



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**SROVNÁNÍ ÚČINKU NANOČÁSTIC STŘÍBRA U  
RŮZNÝCH DRUHŮ ROSTLIN**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	Renata Trajerová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Renata Trajerová
Název práce	Srovnání účinku nanočástic stříbra u různých druhů rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Díky jejich bohatému využití výroba spotřebních produktů, které obsahují nanočástice stříbra (AgNPs), stále roste. To vede k rostoucímu uvolňování těchto nanočástic do životního prostředí, což může mít negativní dopad na ekosystémy a lidské zdraví. Vegetace může být rostoucím množstvím těžkých kovů v prostředí a jejich bioakumulací výrazně negativně ovlivněna. Z tohoto důvodu je potřebné získat znalosti o chování a dopadu těchto nanočástic na životní prostředí a rostliny. Vliv stříbrných nanočástic na vyšší rostliny je prozatím málo prozkoumán, předpokládá se, že mimo jiné závisí na druhu rostliny a na způsobu aplikace. Cílem práce bylo porovnat účinek AgNPs při různých způsobech aplikace u vybraných rostlinných druhů (tabák virginský, huseníček rolní, ječmen jarní, vojtěška setá). Vliv AgNPs byl posuzován na základě změn parametrů chlorofylové fluorescence odrážejících fungování primárních fotosyntetických procesů. Obecně byl zaznamenán pouze velmi malý vliv AgNPs. Nejmenší dopad AgNPs aplikovaných v hydroponii byl pozorován v případě kořenů i oddělených listů ječmene jarního, naopak největší změny fotosyntetických parametrů byly zaznamenány při aplikaci na kořeny tabáku virginského. Při jednorázovém postřiku nedošlo k žádné významné změně u žádného rostlinného druhu.</p>
Klíčová slova	chlorofylová fluorescence, fotosyntéza, huseníček rolní, ječmen jarní, nanočástice stříbra, postřik, růst, tabák virginský, vojtěška setá
Počet stran	95
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Renata Trajerová
Title of thesis	Comparison of effect of silver nanoparticles in different plant species
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Thanks to their rich use, the production of consumer products that contain silver nanoparticles (AgNPs) is still growing. This leads to an increasing release of these nanoparticles into the environment, which can have an impact on ecosystems and human health. Vegetation can be significantly impaired by the increasing amount of heavy metals in the environment and by their bioaccumulation. For this reason, it is necessary to gain knowledge about the behavior and impact of AgNPs on the environment and plants. The effect of AgNPs on higher plants has so far been little studied, and is expected to be affected, among other things, by the plant species and by the method of application. The aim of the work was to compare the effect of AgNPs applied by different ways in selected plant species (<i>Nicotiana tabacum</i>, <i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Hordeum vulgare</i>, <i>Medicago sativa</i>). The effect of AgNPs was estimated from changes in chlorophyll fluorescence parameters reflecting function of primary photosynthetic processes. In general, the effect of AgNPs was very low. The smallest impact of AgNPs applied hydroponically was observed in case of roots and detached leaves of barley. On the contrary, the largest changes of photosynthetic parameters were recorded in case of application on roots of tobacco. There was no significant change in any plant species by the single spray method.</p>
Keywords	chlorophyll fluorescence, photosynthesis, arabidopsis, barley, silver nanoparticles, spraying, growth, tobacco, alfalfa
Number of pages	95
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne .....

.....

### Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D. za vedení, čas a nesmírnou trpělivost při psaní práce a také kolektivu oddělení za ochotu a pomoc.

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	8
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	9
2.1 Nanotechnologie a nanočástice.....	9
2.2 Výroba.....	10
2.3 Nebezpečí na lidské zdraví.....	10
2.4 Interakce v půdě.....	11
2.5 Transport rostlinou.....	11
2.6 Vliv na rostliny.....	13
2.6.1 Růst.....	13
2.6.2 Fotosyntéza.....	14
2.7 Metodiky aplikace nanočástic na rostliny.....	15
2.7.1 Hydroponie.....	15
2.7.2 Postřik.....	17
2.8 Vliv nanočástic stříbra na různé druhy rostlin.....	17
2.8.1 Tabák virginský ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	17
2.8.2 Huseníček rolní ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.).....	18
2.8.3 Ječmen jarní ( <i>Hordeum vulgare</i> L.).....	19
2.8.4 Vojtěška setá ( <i>Medicago sativa</i> L.).....	20
3 MATERIÁL A METODY .....	21
3.1 Rostlinný materiál.....	21
3.2 Přístrojové vybavení.....	21
3.3 Použité chemikálie.....	21
3.4 Příprava rostlinného materiálu.....	21
3.5 Měření parametrů chlorofylové fluorescence.....	22
3.5.1 Stanovení parametru Fv/Fm.....	22
3.5.2 Stanovení časového průběhu parametrů chlorofylové fluorescence.....	23
3.6 Zpracování získaných dat.....	24
4 VÝSLEDKY.....	25
4.1 Tabák virginský ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	25
4.2 Huseníček rolní ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.).....	40
4.3 Ječmen jarní ( <i>Hordeum vulgare</i> L.).....	55
4.4 Vojtěška setá ( <i>Medicago sativa</i> L.).....	70
5 DISKUZE.....	85
6 ZÁVĚR.....	88
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	89

## SEZNAM ZKRATEK

Ag <sub>2</sub> SNPs	nanočástice sulfidu stříbrného
AgNPs – PVP	nanočástice stříbra s polyvinylpyrrolidonovým coatingem
AgNPs	nanočástice stříbra
F <sub>0</sub>	minimální intenzita fluorescence
F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub>	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
NFT	nutrient film technique
NPs	nanočástice
OECD	The Organization for Economic Co-operation and Development
PEPC	fosfoenolpyruvátcarboxylasa
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
ROS	reaktivní formy kyslíku
RuBisCo	ribulóza-1,5bisfosfátcarboxylasa/oxygenasa
SDS	dodecylsíran sodný
Φ <sub>f,d</sub>	kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů
ΦNPQ	kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení
ΦP	efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Za posledních několik let došlo k velkému rozvoji v nanotechnologickém odvětví při výrobě kovových nanočástic, zvláště pak nanočástic stříbra. Nanočástice se přirozeně vyskytují v přírodě jako součást vulkanického popele a minerálů nebo jsou připravovány člověkem. Nanočástice stříbra se používají v elektrotechnickém průmyslu, strojírenství, v oděvnictví, kosmetice, ale i v medicíně. Díky jejich stále rostoucí celosvětové produkci roste pravděpodobnost možného úniku do ekosystému, zejména pak do půdy a vody. Pokud jsou rostliny vystaveny prostředí kontaminovanému nanočásticemi stříbra, může to negativně ovlivnit jejich růst a výnos. V případě, že by docházelo k akumulaci nanočástic stříbra v rostlinách, které jsou základem potravního řetězce, existují zdravotní rizika také pro živočichy, člověka nevyjímaje.

Díky charakteristickým vlastnostem nanočástic, mezi které patří velikost do 100 nm, a velmi velký poměr povrchu ku objemu, se tyto nanočástice dobře akumulují v půdách, kde reagují s organickými látkami. K přímému kontaktu mezi nanočásticemi jakéhokoliv druhu a rostlinou pak dochází prostřednictvím kořene. Pokud nanočástice do kořene proniknou skrz endodermální buňky, mohou se dostat cévními svazky až do nadzemních orgánů. Doposud získané informace ukazují, že absorpce, transport a akumulace nanočástic v rostlinách závisí jak na jejich fyzikálních a chemických vlastnostech, tak i na druhu rostliny.

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších procesů na Zemi, při kterém v rostlinách, dochází k přeměně světelné energie na energii chemickou. V poslední době bylo zjištěno, že účinkem nanočástic stříbra dochází k ovlivnění fotosyntézy, zejména na úrovni množství chlorofylu, fotosyntetických enzymů a funkce fotosystému II.

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše týkající se nanočástic stříbra, se zaměřením na jejich vliv na rostliny při hydroponické aplikaci a aplikaci postřiku. V experimentální části bylo cílem srovnat účinek stříbrných nanočástic při různých způsobech aplikace (aplikace na kořeny, řapíkem nebo řezem listu a postřikem na listy) na tabák virginský, huseníček rolní, ječmen jarní a vojtěšku setou se zaměřením na změny fotosyntetických parametrů. Jako negativní kontrola byla v experimentech použita aplikace dusičnanu stříbrného.



## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Nanotechnologie a nanočástice

Nanotechnologie je věda vyrábějící a manipulující s materiály v měřítku řádově jednotek až desítek nanometrů. V poslední době je vývoj nanočástic směřován do vyspělých technologií v oblastech zemědělství a medicíny, což může významně přispět ke zmírnění dopadů na životní prostředí výrobou ekologicky šetrnějších a účinnějších pesticidů se schopností potlačit také abiotický stres (Khodakovskaya et al., 2016a). Velký přínos v ochraně rostlin vůči patogenům mají zejména nanočástice stříbra (Nair et al. 2010).

Během posledních několika let došlo k průlomovému pokroku v nanotechnologickém průmyslu při výrobě různých typů nanočástic (Patra et al., 2020). S jejím nárůstem však roste také pravděpodobnost kontaminace životního prostředí. Specifické vlastnosti nanočástic jim umožňují dlouhodobě přetrvávat v přírodě.

Rozlišujeme tři druhy nanočástic dle původu. Přírozeně se vyskytující nanočástice jsou součástí vulkanického popele, měsíčního prachu a minerálů. V průmyslové výrobě vznikají náhodné nanočástice v benzínu či naftě (Buzea et al., 2007). Nanočástice navržené a cíleně vyráběné člověkem se rozdělují do pěti kategorií: uhlíkové (např. C<sub>70</sub>, nanotrubičky), kovové (např. Au, Ag, Cu), magnetické (např. Fe, Co, Ni), dendrimery (nanočásticové polymery) a složeniny (kombinace nanočástic) (Lu et al., 2007).

Celosvětová roční produkce nanočástic stříbra (AgNPs) činí 320 až 480 tun (Nowack et al., 2011). Tyto nanočástice se využívají především v oděvnictví, v kosmetice a medicíně (Gottschalk et al., 2013; McGillicuddy et al., 2017).

Nanočástice jsou definovány svojí velikostí, která dosahuje od 1–100 nm (Love et al. 2005). Jsou variabilní nejen svojí velikostí, ale i tvarem. Mohou být ve tvaru koule, vláken, disků, čtverců i elipsoidů. Nejvíce flexibilní jsou kovové nanočástice díky jejich syntetické kontrole fyzikálních vlastností (Khodakovskaya et al., 2016b).

Díky své malé velikosti a vysoké reaktivitě mají nanočástice obecně velký dopad na životní prostředí (Rico et al., 2011). Nezbytnou podmínkou pro růst rostlin je půda, voda a atmosférické plyny. Všechny tyto složky prostředí mohou obsahovat nanočástice, které mohou následně ovlivnit růst rostlin včetně jejich výnosu, případně se v rostlinách či jejich produktech akumulovat (Judy et al., 2010).

## 2.2 Výroba

Nanočástice se vyskytují ve volné přírodě při erozích či požárech lesů nebo mohou být vytvořeny člověkem (Nowack a Bucheli, 2007). Ty můžeme rozlišovat podle typu použitého materiálu: kovy (Au, Ag, Fe) (Fedlheim a Foss, 2001), oxidy kovů ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (Fernández-García a Rodriguez, 2011), nekovy ( $\text{SiO}_2$ ) (Ehrman et al., 1999) a další.

Způsob výroby nanočástic stříbra je založen na fyzikálně-chemických technikách, mezi které patří gama záření (Flores-Rojas et al., 2018), chemická redukce (Khan et al., 2017) i elektrochemická reakce (Nasretdinova et al., 2015). Tyto cesty vedoucí k výrobě nanočástic jsou velmi efektivní, avšak finančně náročné a vznikají při nich toxické produkty (Tortella et al., 2020). Kapalná syntéza se využívá při přípravě anorganických nanočástic, přičemž se používají metody coprecipitace, micro-emulze či templátová syntéza (Cushing et al. 2004). V rámci plynné syntézy lze určovat velikost a tvar nanočástic a lze je vyrábět ve velkém množství (Jiang et al., 2007; Thimsen et al., 2008). V posledních letech je vývoj soustředěn na ekologicky šetrnější způsob výroby, tj. na biologickou, tzv. zelenou syntézu. Její součástí jsou mikroorganismy, řasy nebo rostliny, které se označují jako nanotovárny. S využitím této metody dochází k nižší produkci nebezpečného odpadu a výroba nanočástic je levnější (Tortella et al., 2020).

## 2.3 Nebezpečí pro lidské zdraví

Neschopnost související s akumulací nanočástic v životním prostředí je spojovaná s distribucí rostlinných produktů, které byly vystaveny nanočásticím a mohly by způsobit člověku zdravotní potíže. Nanočástice mohou být v těle pozvolna rozložitelné nebo naopak neschopné se rozložit. Fagocyty jsou buňky, které slouží k pohlcení a degradaci cizorodých látek, v našem případě tedy nanočástic. Větší množství nanočástic v těle může způsobit přehlcení fagocytů, což vede ke snížení obranyschopnosti organismu, vzniku zánětu a ovlivnění regulačních mechanismů enzymů (Herzog et al., 2007; Nel et al., 2006).

Lidské tělo má vyvinutu určitou toleranci k přirozeně se vyskytujícím se látkám. Tělo člověka může být vystaveno nanočásticím prakticky kdekoliv, pokožkou působením kosmetiky, inhalací na pracovištích, požitím, nebo v medicínském prostředí. Tedy nanočástice mohou vstoupit do těla několika způsoby. Skrz dermální cestu, plícemi nebo trávicí soustavou, a to buď primárně (konzumace kontaminovaných rostlin nebo rostlinných produktů) nebo sekundárně (produkty z živočichů krmených kontaminovanými rostlinami) (Thomas et al., 2013).

## 2.4 Interakce v půdě

Vzhledem ke každodennímu využití produktů obsahující nanočástice stříbra je velká pravděpodobnost možného úniku do prostředí při výrobě nebo jejich likvidaci (Yu et al., 2013). Toxicky mohou působit nanočástice jako takové nebo prostřednictvím iontů, které se z nich uvolňují. Způsob, kterým dochází k uvolnění iontů z nanočástic, je jejich rozpouštění. Jedná se o dynamický proces, který závisí na reaktivitě nanočástic a na obsahu živin v prostředí. Rozpustnost je dána také jejich organickým coatingem, který může podporovat nebo naopak inhibovat jejich rozpouštění (Sharma et al., 2014). U SDS a Tween coatingu bylo zjištěno, že mohou negativně ovlivnit rozpouštění nanočástic, citrátový coating naopak nikoliv (Li et al., 2011).

Jakmile se nanočástice dostanou do půdy mohou reagovat s organickými látkami, které jsou obsaženy v půdách. Čím vyšší obsah organických látek, tím je půda úrodnější. Organické látky svojí vysokou reaktivitou a značnou pohyblivostí mohou reagovat s nanočásticemi a ovlivnit jejich působení (Deb a Shukla, 2011). Vysoký obsah organických látek je založen na přítomnosti kyseliny humusové, fulvové, mastných kyselina, aminokyselin, hydrofilních kyselin a uhlovodíků (Nebbioso a Piccolo, 2013). Interakce mezi nanočásticemi a organickými látkami v půdách je zajišťována prostřednictvím elektrostatických, van der Waalsových a hydrofobních sil. Účinkem zvýšených elektrostatických a hydrofobních sil dochází ke snížení agregace a adsorpce organických látek k povrchu nanočástic (Dickson et al., 2012). Působením redoxních reakcí, které jsou založeny na přenosu elektronů, vznikají chemické transformace nanočástic (Lowry et al., 2012). Mezi další reakci, která dokáže ovlivnit působení nanočástic, zejména jejich náboj, toxicitu a schopnost uvolnit se do prostředí, patří sulfidace (Levard et al., 2011). Tyto chemické transformace mají schopnost zvýšit nebo naopak snížit toxicitu nanočástic (Mahendra et al., 2008; Lowry et al., 2012).

## 2.5 Transport rostlinou

Doposud získané informace ukazují, že absorpce, transport a akumulace nanočástic v rostlinách závisí jak na jejich fyzikálních a chemických vlastnostech, tak i na druhu rostliny, a také fakt, že jejich toxicita může být spojena s toxicitou příslušného prvku (Rico et al., 2011).

Distribuce nanočástic v rostlinách je ovlivněna především velikostí, tvarem a povrchem nanočástic, ale také velikostí stomat a pórů v buněčné stěně rostlin (Eichert et al., 2008; Schreck et al., 2012; Wang et al., 2013). Nanočástice jsou složeny z jádra a obalu. Jádro má variabilní tvar i velikost a obal ovlivňuje samotný rozměr částic a poskytuje náboj, který

stabilizuje částici v roztoku (Levard et al., 2012). Rychlost transportu nanočástic závisí také na jejich hydrofobicitě a náboji (Khodakovskaya et al., 2016b). Částice menších rozměrů snadno procházejí a ukládají se kdekoliv, kdežto větší částice procházejí hůře a více se hromadí hlavně v kořenové oblasti (Lin et al., 2009). Povrch nanočástic ovlivňuje jejich mobilitu. Díky hydrofilnímu povrchu se mohou snadno rozptýlit a být více pohyblivé v rostlině, zatímco nanočástice s hydrofobním povrchem mají tendenci agregovat (Darlington et al., 2009).

Primární místo interakce nanočástic s rostlinou souvisí s místem aplikace, zpravidla je to tedy oblast kořene nebo povrch listů (Navarro et al., 2008; Eichert et al., 2008). Přes kořen je transport veden prostřednictvím xylému a poté mohou být nanočástice vedeny skrz póry v buněčné stěně, apoplastickou nebo symplastickou cestou (Miralles et al., 2012). Jakmile dosáhnou cévního systému, tak jsou vedeny transpiračním proudem do nadzemních orgánů (Lin et al., 2009). Nanočástice, které přecházejí z listů jsou vedeny do stonku prostřednictvím floému (Wang et al., 2013). Jakmile se nanočástice dostanou do rostliny mohou být vedeny do jakékoliv její části přes plasmodezmata, aquaporiny, iontové kanály nebo se mohou vázat na organické látky (Rico et al., 2011). Existuje několik faktorů, které hrají zásadní roli v absorpci a transportu nanočástic. Nejedná se pouze o vlastnosti nanočástic a fyziologickou charakteristiku rostlin, ale i vnější podmínky jako je vlhkost či teplota prostředí (Su et al., 2019). Při vysoké teplotě a nízké vlhkosti dochází ke zmenšení až k uzavření průduchů, naopak se zvyšující se vlhkostí dochází ke zvýšení absorpce kovových nanočástic (Shahid et al., 2017).

Existuje několik mechanismů pro průnik nanočástic do buněk rostlin. Jedním z nich je difúze, kdy nanočástice stříbra pronikají přes lipidovou dvojvrstvu plazmatické membrány, avšak průchod je ovlivněn jak nábojem, velikostí, složením a hydrofobicitou částice, tak i složením a tekutostí plazmatické membrány (Verma et al., 2008). Vstup nanočástic v kapalně nebo pevně formě zajišťuje endocytóza, prostřednictvím vezikul nebo vazbou na membránové struktury jako jsou proteiny, lipidy či sacharidy (Rejman et al., 2004). K hromadění nanočástic dochází v buněčných elementech, mezi které patří buněčná stěna a vakuoly (Shahid et al., 2017; Li et al., 2020).

První testy týkající se aplikace nanočástic stříbra na rostliny byly provedeny u tykve obecné a vedly k závěru, že čím vyšší uvolnění iontů z AgNPs, tím vyšší koncentrace stříbra je v kořenech (Stampoulis et al., 2009). Jiné studie, například u brukve sítinovité, nezjistily po aplikaci AgNPs žádnou akumulaci stříbra v jakékoliv formě (Haverkamp a Marshall,

2009). Přítomnost AgNPs byla pozorována ve stoncích rostlin vojtěšky seté (Gardea-Torresdey et al., 2003).

## 2.6 VLIV NA ROSTLINY

### 2.6.1 Růst

Existuje mnoho způsobů, jak na kovové nanočástice rostliny reagují. Vliv na rostliny mohou mít samotné nanočástice nebo kovové ionty, které vznikají oxidací kovových nanočástic v půdě (Rico et al., 2011).

Ionty stříbra zvyšují hladinu reaktivních forem kyslíku (ROS), kdy dochází v rostlinách k poškození proteinů, nenasycených mastných kyselin a DNA, což může vyústit až k úhynu rostlin. Aquaporiny jsou vodní kanály tvořené transmembránovými proteiny, které jsou inhibovány účinkem stříbrných iontů, kdy dochází ke smrštění kanálů (Křížková et al., 2009). Etylen patří mezi nejdůležitější rostlinné hormony, který má vliv zejména na klíčení, růst, senescenci a odpověď na stresové faktory (Chen et al., 2005). Pozitivní dopad AgNPs byl pozorován u vývoje kořene šafránu setého, kdy došlo k blokaci signální dráhy ethylenu (Rezvani et al., 2012). Účinkem nanočástic dochází i k ovlivnění klíčení semen. Bylo zjištěno, že nanočástice dokážou zlepšit schopnost semen absorbovat vodu (Zheng et al., 2005), snížit oxidační stres redukcí tvorby peroxidu vodíku (Lu et al., 2002) a zvýšit produkci enzymů (Lei et al., 2008). Pozitivní účinek AgNPs na klíčení semen byl pozorován u kukuřice, cukety a melounu při koncentraci 0,5 – 2,5 mg · L<sup>-1</sup> (Almutairi a Alharbi, 2015).

Růst rostlin je charakterizován hlavně délkou kořenů, výhonků a počtem listů. Studium účinku nanočástic na rostliny se zaměřuje právě na tyto parametry (Rico et al., 2011). Při hydroponickém pěstování, tedy vystavení kořenů nanočásticím v roztoku, dochází buď k posílení příjmu živin nebo naopak k jeho potlačení.

Yin et al. (2011) uvádějí, že velikost AgNPs ovlivňuje míru průniku nanočástic do rostlin, a tedy i jejich působení na růst rostlin. Tento fakt byl zjištěn u jílku mnohokvětého při jeho vystavení různým velikostem nanočástic. Nanočástice menších rozměrů (6 nm) způsobily signifikantní redukci růstu kořenů a výhonků v porovnání s rostlinami, na které byly aplikovány větší AgNPs (25 nm).

Jak již bylo zmíněno, účinek je ovlivněn jak ze strany fyzikálních a chemických vlastností nanočástic, tak i ze strany rostlinného druhu. Kromě výše uvedeného negativního vlivu nanočástic na růst byl zjištěn i vliv pozitivní – např. zvýšení délky kořenů, stonků, listů a zvýšený obsah chlorofylu u fazol obecné a kukuřice při koncentracích 20, 40 a 60 mg · L<sup>-1</sup> AgNPs aplikovaných v půdě (Salama 2012). U brukve měly AgNPs pozitivní dopad na růst kořenů a výhonků při koncentraci 25 a 50 mg · L<sup>-1</sup>, nejvyšší účinnost fotosystému II byla

taktéž zaznamenána při koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Naopak se zvyšující se koncentrací došlo k negativní dopadu (Sharma et al. 2012). Studie Gruyer et al. (2013) zaznamenala pozitivní i negativní účinek AgNPs, pozitivní v případě růstu kořenů ječmene jarního, a naopak inhibici růstu u salátu. U huseníčku rolního byl proveden experiment se třemi odlišnými morfologiemi AgNPs. Závěrem experimentů bylo, že desetistěnné AgNPs jevily nejvyšší pozitivní efekt na kořeny, zatímco sférické nanočástice neměly žádný pozorovatelný účinek (Syu et al., 2014). U cukety, která byla testována při hydroponických podmínkách v roztoku AgNPs, nevykazovaly nanočástice žádný signifikantní účinek na růst, avšak došlo ke snížení transpirace způsobené dlouhodobou expozicí nanočástic (Stampoulis et al., 2009).

## 2.6.2 Fotosyntéza

Fotosyntéza patří mezi jeden z nejdůležitějších procesů na Zemi. Je založena na přeměně světelné energie na energii chemickou za účasti chlorofylu. Potřebná energie je uložena v sacharidových vazbách. Celý proces probíhá v chloroplastech. Pro zahájení fotosyntézy je potřeba světelné energie, oxidu uhličitého a vody, což jsou látky, které jsou v přírodě hojně dostupné. Účinnost přeměny energie je u rostlin pouhých 2–4 % (Kirschbaum, 2011). Tento fakt vede vědce ke snaze o zlepšení současné přeměny energie s využitím nanočástic, které dokážou proniknout do rostlin a mají schopnost ovlivnit jejich fotosyntetický aparát (Rico et al., 2011).

Účinnost fotosyntézy se opírá nejen o udržení dostatečného příjmu oxidu uhličitého (Mediavilla et al., 2001), ale i o funkčnost mezofylových buněk, chloroplastů, tylakoidních membrán, enzymu ribulosa-1,5bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa (RuBisCo) a přítomnost chlorofylu *a* i chlorofylu *b* spolu s proteiny tylakoidů (Wang et al., 2014; Sáez et al., 2017). Nanočástice dokážou zmírnit škodlivý účinek UV záření, díky čemuž dochází ke zvýšení fotosyntézy, snížení oxidačního stresu, zvýšení obsahu chlorofylu, enzymu RuBisCo a přeměny energie (Hong et al., 2005; Gao et al., 2006). Kovové nanočástice mohou inhibovat fotosyntézu zvýšenou produkcí volných radikálů a ROS, které mohou zapříčinit oxidaci jednotlivých složek fotosyntézy (Patra et al., 2020). Mohamed et al. (2017) zjistili, že se zvyšující se koncentrací AgNPs dochází ke snížení obsahu chlorofylu.

U pelargonie páskaté byly naměřeny zvýšené obsahy antioxidantů a fotosyntetických pigmentů při působení AgNPs ( $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Ghorbanpour a Hatami, 2014). Naopak u huseníčku rolního účinkem AgNPs ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) došlo ke zvýšení oxidačního stresu v chloroplastech, které vedlo ke snížení obsahu chlorofylu a dalších fotosyntetických pigmentů a následně k inhibici růstu (Li et al., 2018). Vlivem AgNPs aplikovaných na listy huseníčku rolního došlo k poškození tylakoidních membrán, což později vedlo

k negativnímu ovlivnění růstu (Qian et al., 2013). Sedmidenní expozice AgNPs vedla k signifikantnímu snížení obsahu chlorofylu a karotenoidů v rýži (Nair a Chung, 2014a). Podle práce Rastogi et al. (2019) dochází v pšenici vlivem AgNPs (1 a 5 mM) k poškození fotosystému I (PSI) i fotosystému II (PSII). Při koncentraci 5 mM došlo k silnému potlačení fotochemických procesů v chloroplastech, což mělo fatální dopad na rostliny, zatímco při koncentraci 1 mM byla snížena účinnost fotosyntetického transportu elektronů.

## **2.7 METODIKY APLIKACE NANOČÁSTIC NA ROSTLINY**

### **2.7.1 Hydroponie**

Nejdostupnější a nejrozšířenější metodou pěstování rostlin je pěstování v půdě či půdním substrátu. Tato metoda poskytuje rostlinám celou řadu nezbytných živin a minerálů pro správný růst (Ellis et al., 1974). Nese ale i řadu omezení jako je riziko vysušení, výskyt mikroorganismů či geografické podmínky, z tohoto důvodu se na vzestup dostává hydroponické pěstování (Beibel, 1960).

Slovo hydroponie pochází ze složenin dvou řeckých slov hydro a ponos, v doslovném překladu je to „pracující voda“ (Benton, 2005). Poprvé byla tato metoda popsána v roce 1937 ve vědeckém článku, jehož autorem byl W. F. Gericke, který se jako první zajímal o hydroponické pěstování. Existuje několik různých způsobů hydroponického pěstování, avšak všechny vychází ze společného základu, tj. pěstování rostlin bez půdy, s vodou obohacenou o potřebné živiny s možností mechanické podpory jako je písek nebo štěrk.

Výhody hydroponie zahrnují možnost pěstování plodin v místech, kde půda není schopna splňovat potřebné podmínky pro růst rostlin nebo při její kontaminaci. Nevyžaduje náročnou péči, zajišťuje maximální výnos, díky čemuž je ekonomicky prospěšná (Benton, 2005). Pěstování rostlin v hydroponii je výhodnější než v půdě, vlivem nepřítomnosti škůdců a patogenů mezi které se řadí např. srpovnička (*Fusarium*) a přeslenatka (*Verticillium*), které způsobují vadnutí rostlin. Hydroponie umožňuje monitorování růstu i obsahu živin u kořenů rostlin, což by v půdě bylo značně obtížné (Franco et al., 2012; Papadopoulos et al., 2008, Savvas, 2002).

Hydroponické systémy rozdělujeme do několika typů v závislosti na jejich konstrukci. Nejjednodušší systém je tzv. knotový, který nevyžaduje žádné speciální vybavení. Mechanickou podporou rostlin je perlit s nylonovým knotem ponořeným v roztoku, odkud rostlina čerpá potřebné živiny. Systém je vhodný pro malé rostliny, které nevyžadují velké množství vody (Shrestha a Dunn, 2013). Příliv-odlivový systém je charakterizován svým názvem, kdy ke kořenům rostlin je v daných časových intervalech přiváděno určité množství vody. Po přelití rostliny dochází k odtoku přebytečné vody (Nielsen et al., 2006). Kapkový

system je svou strukturou podobný příliv-odlivovému s několika výjimkami – jednotlivé rostliny mají svůj individuální přítok vody a přebytečná voda je vedena zpět do nádrže ve formě kapek, odkud je opět čerpána k rostlinám. Je využíván širokým spektrem pěstitelů od laiků zahrádkářů po zkušené zemědělce (Rouphael a Colla, 2005). Systém hluboké vody a NFT (Nutrient Film Technique) jsou metody, které vyžadují sledování hodnot obsahu kyslíku, pH, salinity i nutričních hodnot. V systému hluboké vody jsou rostliny umístěny v síťovině, kdy jejich kořeny mohou čerpat vodu a živiny. Metoda NFT byla vynalezena v druhé polovině 20. století a je založena na cirkulaci vody a živin (Domingues et al., 2012).

Hydroponické pěstování má značně menší spotřebu vody v porovnání s pěstováním v zemině, kde většina vody se vsákne hluboko do půdy a stává se nedostupnou pro kořeny rostlin, kdežto v hydroponii jsou kořeny ponořeny ve vodě. Tím jsou neustále zajišťovány potřebné látky a nedochází ke ztrátám vody (Choi et al., 2012). V současné době hydroponické pěstování umožňuje efektivně a ekologicky dosáhnout maximálního výtěžku v zemědělství (Butler and Oebker, 2006). Řadí se mezi jednu z nejrychleji se rozvíjejících se metod pěstování, která v budoucnu může vést ke zvýšené produkci potravin v zemích třetího světa.

Gruyer et al. (2014) provedli experiment, který se zaměřil na porovnání účinku AgNPs a AgNO<sub>3</sub> (1 a 2,5 mg · L<sup>-1</sup>) v hydroponickém pěstování a půdě. Negativní účinek byl pozorován u salátu při hydroponickém pěstování, zatímco v půdě nebyly pozorovány žádné změny oproti kontrole (KNO<sub>3</sub>). To může být vysvětleno vzájemnou interakcí nanočástic stříbra a stříbrných iontů s organickými látkami obsaženými v půdě. Nanočástice stříbra mohou v půdě vytvářet shluky nebo reagovat s ligandy, což může vést k oslabení jejich dostupnosti a účinku (Colman et al., 2012; Pan a Xing, 2012). Noori et al. (2020) vedli experiment, který byl zaměřen na porovnání účinku AgNPs – PVP a AgNO<sub>3</sub> na rajče v hydroponickém prostředí. Po týdenním vystavení účinku stříbra došlo ke snížení růstu vůči kontrole. Hodnoty obsahu peroxidu vodíku a malondyaldehydu, které odrážejí oxidační stres, byly několikanásobně zvýšeny. Zároveň došlo ke stimulaci antioxidantů působením AgNPs a stříbrných iontů uvolněných z AgNO<sub>3</sub>. Větší poškození bylo pozorováno u rostlin pod vlivem AgNO<sub>3</sub>.



## 2.7.2 Postřik

Půda je hlavním zdrojem pro prospěšný růst rostlin. Při kvetení a produkci semen vyžadují rostliny zvýšený příjem vody i živin. Příjem nutričních látek a vody z půdy nese řadu nevýhod, kdy anorganické látky mohou být zadržovány v půdě v nerozpustných formách nebo při působení přírodních vlivů (Alshaal a El-Ramady, 2017). Při inhibici růstu kořenů, dochází ke snížení nebo potlačení příjmu živin (Trobisch a Schilling, 1970).

Po aplikaci nanočástic metodou postřiku, dochází k jejich průniku do rostliny prostřednictvím pokožky listu nebo stomaty. Následně nanočástice procházejí mezibuněčnými prostory (tzv. apoplastickou cestou) nebo skrz buňky (tzv. symplastickou cestou) (Lv et al., 2019; Ullah et al., 2020;).

Sadak (2019) provedl experiment, při kterém porovnával různé koncentrace AgNPs při foliární aplikaci na pískavici řecké seno. Zjistil, že nižší koncentrace AgNPs (20 a 40 mg · L<sup>-1</sup>) měla pozitivní účinky na rostliny, kdežto vyšší koncentrace AgNPs (60 mg · L<sup>-1</sup>) vykazovala negativní dopad. Účinkem nižších koncentrací došlo k podpoře růstu výhonků i k vyššímu obsahu fotosyntetických pigmentů (zejména chlorofylu *a* i *b*, a karotenoidů) a auxinů. Rezvani et al. (2012) uvádějí, že právě nižší koncentrace AgNPs (zejména 40 mg · L<sup>-1</sup>), která podporuje růst rostlin, vede k blokaci signální dráhy ethylenu u pískavice řecké seno. Vyšší množství fotosyntetických pigmentů vede ke zvýšení rychlosti fotosyntézy, a tedy i fotosyntetické produkce, která se projeví rychlejším růstem rostliny (Sadak, 2019).

