

FYTOTOXICITA STŘÍBRNÝCH IONTŮ

SOŇA KRÍŽKOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}
a RENÉ KIZEK^a

^a Ústav chemie a biochemie, a ^b Ústav výživy zvířat a pícní-nářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
kizek@sci.muni.cz

Došlo 2.7.08, přepracováno 30.9.08, přijato 29.1.09.

Klíčová slova: rostliny, stříbro, toxicita, hyperakumulace, inhibice, akvaporiny, ethylen, kyselina abscisová (ABA), oxidativní stres, fytochelatinu

Obsah

1. Toxicita stříbra pro rostliny
 - 1.1. Stříbro ve vodách a půdách
 - 1.2. Kontaminace životního prostředí
 - 1.3. Toxicita stříbrných iontů
2. Akumulace a distribuce stříbra v rostlinách
3. Působení stříbra na rostliny
 - 3.1. Stříbrné ionty způsobují v rostlinách oxidativní stres
 - 3.2. Syntéza detoxikačních peptidů a proteinů
 - 3.2.1. Produkce fytochelatinů
 - 3.2.2. Rostlinné proteiny podobné metalothioneinu
 - 3.3. Syntéza obranných proteinů
 - 3.4. Ovlivnění příjmu vody rostlinami
 - 3.5. Inhibice enzymů
 - 3.6. Vliv stříbra na signální dráhy rostlin
 - 3.6.1. Ag⁺ ionty jsou schopny inhibovat působení ethylenu
 - 3.6.2. Vliv na biosyntézu ethylenu
 - 3.6.3. AgNO₃ zvyšuje hladinu kyseliny abscisové
 - 3.7. Ovlivnění syntézy membránových lipidů
4. Závěr

1. Toxicita stříbra pro rostliny

Stříbro je ušlechtilý kov využívaný člověkem již od starověku. V přírodě se stříbro vyskytuje jak v kovové formě, tak ve formě stříbrných rud, především argentitu a akantitu (Ag₂S), často společně se sulfidy jiných kovů např. olova, mědi, železa a zlata. V českých zemích byla těžba stříbra soustředěna do okolí Kutné Hory. První průmyslová těžba stříbra pochází z let 985–995, kdy zde razili

stříbrné denáry Slavníkovci na svém hradišti v Malíně. Z fyzikálního pohledu se čisté stříbro vyznačuje nejvyšší tepelnou a elektrickou vodivostí ze všech kovů a zároveň nízkou kontaktní rezistencí. Díky těmto vlastnostem a vysoké poddajnosti a kujnosti je používáno v celé řadě aplikací. V současné době slouží jako součást různých slitin v elektrotechnice, při výrobě CD a DVD nosičů, ve šperkařství, v lékařství a některé jeho sloučeniny jsou díky fotosenzitivním vlastnostem nezbytné pro fotografický průmysl. Nověji se ukazuje, že stříbrné částice mohou nacházet uplatnění v nanotechnologických postupech a aplikacích¹.

1.1. Stříbro ve vodách a půdách

Obsah stříbra v povrchových vodách se pohybuje od 0,01 μg l⁻¹ v nekontaminovaných oblastech až po 0,1 μg l⁻¹ ve městech a průmyslových oblastech. V blízkosti skladů nebezpečných odpadů, fotografických provozů a v horkých pramenech bylo zjištěno až 300 μg l⁻¹ stříbrných iontů².

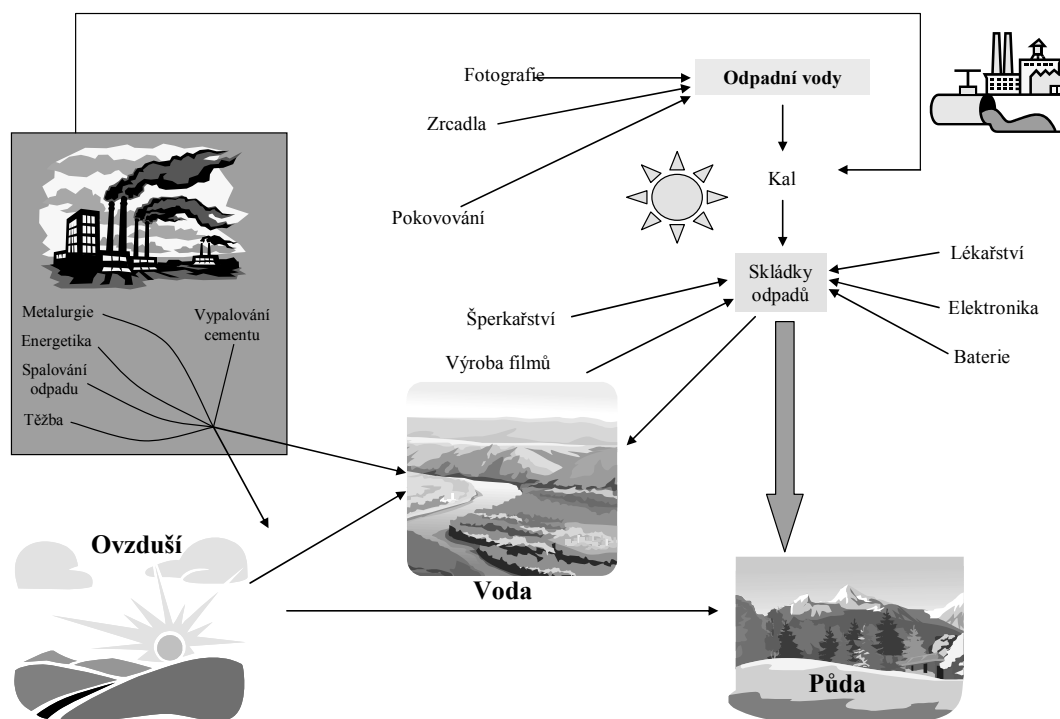
Průměrný obsah stříbra v půdě je 0,1 μg g⁻¹. Rozpětí zjištěných hodnot se pohybuje od 0,01 do 5 μg g⁻¹, ale byly zjištěny obsahy stříbrných iontů nad 40 μg g⁻¹ v oblastech s výskytem stříbronosných rud. Na rozdíl od velmi nízkých koncentrací v životním prostředí jsou obsahy stříbrných iontů v odpadních kalech z chemických, průmyslových a těžebních provozů relativně vysoké a mohou dosáhnout hodnoty až 900 μg g⁻¹ (cit.³).

