471-487.

Barceló R.A. (1997) Lignification in plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* **176**, 87-132.

Beyer E.M. (1976) A Potent Inhibitor of Ethylene Action in Plants. *Plant Physiol.* **58**, 268-271.

Bilberg K., Hovgaard M.B., Besenbacher F., Baatrup E. (2012) In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Toxicology* **2012**, 1-9.

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Ann. Bot.* **91**, 179-194.

Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32** (1-2), 191-222.

Bukau B., Horwich A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* **92**, 351–366.

Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. M., Braydich-Stolle L. K., Hess K. L., Jones R. L., Schlager J. J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* **112**, 13608-13619.

Clement J.L., Jarrett P.S. (1994) Antibacterial silver. *Met. Based Drugs* **1** (5-6), 467-482.

De Gara L., de Pinto M.C., Tommasi F. (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 863-870.

Dibrov P., Dzioba J., Gosink K., Hase C. (2002) Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2668-2670.

Dolin M.I. (1957) The *Streptococcus faecalis* oxidases for reduced diphosphopyridine nukleotide III. Isolation and properties of a flavin peroxidase for reduced diphosphopyridine nucleotide *J. Biol. Chem.* **225**, 557-573.

Elechiguerra J., Burt J., Morones J., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H., Yacaman M. (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology* **3** (6), 1-10.

Ellender G., Ham K.N. (1989) Connective tissue responses to some heavy metals. III Silver and dietary supplements of ascorbic acid. Histology and ultrastructure. *Br. J. exp. Path.* **70**, 21-39.

Epple P., Apel K., Bohlmann H. (1995) An *Arabidopsis thaliana* Thionin Gene Is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiol.* **109**, 813-820.

Gosheger G., Harges J., Ahrens H., Streitburger A., Buerger H., Erren M., Gonsel A., Kemper F.H., Winkelmann W., Von Eiff C. (2004) Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials.* **25**(24), 5547-5556.

Griffiths G., Leverentz M., Silkowski H., Gill N., Sanches-Serrano J.J. (2000) Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *J. Exp. Bot.* **51** (349), 1363-1370.

Hahlbrock K., Bednarek P., Ciolkowski I., Hamberger B., Heise A., Liedgens H., Logemann E., Nurnberger T., Schmelzer E., Somssich I.E., Tan J. (2003) Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant-pathogen interactions. *PNAS* **100** (2), 14569–14576.

Hamilton E.W., Coleman J.S. (2001) Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *Am. J. Bot.* **88**(5), 950–955.

Heitefuss R. (2001) Defense reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* **88** (7), 273-283.

Howe G., Merchant S. (1992) Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **98**, 127-136.

Chen X., Schluesener H.J. (2008) Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* **176**, 1–12.

Cheng X., Jia R., Li P., Tu S., Zhu Q., Tang W., Li X. (2007). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enz. Microb. Technol.* **41** (3), 258-264.

Cheong Y.H., Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T., Luan S. (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**, 661-677.

Choi O., Deng K., Kim N., Ross L., Surampalli R., Hu Z. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* **42**, 3066-3074.

Choi O., Hu Z. (2008) Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 4583-4588.

Jacob D., David D.R., Sztjenberg A., Elad Y. (2008) Conditions for Development of Powdery Mildew of Tomato Caused by *Oidium neolycopersici*. *Phytopathology* **98** (3), 271-281.

Jo Y.-K., Kim B.H., Jung G. (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis.* **93**, 1037-1043.

Jones H., Whipps J.M., Gurr S.J. (2001) The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Mol. Plant Pathol.* **2** (6), 303 – 309.

Jung W.K., Koo H.Ch., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H. (2008) Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (7), 2171–2178.

Kelley R.L., Reddy C.A. (1986) Purification and Characterization of Glucose Oxidase from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **166** (1), 269-274.

Keuk-Jun K., Sung W.S., Moon S.S., Choi J.S., Kim J.G., Lee D.G. (2008) Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**(8), 1482–1484.

Kim J.S., Kim, Kuk E., Yu K.N., Kim J.-H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang Ch.-Y., Kim Y.-K., Lee Y.S., Jeong D.H., Cho M.-H. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **3**, 95– 101.

Kim S.W., Kim K.S., Lamsal K., Kim Y.J., Kim S.B, Jung M., Sim S.J., Kim H.S., Chang S.J., Kim J.K., Lee Y.S. (2009) An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 760-764.

Koduri R.S., Tien M. (1995) Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **270** (38), 22254–22258.

Kolář M, Urbánek K, Látal T. (2001) Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**(5), 357-363.

Kong L., Yeung A.C. (1994), Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. *Plant Sci.* **104** (1), 71–80.