Cocozza et al. (2019) uskutečnili experiment, který se zaměřil na rychlost transportu AgNPs prostřednictvím kořenů a listů u dubu pýřitého, borovice lesní a topolu černého. Autoři zjistili, že u všech vybraných stromů byla rychlost transportu AgNPs rychlejší při foliární aplikaci než přes kořeny.

## 2.8 VLIV NANOČÁSTIC STŘÍBRA NA RŮZNÉ DRUHY ROSTLIN

### 2.8.1 Tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.)

Studie Cvjetko et al. (2018) se soustředila na účinek nanočástic stříbra s citrátovým coatingem na kořenech a listech tabáku ve srovnání s dusičnanem stříbrným. Při aplikaci AgNPs i AgNO<sub>3</sub> zjistili nižší koncentraci stříbra v listech oproti kořenům, což naznačuje predominantní akumulaci stříbra v kořenech. Vyšší množství stříbra v kořenech bylo akumulováno z AgNPs než z AgNO<sub>3</sub>. I v další práci bylo zjištěno, že v kořenech tabáku virginského bylo akumulováno signifikantně vyšší množství stříbra než ve výhoncích (Geisler-Lee et al. 2014).

Při vystavení účinku AgNPs s citrátovým coatingem a AgNO<sub>3</sub> při koncentraci 100 μM v MS médiu došlo k ovlivnění tloušťky listů u tabáku v porovnání s kontrolou (Peharec Štefanič et al., 2021). Nejtenčí listy byly u AgNPs, kde došlo ke snížení počtu buněk v parenchymatickém pletivu a zvětšení objemu chloroplastů bez známek poškození thylakoidů. Ovlivnění listů při vystavení AgNO<sub>3</sub> bylo minimální oproti AgNPs.

Při působení kovových nanočástic dochází ke stresu rostlin spojeným se zvýšenou produkcí ROS (Balén et al., 2011; Tkalec et al., 2014). U tabáku virginského, který byl vystaven účinku AgNO<sub>3</sub> v koncentraci 100 a 500 μM, došlo ke zvýšení obsahu ROS, zatímco žádný efekt nebyl pozorován pod vlivem AgNPs při stejné koncentraci. Autoři předpokládají, že při vystavení účinku AgNPs nedošlo u tabáku ke zvýšení ROS v porovnání s AgNO<sub>3</sub>, protože AgNPs zůstávaly ve formě nanočástic a neuvolňovaly se z nich toxické stříbrné ionty jako v případě AgNO<sub>3</sub> (Cvjetko et al., 2018). Stříbro se akumulovalo v kořenové oblasti ve vakuolách, které mohou být jedny z hlavních organel pro uložení AgNPs (Cvjetko et al., 2018).

Odlišné výsledky byly naopak zjištěny u pšenice, kdy AgNPs a AgNO<sub>3</sub> měly srovnatelný negativní dopad na rostliny při koncentraci 20, 40 a 60 mg · L<sup>-1</sup> v MS médiu (Barbasz et al., 2016), došlo ke zvýšení peroxidace lipidů i oxidace proteinů. Změny obsahu ROS a oxidačního stresu vyvolané AgNPs jsou tedy ovlivněny druhem rostliny (Cvjetko et al., 2018).

### **2.8.2 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)**

Studie Ke et al. (2018) se zaměřila na účinek AgNPs a AgNO<sub>3</sub> při hydroponickém pěstování huseníčku rolního po dobu 3 dnů při koncentracích 1 a 2,5 mg · L<sup>-1</sup>. Během testování došlo ke zpomalení růstu listů u AgNPs i AgNO<sub>3</sub>, tedy listy byly méně narostlé než u kontrol a při vyšší koncentraci u AgNPs byly pozorovány drobné žluté skvrny na povrchu listů, listy byly zvadlé a chlorotické. Proces růstu kořenů byl také inhibován. Efekt AgNPs byl větší než efekt AgNO<sub>3</sub>. Tyto závěry se shodují i se studií Qian et al. (2013), ve které bylo zjištěno, že aplikací AgNPs dochází ke snížení obsahu chlorofylu v rostlinách, zatímco stříbrné ionty uvolněné z AgNO<sub>3</sub> takový efekt nevykazovaly. Výsledky práce Nair a Chung (2014b) zaznamenaly větší poškození kořenových vlásků a inhibici procesu růstu kořenů při vystavení AgNPs (1 mg · L<sup>-1</sup>) oproti AgNO<sub>3</sub>. Nižší obsah biomasy byl zaznamenán u huseníčku rolního při aplikaci AgNPs v koncentraci 5 mg · L<sup>-1</sup>, zatímco u 1 mg · L<sup>-1</sup> a 2,5 mg · L<sup>-1</sup> došlo ke stimulaci růstu působením AgNPs (Kaveh et al., 2013).

Při hydroponickém vystavení rostlin huseníčku stříbrným nanočásticím došlo během tří dnů k signifikantnímu poklesu obsahu chlorofylu *a* i *b* o více jak 30 % v porovnání

s kontrolou, nižší pokles byl pozorován u  $\text{AgNO}_3$  (Ke et al., 2018). Došlo také ke zvýšení obsahu antokyanů vlivem obou roztoků, vyšší hodnoty byly zaznamenány při účinku AgNPs (Ke et al., 2018). V uvedené práci bylo dále zjištěno, že jak AgNPs, tak i  $\text{AgNO}_3$  měly negativní dopad na fotosyntézu, přičemž silnější inhibice byla pozorována při aplikaci AgNPs. K ovlivnění růstu a fotosyntetické aktivity docházelo podle autorů z důvodu poškození kořene, jakožto důležitého orgánu zajišťujícího potřebné živiny.

Inhibice růstu kořene vlivem AgNPs v MS médiu ( $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) byla u huseníčku rolního zjištěna ve studii Sosan et al. (2016), kdy listy byly oproti kořenům ovlivněné méně, což potvrzuje primární účinek AgNPs na kořeny rostlin. Slabé ovlivnění listů tito autoři vysvětlují částečným transportem nanočástic z kořenů prostřednictvím xylému (Sosan et al., 2016). Geisler-Lee et al. (2012) pozorovali hnědé zbarvení kořenových špiček u huseníčku rolního při působení AgNPs. Kořenové špičky jsou kyselé a vylučují sliz, který je chrání před patogeny, a zachycují se zde i samotné nanočástice stříbra, jak na povrchu, tak i uvnitř. Kořenové špičky obsahují mimo jiné i kmenové buňky, které mohou být ovlivněny AgNPs. Tedy, hnědé zbarvení kořenových špiček je viditelný fenotyp pro pravděpodobnou toxicitu vyvolanou AgNPs (Geisler-Lee et al., 2012).

### **2.8.3 Ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L.)**

Ječmen jarní je celosvětově využívaná plodina, která se řadí mezi čtvrtou nejpěstovanější obilovinu na světě (Ullrich, 2011).

V experimentu autorů González – Linares et al. (2020) byly studovány účinky AgNPs aplikovaných do půdních substrátů. Jednalo se o druh půdy Delacour a OECD při koncentraci  $\text{Ag}$   $366 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Došlo k inhibici růstu ječmene u obou druhů půdy, přičemž míra inhibice byla závislá na koncentrací AgNPs, tedy se zvyšující se koncentrací AgNPs rostla inhibice růstu kořenů i výhonků ječmene. V obou půdách s aplikovanými nanočásticemi byly kořeny ječmene zakrnělejší než u kontroly, u půdy Delacour byly také pozorovány hustší kořeny. Růst stonků byl také inhibován a u listů byla viditelná chloróza. V kořenech byla zaznamenána několikanásobně vyšší koncentrace AgNPs než ve stoncích. Vyšší citlivost ječmene vůči AgNPs byla zjištěna v půdě OECD, což autoři dávají do souvislosti s nižším příjmem stříbra rostlinami právě v půdě OECD, která se vyznačovala nižší koncentrací vápníku a kyselejším pH oproti půdě Delacour. Vápník v půdě byl absorbován přednostně rostlinou, díky čemuž došlo ke snížení absorpce iontů stříbra. S nižším pH došlo k rychlejší oxidaci AgNPs, který způsobil větší uvolňování stříbrných iontů do půdy (Luo et al. 2008). Změna koncentrace vápníku a hodnoty pH může mít vliv na množství stříbra interagujícího s rostlinami (González – Linares et al., 2020).

#### 2.8.4 Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.)

Vojtěška setá je hojně pěstovaná luštěnina původem z Asie a Iránu, jejíž celosvětová produkce přesahuje 436 milionů tun ročně (Ehsanpour a Razavizadeh, 2005; Bora a Sharma, 2010). Řadí se mezi nejstarší plodiny na světě a díky své vysoké produkci má široké uplatnění zejména v zemědělství a v potravinářství, ale i v medicíně (Steppler, 1987). Studiemi Gardea-Torresdey et al. (1998) a Peralta-Videa et al. (2004) bylo prokázáno, že vojtěška dokáže velmi dobře akumulovat těžké kovy z půdy a vody.

Studie Stegemeier et al. (2015) zjistila zvýšenou akumulaci stříbra v kořenech vojtěšky při jejím hydroponickém pěstování s nanočásticemi sulfidu stříbrného ( $\text{Ag}_2\text{S-NPs}$ ), nanočásticemi stříbra s polyvinylpyrrolidonovým coatingem ( $\text{AgNPs-PVP}$ ) a s  $\text{AgNO}_3$  při koncentraci  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . V kořenech vojtěšky byla zjištěna nejvyšší koncentrace stříbra při aplikaci  $\text{AgNPs} - \text{PVP}$  ve srovnání s kontrolou (silikátové nanočástice). Výhonky vykazovaly minimální hromadění stříbra bez ohledu na jeho aplikovanou formu. Nejvyšší koncentrace stříbra byla v případě  $\text{AgNPs} - \text{PVP}$  zaznamenána v kořenové čepičce a v prodlužovací zóně, zatímco stříbrné ionty z  $\text{AgNO}_3$  byly v kořeni akumulovány rovnoměrně.

Provedené experimenty u vojtěšky seté zjistily transport stříbra rostlinou, z kořenů až do nadzemních orgánů. Nejvyšší koncentrace stříbra byla naměřena v kořenech, především v kořenové čepičce (Stegemeier et al., 2015). Negativní dopad  $\text{AgNPs}$  na růst a obsah fotosyntetických pigmentů v rostlinách vojtěšky nebyl doposud prozkoumán. V nedávné době byl u vojtěšky popsán pozitivní účinek nanočástic  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  na růst listů a obsah chlorofylu při koncentraci  $25 \mu\text{M}$  v perlitu (Askary et al., 2018).

## **3 MATERIÁL A METODY**

### **3.1 Rostlinný materiál**

V experimentech byly AgNPs aplikovány na kořeny, řapíky (popř. řezy listů) a listy čtyř druhů rostlin. Jednalo se o tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun), huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L., ekotyp Col -0), ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos) a vojtěšku setou (*Medicago sativa* L. cv. Morava). Pro pěstování rostlin byly použity květináče, které byly naplněny půdním substrátem (Potgrond H, Klasman – Deilmann, Německo). Rostliny byly pravidelně zalévány Knopovým roztokem. U ječmene jarního byl pro pěstování použit perlit. Pro růst rostlin za definovaných podmínek sloužila fytokomora (Snijders Scientific, Nizozemí). Pěstební podmínky zahrnovaly teplotu 21 °C (16 hodin světlo/ 8 hodin tma), ozáření byla 100  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (50 %). Výjimkou byl huseníček rolní, který byl pěstován při teplotě ve fytotronu 22 °C/20 °C a krátkém dni (8 hodin světlo/ 16 hodin tma), ozáření 100  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Relativní vlhkost vzduchu byla ve všech případech 60 %. Po aplikaci AgNPs nebo během ní byly rostliny či listy inkubovány ve fytokomoře za stejných podmínek, za jakých byly pěstovány (s výjimkou teploty u huseníčku, kdy byla použita teplota 20 °C). Experimenty byly provedeny v srpnu – září 2020. Stáří rostlin (před aplikací roztoků) bylo u tabáku virginského 4 týdny, u huseníčka rolního 5 týdnů, u ječmene jarního 1 týden a u vojtěšky seté 3 týdny.

### **3.2 Přístrojové vybavení**

fluorescenční zobrazovací systému FluorCam FC 800-0 (PSI, Drásov, ČR)

fytokomora (Snijders Scientific, Nizozemí)

### **3.3 Použité chemikálie**

Dusičnan stříbrný (500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Nanočástice stříbra s citrátovým coatingem (13  $\text{mg Ag}\cdot\text{L}^{-1}$ ) – připraveny a poskytnuty P. Andrýskovou a A. Václavkovou (KEFa KBF PřF UP), koncentrace stříbra stanovena dr. T. Pluháčkem (ACH PřF UP)

Tween (0,5 %)

Deionizovaná voda

### **3.4 Příprava rostlinného materiálu**

Vybrané rostlinné druhy byly napěstovány v květináčích při definovaných podmínkách ve fytokomoře nebo fytotronu. Po dosažení určitého stáří byly rostliny (příp. oddělené listy) přemístěny z plastových květináčů do eppendorfek různé velikosti v závislosti na druhu a

testované části. Pro experimenty byly vybrány reprezentativní rostliny bez zjevného poškození.

Rostliny, u kterých byla prováděna aplikace na kořeny, byly den předem vyjmuty z květináčů, jejich kořeny očištěny a omyty od zeminy a poté vloženy do eppendorfek s deionizovanou vodou. Podobně, v případě aplikace na oddělené listy byly tyto odděleny den před měřením a umístěny řapíkem či řezem do eppendorfky s deionizovanou vodou. Rostliny, na jejichž listy byly aplikovány testované roztoky pomocí postřikovače, byly ponechány v květináčích. Eppendorfky s vloženými kořeny byly vždy obaleny v alobalu, aby se zabránilo jejich vystavení světlu. Vliv vybraných roztoků byl sledován při jejich několikadenní aplikaci na kořeny nebo řapíky či řezy oddělených listů ponořené v příslušných roztocích a při jednorázovém postřiku listů. U jednorázového postřiku listů byl aplikován přibližně 1 ml roztoku na každou rostlinu.

Rostliny byly sledovány celkem sedm dnů, měření probíhalo těsně před aplikací roztoků („0. den po aplikaci“; dpa) a poté 1., 3. a 6. dpa. Pro každou variantu (kombinaci roztoku, způsobu aplikace a druhu rostliny) bylo provedeno 6 opakování. Jako kontrolní roztok sloužila deionizovaná voda (v případě aplikace na kořeny a řapíky či řezy listů) nebo 0,5% roztok Tween (v případě aplikace postřikem na listy). Jako negativní kontrola byl použit roztok dusičnanu stříbrného ( $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Nanočástice stříbra s citrátovým coatingem byly použity v koncentraci  $13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### **3.5 Měření parametrů chlorofylové fluorescence**

Rostlinné druhy byly podrobeny měřením ve fluorescenčním zobrazovacím systému FluorCam FC 800-0 (PSI, Drásov, ČR) s cílem zjištění parametrů chlorofylové fluorescence během působení vybraných roztoků. Před zahájením měření byly vždy rostliny (příp. listy) zatemněny po dobu 20 minut v temné komoře. Poté byly vzorky vloženy do Fluorcamu a bylo zahájeno měření fluorescence pomocí automatizované procedury. V rámci ní byl nejprve změřen parametr  $F_v/F_m$  (viz dále) a poté bylo aplikováno červené aktinické světlo po dobu přibližně 7 min, během které byly pomocí série saturačních pulsů stanoveny fluorescenční parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{NPQ}$  a  $\Phi_{f,d}$  (viz dále).

#### **3.5.1 Stanovení parametru $F_v/F_m$**

Parametr  $F_v/F_m$  vyjadřuje maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ve stavu adaptovaném na tmu. Poměr je vypočítán jako  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ , kde  $F_m$  je maximální intenzita chlorofylové fluorescence měřená při aplikaci saturačního pulsu a  $F_0$  je minimální intenzita fluorescence měřená pomocí velmi slabého měřicího světla. U zdravé nestresované

rostliny se hodnota  $F_v/F_m$  pohybuje nad hodnotou 0,8, při stresu či poškození tato hodnota klesá (Špundová et al., 2003). Pro stanovení  $F_m$  byla použita 100% intenzita saturačního pulsu (přibližně  $2000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### 3.5.2 Stanovení časového průběhu dalších parametrů chlorofylové fluorescence

Dalšími parametry chlorofylové fluorescence, které byly použity za účelem posouzení vlivu AgNPs na funkci fotosyntetického aparátu, byly parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{NPQ}$  a  $\Phi_{f,d}$ . Ty byly měřeny během tzv. fluorescenční indukce chlorofylu, kdy je měřený rostlinný vzorek osvětlen aktinickým světlem a postupně tedy přechází ze stavu adaptovaného na tmu do stavu adaptovaného na světlo. Bylo použito červené aktinické světlo o intenzitě přibližně  $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a během přibližně 7 min bylo postupně aplikováno 12 saturačních pulsů ( $2000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

$\Phi_P$  vyjadřuje efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (PSII) v průběhu adaptace vzorku na světlo a odráží, kolik absorbované světelné energie je následně využito ve fotosyntetických procesech. Je vypočítán jako:

$$\Phi_P = \frac{(F_{m'} - F_t)}{F_{m'}}$$

kde  $F_{m'}$  je maximální intenzita fluorescence vzorku osvětleného aktinickým světlem měřená pomocí saturačního pulsu a  $F_t$  je intenzita fluorescence v čase  $t$  aktinického světla. U standardních nestresovaných vzorků parametr  $\Phi_P$  rychle narůstá, kdežto při stresu se jeho nárůst zpomaluje a  $\Phi_P$  dosahuje nižší saturační hodnoty.

$\Phi_{NPQ}$  vyjadřuje kvantový výtěžek nefotochemického zhášení a je definovaný jako:

$$\Phi_{NPQ} = \frac{F_t}{F_{m'}} - \frac{F_t}{F_m}$$

U nestresovaných rostlin tento parametr zpravidla rapidně roste v první minutě po osvětlení a poté klesá. Jeho průběh je ale ovlivněn i dalšími faktory, mezi které patří intenzita použitého aktinického světla a světelné podmínky při růstu rostlin. Rostlina absorbuje velké množství energie, které hlavně na začátku osvětlení není využito ve fotosyntéze, a proto dochází k nárůstu nefotochemického zhášení, aby se zabránilo poškození fotosyntetického aparátu. Při plné aktivaci fotosyntézy ve stavu adaptovaném na světlo dochází k poklesu parametru  $\Phi_{NPQ}$ . U mírně stresovaných rostlin je zpravidla zaznamenán pomalejší prvotní nárůst a vyšší saturační hodnota  $\Phi_{NPQ}$ , zatímco při silném poškození je  $\Phi_{NPQ}$  výrazně inhibován a naopak roste  $\Phi_{f,d}$ .

$\Phi_{f,d}$  vyjadřuje kvantový výtěžek bazálního nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu. Zvýšení jeho hodnot odráží výrazné poškození PSII.  $\Phi_{f,d}$  se vypočte jako:

$$\Phi_{f,d} = \frac{F_t}{F_m}.$$

Podíl zmíněných tří kvantových výtěžků vyjadřuje, jak je absorbovaná světelná energie využita ve fotosyntéze. Jejich součet dává číslo 1 (100 %) (Lazár, 2015). Nemění-li se hodnota  $\Phi_P$ , není ovlivněna funkce PSII. Pokud klesá  $\Phi_P$  a roste  $\Phi_{NPQ}$ , jedná se o mírný stres, kdy  $\Phi_{f,d}$  neroste. PSII není poškozen, ale absorbuje se více excitací, než kolik je jich využito ve fotosyntéze a tím se aktivují ochranné zhášecí procesy, což se projeví nárůstem  $\Phi_{NPQ}$ . Při silném stresu, tedy silném poškození PSII, se prohlubuje pokles  $\Phi_P$  a roste  $\Phi_{f,d}$ .

V práci jsou prezentovány hodnoty parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{NPQ}$  a  $\Phi_{f,d}$  v ustáleném stavu adaptovaném na světlo, a to jednak formou sloupcových grafů (průměry a směrodatné odchylky), jednak formou koláčových grafů (průměry) pro ilustrativnější zobrazení podílu jednotlivých kvantových výtěžků.

### 3.6 Zpracování dat

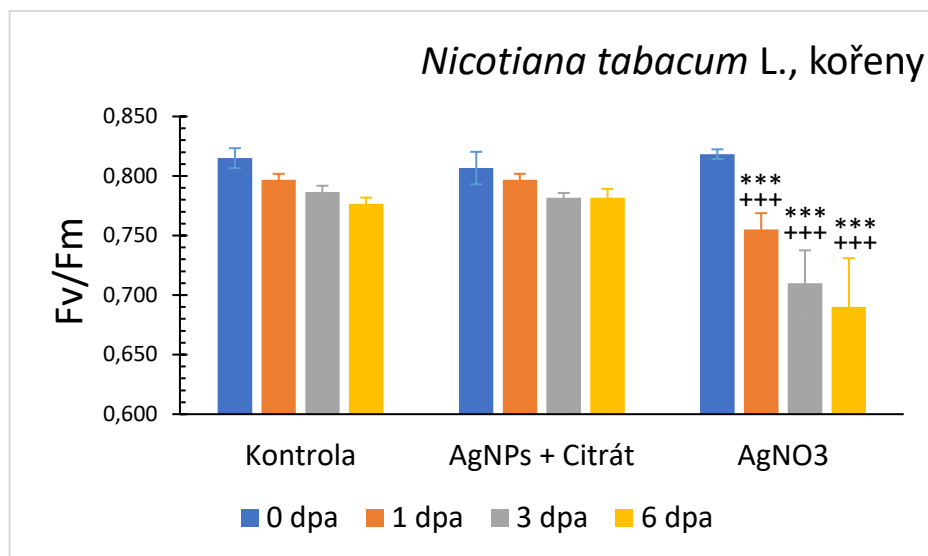
Získaná data byla zpracována v programu FluorCam (PSI, Drásov, ČR) a Microsoft Office Excel. Statistická významnost rozdílů mezi vybranými variantami byla zjištěna pomocí t-testu.

Statisticky významné rozdíly parametrů v příslušný den po aplikaci vůči kontrole (deionizovaná voda) jsou v obrázcích ve výsledkové části označeny symbolem „-“ (u varianty AgNPs+citrát) a „\*“ (u varianty AgNO<sub>3</sub>). Statisticky významné rozdíly parametrů mezi variantami AgNPs+citrát a AgNO<sub>3</sub> jsou označeny symbolem „+“. Tři symboly označují statisticky významný rozdíl na hladině  $P < 0,001$ , dva symboly na hladině  $P < 0,01$  a jeden symbol na hladině  $P < 0,05$ .

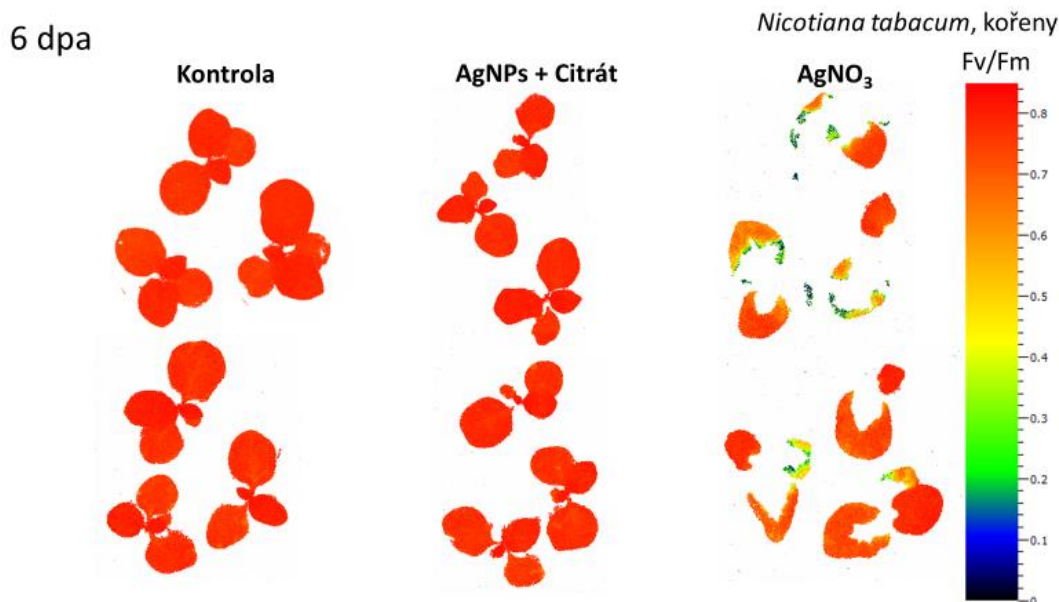


## 4 VÝSLEDKY

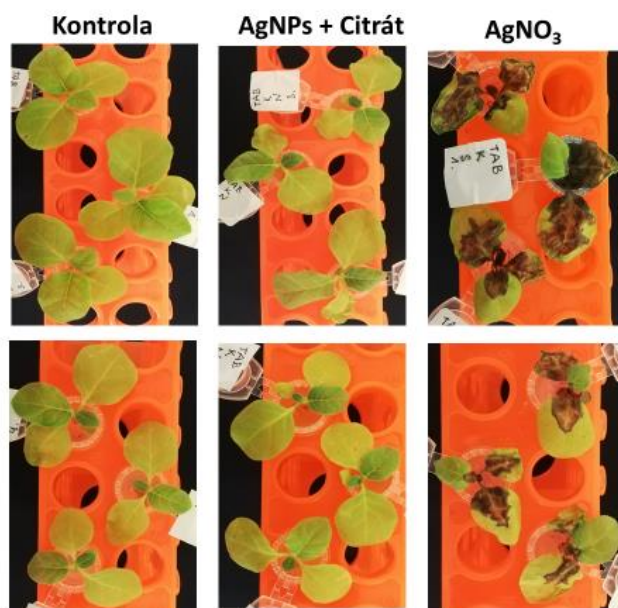
### 4.1 Tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.)



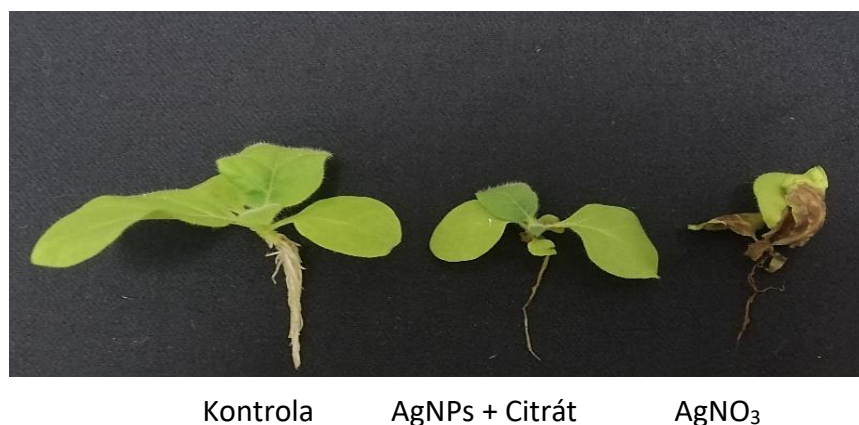
Obr. 1 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).



Obr. 2 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.

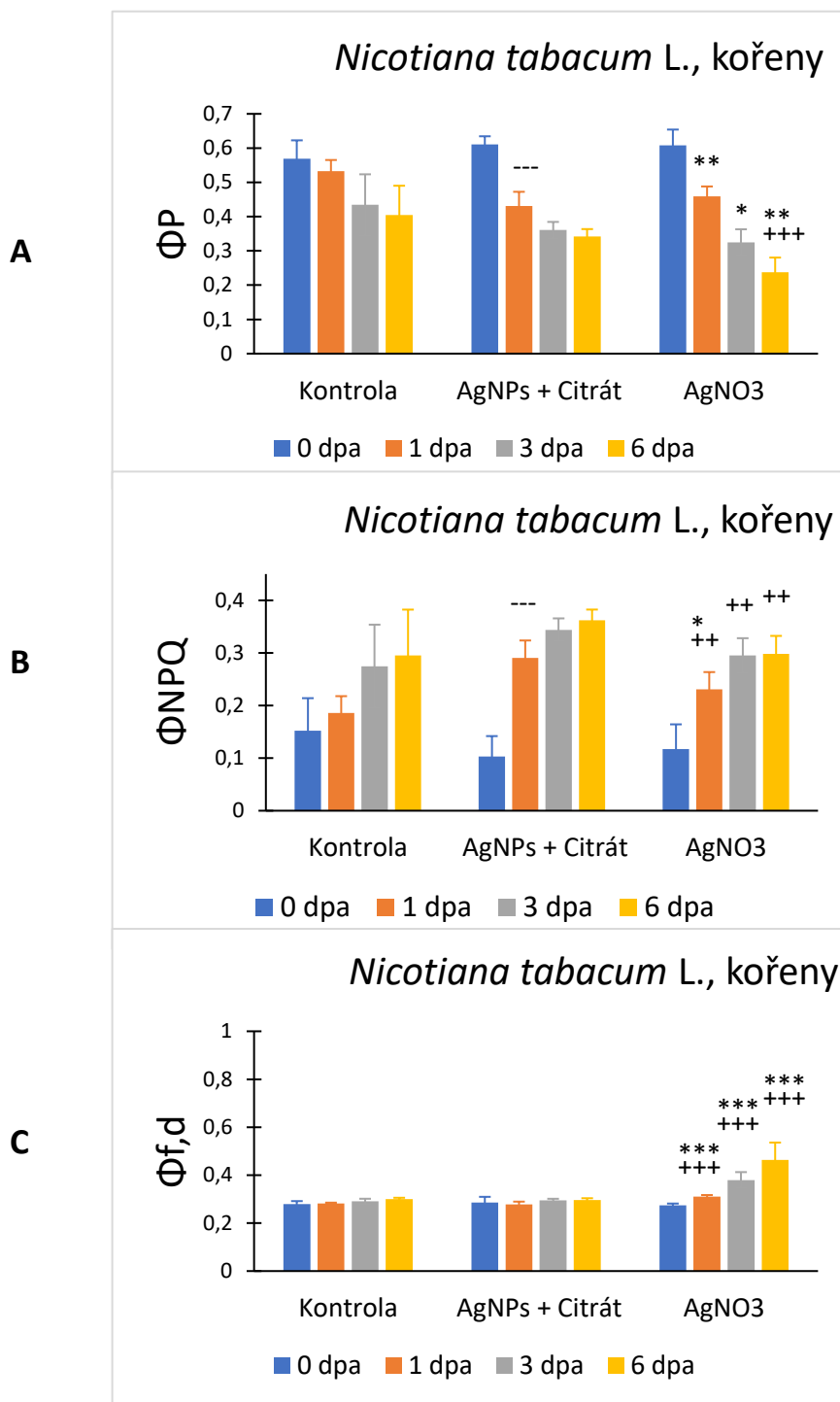


Obr. 2 B) Fotografie měřených rostlin.



Obr. 3 Vizuální porovnání kořenů vybraných rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a  $\text{AgNO}_3$  na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.

Vyjmutí rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) z květináčů s půdním substrátem a vložení jejich kořenů do deionizované vody způsobilo během 6 dnů experimentálního testování pokles parametru Fv/Fm (Obr. 1 a Obr. 2 A, Kontrola). U rostlin, jejichž kořeny byly vystaveny účinku nanočástic stříbra, nebyl zjištěn rozdíl v parametru Fv/Fm oproti kontrole, zatímco po aplikaci  $\text{AgNO}_3$  došlo během 6 dnů k signifikantnímu snížení Fv/Fm, tedy ke zhoršení funkce PSII (Obr. 1, Obr. 2 A). Poslední den měření (6. den) byla velká část listů rostlin u  $\text{AgNO}_3$  nekrotická (Obr. 2 B), z tohoto důvodu nebyla v těchto částech detekována fluorescence chlorofylu. Nanočástice stříbra sice neměly negativní vliv na Fv/Fm, avšak jejich aplikace potlačila růst kořenů (Obr. 3).