1.2. Kontaminace životního prostředí

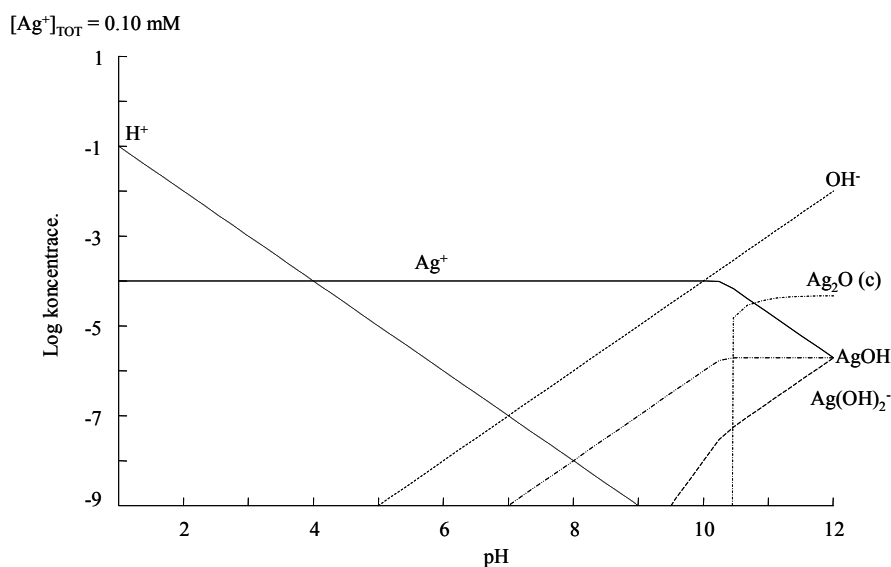
Do životního prostředí se stříbro dostává především díky průmyslové těžbě, metalurgii, v menší míře díky umělému vyvolávání srážek (krystalky jodidu stříbrného vytváří kondenzační jádra v oblacích) a fotografickému průmyslu (vývojky)⁴. Z těchto zdrojů se stříbrné ionty šíří a zasahují do celého ekosystému^{5,6}, viz shrnutí na obr. 1. Největší pozornost je věnována rybám a jiným vodním organismům, pro které je stříbro mimořádně toxické⁷. Při koncentraci Ag⁺ 1–5 μg l⁻¹ dochází k úhynu nejcitlivějších druhů^{2,8}.

1.3. Toxicita stříbrných iontů

Působení těžkých kovů na organismus je obecně založeno na jejich interakci s biopolymery (především proteiny, ale i nukleovými kyselinami) a na indukci vzniku volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS), z čehož dále vyplývají jejich jednotlivé toxické účinky. Toxicita těžkých kovů a jejich jednotlivých sloučenin je závislá na rozpustnosti ve vodě. Stříbro v iontové formě je jedním z nejtoxičtějších těžkých kovů. Na rozdíl od rtuti převážná většina stříbrných iontů v životním pro-



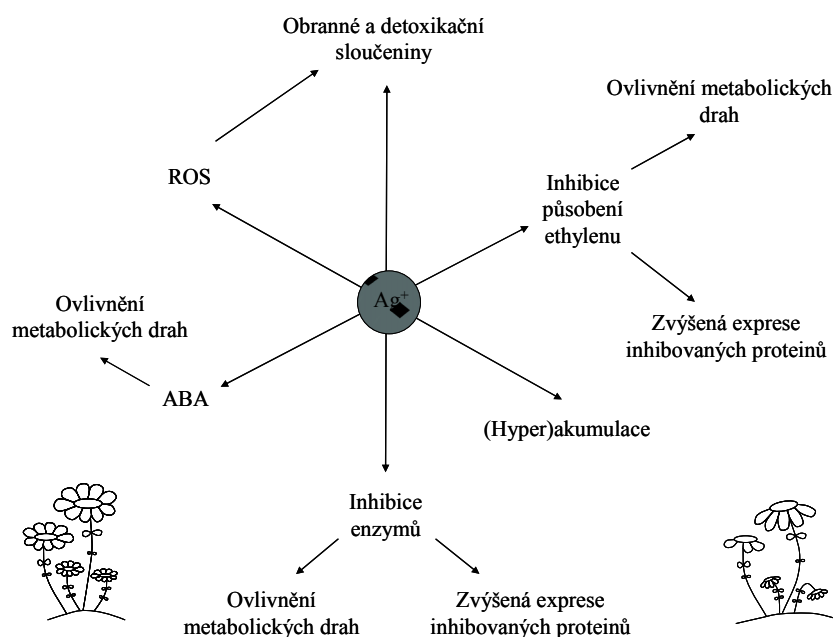
Obr. 1. Schéma toku stříbrných iontů v životním prostředí

Obr. 2. Distribuční diagram iontů stříbra ve vodném prostředí; diagram byl vytvořen pomocí programu Medusa (<http://www.kemi.kth.se/medusa>, cit.⁹⁵)

středí rychle přechází do nerozpustných sloučenin, především sulfidů a chloridů, a proto Ag^+ nepatří k nejzávažnějším polutantům z řad těžkých kovů^{3,7}. Akutní toxicita jednotlivých sloučenin stříbra se tedy výrazně liší v závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě, viz distribuční

diagram jednotlivých forem Ag^+ iontů ve vodě v závislosti na pH (obr. 2)².

Ve sloučeninách se stříbro vyskytuje především v oxidačním stavu Ag^+ (možné jsou i Ag^{2+} a Ag^{3+} , ale za normálních podmínek převažuje jednomocná forma). Stří-



Obr. 3. Shrnutí možného působení stříbrných iontů na rostlinný organismus, ABA – kyselina abscisová, ROS – volné kyslíkové radikály

brné ionty jsou schopny tvorby řady koordinačních komplexů nízkomolekulární i vysokomolekulární povahy. Vazba stříbrných iontů na proteiny se uskutečňuje především pomocí thiolových skupin cysteinových zbytků, možná je i interakce s imidazolovou skupinou histidinu. V případě DNA je možná interakce Ag^+ iontů s jednotlivými bázemi, především s N7 adeninu a guaninu. Dále byly pozorovány i bifunkční adukty s adeninem a thyminem, a guaninem a cytosinem. V přítomnosti potenciálního zdroje volných radikálů (kyseliny askorbové) bylo pozorováno oxidativní poškození DNA s následnými zlomy⁹, možná je i vazba stříbrných iontů na polysacharidy buněčné stěny¹⁰. V mnoha studiích byl potvrzen toxický efekt stříbra na nižší organismy^{11–14}. Vliv stříbrných iontů na rostliny je shrnut na obr. 3. V případě modelového organismu pro ekotoxikologické studie okřehek menšího (*Lemna minor*) byl zkoumán vliv deseti iontů těžkých kovů na jeho růst ($(\text{HAsO}_4)^{2-}$, AsO_2^- , Cd^{2+} , $(\text{CrO}_4)^{2-}$, Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Tl^+ a Zn^{2+}). Bylo zjištěno, že stříbrné ionty vykazovaly pro okřehek nejvyšší toxicitu¹⁴.