Koontz H.V., Berle K.L. (1980) Silver Uptake, Distribution, and Effect on Calcium, Phosphorus, and Sulfur Uptake. *Plant Physiol.* **65**, 336-339.

Kregel K.C. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* **92**, 2177–2186.

Křížková S., Adam V., Kizek R. (2009) Fytotoxicita stříbrných iontů. *Chemické listy* **103**, 559-568.

Kumar V. Parvatam G., Ravishankar G.A. (2009) AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *E. J. Biotechnol.* **12** (2), 1-15.

Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N. (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* **407**, 5243-5246.

Lai L.S., Wang D.J., Chang C.T., Wang Ch. (2006) Catalytic characteristics of peroxidase from wheat grass. *J. Agric. Food Chem.* **54** (22), 8611-8616.

Law N., Ansari S., Livens F.R., Renshaw J.C., Lloyd J.R. (2008) Formation of Nanoscale Elemental Silver Particles via Enzymatic Reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (20), 7090–7093.

Li Ch., Bonnem G., Che D., Dong L., Lindhout P., Visser R., Bai Y. (2007) Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. *MPMI* **20** (9), 1161–1172.

Lok C., Ho C., Chen R., He Q., Yu W., Sun H., Tam P., Chiu J., Che C. (2006) Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* **5**, 916-924.

Machida Y., Nakanishi T. (1981) Purification and Properties of Xanthine Oxidase From *Enterobacter cloacae*. *Agric. Biol. Chem.* **45** (2), 425-432.

Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T. (1996) The Composition of Metals Bound to Class 111 Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* **110**, 1145-1 150.

Marambio-Jones C., Hoek E. M. V. (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* **12**, 1531-1551.

May T., Soll J. (2000) 14-3-3 Proteins Form a Guidance Complex with Chloroplast Precursor Proteins in Plants. *The Plant Cell* **12**, 53–63.

Mieslerová B., Lebeda A., Chetelat R.T. (2000) Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *J. Phytopathol.* **148**, 303 – 311.

Mieslerová B., Lebeda A. (2010) Influence of Temperature and Light Conditions on Germination, Growth and Conidiation of *Oidium neolycopersici*. *J. Phytopathol.* **158**, 616–627.

Miernyk J.A., Hayman C.T. (1996) ATPase Activity and Molecular Chaperone Function of the Stress70 Proteins. *Plant Physiol.* **110**, 419-424.

Miernyk J.A. (1999) Protein Folding in the Plant Cell. *Plant Physiol.* **121**, 695–703.

Mishra V.K., Kumar A. (2009) Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting Rhizobacteria. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **4** (3), 587-592.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7** (9), 405-410.

Mlíčková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerová B., Peč P. (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 753-761.

Murphy A., Taiz L. (1995) Comparison of Metallothionein Gene Expression and Nonprotein Thiols in Ten *Arabidopsis* Ecotypes. *Plant Physiol.* **109**, 945-954.

Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N., Dunand C. (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 195-204.

Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E., Mackerness S. A-H., Buchanan-Wollaston V. (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **54**, 2285-2292.

Niemietz Ch.M., Tyerman S.D. (2002) New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Lett.* **531**, 443-447.

Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V.K., Nevěčná T., Zbořil R. (2006) Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **110**, 16248-16253.

Panáček A., Kvítek L., Soukupová J., Kolář M., Večeřová R., Pucek R., Holecová M., Zbořil R. (2008) Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **112**, 5825-5834.

Panyala N.R., Pena-Méndes E.M., Havel J. (2008) Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *J. Appl. Biomed.* **6**, 117-129.

Pastori G.M., Foyer Ch.H. (2002) Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol.* **129**, 460–468.

Pratt W.B., Toft D.A. (2003) Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. *Exp. Biol. Med.* **228**, 111-133.

Quartacci M.F., Cosi E., Navari-Izzo F. (2001) Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J. Exp. Bot.* **52** (354), 77-84.

Romero D., Rivera M.E., Cazorla F.M., Codina J.C., Fernandez-Ortuno D., Tores J.A., Perez-Garciaa A., de Vicentea A. (2008) Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon–powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. *J. Plant. Physiol.* **165**(18), 1895-1905.

Ruffini C. M., Cremonini R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* **62** (2), 161-165.

Rupp M.E., Fitzgerald T., Marion N., Helget V., Puumala S., Anderson J.R., Fey P.D. (2004) Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am. J. Infect. Control.* **232** (8), 445-450.

Rustérucci C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.J., Etienne P., Suty L., Blein J.P., Triantaphylidès C. (1999) Involvement of lipoygenase-

dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **274** (51), 36446–36455.

Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 643–668.