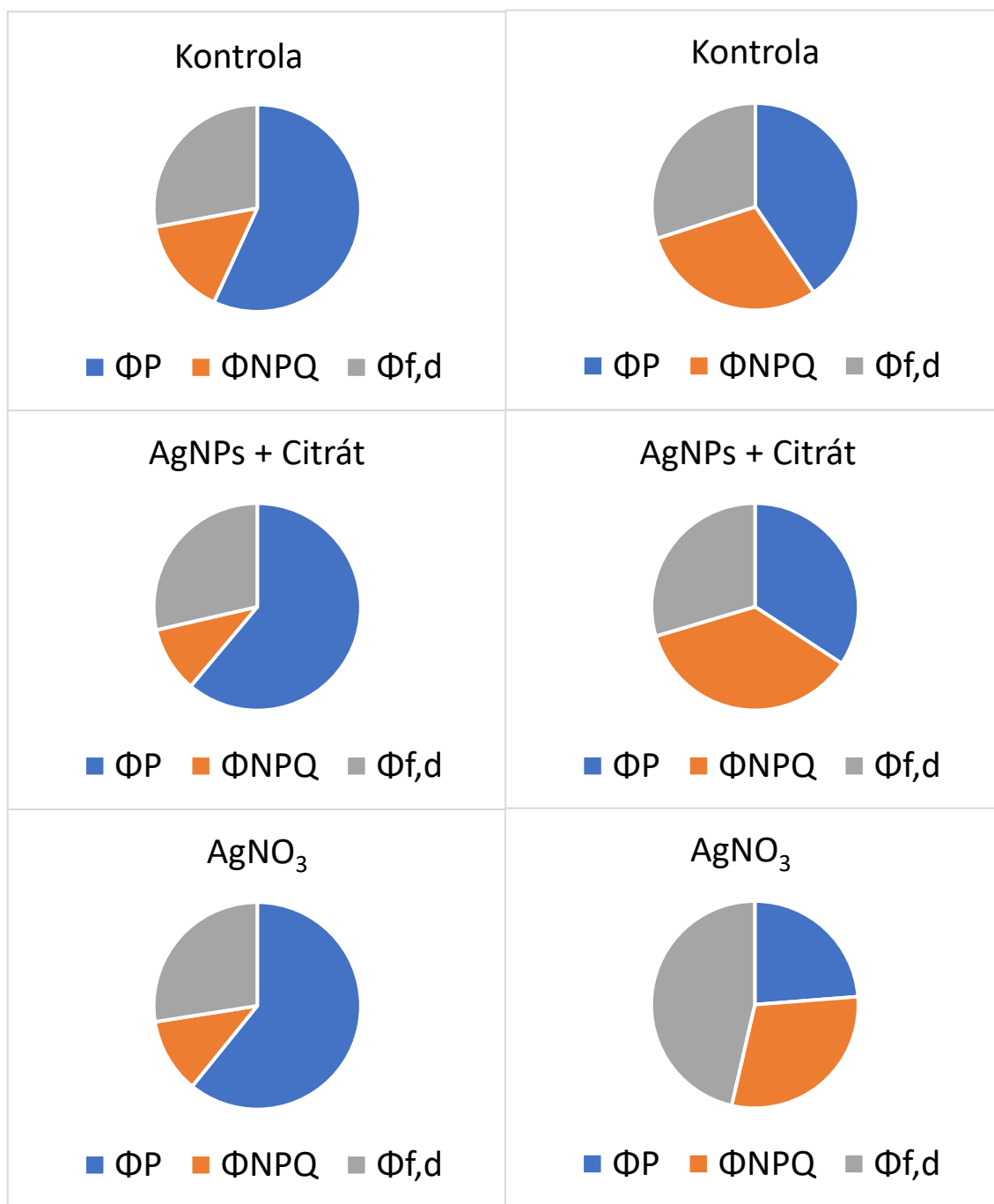


Obr. 4 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

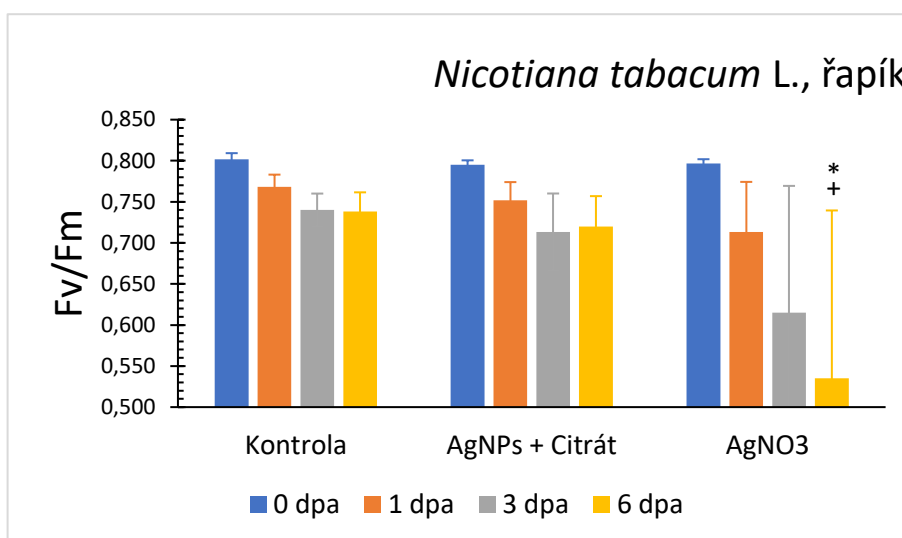
*Nicotiana tabacum* L., kořeny

6 dpa



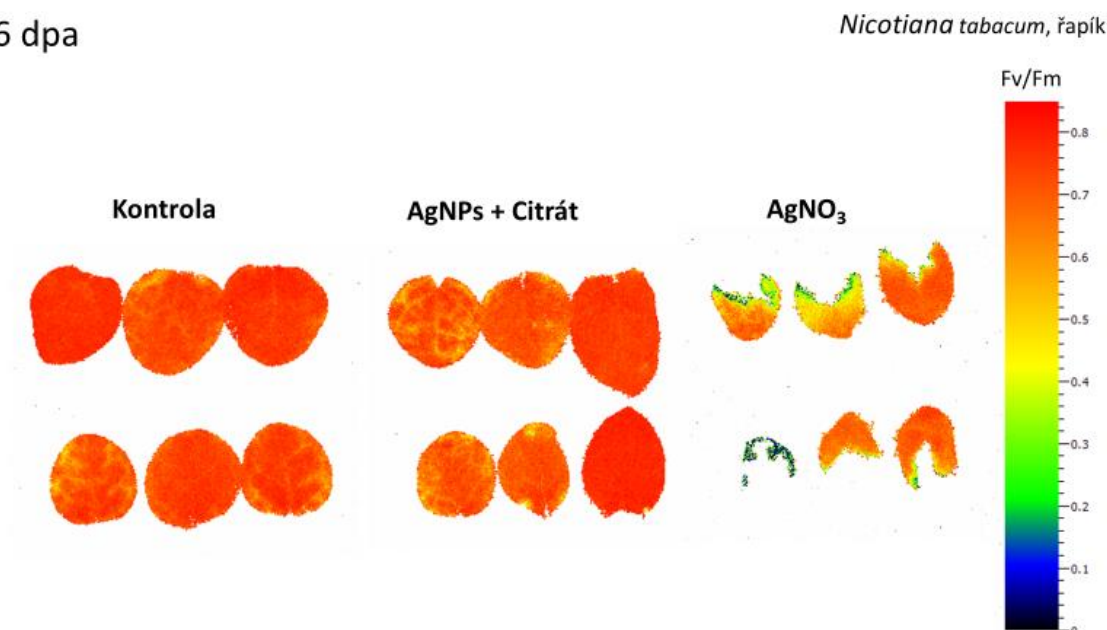
Obr. 5 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

Během experimentálního testování, které trvalo 6 dnů, byl v případě kontrolních rostlin zjištěn pokles ustálené hodnoty parametru  $\Phi_P$ , zatímco hodnota  $\Phi_{NPQ}$  rostla. Parametr  $\Phi_{f,d}$  se neměnil (Obr. 4). Naměřené změny hodnot odrážejí mírné zhoršení fotochemické funkce PSII, které jsou spojené s mírnou stimulací ochranných nefotochemických procesů. První den po aplikaci nanočástic stříbra na kořeny rostlin byla naměřena nižší hodnota  $\Phi_P$  a vyšší hodnota  $\Phi_{NPQ}$  v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 4) indikující vyšší stimulaci ochranných procesů. V následujících dnech měření toto zvýšení již nebylo signifikantní. Již od prvního dne aplikace dusičnanu stříbrného na kořeny tabáku virginského byly hodnoty parametru  $\Phi_P$  nižší a u  $\Phi_{f,d}$  naopak vyšší (Obr. 4). Tímto faktem se potvrzuje, že  $\text{AgNO}_3$  způsobuje výrazné poškození fotosyntetického aparátu. Z Obr. 5 je patrné, že u kontrolních rostlin a rostlin ovlivněných nanočásticemi stříbra byl pokles  $\Phi_P$  spojen s nárůstem  $\Phi_{NPQ}$ , tedy se stimulací ochranných procesů, zatímco u rostlin pod vlivem  $\text{AgNO}_3$  narostl parametr  $\Phi_{f,d}$ , což značí zmíněné výrazné poškození.

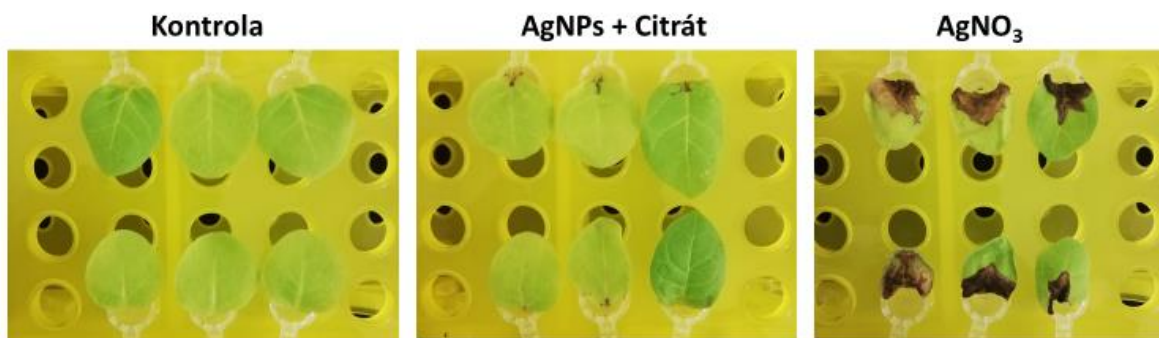


Obr. 6 Parametr Fv/Fm měřený na listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy přes řapík. Řapíky kontrolních listů byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížek označuje statisticky významný rozdíl variantě AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

6 dpa

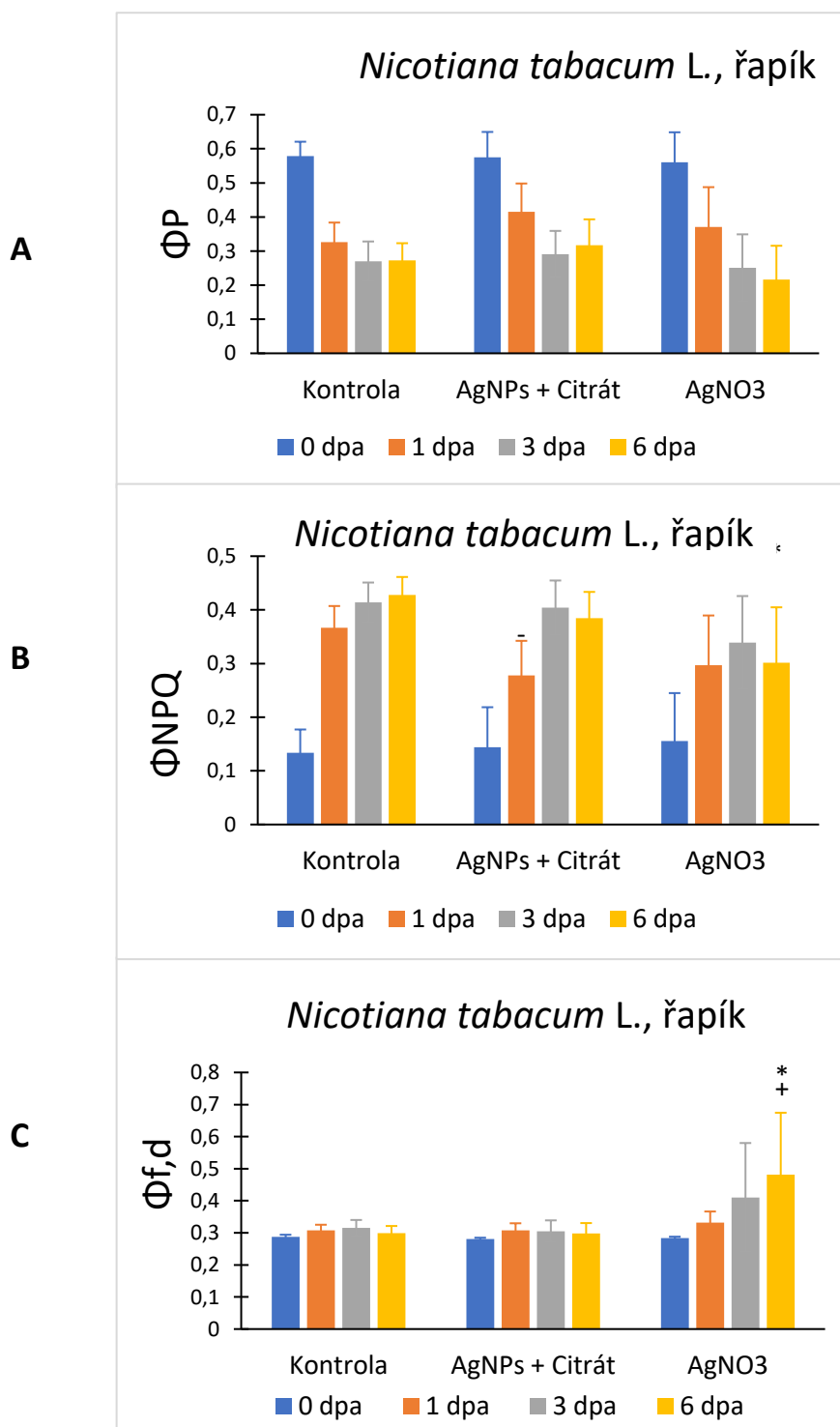


Obr. 7 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u listů tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody.



Obr. 7 B) Fotografie měřených listů.

Oddělení listů tabáku virginského a jejich vložení do deionizované vody způsobilo během 6 dnů experimentálního testování pokles parametru  $F_v/F_m$  (Obr. 6 a Obr. 7 A, Kontrola). Nanočástice stříbra významně neovlivnily parametr  $F_v/F_m$  oproti kontrolním listům. Aplikace  $AgNO_3$  urychlila pokles  $F_v/F_m$ , nicméně u naměřených hodnot byl velký rozptyl, protože listy byly různě zasaženy a významný rozdíl oproti kontrole i listům pod vlivem AgNPs byl zaznamenán až 6. den po oddělení (Obr. 6 a Obr. 7 A). Byla pozorována výrazná nekróza u listů v  $AgNO_3$  a mírně také v AgNPs u báze listů, kde pravděpodobně docházelo k jejich akumulaci (Obr. 7 B).



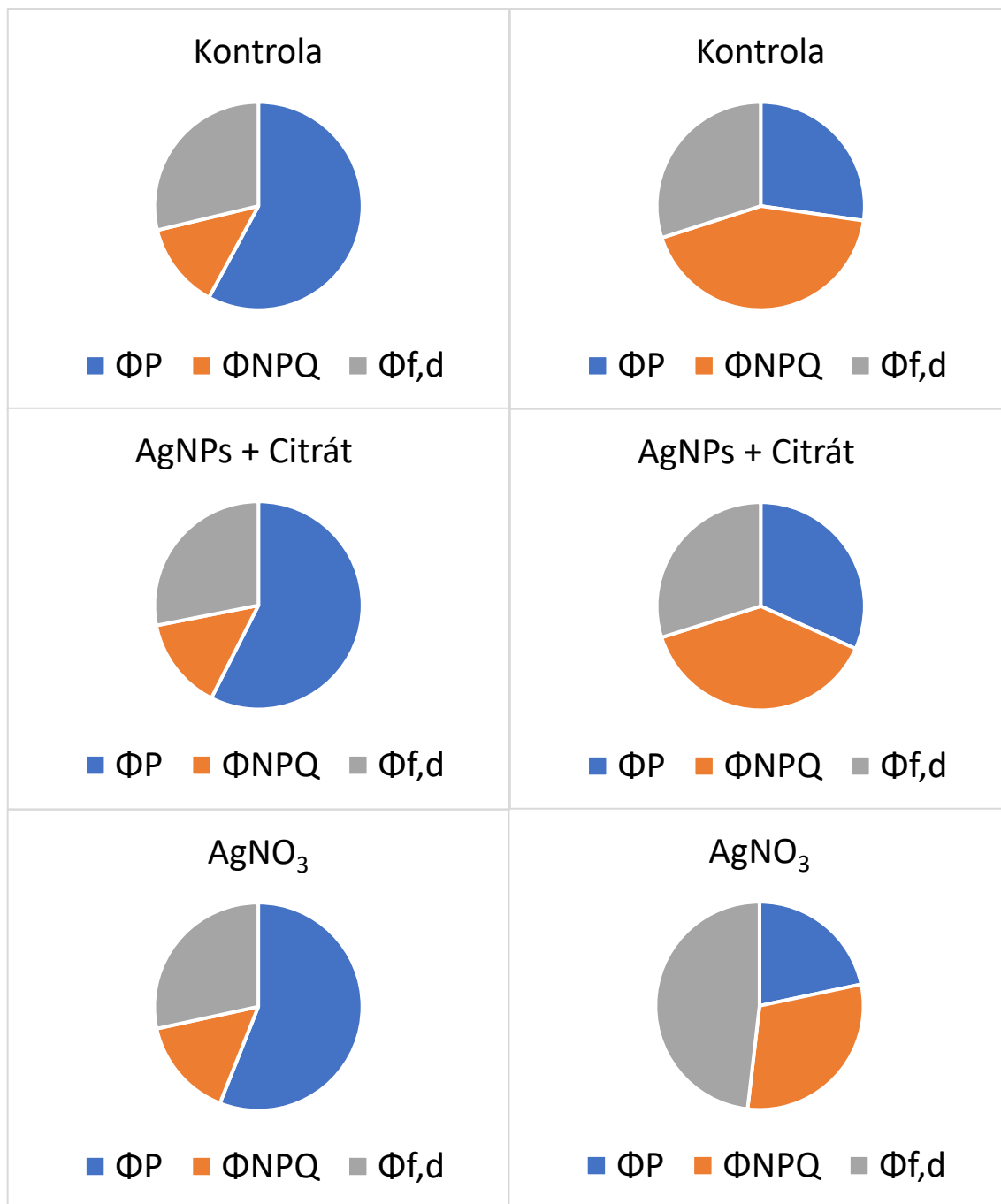
Obr. 8 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u listů tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl oproti příslušný den po aplikaci (t-test).



0 dpa

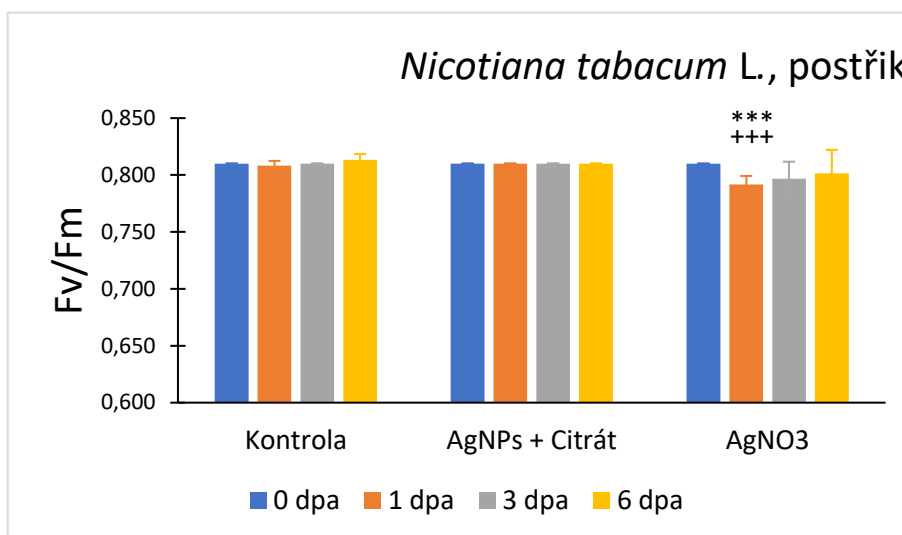
*Nicotiana tabacum* L., řapíky

6 dpa



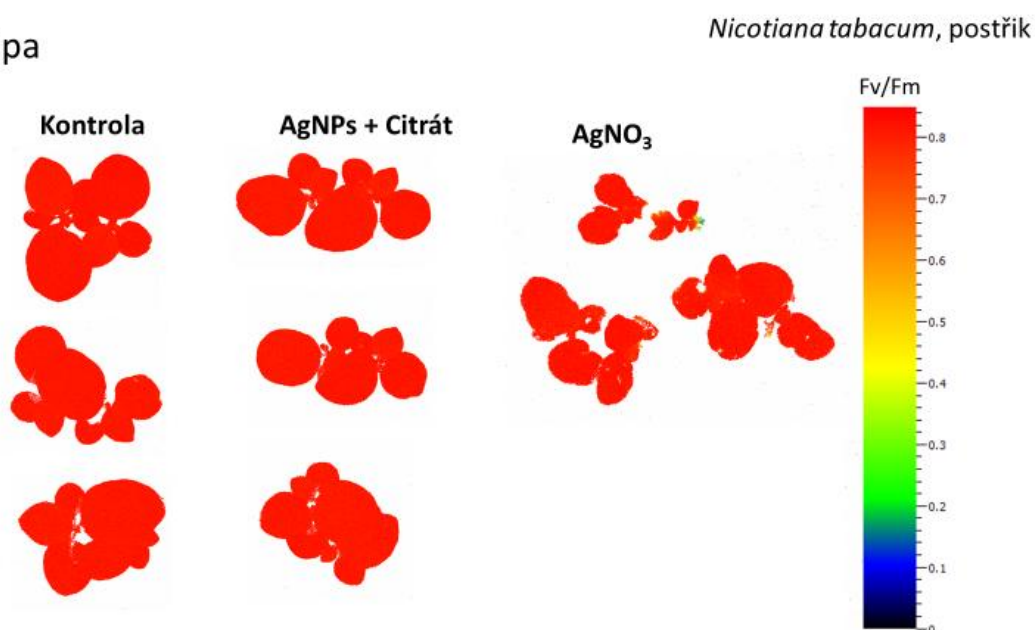
Obr. 9 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u listů tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

U kontrolních listů tabáku virginského bylo během experimentálního testování zjištěno, že první den po aplikaci došlo k poklesu parametru  $\Phi_P$ , zvýšení  $\Phi_{NPQ}$  a parametr  $\Phi_{f,d}$  se nezměnil (Obr. 8 Kontrola). Šestý den byla hodnota parametru  $\Phi_{NPQ}$  u listů vyšší (Obr. 8 Kontrola) než u celých rostlin s kořeny inkubovanými ve vodě (Obr. 4 Kontrola), což značí, že u oddělených listů byly ochranné zhašecí procesy stimulovány více než u celých rostlin. U listů s AgNPs nebyla stimulace ochranných procesů pozorována,  $\Phi_{NPQ}$  bylo podobné jako u kontroly. Vliv AgNPs a  $AgNO_3$  na  $\Phi_P$  a  $\Phi_{NPQ}$  byl podobný (Obr. 8). V souladu s výraznějším poklesem  $F_v/F_m$  byl šestý den zaznamenán nárůst  $\Phi_{f,d}$  značící výrazný negativní účinek  $AgNO_3$  (Obr. 8 a Obr. 9).

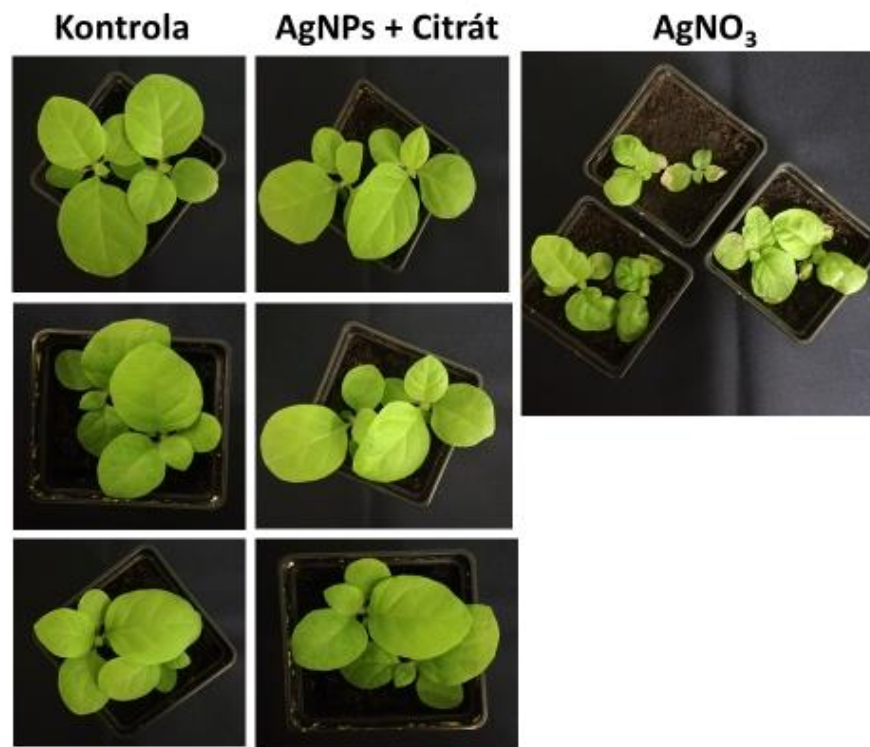


Obr. 10 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. Kontrolní rostliny byly postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

6 dpa

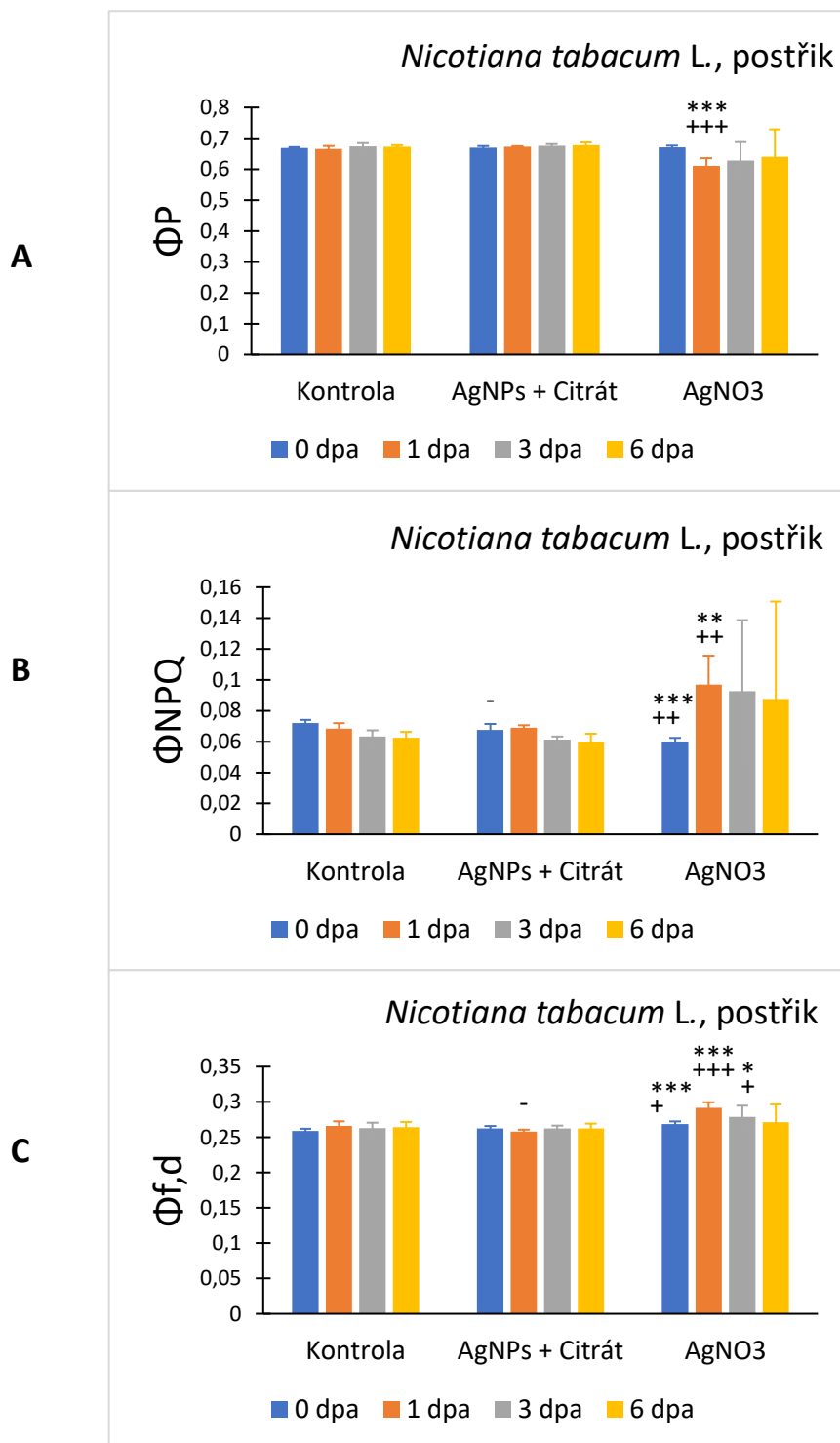


Obr. 11 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween.



Obr. 11 B) Fotografie měřených rostlin.

Po jednorázovém postřiku listů tabáku virginského, který byl proveden nultý den po změření fluorescenčních parametrů, nebyl během následujících šesti dnů experimentálního testování pozorován pokles parametru  $F_v/F_m$  (Obr. 10 a Obr. 11 A, kontrola). Rostliny tedy nebyly, jakkoliv stresované a PSII byl plně funkční. Ani u rostlin, které byly vystaveny postřiku nanočástic stříbra, nebyly zjištěny změny v parametru  $F_v/F_m$ , zatímco po aplikaci  $AgNO_3$  došlo 1. den po aplikaci k velmi mírnému poklesu  $F_v/F_m$  (na hodnotu přibližně 0,78). V dalších dnech však hodnota  $F_v/F_m$  už neklesala (Obr. 10), takže funkce fotosystému II nebyla inhibována. Aplikace  $AgNO_3$  nicméně způsobila výraznou inhibici růstu rostlin, takže byly v porovnání s ostatními značně menšího vzrůstu (Obr. 11 B).

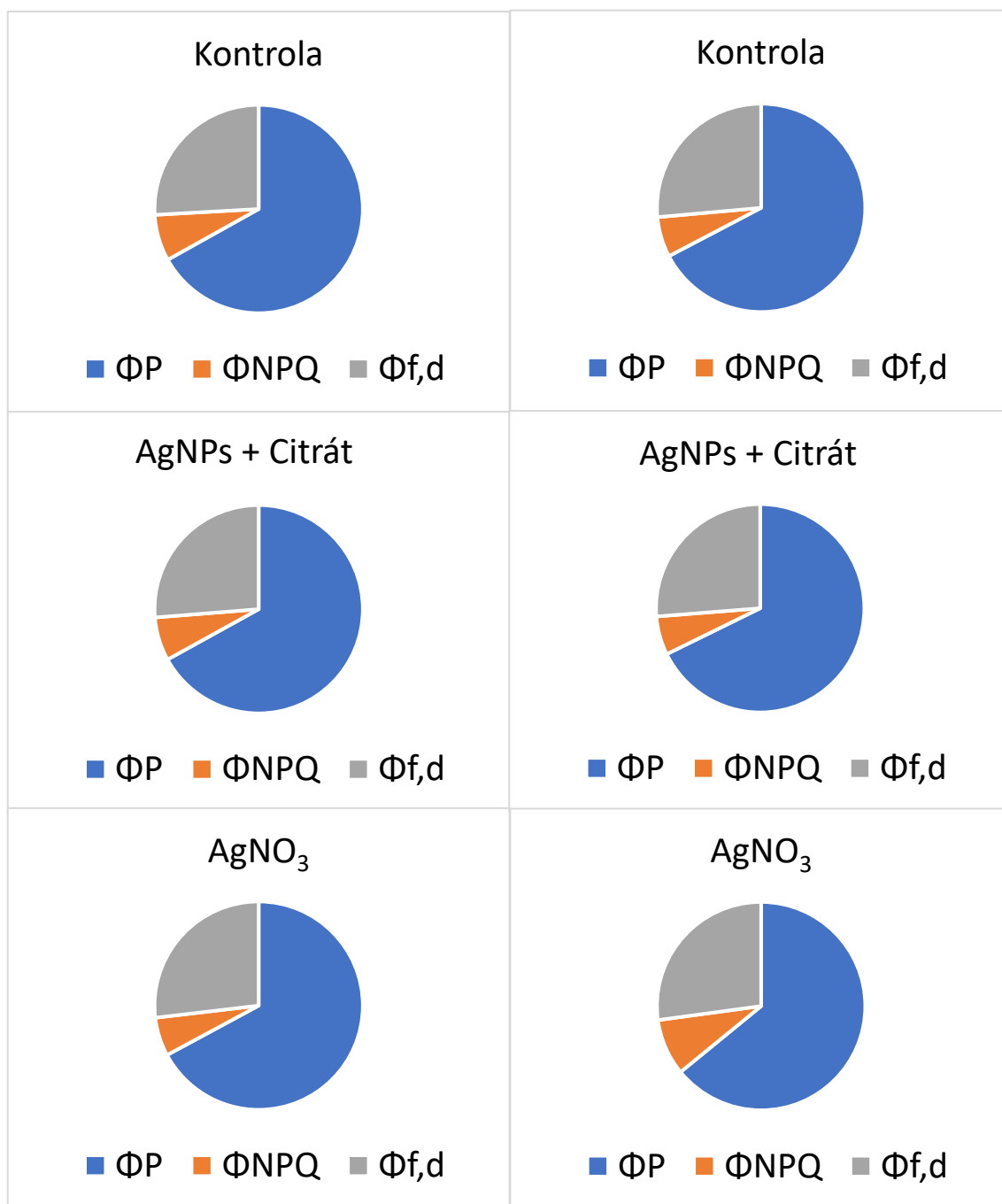


Obr. 12 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum L.*) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. Kontrolní rostliny byly postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

*Nicotiana tabacum* L., postřik

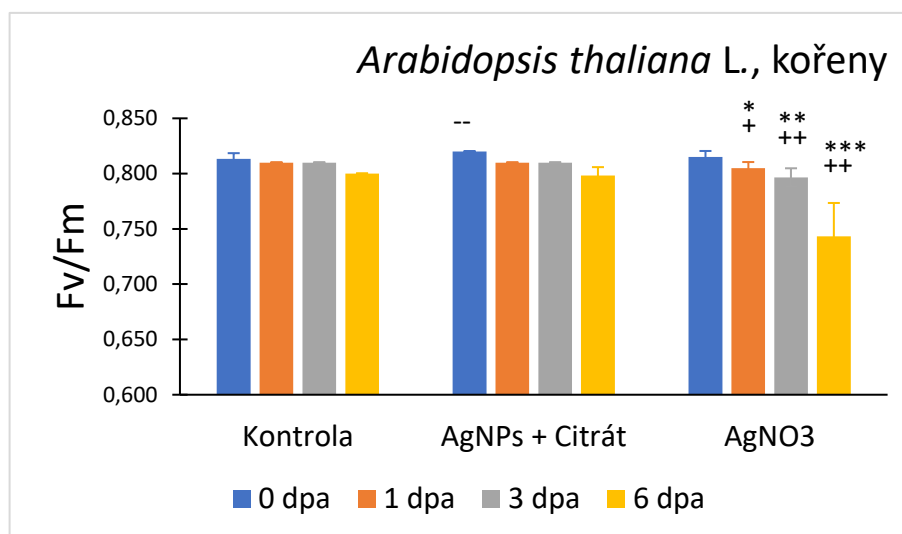
6 dpa



Obr. 13 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% oztokem Tween. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

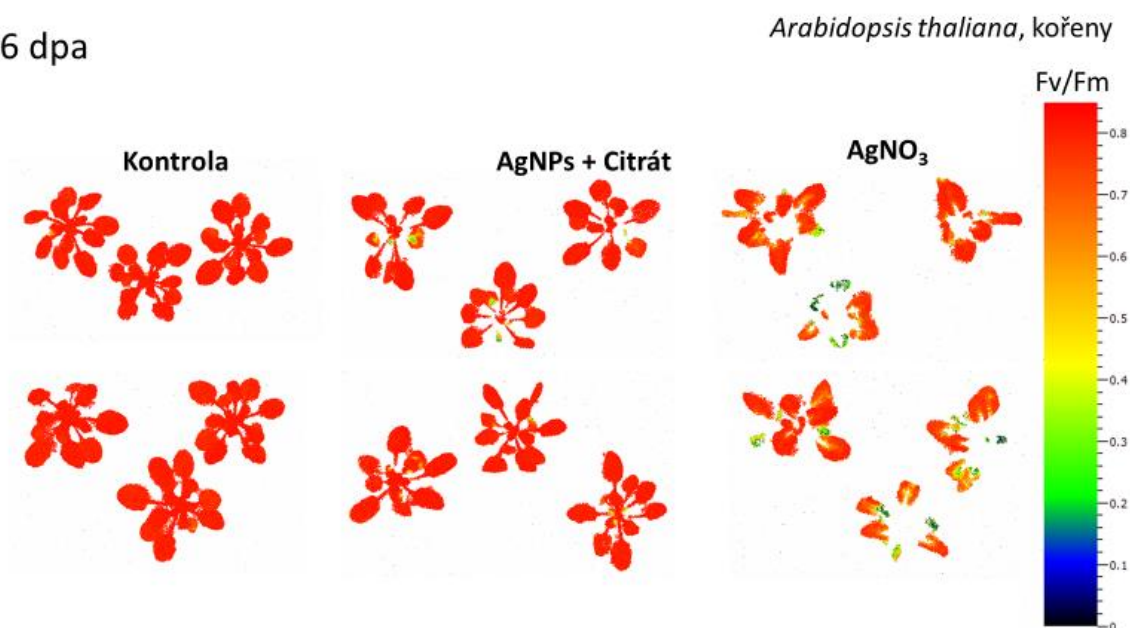
Po jednorázovém postřiku tabáku virginského nebyly zjištěny žádné změny kvantových výtěžků ani u kontroly, ani u AgNPs (Obr. 12 a Obr. 13). V případě AgNO<sub>3</sub> došlo k přechodnému mírnému poklesu parametru  $\Phi_P$  a k zvýšení  $\Phi_{NPQ}$  a  $\Phi_{f,d}$  (Obr. 12 a Obr. 13).