V případě suchozemských rostlin bylo zjištěno, že rostliny jsou nejcitlivější na působení stříbra ve stadiu klíčení, kde byly negativní efekty pozorovány při koncentraci Ag^+ $750 \mu\text{g l}^{-1}$ u salátu hlávkového (*Lactuca sativa*) a $7500 \mu\text{g l}^{-1}$ u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) a jiných zkoumaných rostlin¹⁵. Aplikace $9800 \mu\text{g l}^{-1}$ Ag^+ měla letální efekt na rostliny kukuřice (*Zea mays*) a aplikace $100\,000 - 1\,000\,000 \mu\text{g l}^{-1}$ způsobila úhyn rostlin rajčat (*Lycopersicon esculentum*) a fazole (*Phaseolus spp.*)². Semena kukuřice, salátu, ovsu (*Avena sativa*), brukve (*Brassica rapa*), soji (*Glycine max*), špenátu (*Spinacia*

oleracea), a čínské zeli (*Brassica campestris*) pěstovaná v půdě obsahující Ag_2S se vyvíjela bez známek růstové deprese i při nejvyšším obsahu Ag_2S , tj. $106 \mu\text{g g}^{-1}$ (cit.⁶). Letální efekt stříbrných iontů byl prokázán i u explantátové kultury rajčat¹⁶.

Byla publikována řada prací zabývajících se ekotoxikologickými studiemi vlivu stříbra na různé ekotoxikologické modelové organismy (vodní rostliny, bezobratlí a ryby)^{15,17,18}. Z těchto studií je zřejmé, že stříbro je ve své rozpustné formě schopno ovlivňovat celou řadu buněčných procesů ve všech organismech. Jeho bakteriostatický účinek je využíván například pro dezinfekci vody či při ošetření popálenin^{19–21}.

Vliv stříbra na terestrické rostliny je studován již méně. Nyní je známo, že stříbro v rostlinách ovlivňuje celou řadu procesů, z nichž nejznámější jsou inhibice působení ethylenu, ovlivnění permeability membrán a tím ovlivnění příjmu vody a minerálů, inhibice enzymů a vznik ROS způsobujících oxidační stres.

2. Akumulace a distribuce stříbra v rostlinách

Některé rostlinné druhy jsou schopny vázat vysoké koncentrace těžkých kovů. Pokud se jedná o hodnoty, které jsou vyšší než 0,1 hm.% v sušině v případě většiny kovů, s výjimkou zinku, kde je tato hodnota 1 hm.% v sušině, kadmia (0,01 hm.% v sušině) a zlata (0,0001 hm.% v sušině), je tento jev označován jako hyperakumulace²². V případě rostlin se používá také označení metalofyty. Obsah těžkého kovu v těchto rostlinách je více než $100\times$

vyšší ve srovnání s neakumulujícími druhy. Tato biologická vlastnost je základem pro technologii zvanou fytoextrakce, která může být aplikována pro fyto-mining, ve fyto-remediacích, výrobě funkčních potravin atd. Nedávno bylo prokázáno, že rostliny mohou sloužit jako výrobci kovových nanočástic^{23,24}.

Do roku 2008 nebyl známý žádný rostlinný druh, který by byl schopen hyperakumulace stříbra^{24,25}. Z eukaryotických organismů byla tato schopnost popsána jen u hub, především u muchomůrek (*Amanita* sp.), a to především muchomůrky šiškovitě (*A. strobiliformis*), kde byl zjištěn obsah stříbra více než 1000 mg kg⁻¹, což je více než 250násobný obsah ve srovnání s podložní půdou a více než desetinásobná hodnota oproti dříve známým hodnotám u hub²⁵.

Obsah stříbra v nadzemních částech rostlin po indukované akumulaci, tj. po přidávku chelatačního činidla, se typicky pohybuje od 1 µg g⁻¹ (cit.²⁶) po 126 µg g⁻¹ (cit.²⁷). Většina stříbra je v rostlinném organismu deponována v kořenech³. V nadzemních částech rostliny je stříbro akumulováno převážně do mladších listů a na jejich okraji v případě jednoděložných rostlin, v případě dvouděložných rostlin je rozdílná distribuce stříbra v nadzemní části méně zjevná, ale rozdělení zůstává podobné³. Hyperakumulace stříbra rostlinami byla poprvé popsána v roce 2008 ve studii²⁴, kde byly zkoumány limity akumulace stříbra dvěma druhy rostlin, známých jako metalofyty, brukev sítinovitá (*Brassica juncea*) a tolíce vojtěška (*Medicago sativa*). Za účelem zjištění limitu hyperakumulace stříbra, formy, ve které je akumulováno a mechanismu jeho uchování, byly použity abnormálně vysoké koncentrace stříbra ve formě AgNO₃ a to až do 1 hm.% v médiu. Po 72 h expozice v případě nejvyšší koncentrace stříbra byl obsah stříbra v sušině až 140 000 µg g⁻¹. Rychlost příjmu stříbrných iontů oběma rostlinami byla více než 1000× vyšší, než bylo doposud publikováno. V rostlinných pletivech byla prokázána přítomnost nanočástic o přibližně kulovitém tvaru se střední hodnotou průměru 50 nm. Autoři práce předpokládají možnost použití těchto rostlin pro výrobu stříbrných nanočástic²⁴. Nanočástice stříbra o průměru 0,9 nm byly vyprodukované také ve vojtěšce pěstované na agaru obsahujícím kovové stříbro²³. Produkce stříbrných nanočástic byla dále zjištěna i u kafrovníku lékařského (*Cinnamomum camphora*)²⁸.