Sangster T.A., Queitsch Ch. (2005) The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 86–92

Scandalios J.G. (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol.* **101**, 7-12.

Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y. (2009) Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Ad. Colloid Interface Sci.* **145**, 83–96.

Smetana A., Klabunde K., Marchin G., Sorensen C. (2008) Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir* **24**, 7457-7464.

Strathmann M., Wingender J. (2004) Use of an oxonol dye in combination with confocal laser scanning microscopy to monitor damage to *Staphylococcus aureus* cells during colonisation of silver-coated vascular grafts. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **24** (3), 234-240.

Sue Y.-M., Lee J.Y.-Y., Wang M.-Ch., Lin T.-K., Sung J.-M., Huang J.-J. (2001) Generalized Argyria in Two Chronic Hemodialysis Patients. *A. J. Kidney Diseases* **137** (5), 1048-1051.

Sun W., Montagu M.V., Verbruggen N. (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**, 1-9.

Tano T., Sakai K., Sugio T., Imai K. (1977) Purification and some properties of a ferrocycytochrome c: hydrogen-peroxide oxidoreductase from *Thiobacillus thiooxidans*. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 323-330.

Timperio A.M., Egidi M.G., Zolla L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* **71**, 391-411.

- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P., Lebeda A. (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **68**, 22–32.
- Tommasi F., Paciolla C., de Pinto M.C., De Gara L. (2001) A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J. Exp. Bot.* **52** (361), 1647-1654.
- Tsuji J., Jackson E.P., Gage D.A., Hammerschmidt R., Somerville S.C. (1992) Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* **98**, 1304-1309.
- Tukaj S., Bisewska J., Roeske K., Tukaj Z. (2011) Time- and Dose-Dependent Induction of HSP70 in *Lemna minor* Exposed to Different Environmental Stressors. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **87**, 226–230.
- Ulkür E., Oncul O., Karagoz H., Yeniz E., Celiköz B. (2005) Comparison of silver-coated dressing (Acticoat), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and fusidic acid 2% (Fucidin) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant Staphylococci-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. *Burns.* **31** (7), 874-877.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. J. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53**, 1227-1236.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS Plant Sci.* **9**, 244-251.
- Wang H., Law N., Pearson G., van Dongen B.E., Jarvis R.M., Goodacre R., Lloyd J.R. (2009) Impact of Silver(I) on the Metabolism of *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* **192** (4) 1143–1150.
- Waters E.R., Lee G.J., Vierling E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**, 325-338.
- Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Bioch. J.* **322**, 681-692.

Xu X.-H. N., Brownlow W.J., Kyriacou S.V., Wan Q., Viola J.J. (2004) Real-Time Probing of Membrane Transport in Living Microbial Cells Using Single Nanoparticle Optics and Living Cell Imaging. *Biochemistry* **43**, 10400-10413.

Xu L., Zhu L., Tu L., Liu L., Yuan D., Jin L., Long L., Zhang X. (2011) Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J. Exp. Bot.* **62** (15), 5607–5621.

Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B.P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E.S. More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. (2011) *Environ. Sci. Technol.* **45**, 2360–2367.

Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. (2001) Characterization and High-level Production of D-Amino Acid Oxidase in *Candida boidinii*. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* **65** (3), 627-633.

Zhang X.-P., Glaser E. (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* **7** (1), 14-21.

Seznam použitých zkratk:

ABA	kyselina abscisová
AFR	volné radikály askorbátu
AFFR	reduktasa AFR
AK	aminokyselina
APX	askorbátperoxidasa
ASC	askorbát
ATP	adenosintrifosfát
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BS	buněčná stěna
CAT	katalasa
DAO	diaminoxidasa
DHA	dehydroaskorbová kyselina
DHAR	reduktasa radikálů DHA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
GSH	glutathion
GSSH	disulfid glutathionu
HCl	kyselina chlorovodíková
hpi	hodiny po inokulaci
HR	hypersenzitivní reakce
HSE	regulační oblast genu HSP
Hsf	transkripční faktor HSP
HSP	heat shock protein
mRNA	mediátorová RNA
MAPK	mitogenem aktivovaná kinasa
NADH	nikotinamidadeninukleotid
nano-Ag	nanostříbro
PAL	fenylalaninamoniumlyasa
PAO	polyaminoxidasa
PM	plasmatická membrána,
POD	sekreční peroxidasa

POX	peroxidasa
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
Rp	proteinové receptory
SA	kyselina salycilová
SDS	dodecyl sulfát sodný
smHSP	nízkomolekulární HSP
SOD	superoxoddismutasa
TF	transkripční faktor
TEMED	N, N, , N', N'- tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl) aminomethan