## 4.2 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.)



Obr. 14 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

6 dpa

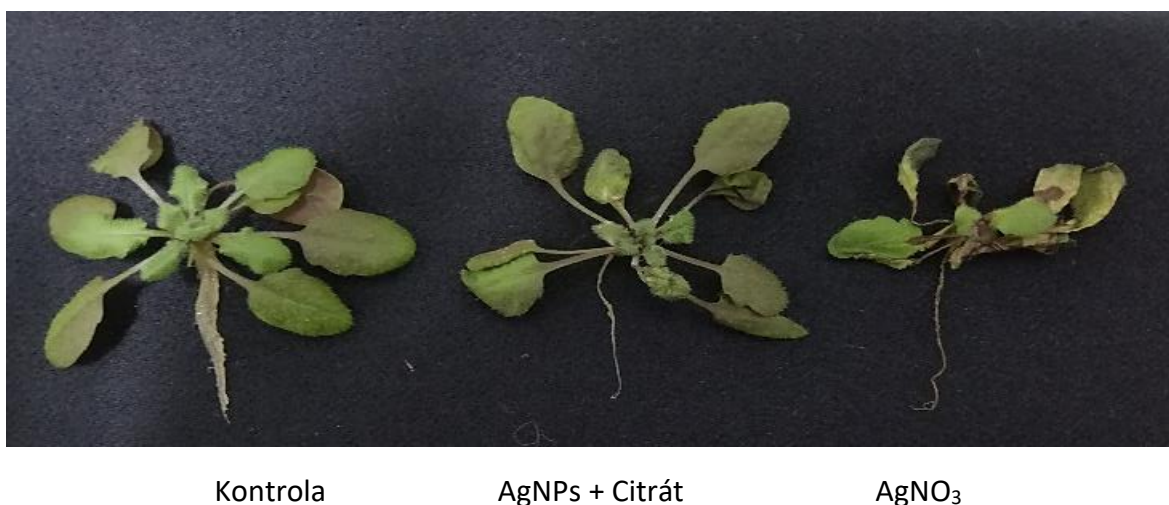


Obr. 15 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.



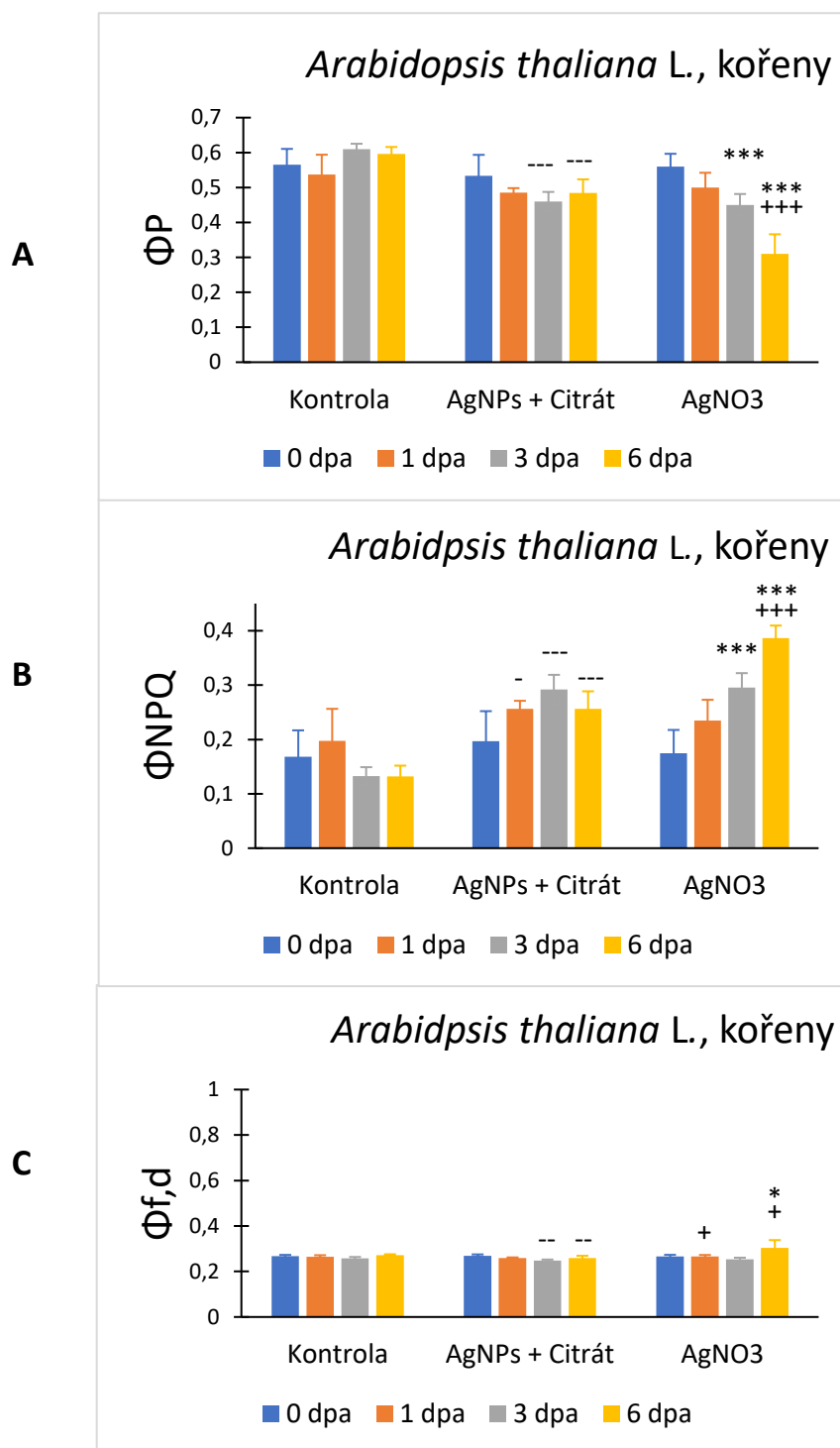


Obr. 15 B) Fotografie měřených rostlin



Obr. 16 Vizuální porovnání kořenů vybraných rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a  $\text{AgNO}_3$  na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.

Vyjmutí rostlin huseníčku rolního z květináčů s půdním substrátem a vložení jejich kořenů do deionizované vody způsobilo během 6 dnů experimentálního testování mírný pokles parametru Fv/Fm (Obr. 14 a Obr. 15 A, Kontrola). U rostlin, jejichž kořeny byly vystaveny účinku nanočástic stříbra, nebyl zjištěn rozdíl v parametru Fv/Fm oproti kontrole, průměrné hodnoty byly srovnatelné, avšak na snímku z fluorescenční zobrazovací techniky (Fluorcamu) jsou u některých listů pozorovatelné nižší hodnoty Fv/Fm (okolo 0,4) , působením AgNPs (Obr. 15 A). Po aplikaci  $\text{AgNO}_3$  došlo během 6 dnů k pozorovatelnému snížení Fv/Fm, tedy ke zhoršení funkce PSII (Obr. 14 a Obr. 15 A). Poslední den měření (6. den) byla velká část listů rostlin u  $\text{AgNO}_3$  nekrotická (Obr. 15 B), z tohoto důvodu nebyla detekována fluorescence chlorofylu. Nanočástice stříbra i  $\text{AgNO}_3$  potlačily růst kořenů (Obr. 16).

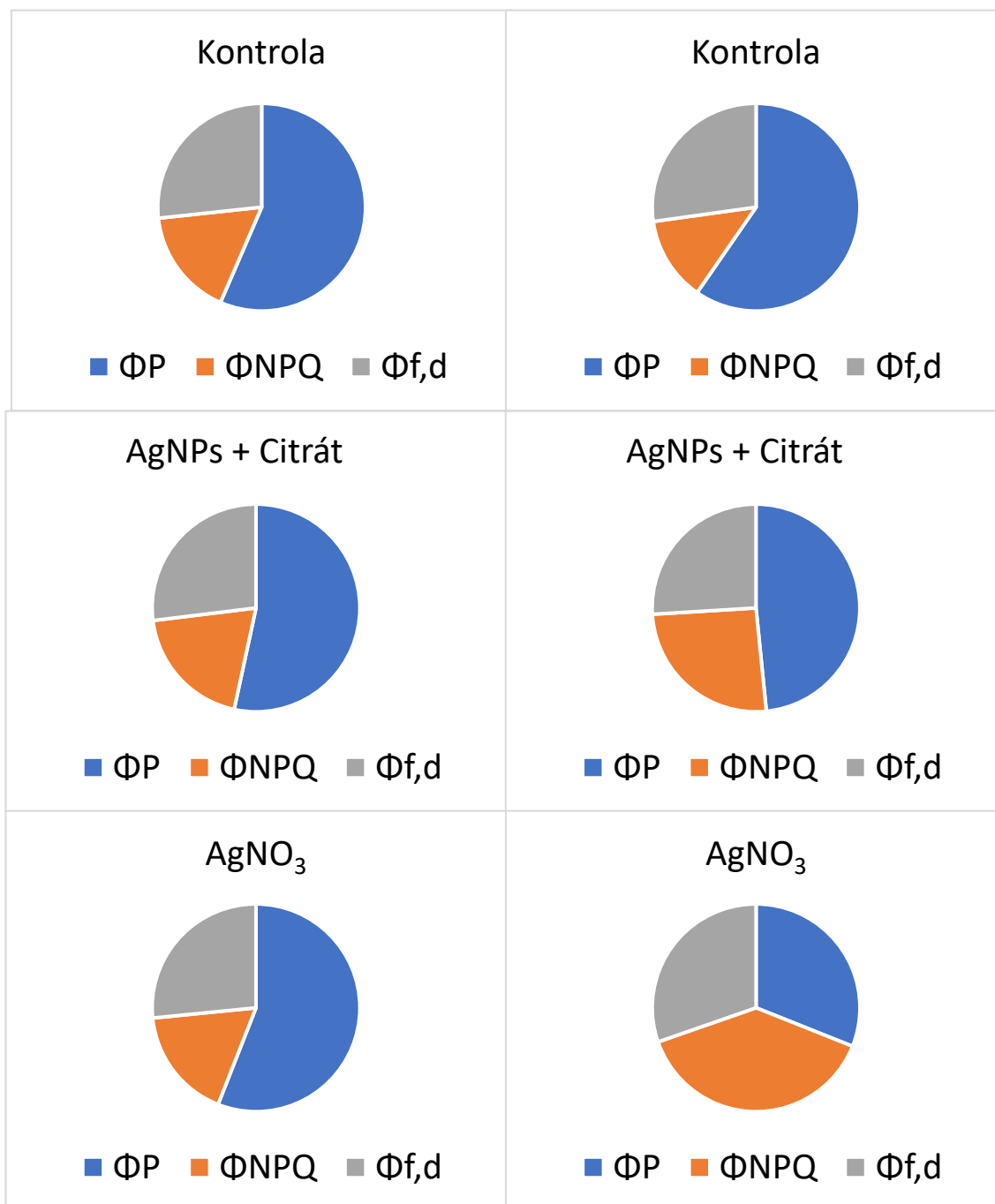


Obr. 17 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

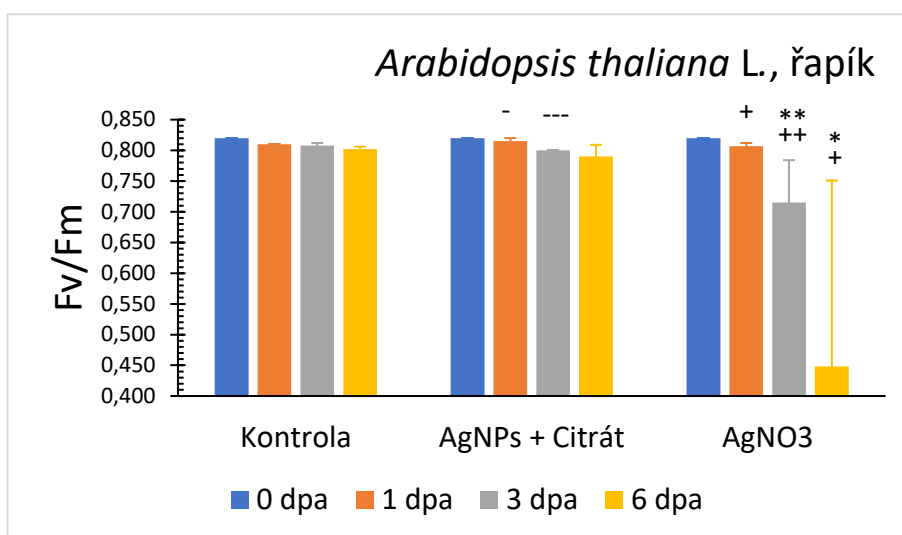
*Arabidopsis thaliana* L., kořeny

6 dpa

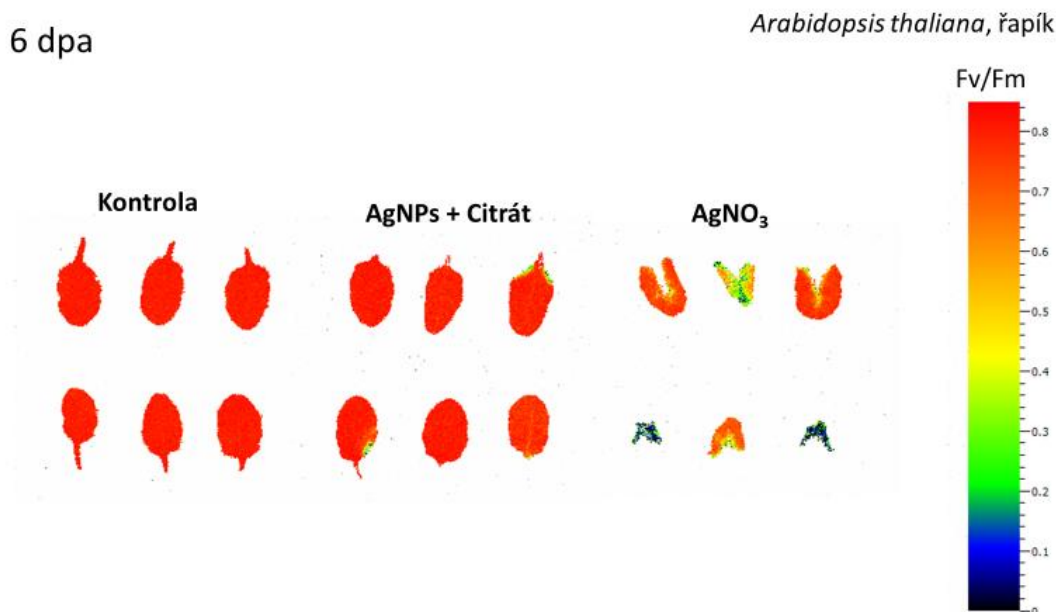


Obr. 18 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

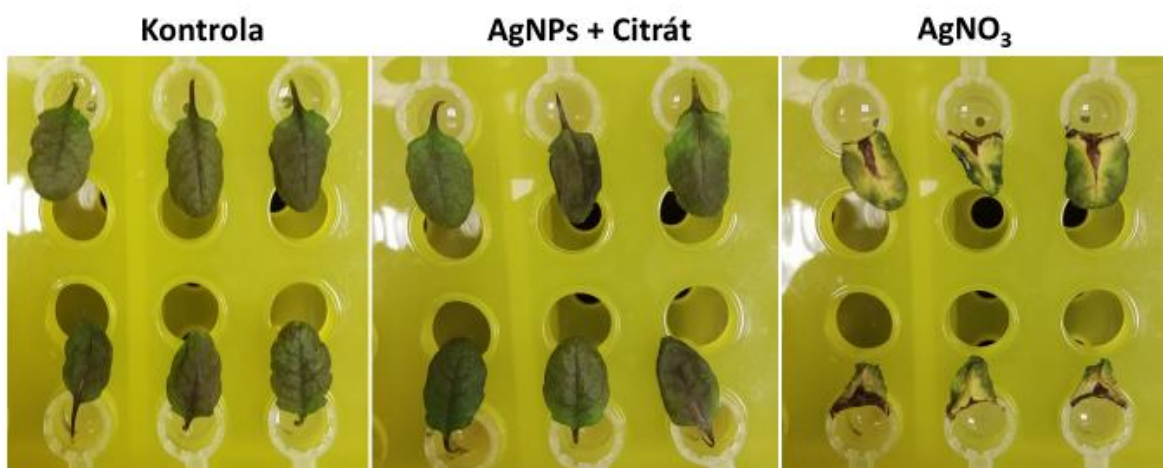
Aplikace AgNPs a AgNO<sub>3</sub> na kořeny huseníčku způsobila od 3. dpa signifikantní pokles ΦP a zvýšení ΦNPQ, parametr Φf,d se téměř neměnil (Obr. 17). Uvedené změny byly výraznější u AgNO<sub>3</sub>. Třetí a 6. den byly účinky AgNPs srovnatelné, kdežto u AgNO<sub>3</sub> byl pokles ΦP a nárůst ΦNPQ výraznější 6. den, což bylo doprovázeno už i mírným nárůstem Φf,d (Obr. 17 a Obr. 18). Tyto změny indikují postupné zhoršování funkce fotosyntetického aparátu vlivem AgNO<sub>3</sub>.



Obr. 19 Parametr  $F_v/F_m$  měřený na listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a  $AgNO_3$  na listy. Řapíky kontrolních listů byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky,  $n = 6$ . Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty  $AgNO_3$  oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

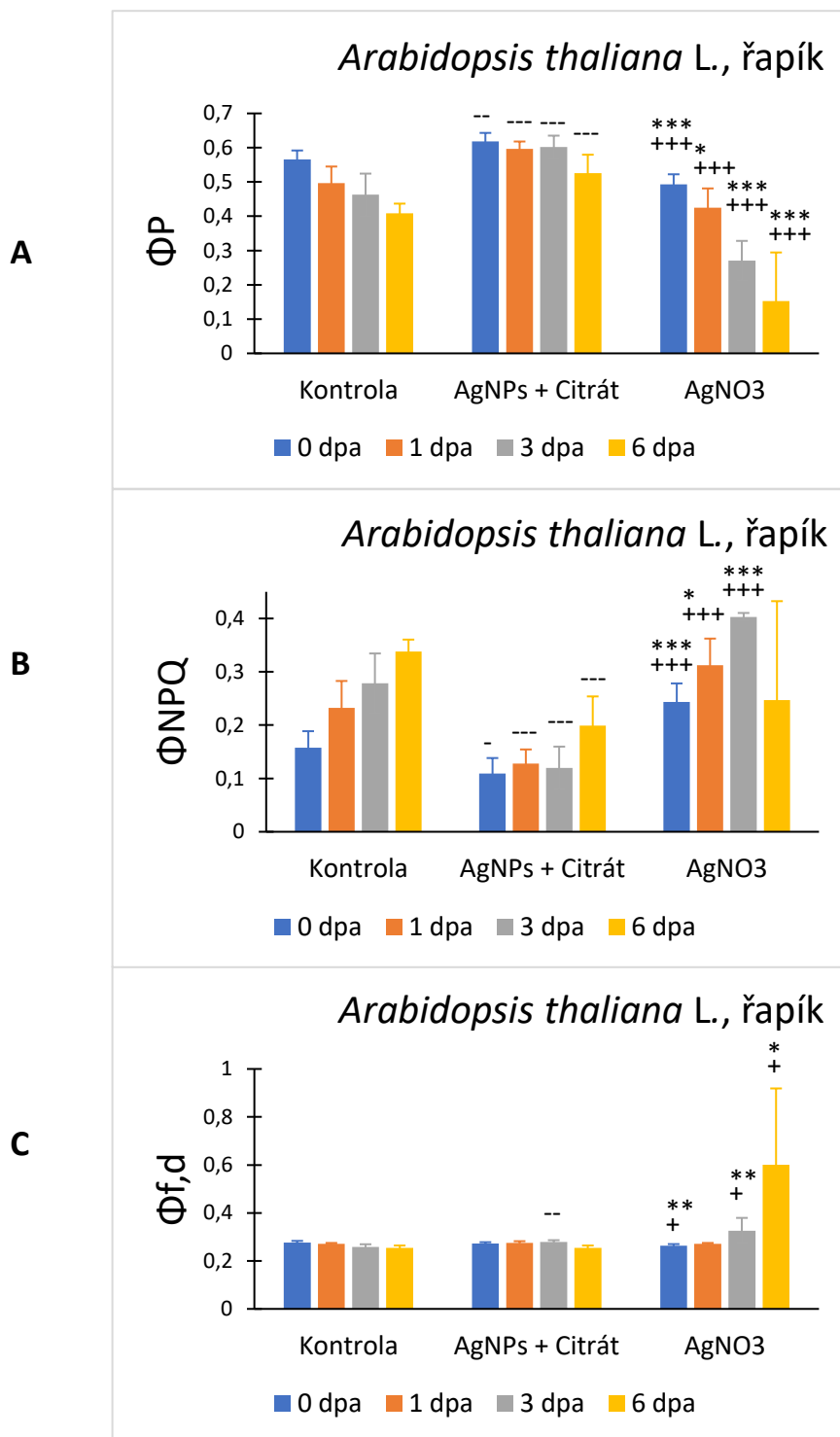


Obr. 20 A) Zobrazení parametru  $F_v/F_m$  z Fluorcamu u listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a  $AgNO_3$  na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody.



Obr. 20 B) Fotografie měřených listů

V případě oddělených listů nedošlo během experimentu k významnému poklesu Fv/Fm jak u kontroly, tak i u AgNPs (Obr. 19). Velký pokles Fv/Fm byl však zaznamenán u listů pod vlivem AgNO<sub>3</sub> šestý den měření (Obr. 19). Ze snímků z Fluorcamu je zřejmé silné poškození listů působením AgNO<sub>3</sub>, kdy velká část listů byla nekrotická, pokles hodnoty Fv/Fm lze v malém rozsahu pozorovat i u AgNPs na okrajích listů (Obr. 20 A). U oddělených listů huseníčku rolního docházelo u varianty v deionizované vodě a AgNPs k fialovění listů způsobenému akumulací antokyanů (Obr. 20 B), což je typické po oddělení a inkubaci listů tohoto rostlinného druhu na světle.

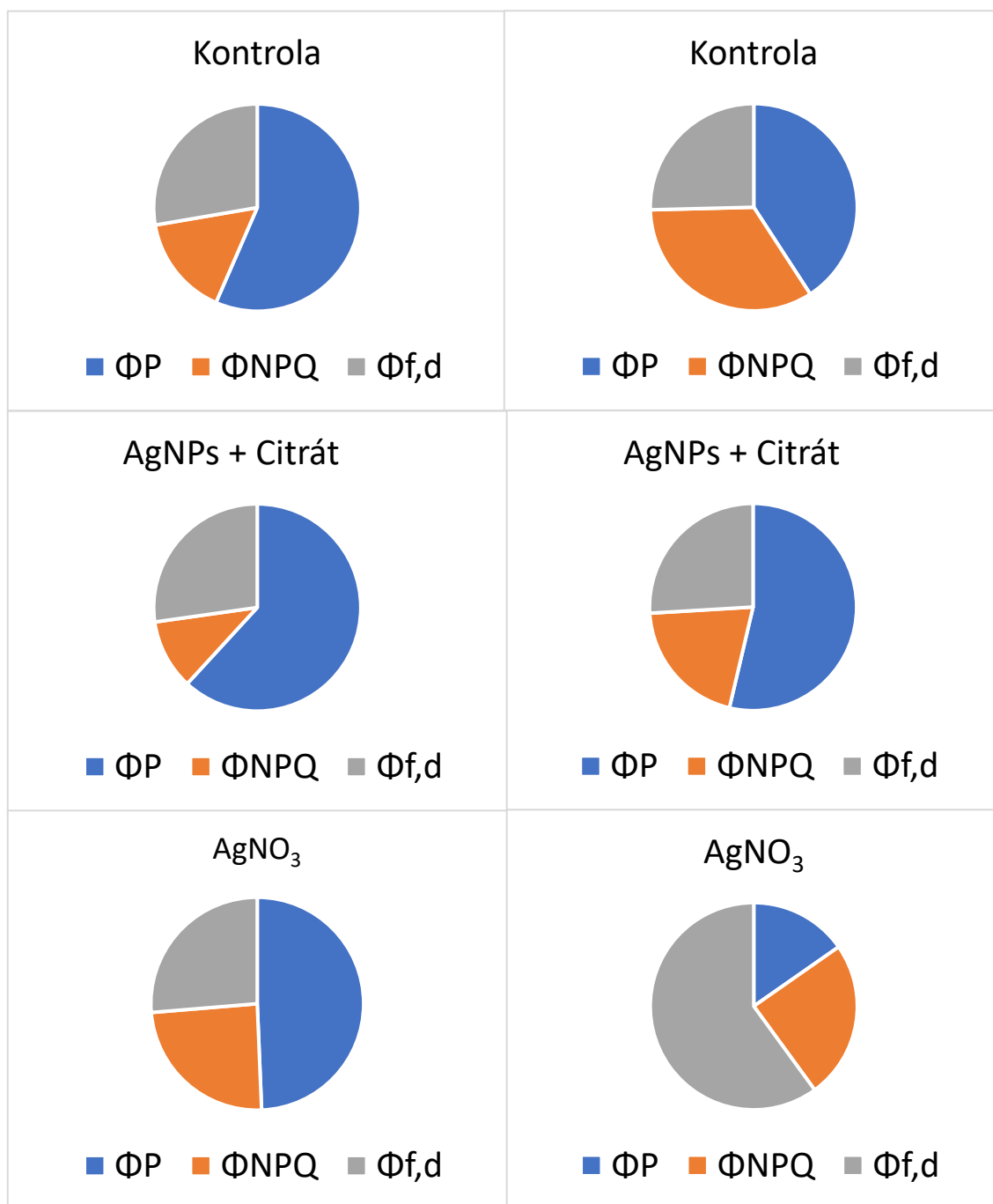


Obr. 21 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Řapíky kontrolních listů byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

*Arabidopsis thaliana* L., řapíky

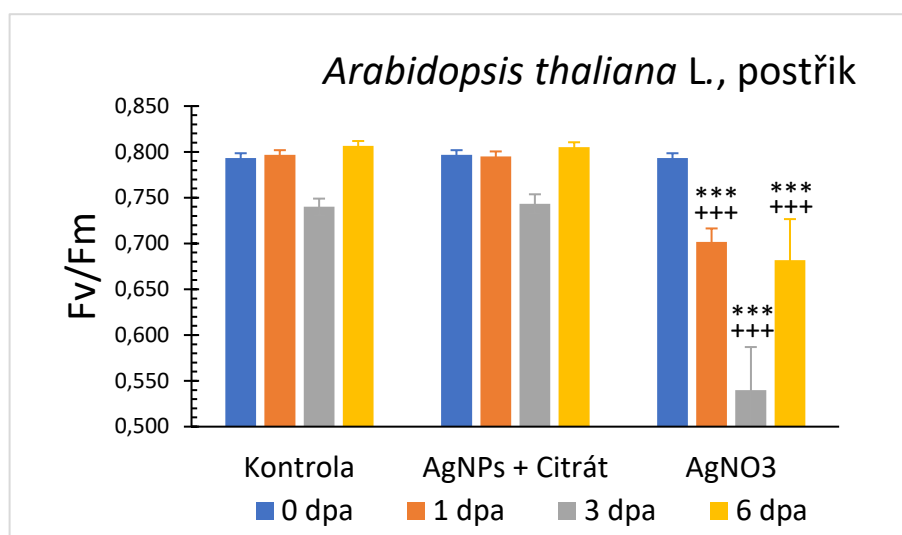
6 dpa



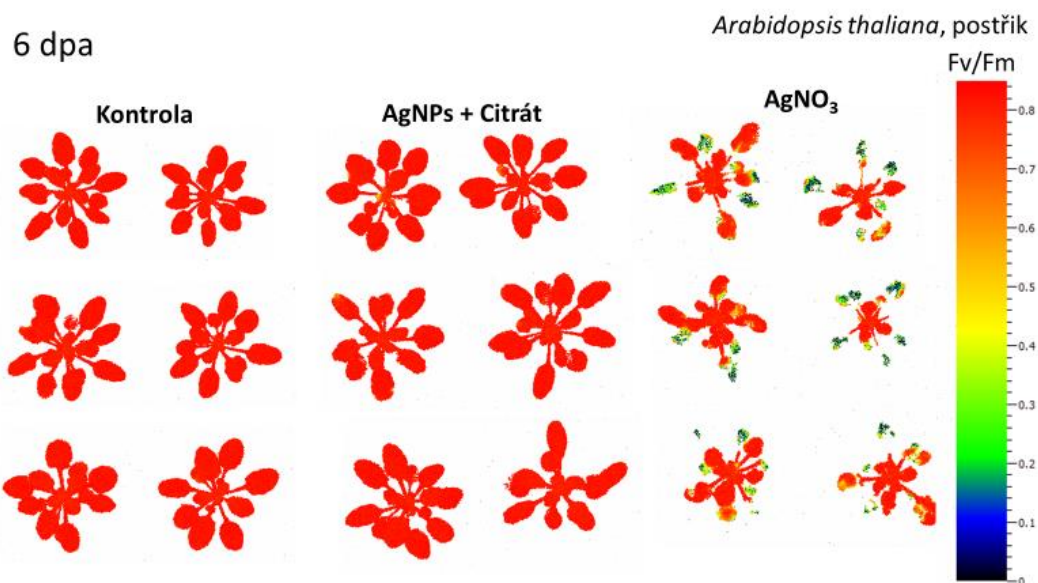
Obr. 22 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.