3. Působení stříbra na rostliny

3.1. Stříbrné ionty způsobují v rostlinách oxidativní stres

Expozice organismu těžkým kovům má za následek vznik volných ROS a následně spuštění buněčných detoxikačních mechanismů. Vystavení buněk působení oxidačního stresu má za následek poškození proteinů, nenasycených mastných kyselin a DNA, což vede k nezvratnému poškození buňky a může vyústit až v její smrt.

Vystavení rostliny zvýšenému působení ROS, např.

při ozáření UV-B paprsky či vystavení ozonu, se projevuje předčasnými příznaky senescence následovanými nektrózou. V práci Navabpour a spol. byl zkoumán vliv AgNO₃ na klíčící rostlinky *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní)²⁹. Ošetření semenáčků způsobilo expresi některých genů spojených se senescencí, především LSC54 kódujícího rostlinný protein podobný metalothioneinu a dalších genů spojených se senescencí (LSC94, LSC222, LSC790, LSC760, LSC803 kódující proteasy a peroxidasy). Dále byla zaznamenána snížená exprese genu RBCS kódujícího malou podjednotku fotosyntetického enzymu ribulosobifosfát karboxylasy, což je také spojováno s rostlinnou senescencí. Celkově byla pozorována zvýšená exprese asi poloviny proteinů spojených se senescencí, ale geny specifické pro senescenci (např. SAG12) indukované nebyly. Tento jev ukazuje na fakt, že k pravé senescenci po vystavení rostlin působení těžkého kovu nedochází.

Účinek AgNO₃ byl výrazně nižší, pokud byly rostlinky ošetřeny zhášeči volných radikálů. Indukce genu LSC803 kódujícího lipidhydroperoxiddependentní glutathionperoxidasu indukovatelnou přítomností ROS a zvýšení obsahu peroxidovaných mastných kyselin naznačuje, že stříbrné ionty v rostlinách způsobují oxidační stres. V exponovaných rostlinách byla zjištěna přítomnost singletového kyslíku, superoxidového a hydroxylového radikálu (¹O₂, O₂^{-•} a OH[•]), a to tak, že pokusné rostliny byly po expozici AgNO₃ vystaveny působení selektivních zhášečů jednotlivých volných radikálů (DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan) pro ¹O₂, TIRON (4,5-dihydroxy-*m*-benzendisulfonát disodný) pro O₂^{-•} a kyselina benzoová pro OH[•]). Toto ošetření mělo u všech použitých sloučenin za následek snížení exprese LSC54 ve srovnání s rostlinami ošetřenými pouze AgNO₃. Pokud byly rostliny po ošetření AgNO₃ vystaveny působení kyseliny askorbové, došlo ke snížení exprese LSC54 až na úroveň kontrolních rostlin, které působení AgNO₃ vystaveny nebyly²⁹. Indukce volných radikálů stříbrnými ionty byla popsána i v dalších pracích^{30–32}.

3.2. Syntéza detoxikačních peptidů a proteinů

3.2.1. Produkce fytochelatinů

Fytochelatiny (neboli kadystiny, PC) jsou skupina nízkomolekulárních peptidů přítomných u rostlin a u hub, které se účastní chelatace a detoxikace těžkých kovů. Na základě své struktury byly fytochelatiny dříve klasifikovány jako metalothioneiny III skupiny. Nyní se toto označení již nepoužívá. Jejich obecný vzorec je L_n-Gly, kde n může nabývat hodnot 2–11, nejčastěji však 2–5. Jejich biosyntéza z glutathionu je katalyzována enzymem fytochelatin-synthasou (EC 2.3.2.15). Nejznámějšími aktivátory tohoto enzymu jsou ionty těžkých kovů, především Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, As⁵⁺ a Ni²⁺ (cit.³³).

Je známo, že stříbrné ionty indukují tvorbu fytochelatinů u nižších i vyšších rostlin^{12,34–39}. Aktivace fytochelatin-synthasy stříbrnými ionty byla prokázána jak *in vivo*¹⁶, tak *in vitro*³³ studiích, kde bylo prokázáno, že Ag⁺ je po Cd²⁺ druhý neúčinnější aktivátor tohoto enzymu

u explantátové kultury rajčat, kde již při nejnižší koncentraci Ag^+ (10 μM) byla pozorována zvýšená syntéza fytochelatinů. V případě aplikace vyšších koncentrací nedošlo ke zvýšení syntézy PC, z důvodu úhynu buněk, na rozdíl od kademnatých iontů, kde buňky byly životaschopné i při 10 \times vyšší koncentraci Cd^{2+} (cit.¹⁶). Pozorovaný jev potvrzuje toxické účinky stříbrných iontů. V práci autorů Mehra a spol.⁴⁰ byla prokázána vazba Ag^+ na fytochelatinu.

3.2.2. Rostlinné metalothioneinu podobné proteiny

Metalothioneiny a metalothioneinům podobné proteiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností a vysokým obsahem cysteinu, které jsou ve své struktuře schopny vázat ionty těžkých kovů. Jejich exprese se zvyšuje mimo jiné po vystavení organismu oxidativnímu stresu a těžkým kovům. Byly nalezeny u živočichů, hub, rostlin a bakterií⁴¹. U rostlinných proteinů podobných metalothioneinu existují dvě isoformy, MT1R a MT2R³⁹.

Indukce exprese metalothioneinu podobného proteinu stříbrnými ionty byla potvrzena na úrovni proteinů autory Navabpour a spol.²⁹. Murény a Taiz pozorovali, že stříbro zvýšilo transkripci mRNA pro MT1R a MT2R ve třech ekotypch *Arabidopsis thaliana* (Columbia, Ws, Shahdara), které dle předchozích experimentů vykazovaly nejvyšší toleranci k Cu^{2+} iontům³⁹. Ze všech použitých ošetření (40 μM CuCl_2 , 1 mM AgNO_3 , 40 μM CdSO_4 , 500 μM ZnSO_4 , 180 μM NiCl_2 , a tepelný šok (40 °C)) se stříbro projevilo jako nejúčinnější induktor MT2R. Indukce MT1R nastala pouze po expozici CdSO_4 . Ani jedna isoforma nebyla indukována působením 200 μM AlCl_3 a 450 μM kyseliny salicylové.

3.3. Syntéza obranných proteinů

AgNO_3 zvyšuje hladinu fytoalexinů a thioninů⁴². Jedná se o obranné látky, které rostlina produkuje při napadení škůdci, především houbami a bakteriemi.

Thioniny jsou nízkomolekulární proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 5000 g mol^{-1} obsahující 45–54 aminokyselinových zbytků s vysokým obsahem sirných a bazických aminokyselin (cystein, arginin, lysin). Dle strukturální podobnosti jsou rozděleny do skupiny α , β a γ . Tyto bazické proteiny vykazují toxicitu pro některé organismy, například pro fytopatogenní bakterie a houby. Kromě toho se předpokládá, že by mohly mít funkci regulační, zásobní a obrannou.

Epple a spol.⁴³ studovali indukci *Thi2.1* a *Thi2.2* genu abiotickými elicitory v klíčcích rostlinkách *Arabidopsis thaliana* na úrovni mRNA. V případě genu *Thi2.1* docházelo ke zvýšené transkripci po 3 h působení AgNO_3 v 0,1 mM koncentraci ve srovnání s kontrolou. V případě genu *Thi2.2* neměl AgNO_3 na zvýšení transkripce tohoto genu efekt.

Fytoalexiny jsou nízkomolekulární látky schopné inhibovat růst bakterií a některých hub, některé jsou syntetizovány stále, jiné až po napadení rostliny patogenem nebo po mechanickém poranění či stresu (působení UV záření, chlad, toxické látky, např. těžké kovy). Jedná se

o různorodou skupinu látek (deriváty stilbenu, kumarinu, indolu, alkaloidy, flavonoidy, terpenoidy, cyklické diony, atd.), každá skupina rostlin syntetizuje vlastní obranné sloučeniny či skupinu sloučenin⁴⁴. Je známo, že Ag^+ indukuje biosyntézu těchto látek u ovsa⁴⁵, *Arabidopsis thaliana*⁴⁶ a tabáku⁴⁷.

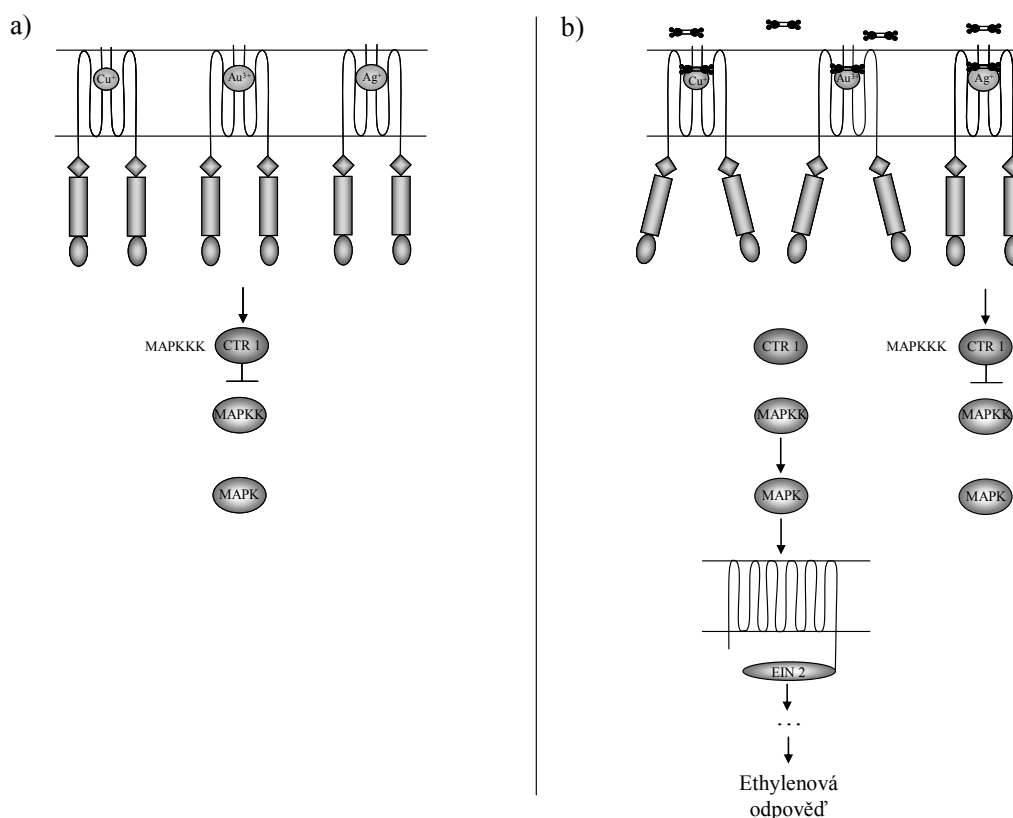
Proteiny spjaté s patogenitou (PR, z anglického „pathogenesis-related“) jsou proteiny, které jsou indukovány jako odpověď na napadení rostliny patogeny (viry, houby, bakterie), aplikací chemikálií nebo působením elicitorů, expozicí ozonu, UV záření a toxickým těžkým kovům. V současnosti jsou rozděleny do 17 podskupin, PR-1 až PR-17, jedná se především o glukanas, chitinasy, nukleasy a peroxidasy přímo působící proti patogenům. U brambor (*Solanum tuberosum*) bylo dosaženo indukce PR proteinů s β -1,3-glukanasovou aktivitou působením 140 mM AgNO_3 (cit.⁴⁸). Dále byla zkoumána exprese kukuřičné chitinasy II z podskupiny PR-4 na úrovni mRNA⁴⁹. Bylo zjištěno, že exprese byla zvýšená jak u klíčcích rostlinek kukuřice vystavené působení houbových patogenů (*Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*), tak u rostlinek vystavených 3 mM AgNO_3 (cit.^{49,50}).