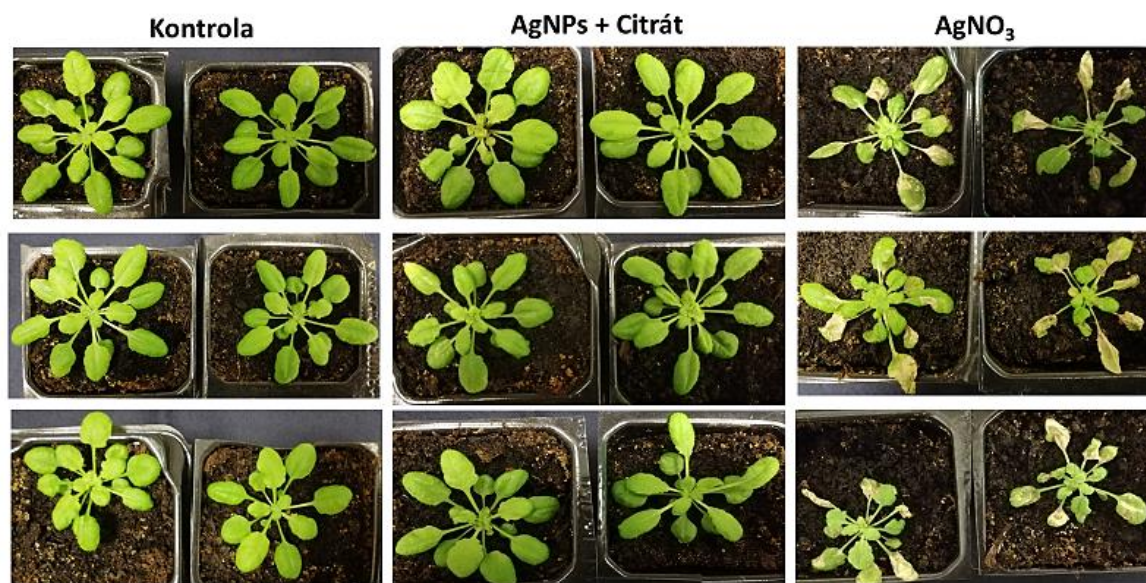
U kontrolních oddělených listů huseníčku rolního došlo během inkubace k mírnému poklesu hodnot  $\Phi_P$  a ke zvýšení  $\Phi_{NPQ}$ , což společně se zmíněnou akumulací antokyanů odráží stimulaci ochranných procesů ve fotosyntetickém aparátu (Obr. 21). Zajímavý výsledek byl zjištěn u listů pod vlivem AgNPs – byly u nich naměřeny signifikantně vyšší hodnoty  $\Phi_P$  (a nižší hodnoty  $\Phi_{NPQ}$ ) než u kontrol, došlo tedy ke stimulačnímu efektu nanočástic na fotochemii fotosystému II (Obr. 21 a Obr. 22).  $AgNO_3$  měl negativní efekt již 1. den po aplikaci a s postupem dnů docházelo ke stále výraznější inhibici fotosyntézy (signifikantně snížené  $\Phi_P$ ) – nejprve v souvislosti s nárůstem  $\Phi_{NPQ}$ , 6. den už kvůli velmi silnému poškození fotosyntetického aparátu indikovanému vysokou hodnotou  $\Phi_{f,d}$  (Obr. 21 a Obr. 22).



Obr. 23 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. Kontrolní rostliny byly postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

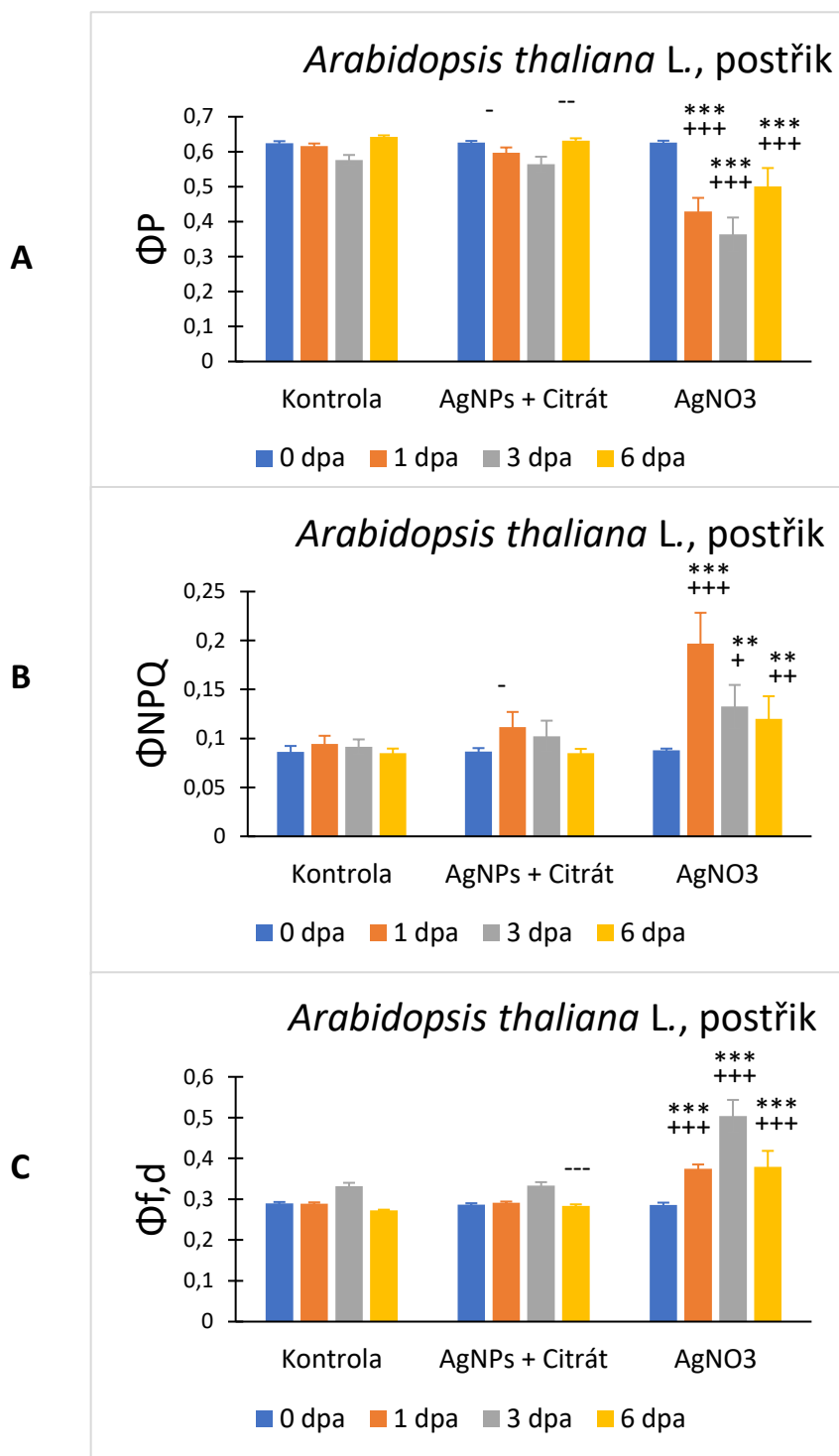


Obr. 24 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween.



Obr. 24 B) Fotografie měřených rostlin.

Po jednorázovém postřiku rostlin huseníčku rolního nebyly zjištěny žádné změny sledovaných parametrů při působení AgNPs, jejich hodnoty byly téměř stejné jako hodnoty u kontrolních vzorků (Obr. 23 a Obr. 24 A). Rostliny nejevily žádné známky poškození. Po aplikaci  $\text{AgNO}_3$  došlo k poklesu  $F_v/F_m$ . Třetí den byly hodnoty  $F_v/F_m$  nejnižší (přibližně 0,55), 6. dpa hodnoty ale opět narostly (přibližně na 0,7). Tento efekt by mohl souviset s výše zmíněnou nevýhodou měření pomocí Fluorcamu, kdy dochází k výpočtu průměrných hodnot parametrů v ploše listů nebo rostlin pouze z míst, ve kterých je možno detekovat fluorescenci. Šestý den po aplikaci  $\text{AgNO}_3$  už byla část listů tak poškozena, že neemitovala chlorofylovou fluorescenci, a protože tyto listy se nezapočítaly do průměrných hodnot měřených parametrů, byl stav rostlin po 6 dnech po aplikaci zdánlivě lepší než po 3 dnech. Jak je vidět z Obr. 24 B,  $\text{AgNO}_3$  způsobil inhibici růstu rostlin.

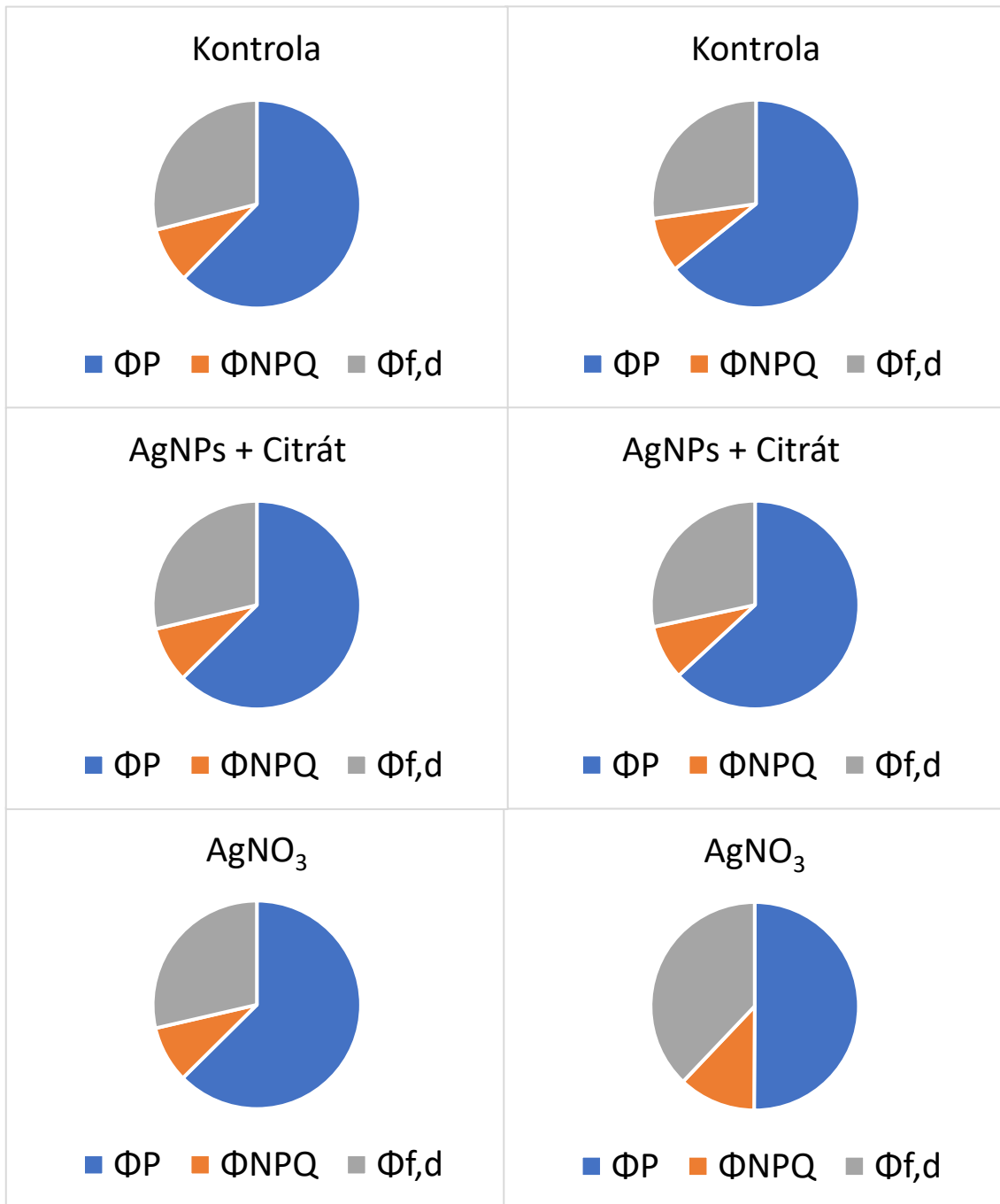


Obr. 25 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

*Arabidopsis thaliana* L., postřik

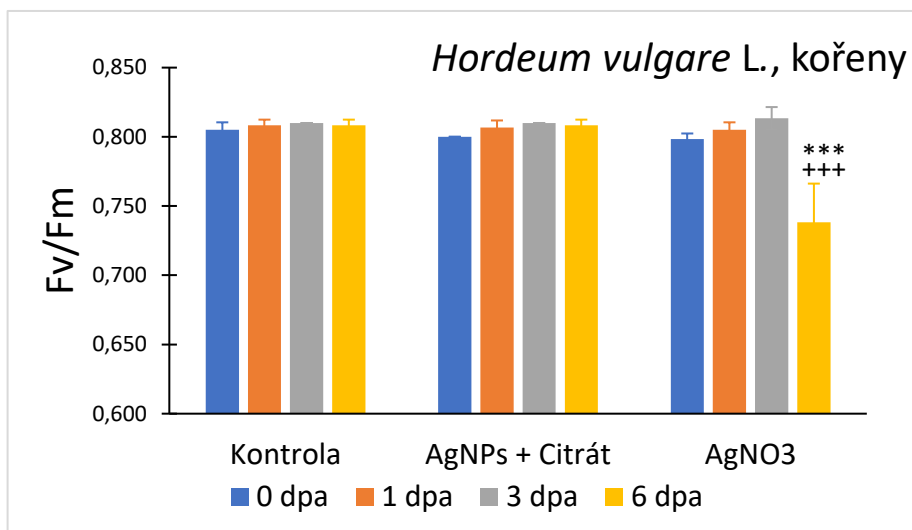
6 dpa



Obr. 26 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) 0. den a 6. den po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

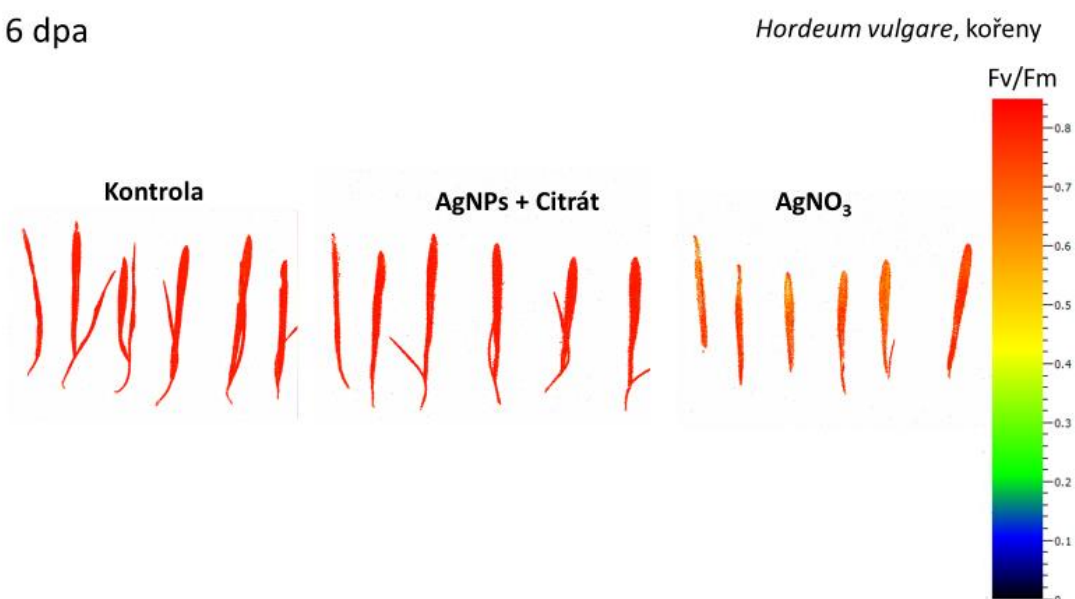
Změny kvantových výtěžků po aplikaci postřiku a rozdíly mezi variantami (Obr. 25 a Obr. 26) odpovídají změnám a rozdílům parametru  $F_v/F_m$ . Aplikace AgNPs nezpůsobila téměř žádné změny oproti kontrole, aplikace  $AgNO_3$  způsobila snížení  $\Phi_P$  a nárůst  $\Phi_{NPQ}$ , a to již 1. den po aplikaci (Obr. 25). Hodnoty kvantových výtěžků indikovaly nejhorší stav rostlin 3. dpa (nejnižší  $\Phi_P$  a nejvyšší  $\Phi_{f,d}$ ), 6. den byly zaznamenány hodnoty zdánlivě lepší, nicméně stav rostlin byl horší. Důvod tohoto nesouladu byl vysvětlen výše u parametru  $F_v/F_m$ .

### 4.3 Ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L.)

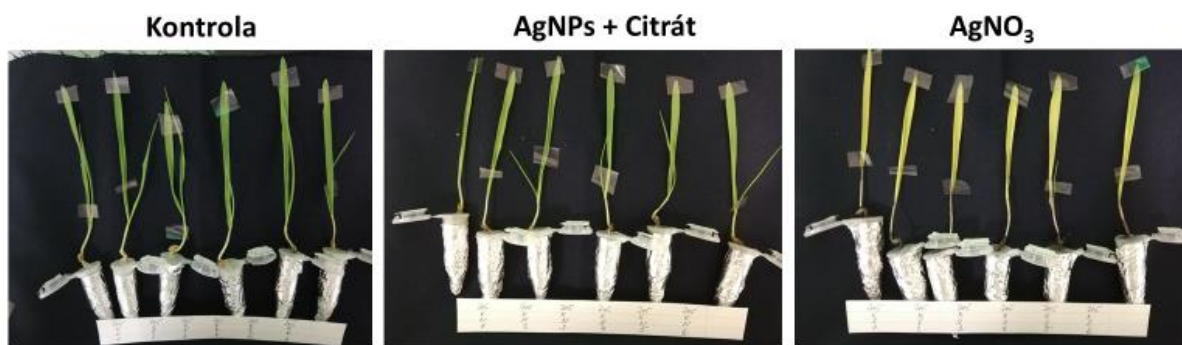


Obr. 27 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

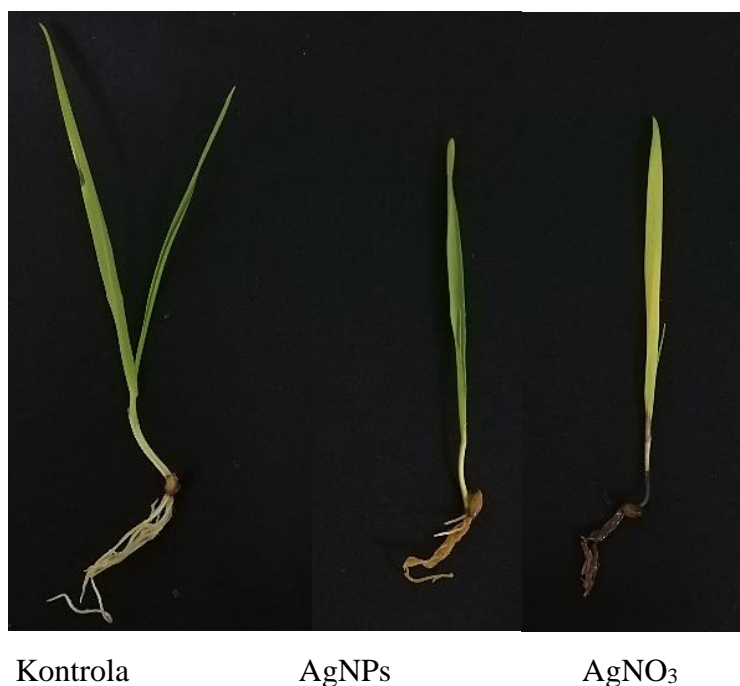
6 dpa



Obr. 28 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.



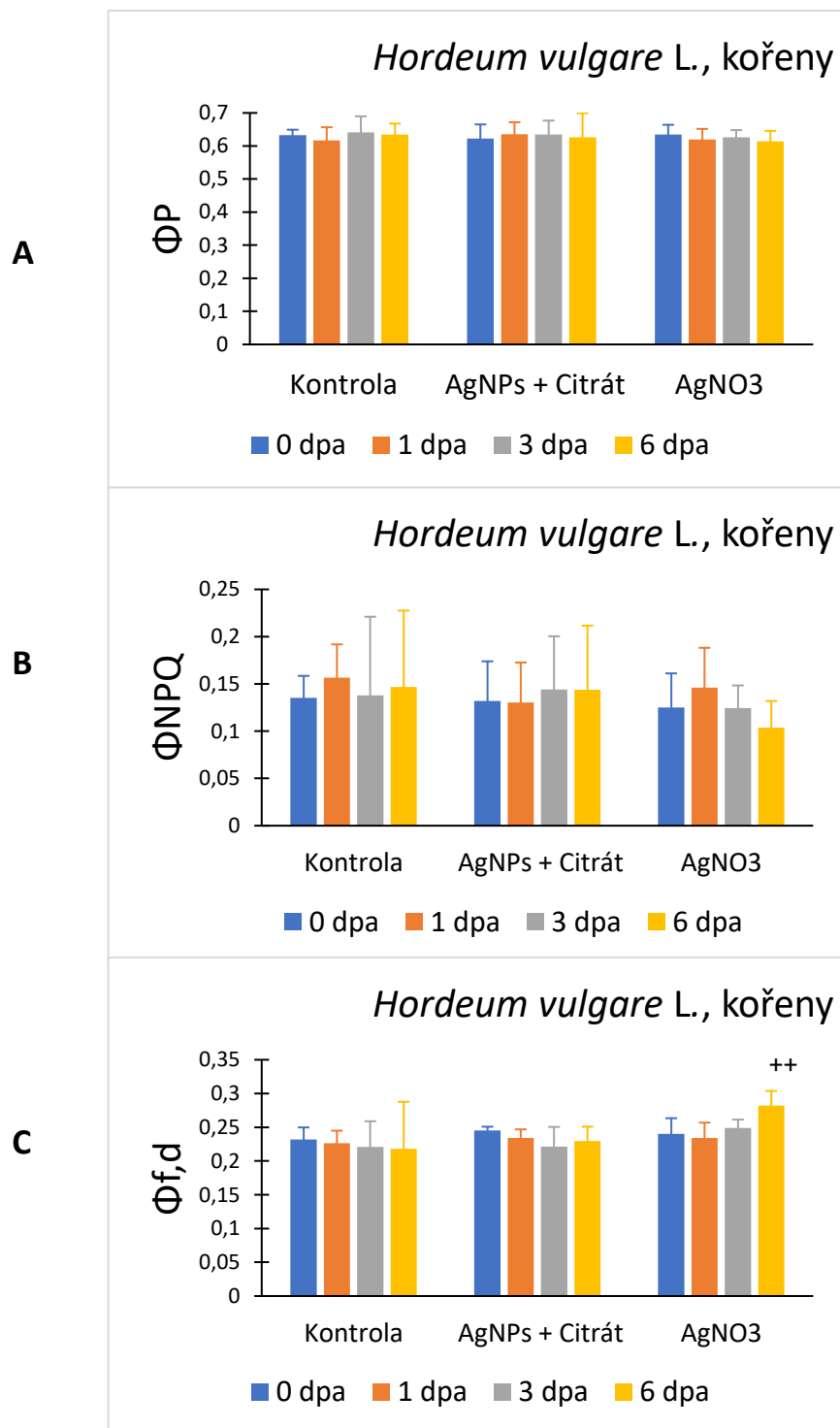
Obr. 28 B) Fotografie měřených rostlin.



Obr. 29 Vizuální porovnání kořenů vybraných rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a  $\text{AgNO}_3$  na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.

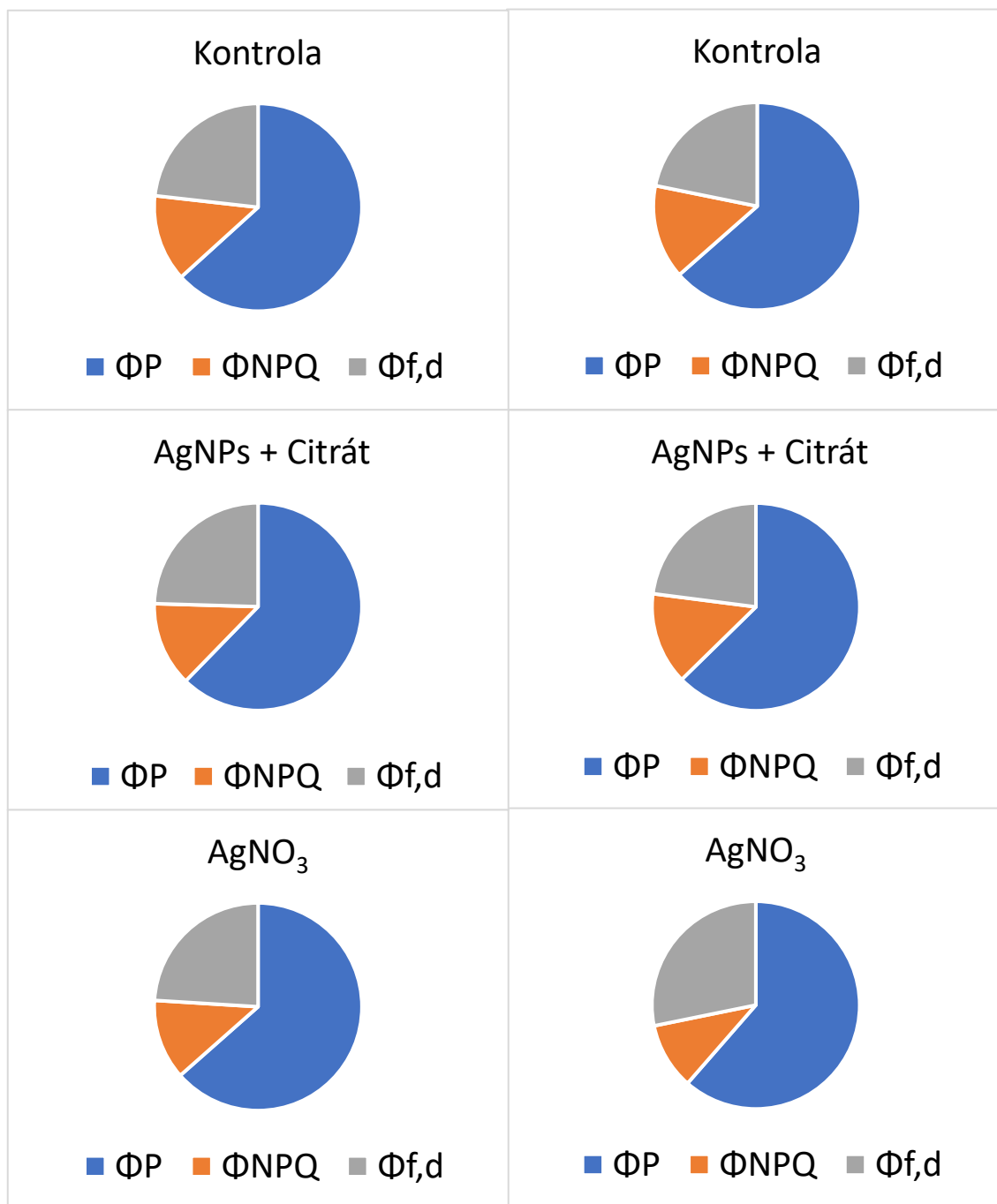
Vyjmutí rostlin ječmene jarního z květináčů s perlitem a vložení jejich kořenů do deionizované vody nezpůsobilo během 6 dnů testování signifikantní změny parametru Fv/Fm. U rostlin, jejichž kořeny byly vystaveny účinku nanočástic stříbra, nebyl zjištěn rozdíl v parametru Fv/Fm oproti kontrole (Obr. 27 a Obr. 28 A), zatímco po aplikaci  $\text{AgNO}_3$  došlo 6. dpa k mírnému snížení Fv/Fm (na hodnotu přibližně 0,73), tedy k mírnému zhoršení funkce PSII (Obr. 27 a Obr. 28 A). Poslední den měření (6. den) byla u listů varianty  $\text{AgNO}_3$  pozorovatelná chloróza a rostliny byly opožděné v růstu (Obr. 28 B, Obr. 29). Efekt na fotosyntézu byl tedy u  $\text{AgNO}_3$  minimální, avšak jeho aplikace potlačila růst kořenů (Obr. 29). Mírná inhibice růstu kořenů byla pozorována i u nanočástic stříbra.





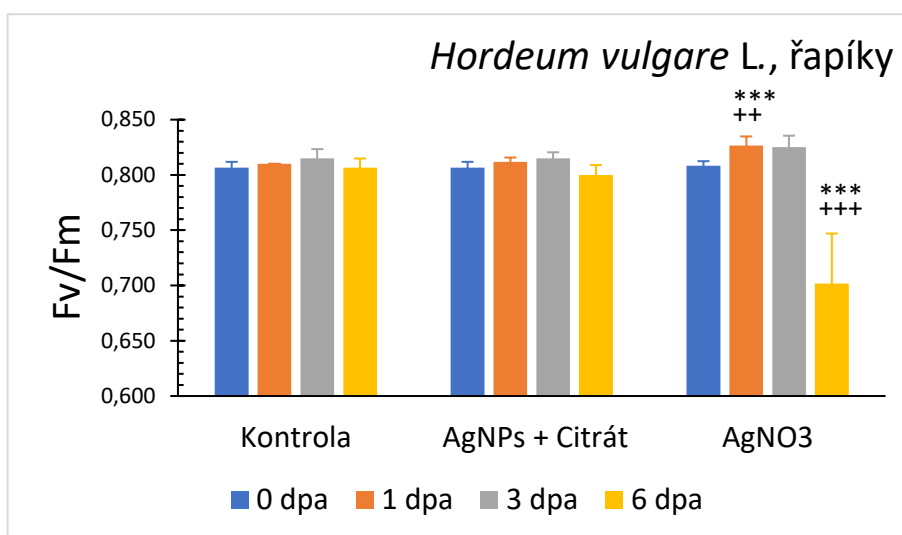
Obr. 30 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare L.*) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa      *Hordeum vulgare* L., kořeny      6 dpa

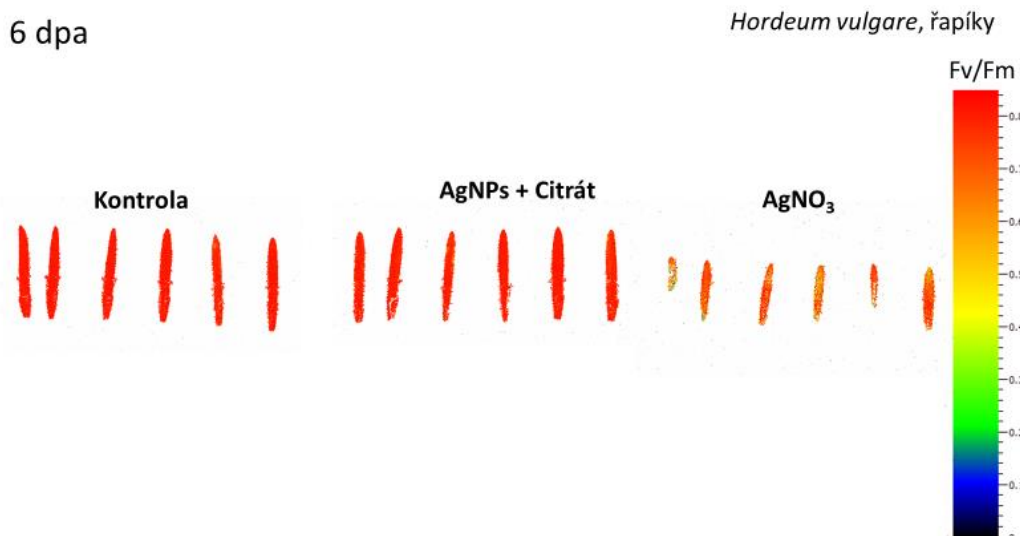


Obr. 31 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

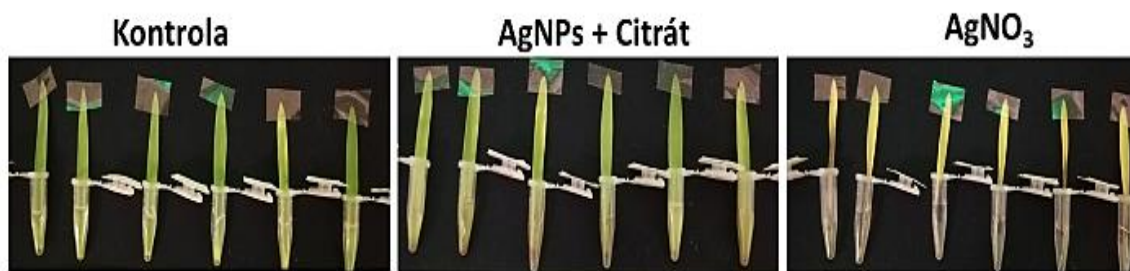
Při aplikaci na kořeny nebyly u rostlin ječmene jarního během šesti dnů měření pozorovány změny u parametru  $\Phi P$  u žádné z testovaných variant. Jedinou zaznamenanou signifikantní změnou bylo velmi malé zvýšení hodnoty  $\Phi f$ , d. 6. den měření u varianty  $AgNO_3$ , které však nebylo doprovázeno poklesem  $\Phi P$ , ale spíše (nesignifikantním) poklesem  $\Phi NPQ$  naznačujícím snížení zastoupení regulačních zhašecích procesů (Obr. 30 a Obr. 31).