3.4. Ovlivnění příjmu vody rostlinami

Příjem vody v cévnatých rostlinách je zprostředkován především díky akvaporinům transmembránovým proteinům tvořícím vodní kanály. Bylo zjištěno, že stříbro ve formě AgNO_3 a sulfadiazinu stříbrného a zlato ve formě HAuCl_4 inhibují tyto proteiny s EC_{50} 2,58 μM pro AgNO_3 , 1,47 μM pro sulfadiazin stříbrný a 10,8 μM pro HAuCl_4 (cit.⁵¹). Interakce s kovem má za následek blokování či stažení kanálu. Na rozdíl od Hg^{2+} iontů, doposud používaných pro jejich studium, jsou stříbrné ionty mnohem méně nespecifické a inhibují i akvaporiny, které jsou k Hg^{2+} necitlivé. To ze stříbrných iontů činí potenciálně velmi dobrý nástroj pro studium těchto proteinů^{52,53}. S jejich pomocí lze také ovlivnit příjem vody u rostlin, což má potenciální praktické uplatnění⁵¹.

3.5. Inhibice enzymů

Stříbrné ionty mohou působit jako inhibitory enzymové aktivity jak v eukaryotních, tak i v prokaryotních organismech. Jejich vysoká toxicita pro bakterie je pravděpodobně způsobena inhibicí membránových enzymů spojených s udržováním osmotické rovnováhy a s oxidativní fosforylací. V případě eukaryotních organismů jsou tyto procesy lokalizovány v jednotlivých kompartmentech uvnitř buňky. Ovlivnění funkce povrchových proteinů spojených se signalizací a s příjmem vody nemá tedy na eukaryotickou buňku fatální efekt. Inhibice enzymové aktivity stříbrnými ionty byla objevena u 560 enzymů (<http://www.brenda-enzymes.info/index.php4>) převážně bakteriálního původu. U enzymů rostlinného původu byla inhibice stříbrnými ionty zjištěna u téměř 70 enzymů, převážně hydrolas, oxidoreduktas a transferas. Stříbrné ionty nejvíce zasahují do biosyntézy a odbourávání di- a polysa-



Obr. 4. Ovlivnění ethylenového receptoru ETR1 stříbrnými ionty; homodimer ETR1 obsahuje jedno vazebné místo pro Cu^+ ionty, které hrají úlohu při vazbě ethylenu na receptor, což má za následek změnu konformace receptoru a tím přenos signálu. a) ETR1 receptory s navázanými Cu^+ , Au^{3+} a Ag^+ ionty bez přítomnosti ethylenu, b) ETR1 receptory s navázanými Cu^+ , Au^{3+} a Ag^+ ionty v přítomnosti ethylenu. ETR1 receptory se všemi třemi ionty jsou schopny vazby ethylenu, ale pouze vazba Cu^+ způsobí konformační změnu receptoru nutnou pro transdukcii signálu. Ionty Au^{3+} jsou schopny Cu^+ částečně nahradit, ale po vazbě Ag^+ nedochází ke změně konformace receptoru. CTR1 (Constitutive Triple Response, složka ethylenové signalizační dráhy s proteinkinasovou aktivitou, negativní regulátor signalizace ethylenem), MAPK, MAPKK, MAPKKK složky MAPK (mitogeny aktivovaná proteinkinasa) signalizační kaskády, EIN2 (Ethylene INsensitive, membránový regulační protein, složka ethylenové signalizační dráhy, pozitivní regulátor ethylenové signalizační dráhy). Upraveno podle^{63,84,85}

charidů (celulasa, chitinasa, lysozym, α - a β -amylasa, chitosanasa, glukosidasa, galaktosidasa, manosidasa, fruktofuranosidasa, atd.), čímž může být vysvětlen zpomalující efekt stříbrných iontů na zrání plodů. Dále tak může být ovlivněna biosyntéza sekundárních metabolitů⁵⁴, např. taxolu⁵⁵, berberinu^{56,57}, nikotinu⁵⁷, flavonoidů⁵⁸, hemových sloučenin⁵⁹ a putrescinu⁵⁷. Stříbro je také známý inhibitor ureasy, čehož bylo použito pro konstrukci biosenzoru těžkých kovů^{60,61}. Podrobnější shrnutí enzymů, u nichž byla objevena inhibice stříbrnými ionty, je uvedeno v Dodatku (pouze v elektronické podobě).

3.6. Vliv stříbra na signální dráhy rostlin

3.6.1. Ag^+ ionty jsou schopny inhibovat působení ethylenu

Ethylen je jeden z pěti klasických rostlinných hormonů rozšířených v celé rostlinné říši. Dle posledních výsledků je u *Arabidopsis thaliana* přibližně 7 % genů kontrolo-

váno ethylenem⁶². Ethylen ovlivňuje ve vyšších rostlinách mnoho procesů, např. klíčení, opad listů a jiných rostlinných částí, senescenci, dozrávání plodů, růst a odpověď na stresové podněty⁶³.

Již v roce 1976 bylo publikováno, že Ag^+ ionty ve formě AgNO_3 aplikovaného na listy blokují působení ethylenu. U etiolovaných rostlinek hrachu bylo dosaženo odvrácení tzv. „triple response“ (inhibice dlouhivého růstu, druhotného tloušťnutí hypokotylu, ztráty gravitropické reakce), přičemž odvrácení abscise listů, květů a plodů bylo pozorováno u etiolovaných rostlinek bavlníku a blokování senescence u květů orchideje⁶⁴. Stříbrné ionty jsou rutinně užívány pro studium role ethylenu v rostlinném organismu, a to jak u celistvých rostlin, tak i u explantátových kultur⁶⁵.

Inhibice působení ethylenu stříbrnými ionty je používána také při regeneraci celistvých rostlin^{66–72} z explantátové kultury a dozrávání embryí u smrků^{70,73}. Při

přípravě transgenních rostlin je jeho účinek využíván při omezení růstu vlasatých kořenů, tzv. „hairy roots“ a zvýšení efektivity transformace (čekanka obecná (*Cichorium intybus*)⁷⁴, *Arabidopsis thaliana*⁷⁵, jabloň (*Malus × domestica*)⁷⁶). Inhibice působení ethylenu stříbrnými ionty může mít praktické uplatnění např. při zpomalování dozrávání ovoce a zeleniny^{77,78}, případně pro prodloužení životnosti řezaných květin^{79,80}.