Obr. 32 Parametr Fv/Fm měřený na listech ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Řapíky kontrolních listů byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

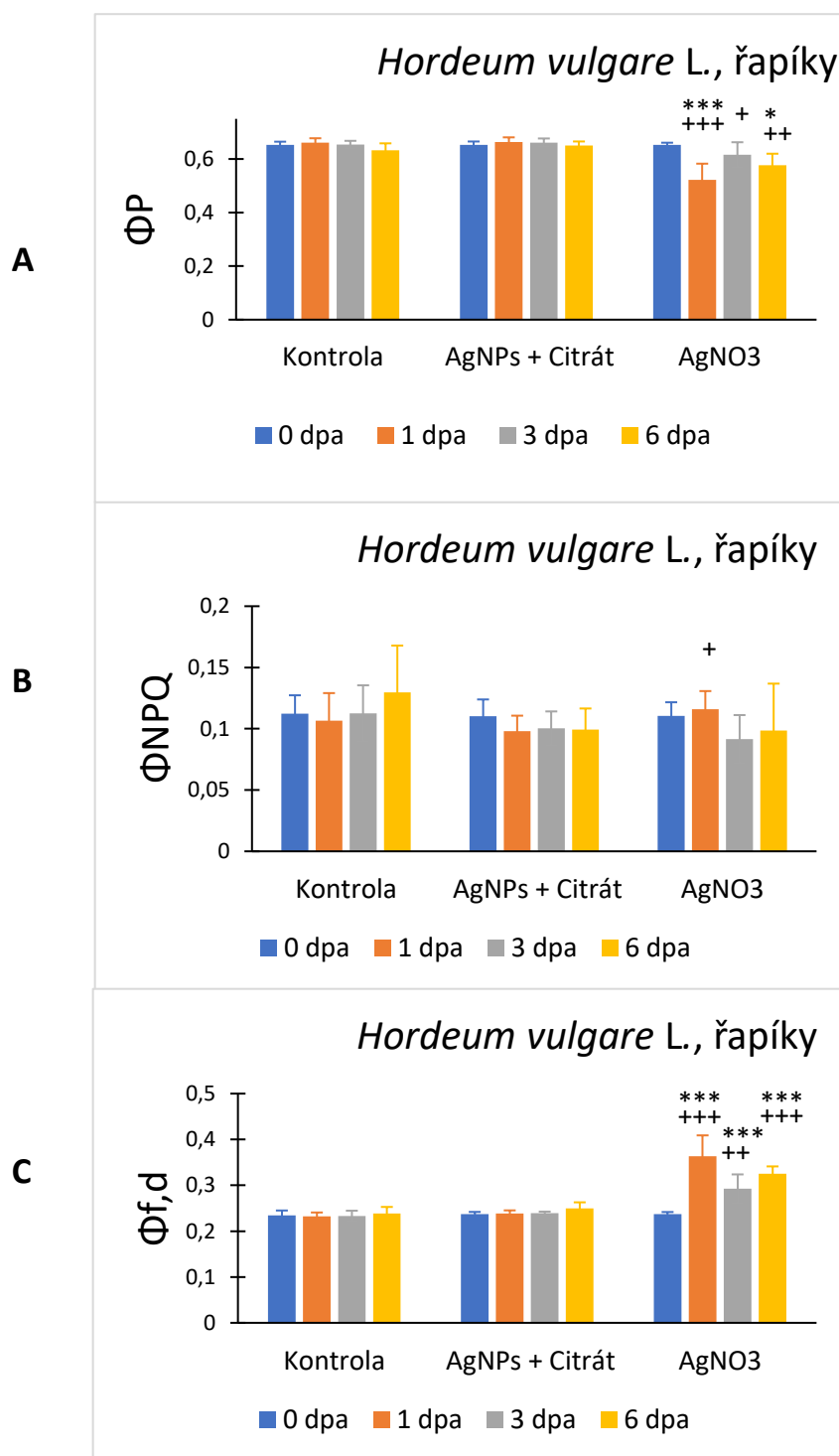


Obr. 33 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody.



Obr. 33 B) Fotografie měřených listů.

Během měření oddělených listů ječmene jarního nedošlo k významnému poklesu  $F_v/F_m$  ani u kontroly, ani u AgNPs (Obr. 32). Mírný pokles  $F_v/F_m$  (na hodnotu přibližně 0,7) byl však zaznamenán u listů  $AgNO_3$  šestý den měření. Jak ze snímku z Fluorcamu, tak z fotografie je zřejmé mírné poškození listů působením  $AgNO_3$ , zejména v jejich spodní části (Obr. 33 A a Obr. 33 B).

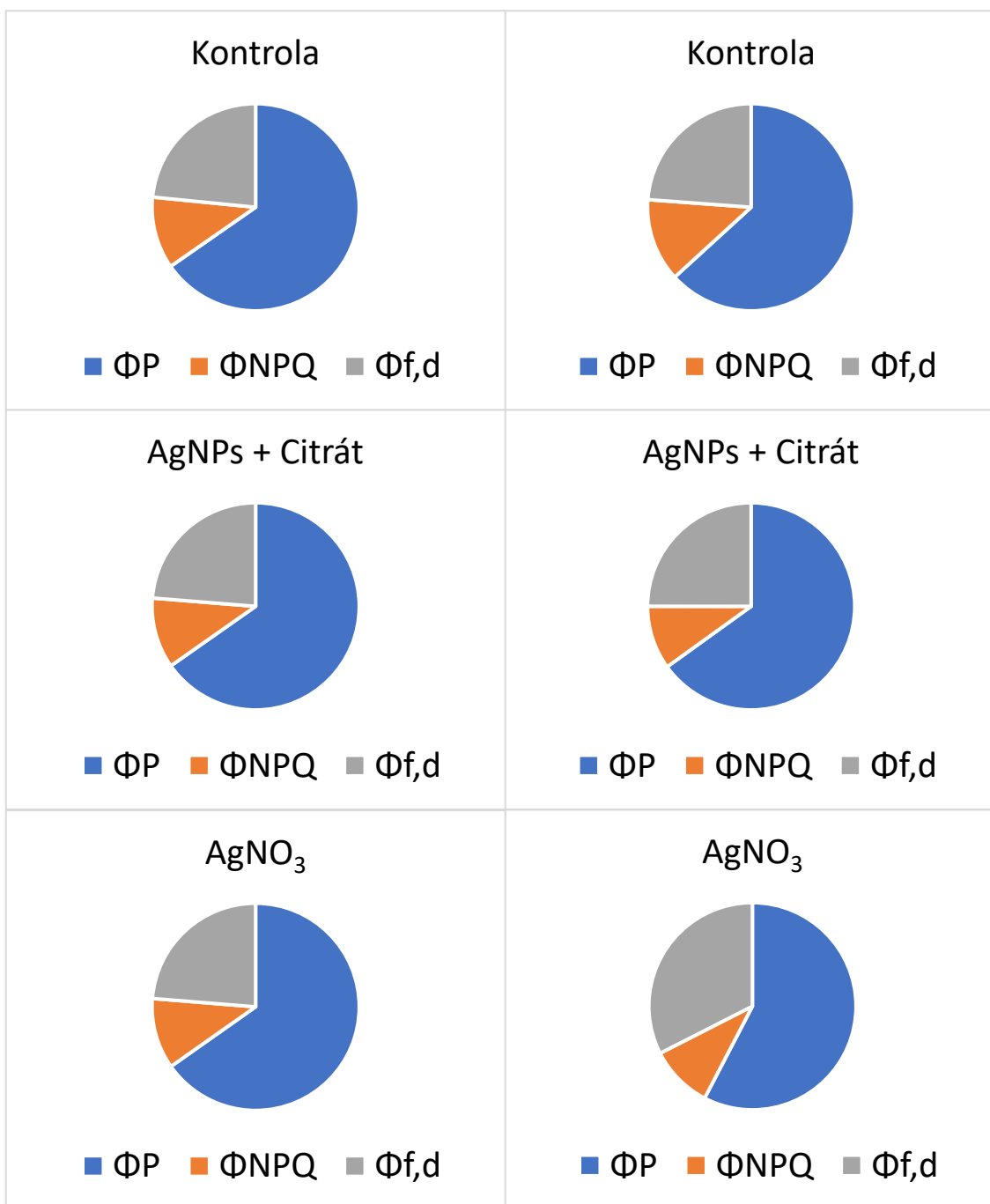


Obr. 34 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare L.*) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

*Hordeum vulgare* L., řapíky

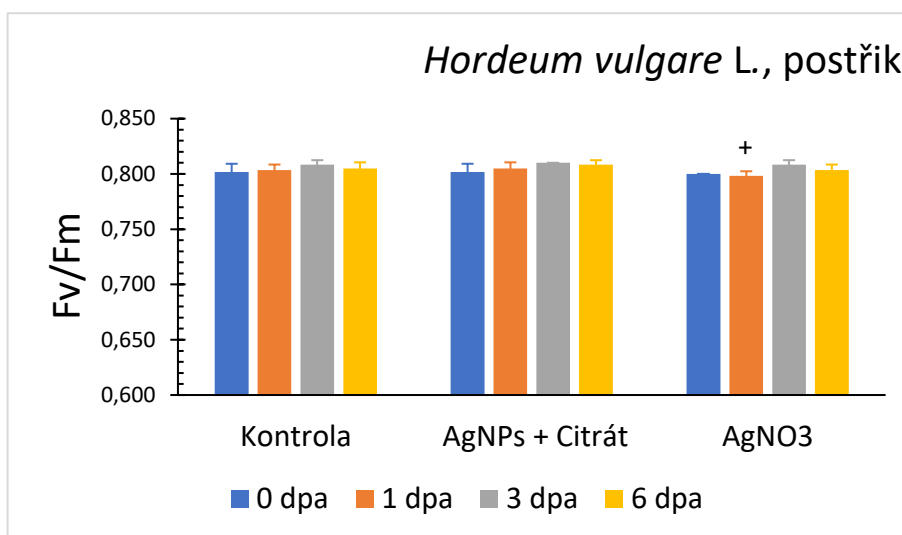
6 dpa



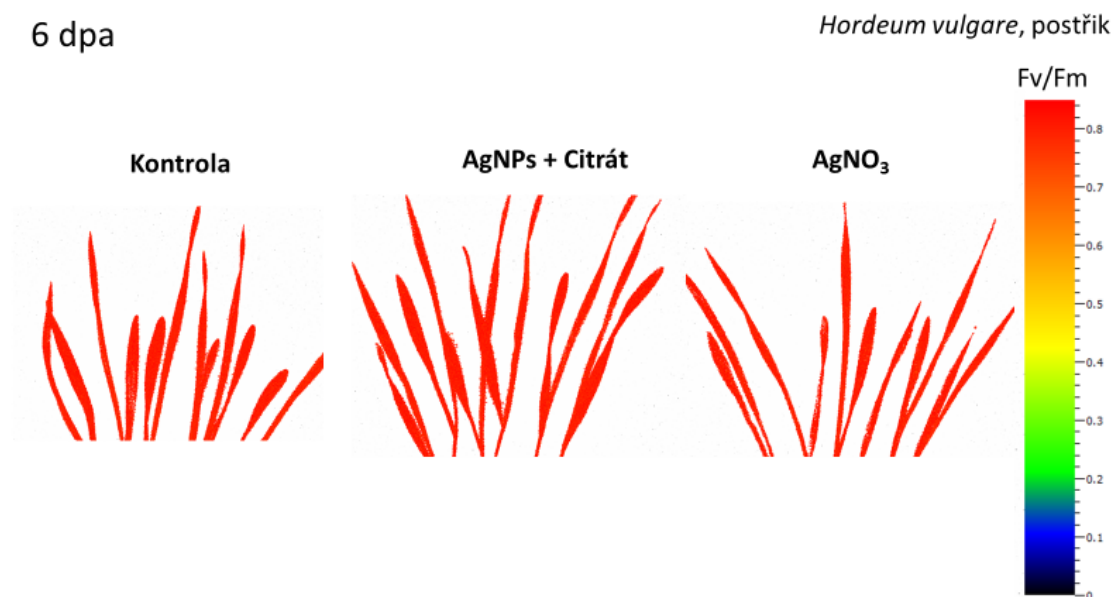
Obr. 35 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

U oddělených listů ječmene jarního bylo zjištěno, že hodnoty parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{NPQ}$  a  $\Phi_{f,d}$  u varianty AgNPs nejsou signifikantně odlišné od hodnot u kontrolních listů. U listů v  $\text{AgNO}_3$  byl již první den pozorován pokles parametru  $\Phi_P$  a nárůst  $\Phi_{f,d}$ , přičemž hodnoty  $\Phi_{NPQ}$  byly téměř beze změny. Tedy pokles fotochemie nebyl v tomto případě spojen se stimulací ochranných zhášecích procesů, ale především s poškozením fotosyntetického aparátu (Obr. 34 a Obr. 35). Relativně nezměněné hodnoty kvantových výtěžků u listů pod vlivem  $\text{AgNO}_3$  naměřené 3. a 6. den po aplikaci (oproti 1. dpa) jsou zřejmě opět dány jejich zkrácením z důvodu postupující nekrotizace listů v bazální části (Obr. 33 B).

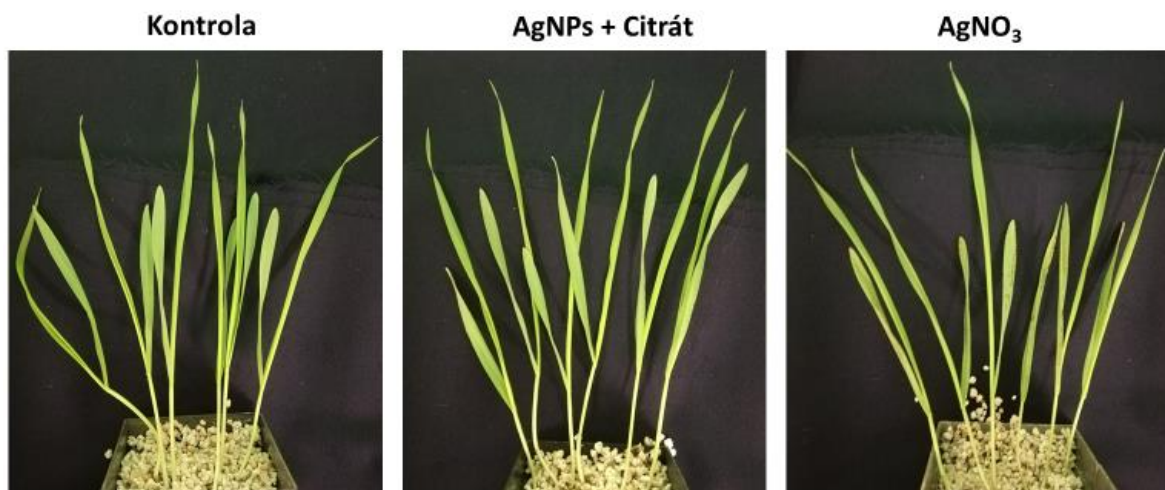




Obr. 36 Parametr  $F_v/F_m$  měřený na rostlinách ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Křížek označuje statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

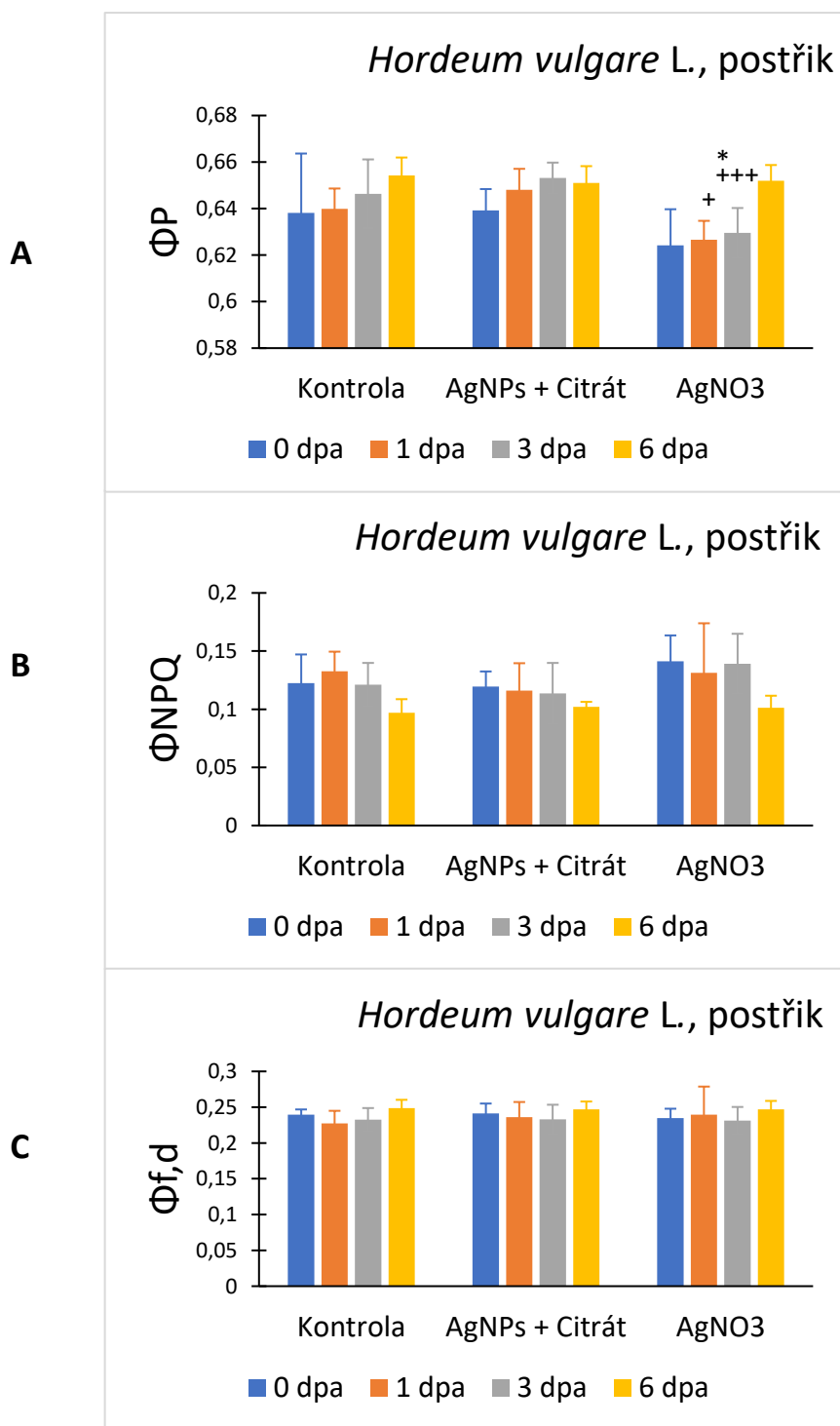


Obr. 37 A) Zobrazení parametru  $F_v/F_m$  z Fluorcamu u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 6. den po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween.



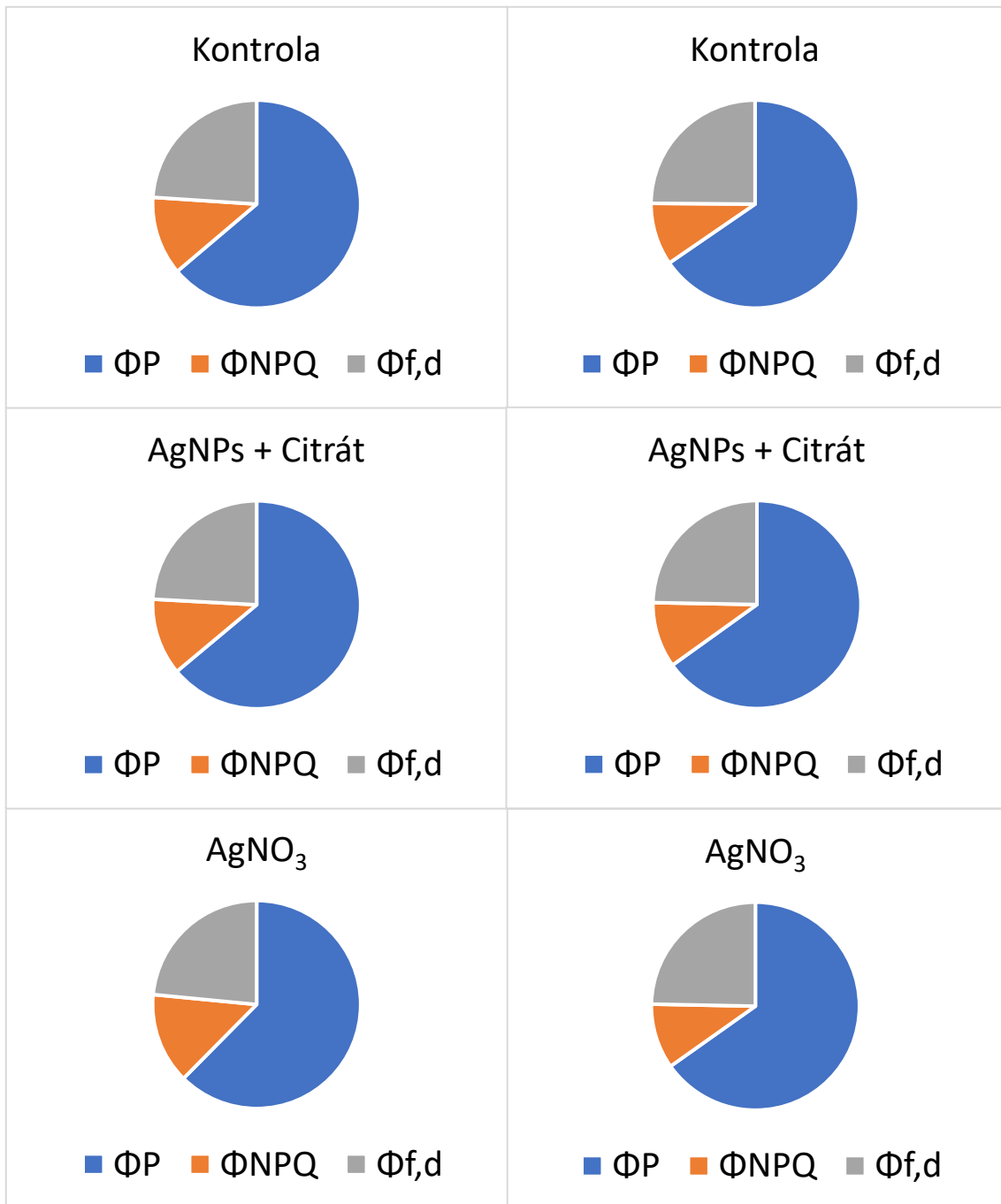
Obr. 37 B) Fotografie měřených rostlin.

Po jednorázovém postřiku rostlin ječmene jarního nebyly zjištěny žádné změny při působení AgNPs ani AgNO<sub>3</sub>. Hodnoty parametru Fv/Fm byly totožné s hodnotami u kontrolních vzorků (Obr. 36 a Obr. 37 A). Rostliny nejevily žádné známky poškození, pouze u listů AgNO<sub>3</sub> bylo pozorováno mírně nahnědlé zbarvení v celé ploše listů způsobené aplikací roztoku (Obr. 37 B).



Obr. 38 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare L.*) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

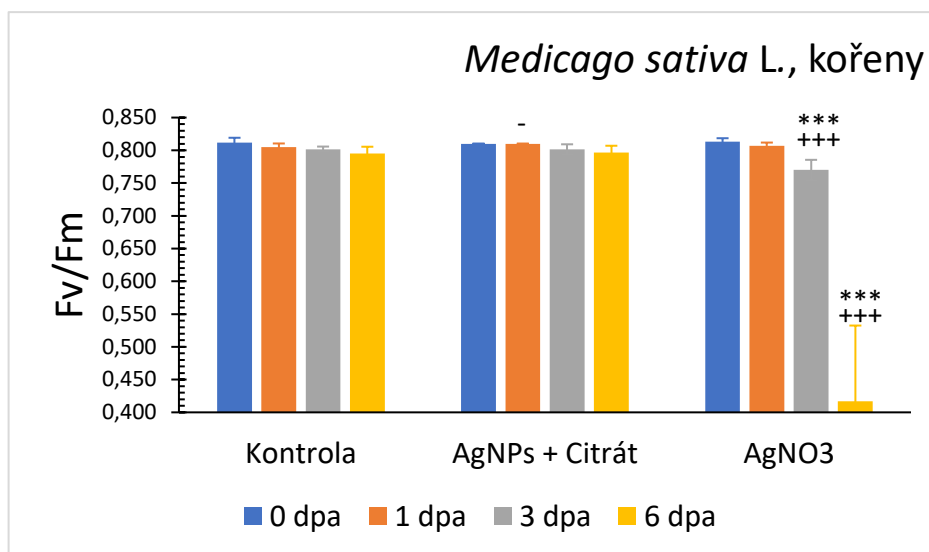
0 dpa

*Hordeum vulgare* L., postřik 6 dpa

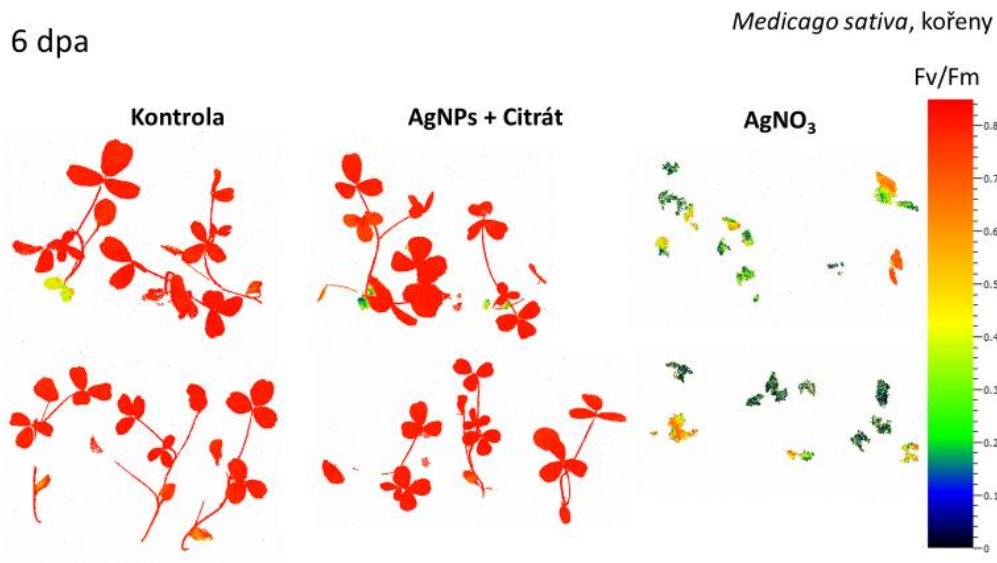
Obr. 39 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) 0. den a 6. den po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhašení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

Ani u kvantových výtěžků nebyly v případě aplikace roztoků postřikem pozorovány téměř žádné signifikantní změny. Výjimkou bylo mírné snížení parametru  $\Phi P$  1. a 3. den po aplikaci u rostlin, které byly vystaveny účinku  $AgNO_3$  (Obr. 38 a Obr. 39), nicméně toto snížení bylo přibližně pouze 2% a navíc mohlo souviset s nižší výchozí hodnotou naměřenou u rostlin před vlastní aplikací  $AgNO_3$ .

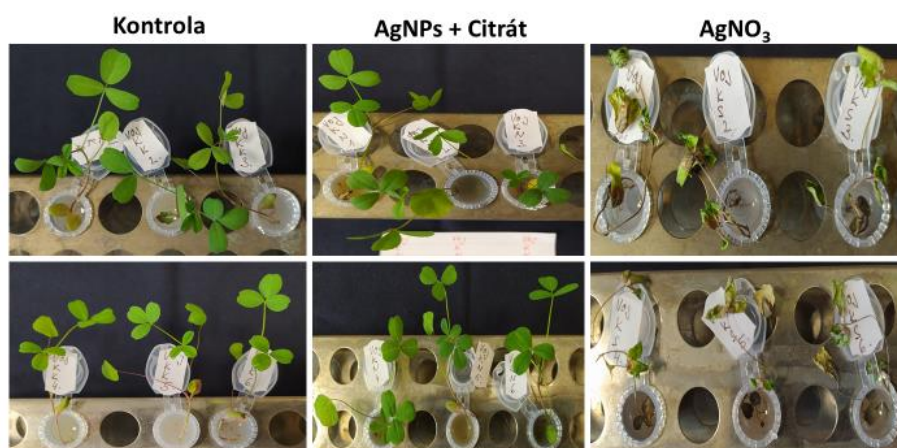
#### 4.4 Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.)



Obr. 40 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).



Obr. 41 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.



Obr. 41 B) Fotografie měřených rostlin



Kontrola

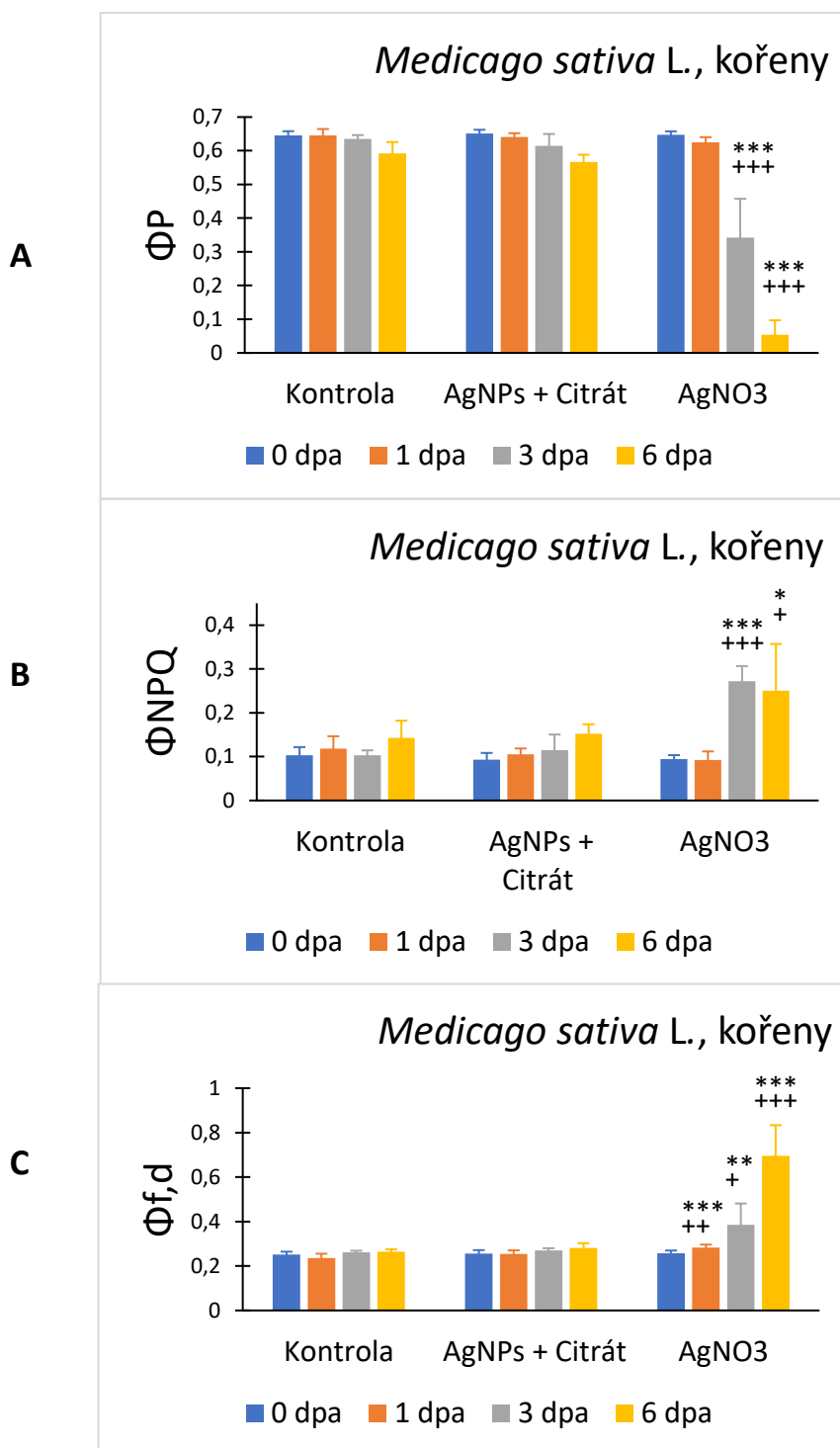
AgNPs

AgNO<sub>3</sub>

Obr. 42 Vizuální porovnání kořenů vybraných rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody.

U rostlin vojtěšky seté, jejichž kořeny byly vystaveny účinku nanočástic stříbra, byly hodnoty parametru Fv/Fm během 6 dní po aplikaci podobné jako u kontroly, zatímco po aplikaci AgNO<sub>3</sub> došlo třetí a zejména 6. den po aplikaci k významnému snížení Fv/Fm (Obr. 40), tedy ke zhoršení funkce PSII. Parametr Fv/Fm poklesl na hodnotu přibližně 0,4, což byla nejnižší hodnota zaznamenaná u rostlin všech testovaných druhů s aplikací roztoků na kořeny. Velmi špatný stav rostlin pod vlivem AgNO<sub>3</sub> je patrný i na fluorescenčním snímku a na fotografii (Obr. 41 A a Obr. 41 B). Z Obr. 42 je zřejmé, že AgNO<sub>3</sub> výrazně

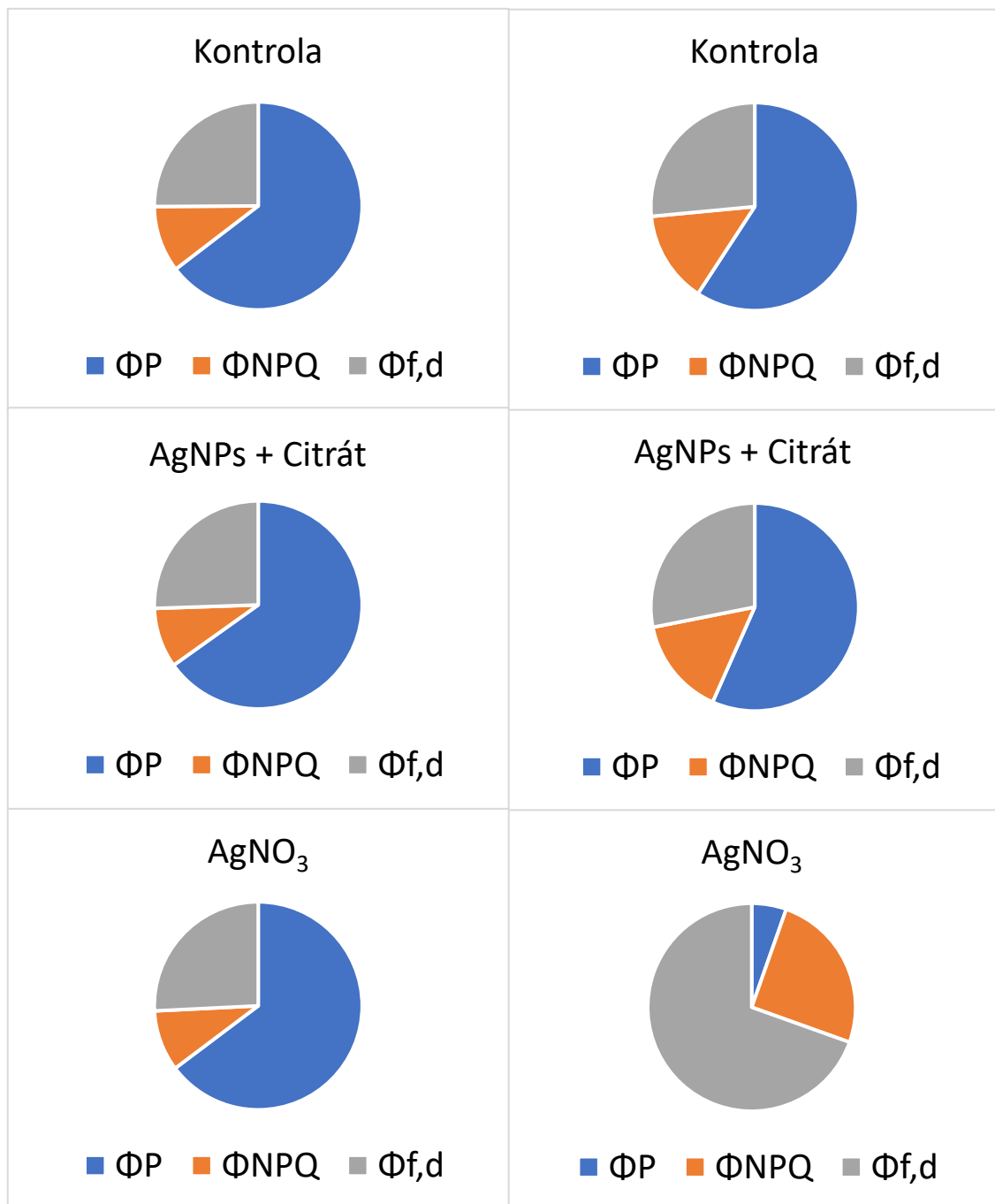
inhiboval také růst rostlin, na rozdíl od AgNPs. Vliv na růst kořenů nebyl zaznamenán ani u nanočástic, ani u AgNO<sub>3</sub> (Obr. 42).



Obr. 43 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

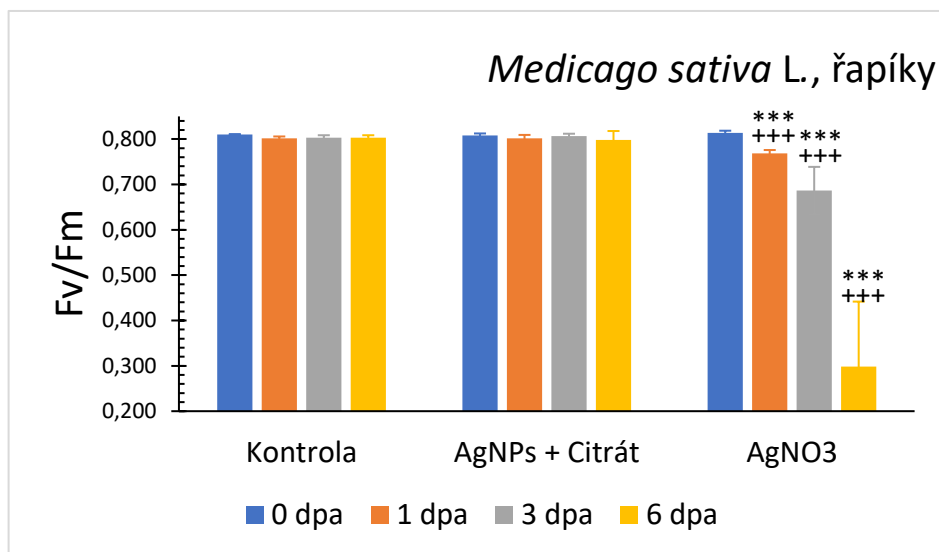


0 dpa      *Medicago sativa* L., kořeny      6 dpa

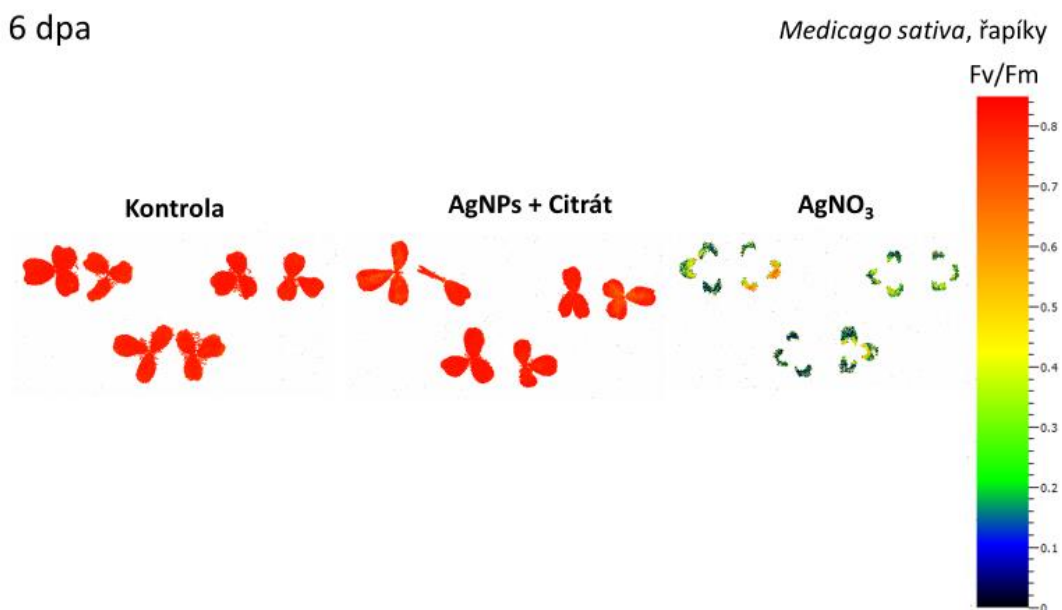


Obr. 44 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na kořeny. U kontrolních rostlin byly kořeny ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

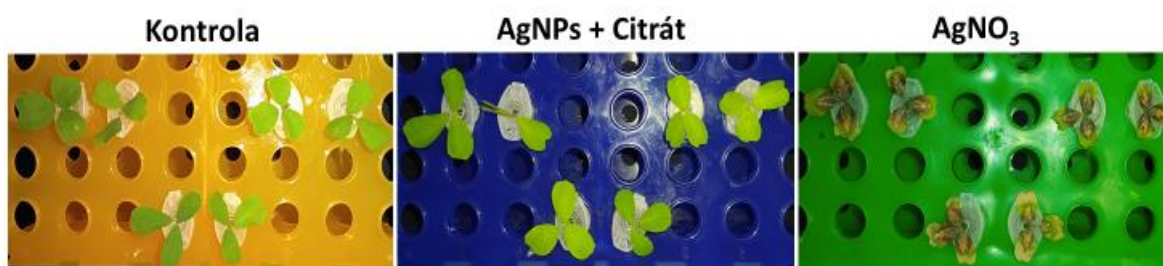
Během 6 dnů aplikace na kořeny nebyl u rostlin vojtěšky seté zjištěn rozdíl mezi kvantovými výtěžky naměřenými u kontrolních rostlin a u rostlin pod vlivem AgNPs (Obr. 43 a Obr. 44). V obou případech došlo 6. dpa k mírnému poklesu  $\Phi_P$  a mírnému nárůstu  $\Phi_{NPQ}$ . Účinek  $AgNO_3$  byl však podobně jako u parametru  $F_v/F_m$  značně negativní. Třetí den po aplikaci došlo k výraznému poklesu parametru  $\Phi_P$  a nárůstu  $\Phi_{NPQ}$  doprovázenému mírným nárůstem  $\Phi_{f,d}$ . Šestý den byl parametr  $\Phi_P$  minimální (přibližně 0,05) a naopak  $\Phi_{f,d}$  dosáhl velmi vysoké hodnoty (přibližně 0,7) (Obr. 43 a Obr. 44). Tyto výsledky značí, že vlivem působení  $AgNO_3$  došlo k téměř úplné inhibici fotosyntetických procesů v důsledku silného poškození rostlin



Obr. 45 Parametr Fv/Fm měřený na listech vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) v průběhu aplikace citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy přes řapík. Řapíky kontrolních listů byly ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

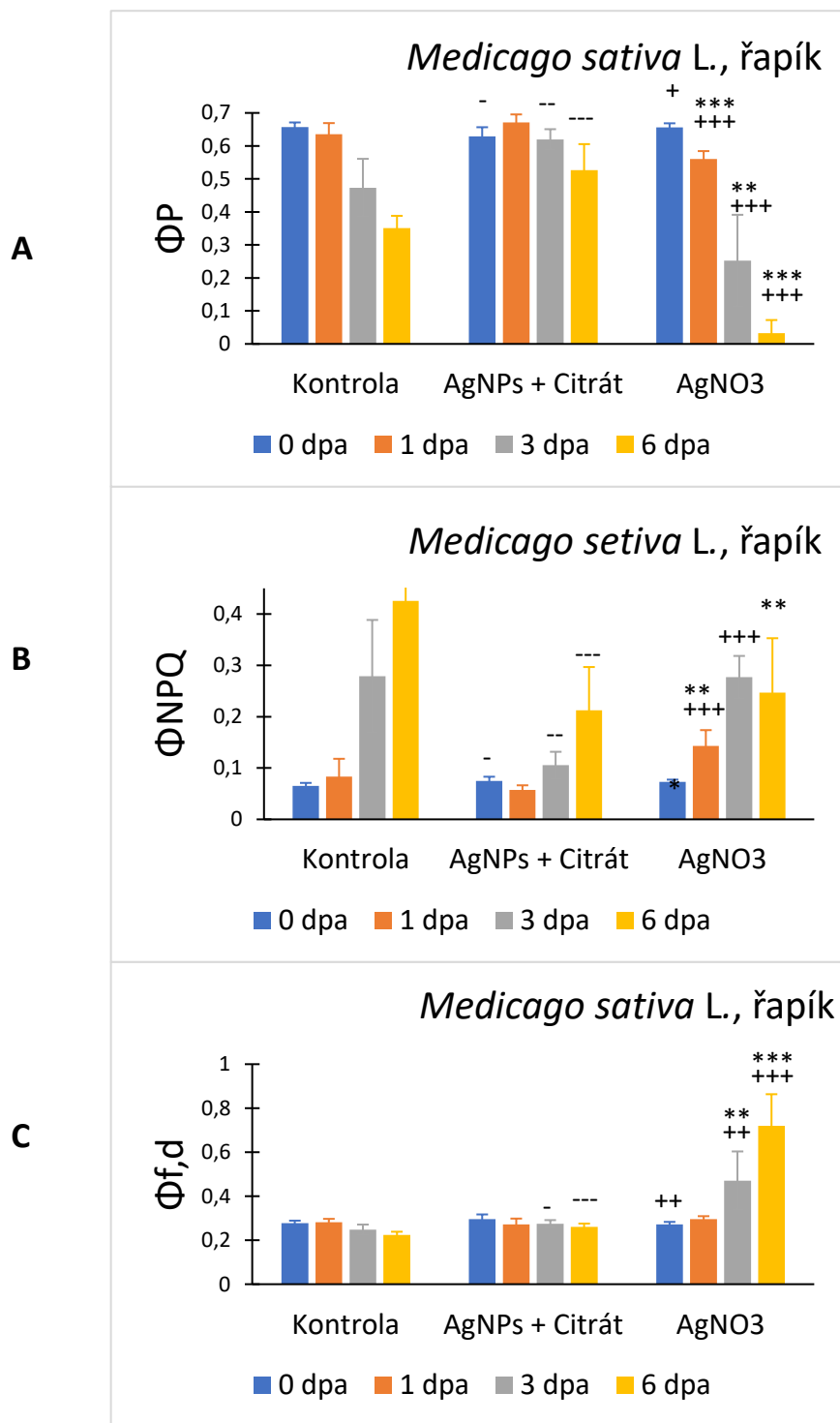


Obr. 46 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy. Kontrolní listy byly ponořeny do deionizované vody.



Obr. 46 B) Fotografie měřených listů

Během měření oddělených listů vojtěšky seté nedošlo k významnému poklesu  $F_v/F_m$  u kontrolní varianty a u listů ovlivněných AgNPs (Obr. 45). Výrazný pokles  $F_v/F_m$  byl však zaznamenán u listů pod vlivem  $AgNO_3$ , a to zejména šestý den měření, kdy byla hodnota  $F_v/F_m$  přibližně 0,3 (Obr. 45). Pokles  $F_v/F_m$  byl tedy ještě výraznější než při aplikaci na kořeny (Obr. 40). Na snímku z Fluorcamu a příslušné fotografii lze pozorovat špatný stav listů způsobený aplikací  $AgNO_3$  – listy byly z velké části nekrotické a zbývající části měly nízké hodnoty  $F_v/F_m$  značící výrazně zhoršenou funkci PSII (Obr. 46 A a Obr. 46 B).

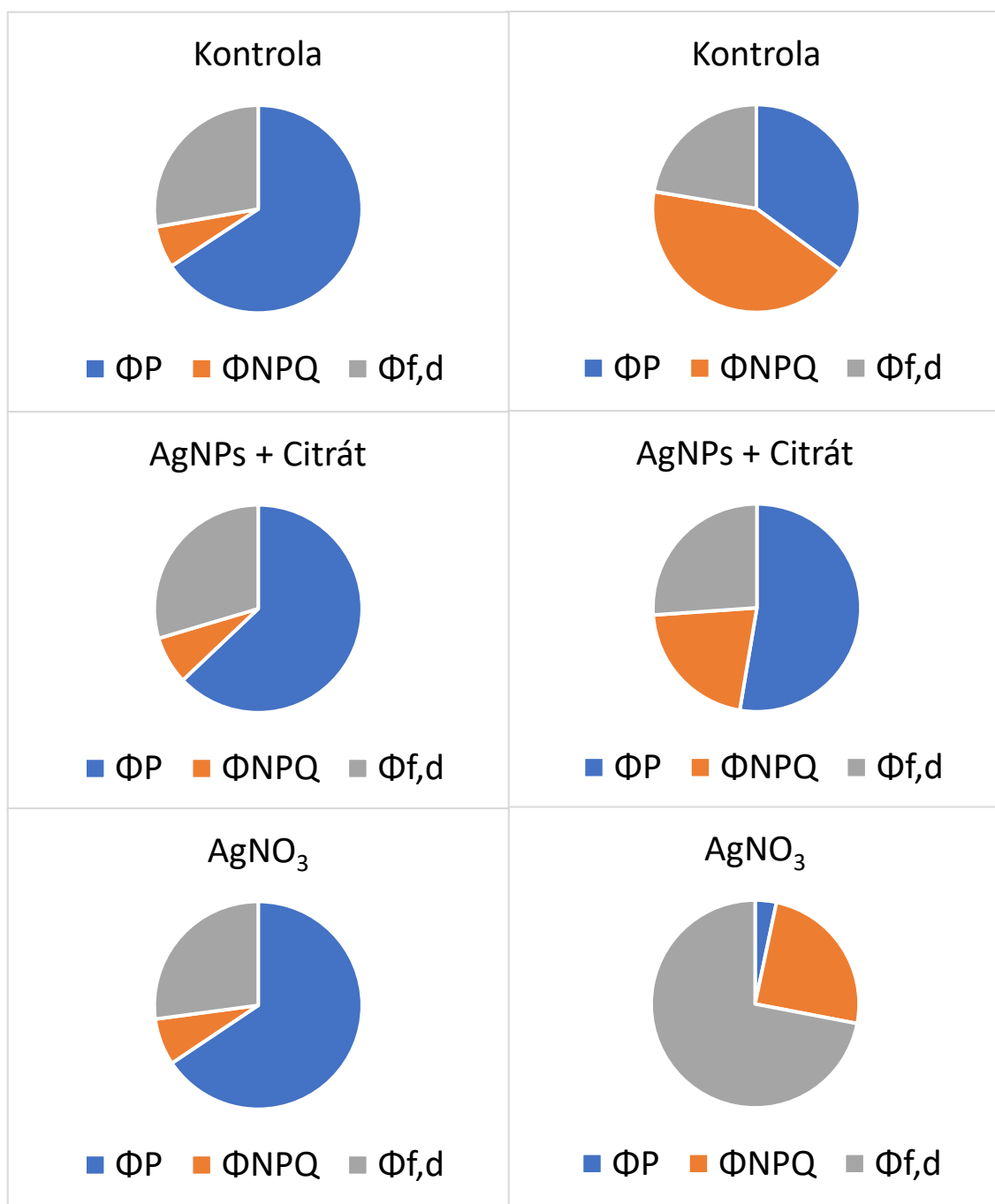


Obr. 47 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u listů vojtěšky seté (*Medicago sativa L.*) v průběhu aplikace citrátového koloиду nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy přes řapík. Kontrolní listy byly řapíkem ponořeny do deionizované vody. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa

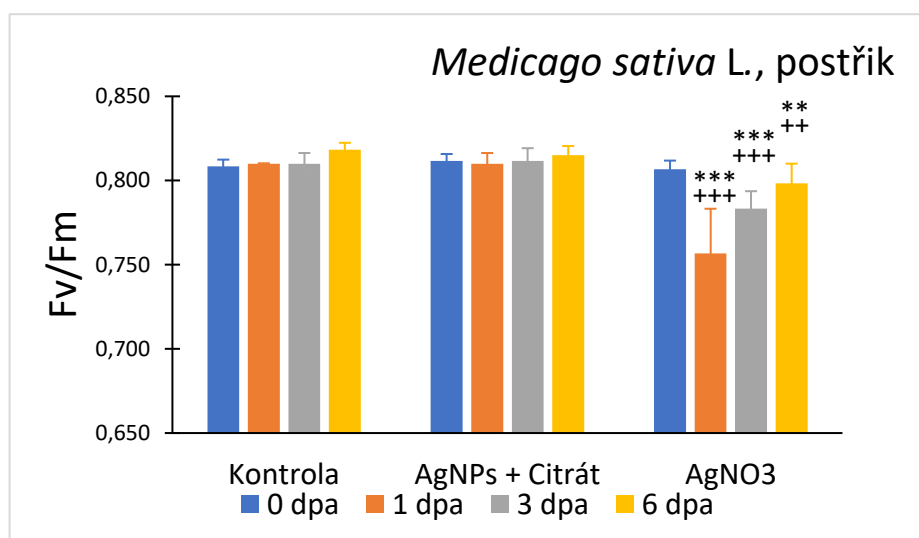
*Medicago sativa* L., řapíky

6 dpa

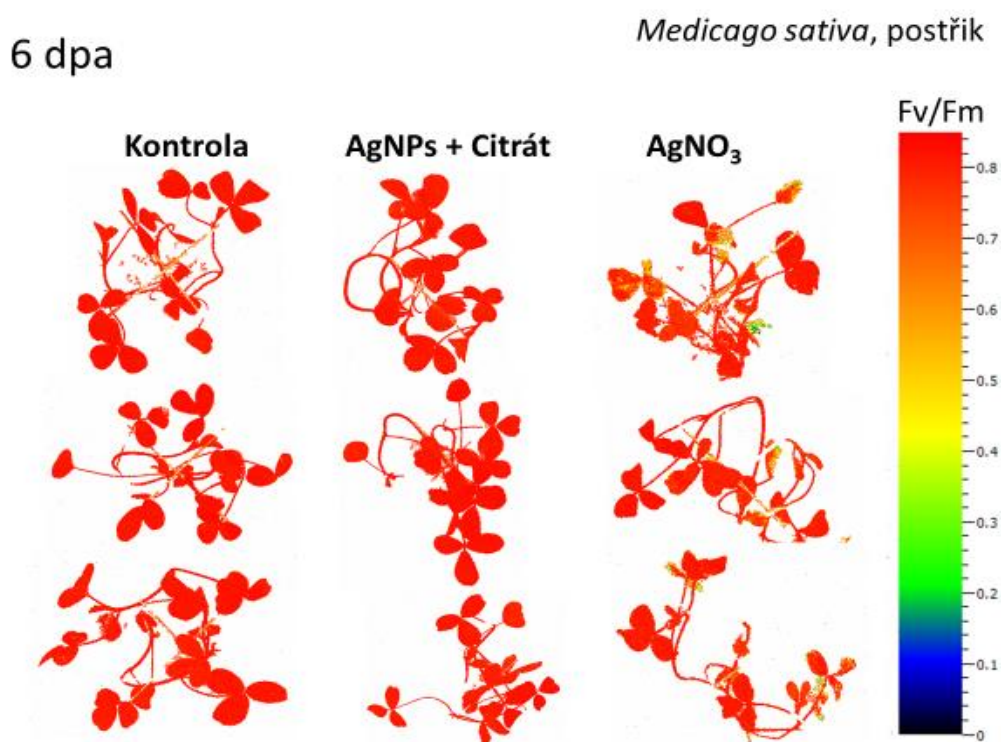


Obr. 48 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 0. den a 6. den po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> na listy přes řapík. Kontrolní listy byly řapíkem ponořeny do deionizované vody. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

U oddělených listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) bylo dále zjištěno, že 3. a 6. dpa byl vlivem AgNPs vyšší  $\Phi_P$  a nižší  $\Phi_{NPQ}$  v porovnání s kontrolou (Obr. 47). Působení nanočástic tedy udrželo efektivitu fotochemických procesů PSII, která u kontrolních listů po oddělení klesala v souvislosti se stimulací ochranných regulačních nefotochemických procesů (Obr. 47 a Obr. 48). U listů pod vlivem  $\text{AgNO}_3$  došlo k postupnému snižování parametru  $\Phi_P$  (až téměř na 0) a ke zvýšení hodnoty  $\Phi_{NPQ}$  (Obr. 47). Od 3. dne po aplikaci došlo u listů v  $\text{AgNO}_3$  k nárůstu  $\Phi_{f,d}$ . Šestý den dosáhl  $\Phi_{f,d}$  hodnoty nad 0,7 (Obr. 47 a Obr. 48), tedy podobně jako při aplikaci na kořeny  $\text{AgNO}_3$  způsobil velmi výrazné poškození fotosyntetického aparátu.

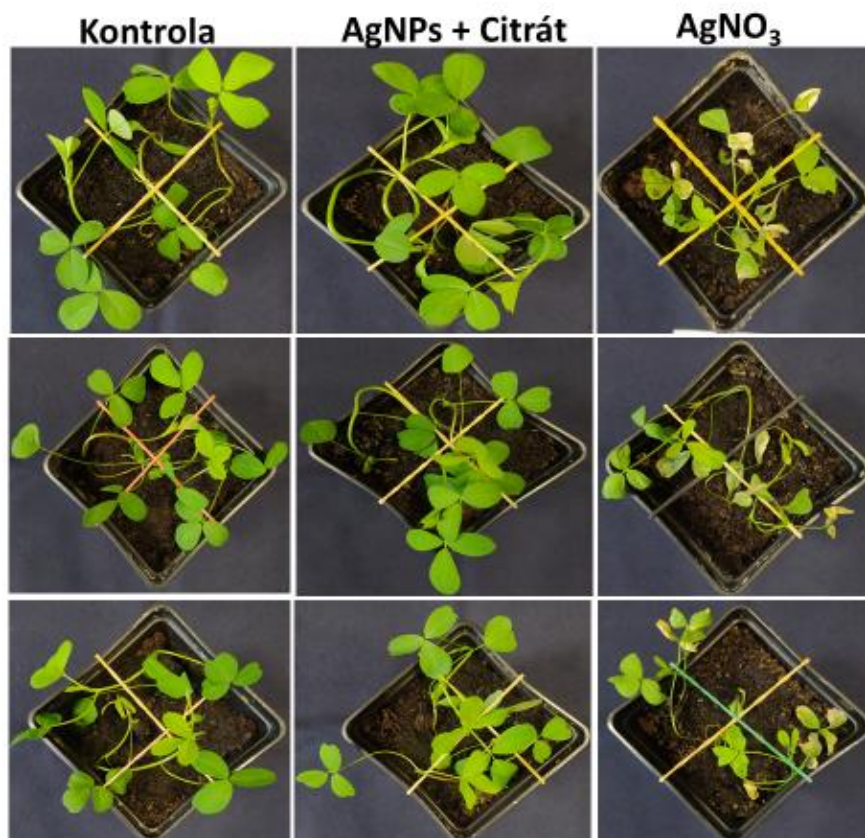


Obr. 49 Parametr Fv/Fm měřený na rostlinách vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postříkány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).



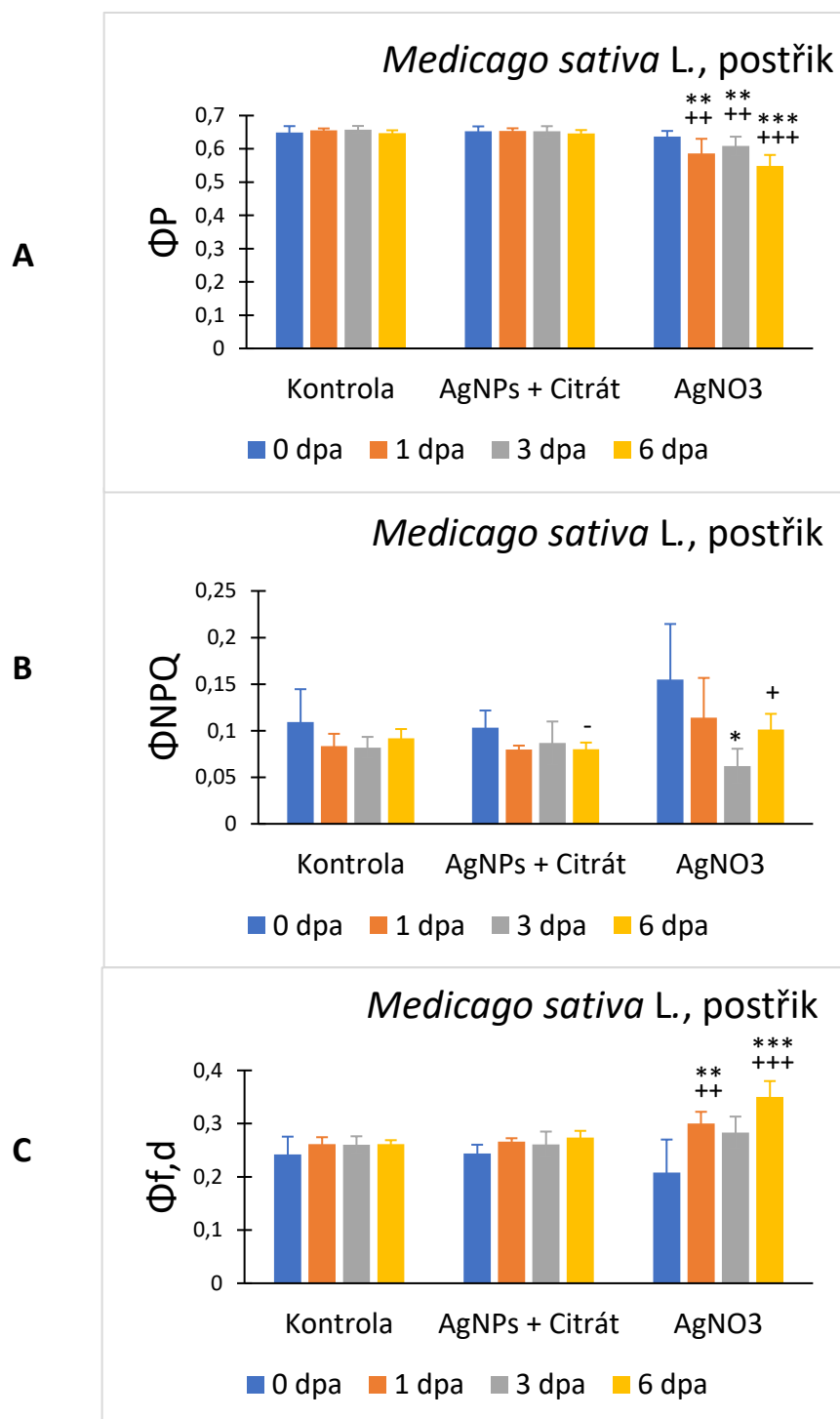
Obr. 50 A) Zobrazení parametru Fv/Fm z Fluorcamu u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 6. den po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postříkány 0,5% roztokem Tween.





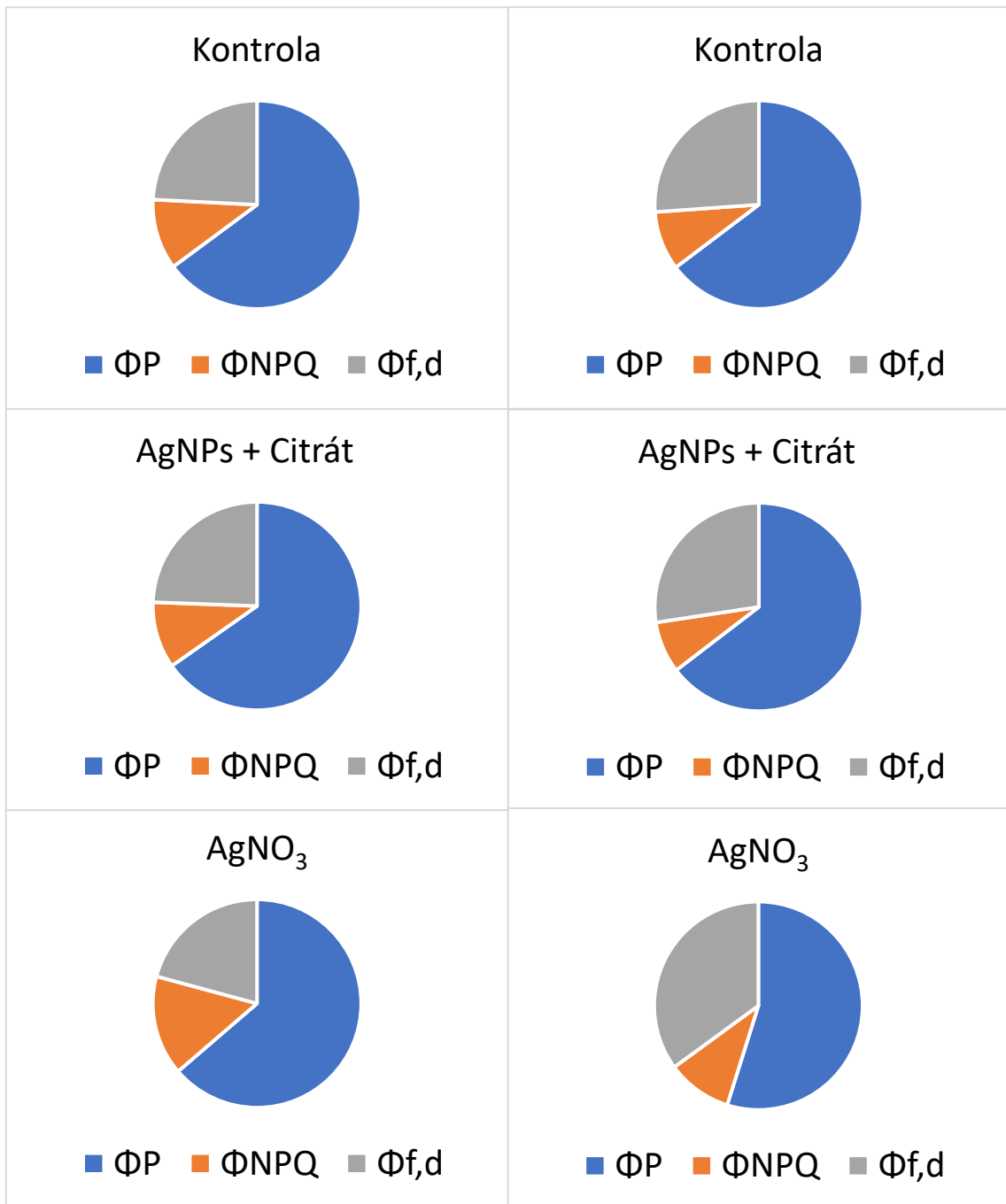
Obr. 50 B) Fotografie měřených rostlin

Po jednorázovém postřiku listů vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) nebyly zjištěny žádné změny parametru Fv/Fm při působení AgNPs, jeho hodnoty byly téměř totožné s hodnotami u kontrolních vzorků (Obr. 49). Zajímavý výsledek byl zaznamenán v případě rostlin, na které byl postřikem aplikován AgNO<sub>3</sub>. První den po aplikaci došlo k signifikantnímu poklesu Fv/Fm (přibližně na hodnotu 0,75), v dalších dnech se ale hodnota Fv/Fm zase postupně zvyšovala, 6. dpa už se blížila 0,8 (Obr. 49 a Obr. 50 A). Tyto změny naznačují, že po postřiku AgNO<sub>3</sub> se funkce PSII nejprve zhoršila a poté se postupně obnovovala. Nicméně u rostlin pod vlivem AgNO<sub>3</sub> byla opět zaznamenána relativně výrazná inhibice růstu (Obr. 50 B).



Obr. 51 A) Efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $\Phi_P$ ), B) kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ), C) kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů ( $\Phi_{f,d}$ ) na konci fluorescenční indukce u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa L.*) po aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. Dpa – dny po aplikaci. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky, n = 6. Hvězdičky nebo pomlčky označují statisticky významný rozdíl oproti kontrole příslušný den po aplikaci, křížky označují statisticky významný rozdíl varianty AgNO<sub>3</sub> oproti variantě AgNPs + Citrát příslušný den po aplikaci (t-test).

0 dpa      *Medicago sativa* L., postřik      6 dpa



Obr. 52 Podíl kvantových výtěžků na konci fluorescenční indukce u rostlin vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) 0. den a 6. den po jednorázové aplikaci citrátového koloidu nanočástic stříbra (AgNPs + Citrát) a AgNO<sub>3</sub> postřikem na listy. U kontrolních rostlin byly listy postřikány 0,5% roztokem Tween. ΦP - efektivní kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, ΦNPQ - kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení, Φf,d - kvantový výtěžek neregulačních disipačních procesů.

U rostlin vojtěšky seté nebyly během 6 dní po jednorázové aplikaci kontrolního roztoku a roztoku AgNPs naměřeny žádné signifikantní rozdíly kvantových výtěžků. U rostlin, které byly vystaveny účinku AgNO<sub>3</sub>, bylo zjištěno mírné snížení parametru  $\Phi_P$  a mírné zvýšení  $\Phi_{f,d}$  (Obr. 51 a Obr. 52). Mírné snížení fotochemie PSII bylo tedy v tomto případě způsobeno nárůstem podílu neregulačních disipativních procesů, a ne nárůstem regulačních nefotochemických procesů.