Biochemické a mutační studie identifikovaly mnoho složek signalizační dráhy ethylenu a vedly k vytvoření modelu transdukce signálu^{63,81}. Podle tohoto modelu je odpověď na stimulaci ethylenem u *Arabidopsis thaliana* zprostředkována rodinou pěti receptorů ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 a EIN4. Jedná se o transmembránové proteiny aktivní ve formě homodimeru, které obsahují v N-koncové doméně vazebné místo pro ethylen^{82,83}. Tato vazebná doména je přes spojovací doménu připojena ke kinázové doméně. Tři z těchto receptorů (ETR1, ETR2, EIN4) obsahují i přijímačovou doménu na C-konci. Vazba ethylenu je zprostředkována Cu⁺ iontem⁸². Tvorba komplexu kovu s ethylenem způsobí konformační změnu receptoru, která má za následek přenos signálu přes membránu na další složky signalizační dráhy.

Inhibice ETR1 receptorů se pravděpodobně děje tak, že Cu⁺ ionty jsou ve struktuře receptoru nahrazeny Ag⁺ ionty. Receptory s Ag⁺ ve své struktuře jsou stále schopny vázat ethylen, ale již nedochází ke konformační změně způsobené vazbou ethylenu a k následnému přenosu signálu^{82,84}, viz obr. 4. Z prací^{64,85} vyplývá, že ethylenové receptory mohou být tímto způsobem inhibovány pouze stříbrnými, rtuťnými, rtuťnatými a palladnatými ionty. Au³⁺ ionty byly schopny nahradit Cu⁺ ionty ve struktuře proteinu nejen v případě vazby ethylenu, ale i v přenosu signálu přes membránu. Tento zajímavý poznatek je možné zdůvodnit buď odlišnou koordinační geometrií komplexu Au³⁺ a Ag⁺ iontů s ethylenem nebo jejich různou velikostí.

3.6.2. Vliv na biosyntézu ethylenu

Stříbro ovlivňuje biosyntézu ethylenu u rostlin, např. rajčat, čekanky obecné, *Citrus aurantiaca*, ředkve seté (*Raphanus sativus*), na úrovni enzymů zahrnutých v této dráze. Pravděpodobně se tak děje díky blokování regulační vazby mezi hladinou ethylenu a jeho syntézou⁸⁶. Zablokování ethylenových receptorů stříbrnými ionty může mít za následek zvýšení jeho titru, což může inhibovat rané kroky jeho syntézy. To může mít za následek zpřístupnění společného prekurzoru ethylenu a polyaminů, S-adenosyl methioninu (SAM), pro biosyntézu polyaminů s následným zvýšením jejich biosyntézy, jak bylo pozorováno v pracích^{74,87}. Přesný mechanismus tohoto děje není doposud zcela prozkoumán.

Polyaminy spermin, spermidin a putrescin u rostlin ovlivňují odpověď na stres, rhizogenezi, vývoj květu, růst buněk a somatickou embryogenezi, klíčení, dozrávání semen, formování nadzemní a podzemní části, ovlivňují fyziologii kvetení, syntézu metabolitů a odpověď na virovou infekci. Dle autorů Quartacci a spol.⁸⁸ mají polyaminy a AgNO₃ synergistické účinky, kde současné ošetření rost-

lin Ag⁺ a putrescinem zvyšovalo morfogenezi a zabráňovalo vzniku „hairy roots“ u rostlin transformovaných *Agrobacterium rhizogenes*.

3.6.3. AgNO₃ zvyšuje hladinu kyseliny abscisové

Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon regulující v rostlinách vývojové a metabolické procesy abscise a dormance. Důležitou regulační funkci má kyselina abscisová i při zvýšení své endogenní hladiny v rostlinách za stresových podmínek. ABA je důležitá pro vývoj somatických embryí u jehličnanů v *in vitro* explantátových kulturách. V pracích^{70,89} bylo zjištěno, že ošetření kultury somatických embryí smrku siveho (*Picea glauca*) Ag⁺ zvyšovalo hladinu ABA v embryích a zvýšilo jejich dozrávání. Tento efekt byl ještě zesílen, pokud byly kultury ošetřeny Ag⁺ v kombinaci s PEG (polyethylenglykol). Přídavek Ag⁺ k základnímu médiu zvýšil obsah ABA o 250 %. V případě nevhodnější kombinace AgNO₃ a PEG (100 μM AgNO₃ a 40 g l⁻¹ ABA) byla produkce ABA zvýšená o 400 % ve srovnání se základním médiem neobsahujícím ani Ag⁺ ani PEG. Stimulační účinky měl i exogenní přídavek ABA, ale efekt nebyl tak zřejmý. V případě popsaného efektu stříbrných iontů na explantátové kultury smrku se pravděpodobně spojuje efekt Ag⁺ jako inhibitoru působení ethylenu, jehož působení zpomaluje dozrávání embryí a působení Ag⁺ jako stresového faktoru přímo ovlivňujícího hladinu ABA.

3.7. Ovlivnění syntézy membránových lipidů

Expozice rostlin působení těžkých kovů má za následek změnu zastoupení membránových lipidů^{90,91}. Tento efekt může souviset s faktem, že těžké kovy indukují peroxidaci lipidů, které má za následek jejich degradaci nebo inhibici jejich biosyntézy. Bylo zjištěno, že stříbrné ionty již ve velmi malých množstvích (5 nM) inhibují aktivitu plastidové lyso-PC acyltransferasy, která hraje významnou roli v procesu biosyntézy plastidových membránových lipidů⁹². Fosfatidylcholin, prekurzor membránových lipidů v plastidech, je u rostlin syntetizován v endoplazmatickém retikulu (ER). Biosyntéza plastidových membránových lipidů je proto závislá na jeho importu. Fosfatidylcholin je nejdříve deacetylován v membráně ER za vzniku lysofosfatidylcholinu, který může přejít do membrány plastidu, kde je následně acetylován plastidovým enzymem lysofosfatidylcholin acyltransferasou a poté použit pro biosyntézu lipidů^{93,94}. Inhibice tohoto enzymu stříbrnými ionty je vratná působením thiolových redukčních činidel DTT (dithiotreitol) a merkptoethanolu. EDTA (kyselina tetraaminooctová) ani imidazol aktivitu enzymu neobnovily. Na základě těchto výsledků lze odvodit, že inhibice enzymové aktivity nastává interakcí stříbrných iontů především s cysteinovými zbytky za vzniku merkptidů. Kromě Ag⁺ byla inhibice plastidové lyso-PC acyltransferasy pozorována i u Cu²⁺, Hg²⁺ a Pb²⁺ iontů, které také silně interagují s thiolovými skupinami, zatímco Cd²⁺, Co²⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mo²⁺, Ni²⁺, Sn²⁺ a Zn²⁺ aktivitu enzymu neinhibovaly⁹².