## 5 DISKUZE

V současné době je spotřeba produktů, které obsahují nanočástice kovů, především nanočástice stříbra, stále rostoucí. To zvyšuje pravděpodobnost jejich akumulace v ekosystému a riziko, že budou působit na rostliny, ovlivní jejich produkci a výnos, případně negativně ovlivní zdraví člověka. Účinek nanočástic stříbra na vyšší rostliny je prozatím málo prozkoumán, avšak na základě dosavadních studií se předpokládá, že absorpce, transport a akumulace nanočástic závisí na druhu rostliny, způsobu aplikace a na jejich koncentraci (Rico et al., 2011; Judy et al., 2010). Např. u pelargonie páskaté byl zjištěn pozitivní dopad AgNPs na obsah fotosyntetických pigmentů (Ghorbanpour a Hatani, 2014), naopak u huseníčku rolního došlo k jeho snížení (Li et al., 2018). Zatímco účinek AgNPs při koncentraci 5 mM u pšenice byl fatální, nižší koncentrace (1 mM) snížila účinnost fotosyntetického transportu elektronů (Rastogi et al., 2019). U brukve sítinovité nebyla zase zjištěna žádná akumulace AgNPs (Haverkamp a Marshall, 2009). Reakce různých rostlinných druhů byla tedy při aplikaci AgNPs odlišná, z tohoto důvodu bylo provedeno srovnání mezi tabákem virginským, huseníčkem rolním, ječmenem jarním a vojtěškou setou, mimo jiné v souvislosti s jejich významností v celosvětové zemědělské produkci (tabák, ječmen, vojtěška) a snadným pěstováním. Huseníček byl vybrán jako standardní modelová rostlina využívaná ve fyziologických studiích.

Aplikace nanočástic stříbra s citrátovým coatingem ( $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) na kořeny tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) neměla signifikantní účinek na sledované fotosyntetické parametry (Obr. 1–4). Pouze první den po aplikaci AgNPs na kořeny byly naměřeny nižší hodnoty  $\Phi\text{P}$  a vyšší hodnota  $\Phi\text{NPQ}$  v porovnání s kontrolními rostlinami indikující vyšší stimulaci ochranných procesů. V následujících dnech toto zvýšení již nebylo pozorovatelné. Naopak při účinku  $\text{AgNO}_3$  byly již od prvního dne zaznamenány nižší hodnoty parametru  $\Phi\text{P}$  a vyšší hodnoty  $\Phi\text{NPQ}$  i  $\Phi\text{f,d}$ ,  $\text{AgNO}_3$  tedy způsobil výrazné poškození fotosyntetického aparátu a rostliny vykazovaly pozdní fázi chlorózy i nekrózy. Nanočástice stříbra sice neměly negativní dopad na fotosyntetické parametry, avšak jejich aplikace potlačila růst kořenů.

U oddělených listů tabáku byla u kontroly zvýšená hodnota  $\Phi\text{NPQ}$  více než u celých rostlin s kořeny inkubovanými ve vodě, to značí, že u kontrolních oddělených listů byly ochranné zhášecí procesy stimulovány více než u celých rostlin. U oddělených listů s AgNPs nebyla pozorována stimulace ochranných procesů, na rozdíl od aplikace na kořeny. Naopak u  $\text{AgNO}_3$  došlo k podobně silnému poškození listů a inhibici fotosyntézy při aplikaci na kořeny a oddělené listy (Obr. 6–9). Absence negativního účinku AgNPs na fotosyntetické

parametry rostlin a oddělených listů tabáku by mohla být způsobena jejich relativně nízkou koncentrací, protože je známo, že negativní efekt AgNPs se projevuje spíše u vyšších koncentrací například u práci Peharec Štefanič et al. (2021) při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Zmíněná inhibice růstu kořenů vlivem AgNPs zřejmě nebyla dostatečně výrazná na to, aby došlo také k inhibici fotosyntézy, která byla zjištěna např. v práci Cvjetko et al. (2018).

Podobně jako u tabáku, ani u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) neměla aplikace AgNPs na kořeny výraznější vliv na fotosyntetické parametry, i když byl potlačen růst kořenů (Obr. 14 – 18). Třetí a 6. den po aplikaci byl však zaznamenán mírný pokles  $\Phi\text{P}$  doprovázený nárůstem  $\Phi\text{NPQ}$  indikující, že AgNPs stimulovaly ochranné zhášecí procesy, které chrání fotosyntetický aparát před nadměrnými excitacemi. Aplikace  $\text{AgNO}_3$  opět vedla k výraznému poškození rostlin a signifikantní inhibici fotosyntézy.

U kontrolních oddělených listů huseníčku došlo po oddělení k postupnému poklesu hodnot  $\Phi\text{P}$  a zvýšení  $\Phi\text{NPQ}$ , což odráží stimulaci ochranných procesů. U AgNPs byly hodnoty parametru  $\Phi\text{P}$  vyšší a  $\Phi\text{NPQ}$  nižší než u kontrol (Obr. 21, Obr. 22). Došlo tedy ke stimulačnímu efektu nanočástic na fotochemii fotosystému II ve stavu adaptovaném na světlo. Negativní efekt  $\text{AgNO}_3$  byl na oddělených listech zaznamenán již 1. den po aplikaci, s postupem dnů docházelo ke stále výraznější inhibici fotosyntézy. Oddělené listy u varianty AgNPs i u kontroly jevíly výrazné fialové zbarvení, což odpovídá zvýšené akumulaci antokyanů. To je typické při oddělení a inkubaci listů tohoto rostlinného druhu na světlo. Tato ochranná reakce vede ke snížení absorpce světelné energie, která je u oddělených listů využívána na fotosyntézu v menší míře než u listů na rostlině. Dochází tak k akumulaci vytvořených asimilátů v listu a následně ke zpětnovazebné inhibici fotosyntézy. Nárůst obsahu antokyanů po aplikaci AgNPs byl zjištěn také v práci Ke et al. (2018), kteří použili hydroponickou aplikaci AgNPs (1 a 2,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) na rostliny huseníčku. V jejich případě byla ale současně zjištěna inhibice fotosyntézy, kterou autoři připisují zhoršenému stavu kořenů.

U ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.) nedošlo téměř k žádné signifikantní změně fotosyntetických parametrů při působení AgNPs na kořeny rostlin vůči kontrole (Obr. 27 – 31). U  $\text{AgNO}_3$  došlo 6. dpa k mírnému zhoršení funkce PSII, u listů byla viditelná chloróza a rostliny byly opožděné v růstu porovnání s kontrolou. Mírná inhibice růstu kořenů byly pozorována u AgNPs i  $\text{AgNO}_3$ . To je v souladu s výsledky práce González-Linares et al. (2020), kteří zjistili inhibici růstu kořenů ječmene při aplikaci AgNPs do půdního substrátu. Námí zaznamenaná inhibice růstu kořenů však nebyla doprovázena poklesem účinnosti fotosyntézy.

Oddělené listy ječmene pod vlivem AgNPs také nevykazovaly žádné změny ve sledovaných fotosyntetických parametrech vůči kontrole (Obr. 32 – 35). U varianty AgNO<sub>3</sub> byl již první den zaznamenán pokles  $\Phi_P$  a zvýšení  $\Phi_f,d$ , zatímco hodnota  $\Phi_{NPQ}$  byla beze změny. Pokles účinnosti fotochemie nebyl v tomto případě spojen se stimulací ochranných zhášecích procesů, ale hlavně s poškozením fotosyntetického aparátu.

Při aplikaci AgNPs na kořeny vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) nebyl zjištěn rozdíl mezi fotosyntetickými parametry oproti kontrolním rostlinám ani vliv na růst kořenů (Obr. 40 – 44). Naopak negativní dopad měl AgNO<sub>3</sub>, který způsobil zhoršení funkce PSII a výrazné zpomalení růstu rostlin. Negativní vliv na růst kořenů, ale u AgNO<sub>3</sub> nebyl zaznamenán, nicméně není vyloučeno jejich funkční poškození v důsledku akumulace stříbra, které mohlo být příčinou výrazně zhoršeného stavu rostlin. Je známo, že vojtěška dokáže velmi dobře akumulovat těžké kovy (Gardea-Torresdey et al., 1998; Peralta-Videa et al., 2004) a bylo také zjištěno, že při hydroponickém pěstování s aplikací AgNPs dochází v kořenech vojtěšky k výrazné akumulaci stříbra v kořenech (Stegemeier et al., 2015). Jestli k akumulaci stříbra došlo po aplikaci AgNPs i v našem případě, není jasné – tato otázka bude předmětem dalšího studia.

U oddělených listů vojtěšky pod vlivem AgNPs došlo během třetího a šestého dne po oddělení ke zvýšení parametru  $\Phi_P$  a snížení  $\Phi_{NPQ}$  v porovnání s kontrolou (Obr. 47 a Obr. 48). Působení nanočástic tedy udrželo efektivitu fotosyntetických procesů PSII, naopak účinkem AgNO<sub>3</sub> došlo k postupnému snižování parametru  $\Phi_P$  a zvyšování  $\Phi_{NPQ}$  i  $\Phi_f,d$ , které odráželo výrazné poškození fotosyntetického aparátu.

Žádné významné změny nebyly pozorovány u vybraných rostlinných druhů při jednorázovém postřiku AgNPs (Obr. 10 – 13, Obr. 23 – 26, Obr. 36 – 39, Obr. 49 – 52). Avšak v případě u AgNO<sub>3</sub> došlo u tabáku a vojtěšky již první den k poklesu parametru Fv/Fm a poté se hodnoty opět vracely, tzn. že po počátečním zhoršení se funkce PSII částečně obnovila. To bylo zřejmě dáno jednorázovou aplikací, ze které se rostliny (alespoň co se týče fotosyntézy) byly schopny vzpamatovat. Růst byl ale inhibovaný. To značí, že AgNO<sub>3</sub> měl negativní účinek na jiné procesy než primární reakce fotosyntézy. Efekt postřiku byl u ječmene jarního obecně menší než u ostatních rostlinných druhů. Tento nižší účinek by mohl souviset s postavením listů na rostlině, které je u ječmene spíše vertikální oproti spíše horizontálnímu postavení listů u ostatních sledovaných rostlinných druhů.

## 6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo srovnat účinek nanočástic stříbra s citrátovým coatingem na vybrané rostlinné druhy, mezi které patřil tabák virginský, huseníček rolní, ječmen jarní a vojtěška setá, při aplikaci na kořeny, řapík nebo řez listu a aplikaci postřikem na listy intaktních rostlin. Pro srovnání účinku byla vybrána deionizovaná voda (příp. 0,5% roztok Tween v případě postřiku), která sloužila jako kontrola, a dusičnan stříbrný (jako negativní kontrola). Byly sledovány změny parametrů chlorofylové fluorescence odrážející fungování primárních fotosyntetických reakcí.

Obecně byl u všech způsobů aplikace a všech rostlinných druhů zjištěn jen velmi malý efekt AgNPs. V rámci aplikace na kořeny a řapíky nebo řez listů byl nejmenší dopad AgNPs pozorován u ječmene jarního. Ječmen nevykazoval téměř žádné změny ve sledovaných parametrech v porovnání s ostatními rostlinami. Naopak největší změny spočívající ve snížení účinnosti fotochemie PSII v důsledku nárůstu ochranných zhášecích procesů (pokles  $\Phi_P$  a nárůst  $\Phi_{NPQ}$ ) byly zaznamenány u kořenů tabáku virginského.,

Účinek  $\text{AgNO}_3$  byl ve většině případů devastující jak při aplikaci na kořeny, tak na řapíky rostlin. Jeho působením došlo k chloróze až k nekróze listů. Největší poškození bylo zaznamenáno při aplikaci na řapíky listů vojtěšky seté – listy byly z velké části nekrotické, s minimální fotosyntetickou funkcí (hodnoty  $\Phi_P$  se blížily 0, zatímco hodnoty  $\Phi_{f,d}$  byly velmi vysoké).

Metodou jednorázového postřiku nedošlo k žádné významné změně fotosyntetických parametrů u žádného rostlinného druhu. Po aplikaci AgNPs se u rostlin neprojevily žádné rozdíly oproti kontrole. Největší změny v porovnání s ostatními testovanými rostlinami byly vidět při účinku  $\text{AgNO}_3$  u huseníčku rolního, kdy došlo ke snížení hodnot parametru  $\Phi_P$  a zvýšení  $\Phi_{f,d}$ , naopak nejmenší efekt byl zaznamenán u ječmene jarního, pravděpodobně vlivem horizontálního postavení listů.

Je důležité zmínit, že výsledky dosažené v rámci této bakalářské práce jsou předběžného charakteru. Ve výzkumu týkajícího se účinků nanočástic stříbra na rostliny je nutné pokračovat. Při pokračování ve studiu této problematiky bych doporučila zvýšit koncentraci nanočástic stříbra a aplikovat nanočástice s odlišnými coatingy, neboť studii byla prokázána odlišná účinnost NPs s různým typem coatingu. Dále bych doporučila rozšířit metody aplikace o aplikaci do půdního substrátu (případně substrátů různého typu) a postřik aplikovat opakovaně během experimentu, případně prodloužit dobu sledování rostlin po aplikaci. Velmi žádoucí by bylo doplnit měření vlivu stříbrných nanočástic na rostliny a jejich fotosyntetické parametry o stanovení obsahu stříbra v rostlinách či listech.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Almutairi Z.M., Alharbi A. (2015) Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* **9**, 551-555.
- Alshaal T., El-Ramady H. (2017) Foliar Application: from Plant Nutrition to Biofortification. *The Environment, Biodiversity and Soil Security* **6**, 71-83.
- Askary M., Amini F., Talebi S. M., Shafiei Gavari M. (2018) Effects of Fe-chelate and iron oxide nanoparticles on some of the physiological characteristics of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Stress in Crop Sciences* **11**, 449-458.
- Balen B., Tkalec M., Šikić S., Tolić S., Cvjetko P., Pavlica M., Vidaković-Cifrek Ž. (2011) Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology* **20**, 815-826.
- Barbasz A., Kreczmer B., Oćwieja M. (2016) Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO<sub>3</sub>). *Acta Physiologiae Plantarum* **38**, 76.
- Beibel J.P. (1960) Hydroponics – the science of growing crops without soil, Florida Department of Agric Bull, **180**.
- Benton J.J. (2005) Introduction: *Hydroponics A Practical Guide for the Soilless Grower*. 2nd ed., CRC press, Boca Raton, Florida, 439 stran.
- Bora K.S., Sharma A. (2010) Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology* **49**, 211-220.
- Butler J.D., Oebker N.F. (2006) Hydroponics as a hobby— growing plants without soil. *Circular* **844**.
- Buzea C., Blandino I.I.P., Robbie K. (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, 17.
- Cocoza C., Perone A., Giordano C., et al. (2019) Silver nanoparticles enter the tree stem faster through leaves than through roots. *Tree Physiology* **39**, 1251-126.
- Colman B.P., Wang S.Y., Auffan M., Wiesner M.R., Bernhardt E.S. (2012) Antimicrobial effects of commercial silver nanoparticles are attenuated in natural streamwater and sediment. *Ecotoxicology* **21**, 1867-1877.
- Cushing B.L., Kolesnichenko V.L., O'Connor C.J. (2004) Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical Reviews* **104**, 3893-3946.
- Cvjetko P., Zovko M., Štefanić P.P., Biba R., Tkalec M., Domijan A-M., Vrček I.V., Letofsky-Papst I., Šikić S. Balen B. (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research* **25**, 5590-5602.
- Darlington T.K., Neigh A.M., Spencer M.T., Nguyen O.T., Oldenburg S. J. (2009) Nanoparticle characteristics affecting environmental fate and transport through soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 08-341.
- Deb S., Shukla M. (2011) A review of dissolved organic matter transport processes affecting soil and environmental quality. *Journal Environmental Analytical Toxicology* **1**, 106.
- Dickson D., Liu G., Li C., Tachiev G., Cai Y. (2012) Dispersion and stability of bare hematite nanoparticles: effect of dispersion tools, nanoparticle concentration, humic acid and ionic strength. *Science of The Total Environment* **419**, 170-177.
- Domingues D.S., Takahashi H.W., Camara C.A.P., Nixdorf S.L. (2012) Automated system developed to control pH and concentration of nutrient solution evaluated in hydroponic lettuce production. *Computers and Electronics in Agriculture* **84**, 53-61.

- Ehrman S.H., Friedlander S.K., Zachariah M.R. (1999) Phase segregation in binary SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticle aerosols formed in a premixed flame. *Journal of Materials Research* **14**, 4551–4561.
- Ehsanpour A.A., Razavizadeh R. (2005) Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **1**, 107-110.
- Eichert T., Kurtz A., Steiner U., Goldbach H.E. (2008) Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* **134**, 151-160.
- Ellis N.K., Jensen M., Larsen J., Oebker N.F. (1974) Nutriculture Systems—Growing Plants Without Soil. *Station Bulletin* **44**.
- Fedlheim D.L., Foss C.A. (2001) *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications*. 1st ed., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 352.
- Fernández-García M., Rodríguez J.A. (2011) Metal oxide nanoparticles. In: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (Schott R.A. ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1-22.
- Flores-Rojas G.G., Kopez-Saucedo F., Bucio E. (2018) Gamma-irradiation applied in the synthesis of metallic and organic nanoparticles: a short review. *Radiation Physics and Chemistry*, **169**.
- Franco A., Fernandez-Canero R., Perez-Urrestarazu L., Valera D.L.L. (2012) Wind tunnel analysis of artificial substrates used in active living walls for indoor environment conditioning in mediterranean buildings. *Building and Environment* **51**, 370-378.
- Gao F.Q., Hong F.S., Liu C., Zheng L., Su M.Y., Wu X., Yang F., Wu C., Yang P. (2006) Mechanism of nanoanatase TiO<sub>2</sub> on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach, inducing complex of rubiscoe rubisco activase. *Biological Trace Element Research* **111**, 239-253.
- Gardea-Torresdey J. L., Gonzalez J. H., Tiemann K. J., Rodríguez O., Gamez G. (1998) Phytofiltration of hazardous cadmium, chromium, lead and zinc ions by biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa). *Journal of Hazardous Materials* **57**, 29-39.
- Gardea-Torresdey J.L., Gomez E., Peralta-Videa J., Parsons J.G., Troiani H.E., Yacaman M.J. (2003) Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir* **19**, 1357-1361.
- Geisler-Lee J., Brooks M., Gerfen J.R., Wang Q., Fotis C., Sparer A., Ma X., Berg R.H., Geisler M. (2014) Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* **4**, 301-318.
- Geisler-Lee J., Wang Q., Yao Y., Zhang W., Geisler M., Li K., Huang Y., Chen Y., Kolmakov A., Ma X. (2012) Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* **7**, 323-337.
- Ghorbanpour M., Hatami M. (2014) Spray treatment with silver nanoparticles plus thidiazuron increases anti-oxidant enzyme activities and reduces petal and leaf abscission in four cultivars of geranium (*Pelargonium zonale*) during storage in the dark. *The Journal of Horticultural Science* **89**, 712-718.
- González-Linares M, Jia Y., Sunahara G.I., Whalen J.K., Naeth M.A. (2020) Barley (*Hordeum vulgare*) seedling growth declines with increasing exposure to silver nanoparticles in biosolid-amended soils. *Canadian Journal of Soil Science* **100**, 189-197.
- Gottschalk F., Sun T., Nowack B. (2013) Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution* **181**, 287-300.
- Gruyer N., Dorais M., Bastien C., Dassylva N., Triffault-Bouchet G. (2013) Interaction between silver nanoparticles and plant growth. In: *International symposium on new technologies for*

*environment control, energy-saving and crop production in greenhouse and plant factory greensys*, Jeju, Korea, 6-11.

Gruyer N., Dorais M., Bastien C., Dassylva N., Triffault-Bouchet G. (2014) Interaction between silver nanoparticles and plant growth. *Acta Horticulturae* **1037**, 795-800.

Haverkamp R.G., Marshall A.T. (2009) The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 1453-1463.

Herzog E., Casey A., Lyng F.M., Chambers G., Byrne H.J., Davoren M. (2007) A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials—the clonogenic assay. *Toxicology Letters* **174**, 49-60.

Hong F.S., Zhou J., Liu C., Yang F., Wu C., Zheng L., Yang P. (2005) Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research* **105**, 269-280.

Chen Y.F., Etheridge N., Schaller G.E. (2005) Ethylene Signal Transduction. *Annals of Botany* **95**, 901-915.

Choi B., Lee S.S., Sik O. Y. (2012) Effects of waste nutrient solution on growth of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) in Korea. *Korean Journal of Environmental Agriculture* **30**, 125-131.

Jiang J., Chen D.-R., Biswas P. (2007) Synthesis of nanoparticles in a flame aerosol reactor with independent and strict control of their size, crystal phase and morphology. *Nanotechnology* **18**, 285603.

Judy J.D., Unrine J.M., Bertsch P.M. (2011) Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental Science & Technology* **45**, 776-781.

Kaveh R., Li Y.S., Ranjbar S., Tehrani R., Brueck C.L., Van Aken B. (2013) Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environmental Science and Technology* **47**, 10637-10644.

Ke M., Qu Q., Peijnenburg W.J.G.M., Li X., Zhang M., Zhang Z., Lu T., Pan X., Qian H. (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Science of The Total Environment* **644**, 1070-1079.

Khan Z., Hussain J.I., Hashmi A.A., Al-thabaiti S.A. (2017) Preparation and characterization of silver nanoparticles using aniline. *Arabian Journal of Chemistry* **10**, 1506-1511.

Khodakovskaya M. V., Kole C., Kumar D.S. (2016a) Plant nanotechnology. In: *Plant Nanotechnology: Principles and Practices* 1st ed. (Khodakovskaya M. V., Kole C., Kumar D.S., eds.), Springer, Switzerland, 2-6.

Khodakovskaya M. V., Kole C., Kumar D.S. (2016b) Physical and Chemical Nature of Nanoparticles. In: *Plant Nanotechnology: Principles and Practices* 1st ed. (Khodakovskaya M. V., Kole C., Kumar D.S., eds.), Springer, Switzerland, 15–20.

Kirschbaum M.U.F. (2011) Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO<sub>2</sub> enrichment studies. *Plant Physiology* **155**, 117-124.

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

Lazár D. (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* **175**, 131-147.

Lei Z., Mingyu S., Xiao W., Chao L., Chunxiang Q., Liang C., et al. (2008) Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation, *Biological Trace Element Research* **121**, 69-79.

- Levard C., Reinsch B. C., Michel F. M., Oumahi C., Lowry G. V., Brown G. E. (2011) Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: Impact on dissolution rate. *Environmental Science & Technology* **45**, 5260-5266.
- Levard C.E., Hotze M., Lowry G.V., Brown G.E (2012) Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science & Technology* **46**, 6900-6914.
- Li W. Q., Qing T., Li C. C., Li F., Ge F., Fei J. J., Peijnenburg W. (2020) Integration of subcellular partitioning and chemical forms to understand silver nanoparticles toxicity to lettuce (*Lactuca sativa* L.) under different exposure pathways. *Chemosphere* **258**, 127349.
- Li X., Ke M., Zhang M., Peijnenburg W.J.G.M., Fan X., Xu J., Zhang Z., Lu T., Fu Z., Qian H. (2018) The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: growth, photosynthesis and antioxidant system. *Environmental Pollution* **232**, 212-219.
- Li X., Lenhart J.J., Walker H.W. (2011) Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles. *Langmuir* **28**, 1095-1104.
- Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J. S., Reid M. L., Ratnikova T. A., Rao A. M., Luo H., Ke P. C. (2009) Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small* **5**, 1128.
- Love J. C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M. (2005) Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* **105**, 1103-1170.
- Lowry G. V., Gregory K.B., Apte S.C., Lead J.R. (2012) Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental Science & Technology* **46**, 6893-6899.
- Lu A.-H., Hui A., Salabas E.L., Schüth F. (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 1222-1244.
- Lu C.M., Zhang C.Y., Wen J.Q., Wu G.R., Tao M.X. (2002) Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of Glycine max and its mechanism, *Soybean Science* **21**, 168-172.
- Luo C.L., Shen Z.G., Li, X.D. (2008) Root exudates increase metal accumulation in mixed cultures: Implications for naturally enhanced phytoextraction. *Water Air Soil Pollution* **193**, 147-154.
- Lv J., Christie P., Zhang S. (2019) Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environmental Science: Nano* **6**, 41-59.
- Mahendra S., Zhu, H. G., Colvin V. L., Alvarez, P. J. (2008) Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environmental Science & Technology* **42**, 9424-9430.
- McGillicuddy E., Murray I., Kavanagh S., Morrison L., Fogarty A., Cormican M., Dockery P., Prendergast M., Rowan N., Morris D. (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of The Total Environment* **57**, 231-246.
- Mediavilla S., Escudero A., Heilmeyer H. (2001) Internal leaf anatomy and photosynthetic resource use efficiency: interspecific and intraspecific comparisons. *Tree Physiology* **21**, 251-259.
- Miralles P., Church T. L., Harris A. T (2012) Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environmental Science & Technology* **46**, 9224-9239.
- Mohamed A.K.S.H., Qayyum M.F., Abdel-Hadi A.M., Rehman R.A., Ali S., Rizwan M. (2017) Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat. *Archives of Agronomy and Soil Science* **63**, 1736-1747.
- Nair P.M.G., Chung I.M. (2014a) Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* **112**, 105-113.

- Nair P.M.G., Chung I.M. (2014b). Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research* **21**, 8858-8869.
- Nair R., Varghese S.H., Nair B.G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D.S. (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* **179**, 154-163.
- Nasretidinova G. R., Fazleeva R.R., Mukhitova R.K., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Ziganshina A.Y., Yanilkin V.V. (2015) Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in solution. *Electrochemistry Communications* **50**, 69-72.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N., Filser J., Miao A. J., Quigg A., Santschi P., Sigg L. (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **17**, 372-386.
- Nebbioso A., Piccolo A. (2013) Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 109-124.
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622-627.
- Nielsen, C.J., Ferrin, D.M. and Stanghellini, M.E. (2006) Efficacy of biosurfactants in the management of *Phytophthora capsici* on pepper in recirculating hydroponic systems. *Canadian Journal of Plant Pathology* **28**, 450-460.
- Noori A., Donnelly T., Colbert J., Cai W., Newman L.A., White J. C.(2020) Exposure of tomato (*Lycopersicon esculentum*) to silver nanoparticles and silver nitrate: physiological and molecular response. *International Journal of Phytoremediation* **22**, 40-51.
- Nowack B., Bucheli T.D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* **150**, 5-22.
- Nowack B., Krug H.F., Height M. (2011) 120 Years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science & Technology* **45**, 1177-1183.
- Pan B. Xing B.S. (2012) Applications and implications of manufactured nanoparticles in soils: a review. *European Journal of Soil Science* **63**, 437-456.
- Papadopoulos A.P., Bar-tal A., Silbe A., Saha U.K., Raviv M. (2008) Inorganic and Synthetic Organic Components of Soilless Culture and Potting Mixes. In: *Soilless Culture: Theory and Practice*. (Raviv M a Lieth J.H. eds.), Elsevier, San Diego, 505-543.
- Parsons J.G., Lopez M.L., Gonzalez C.M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2010) Toxicity and biotransformation of uncoated and coated nickel hydroxide nanoparticles on mesquite plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 1146-1154.
- Patra J.K., Fraceto L.F., Das G., Campos E.V.R. (2020) Nanoparticles on Photosynthesis of Plants: Effects and Role. In: *Green Nanoparticles: Synthesis and Biomedical Applications*, (Patra J.K., Das G., Fraceto L.F., Campos E.V.R. eds.), Springer, Switzerland, 251-272.
- Peharec Štefanić P., Košpić K., Lyons D.M., Jurković L., Balen B., Tkalec M. (2021) Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: Evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. *Nanomaterials* **11**, 744.
- Peralta-Videa J. R., de la Rosa G., Gonzalez J. H., Gardea-Torresdey J. L. (2004) Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research* **8**, 679-685.
- Qian H., Peng X., Han X., Ren J., Sun L., Fu Z. (2013) Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences* **25**, 1947-1955.

- Rastogi A., Zivcak M., Tripathi D.K., Yadav S., Kalaji H.M., Brestic M. (2019) Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. *Photosynthetica* **57**, 209-216.
- Rejman O., Oberle V., Zuhorn I., Hoekstra D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **377**, 159-169.
- Rezvani N., Sorooshzadeh A., Farhadi N. (2012) Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **6**, 517-522.
- Rico C. M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J. R., Gardea – Torresdey J.L. (2011) Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 3485-3498.
- Rouphael, Y., Colla, G. (2005) Growth, yield, fruit quality and nutrient uptake of hydroponically cultivated zucchini squash as affected by irrigation systems and growing seasons. *Scientia Horticulturae* **105**, 177-195.
- Sadak M. S. (2019) Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre* **43**, 38.
- Sáez P.L., Bravo L.A., Cavieres L.A., Vallejos V., Sanhueza C., Font-Carrascosa M., Gil-Pelegrín E., Peguero-Pina J., Galmés J. (2017) Photosynthetic limitations in two Antarctic vascular plants: importance of leaf anatomical traits and Rubisco kinetic parameters. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2871-2883.
- Salama H.M.H. (2012) Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology* **3**, 190-197.
- Savvas D. (2002) Nutrient solution recycling in hydroponics. In: *Hydroponic Production of Vegetables and Ornamentals* (Savvas, D., Passam, H. C. eds.), Embryo Publications, Athens, Greece., 299-343.
- Shahid M., Dumat C., Khalid S., Schreck E., Xiong T., Niazi N. K. (2017) Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of Hazardous Materials* **325**, 36-58.
- Sharma P., Bhatt D., Zaidi M.G., Saradhi P.P., Khanna P.K., Arora S. (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167**, 2225-2233.
- Sharma V.K., Siskova K.M., Zboril R., Gardea-Torresdey J.L. (2014) Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science* **204**, 15-34.
- Shrestha A., Dunn B. (2013) Hydroponics. Oklahoma Cooperative Extension Services HLA-6442.
- Schreck E., Foucault Y., Sarret G., Sobanska S., Cécillon L., Castrec-Rouelle M., Uzu G., Dumat C. (2012) Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: Mechanisms involved for lead. *Science of The Total Environment* **427-428**, 253-262.
- Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., Tsiurkina K., Smolich I., Lawson T., Subramaniam S., Golovko V., Anderson D., Sokolik A., Colbeck I., Demidchik V. (2016) Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal* **85**, 245-257.
- Stampoulis D., Sinha S.K., White J.C. (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science and Technology* **43**, 9473-9479.

- Stegemeier J. P., Schwab F., Colman B. P., Webb S.M., Newville M., Lanzirotti A., Winkler C., Wiesner M.R., Lowry G.V. (2015) Speciation Matters: Bioavailability of Silver and Silver Sulfide Nanoparticles to Alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science & Technology* **49**, 8451-8460.
- Steppler H.A. (1987) ICRAF and a decade of agroforestry development. In: *Agroforestry a decade of development* (Steppler H.A, Nair P.K.R. eds., International Council for Research in Agroforestry, Nairobi, Kenya, 13-24.
- Su Y., Ashworth V., Kim C., Adeleye A. S., Rolshausen P., Roper C., White J., Jassby D. (2019) Delivery, uptake, fate, and transport of engineered nanoparticles in plants: a critical review and data analysis. *Environmental Science: Nano* **6**, 2311-2331.
- Syu Y.Y., Hung J.H., Chen J.C., Chuang H.W. (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* **83**, 57-64.
- Špundová M., Popelková H., Ilík P., Skotnica J., Novotný R., Nauš J. (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**,1051-1058.
- Thimsen E., Rastgar N., Biswas P. (2008) Nanostructured TiO<sub>2</sub> films with controlled morphology synthesized in a single step process: Performance of dye-sensitized solar cells and photo watersplitting. *Journal of Physical Chemistry C* **112**, 4134-4140.
- Thomas S.P., Al-Mutairi E.M., De S.K., (2013) Impact of nanomaterials on health and environment. *Arabian Journal for Science and Engineering* **38**, 457-477.
- Tkalec M., Peharec Štefanić P., Cvjetko P., Šikić S., Pavlica M., Balen B. (2014) The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS One* **9**, 1.
- Tortella G.R., Rubilar O., Durán N., Diez M.C., Martínez M., Parada J., Seabra A.B. (2020) Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials* **390**, 2-15.
- Trobisch S., Schilling G. (1970) Contribution to the clarification of the physiological foundations of seed formation in annual plants and to the effect of additional N-additions to this process on the example of *Sinapis alba* L. *Archives of Agronomy and Soil Science* **14**, 253-265.
- Ullah H., Li X., Peng L., Cai Y., Mielke H.W. (2020) In vivo phytotoxicity, uptake, and translocation of PbS nanoparticles in maize (*Zea mays* L.) plants. *Science of The Total Environment* **737**, 139558.
- Ullrich S. E. (2011) Cultural Practises Focus on Major Barley-Producing Regions In: *Barley, production, improvement, and uses* (Ullrich S.E. ed.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 242.
- Wang L., Czedik-Eysenberg A., Mertz R.A, Si Y., Tohge T., Nunes-Nesi A., Arrivault S., Dedow L.K., Bryant D.W., Zhou W., Xu J. (2014) Comparative analyses of C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> photosynthesis in developing leaves of maize and rice. *Nature Biotechnology* **32**, 1158-1165.
- Wang W.-N., Tarafdar J.C., Biswas P. (2013) Nanoparticle synthesis and delivery by an aerosol route for watermelon plant foliar uptake. *Journal of Nanoparticle Research* **15**, 1-13.
- Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B.P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J, Bernhardt E.S. (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology* **45**, 2360-2367.
- Yu S. J., Yin J.G., Liu J.F (2013) Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes Impacts* **15**, 78-92.
- Zheng L, Hong F., Lu S., Liu C. (2005) Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach, *Biological Trace Element Research* **104**, 82-93.