4. Závěr

Vliv stříbrných iontů na terestrické rostliny není dosud zcela prozkoumán. Stříbrné ionty představují pro rostliny významný stresový faktor. Jejich působení spouští v rostlinách obrannou reakci v podobě biosyntézy obranných proteinů (PR proteiny) a biosyntézu obranných sloučenin za účelem jejich detoxikace. Jejich působením dochází ke zvýšení biosyntézy některých alkaloidů, což lze také dát do souvislosti s obrannou reakcí rostliny. Další efekt stříbrných iontů je inhibice enzymů, především těch, které jsou zahrnuty v biosyntéze polysacharidů. Dále mohou tyto ionty ovlivnit i transport vody a membránový potenciál. Další jejich účinek je zasahování do rostlinné signalizace inhibicí signalizace ethylenem a jeho biosyntézy. Expozice stříbrným iontům pravděpodobně ovlivňuje i hladinu ABA. I přesto, že se volná forma Ag^+ vyskytuje v životním prostředí vzácně, účinky Ag^+ iontů na rostlinný organismus jsou poměrně specifické, což z nich činí užitečný nástroj pro porozumění procesům rostlinné fyziologie. Další zkoumání jejich účinku na rostliny může být významným přínosem s možným praktickým uplatněním.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 526/07/0674.

LITERATURA

- Sarikaya M., Tamerler C., Jen A. K. Y., Schulten K., Baneyx F.: *Nat. Mater.* 2, 577 (2003).
- I. WHO, CICAD 44. *Silver and Silver Compounds, Environmental Aspects*. 42 s. Geneva 2002.
- Koontz H. V., Berle K. L.: *Plant Physiol.* 65, 336 (1980).
- Purcell T. W., Peters J. J.: *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 539 (1998).
- Gorsuch J. W., Klaine S. J.: *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 537 (1998).
- Hirsch M. P.: *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 610 (1998).
- Wood C. M., Playle R. C., Hogstrand C.: *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 71 (1999).
- Eisler R., v: *Biological Report 32 and Contaminant Hazard Reviews Report 32*, p 44. US Department of the Interior, National Biological Service, Washington 1997.
- Hossain Z., Huq F.: *J. Inorg. Biochem.* 91, 398 (2002).
- Hall J. L.: *J. Exp. Bot.* 53, 1 (2002).
- Hiriart-Baer V. P., Fortin C., Lee D. Y., Campbell P. G. C.: *Aquat. Toxicol.* 78, 136 (2006).
- Perrein-Ettajani H., Amiard J. C., Haure J., Renaud C.: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 1757 (1999).
- Wang W. C.: *J. Environ. Sci. Health Part A-Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Contr.* A27, 1313 (1992).
- Naumann B., Eberius M., Appenroth K. J.: *J. Plant Physiol.* 164, 1656 (2007).
- Ratte H. T.: *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 89 (1999).
- Chen J. J., Zhou J. M., Goldsbrough P. B.: *Physiol. Plant.* 101, 165 (1997).
- Campbell P. G. C., Errecalde O., Fortin C., Hiriart-Baer W. R., Vigneault B.: *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 133, 189 (2002).
- Call D. J., Polkinghorne C. N., Markee T. P., Brooke L. T., Geiger D. L., Gorsuch J. W., Robillard K. A.: *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 30 (1999).
- Thurman R. B., Gerba C. P.: *Crit. Rev. Environ. Contr.* 18, 295 (1988).
- Drake P. L., Hazelwood K. J.: *Ann. Occup. Hyg.* 49, 575 (2005).
- Silvestry-Rodriguez N., Sicairos-Ruelas E. E., Gerba C. P., Bright K. R., v knize: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 191, str. 23. Springer, New York 2007.
- Brooks R. R., Chambers M. F., Nicks L. J., Robinson B. H.: *Trends Plant Sci.* 3, 359 (1998).
- Gardea-Torresdey J. L., Peralta-Videa J. R., de la Rosa G., Parsons J. G.: *Coord. Chem. Rev.* 249, 1797 (2005).
- Harris A. T., Bali R.: *J. Nanopart. Res.* 10, 691 (2008).
- Borovicka J., Randa Z., Jelinek E., Kotrba P., Dunn C. E.: *Mycol. Res.* 111, 1339 (2007).
- Sagiroglu A., Sasmaz A., Sen O.: *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 317 (2006).
- Anderson C., Stewart B., Wreesmann C., Smith G., Meech J.: *Fourth International Conference on the Intelligent Processing and Manufacturing of Materials (IPPM)*, (Meech J., Kawazoe Y., Maguire J., Kumar V., Wang H., ed.) Sendai, Japan 2003.
- Huang J. L., Li Q. B., Sun D. H., Lu Y. H., Su Y. B., Yang X., Wang H. X., Wang Y. P., Shao W. Y., He N., Hong J. Q., Chen C. X.: *Nanotechnology* 18, (10), (2007).
- Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E., Mackerness S. A-H, Buchanan-Wollaston V.: *J. Exp. Bot.* 54, 2285 (2003).
- Le Pape H., Solano-Serena F., Contini P., Devillers C., Maftah A., Leprat P.: *J. Inorg. Biochem.* 98, 1054 (2004).
- Yoshimaru T., Suzuki Y., Inoue T., Nilde O., Ra C.: *Free Radical Biol. Med.* 40, 1949 (2006).
- Scragg A. H., Bonnett C.: *Biotechnol. Lett.* 24, 169 (2002).
- Maier T., Yu C., Kullertz G., Clemens S.: *Planta* 218, 300 (2003).
- Howe G., Merchant S.: *Plant Physiol.* 98, 127 (1992).
- Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H.: *Science* 230, 674 (1985).
- Figuerola J. A. L., Wrobel K., Afton S., Caruso J. A., Corona J. F. G., Wrobel K.: *Chemosphere* 70, 2084 (2008).
- Le Faucheur S., Schildknecht F., Behra R., Sigg L.: *Aquat. Toxicol.* 80, 355 (2006).
- Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T.: *Plant*

- Physiol. 110, 1145 (1996).
39. Murphy A., Taiz L.: *Plant Physiol.* 109, 945 (1995).
 40. Mehra R. K., Tran K., Scott G. W., Mulchandani P., Saini S. S.: *J. Inorg. Biochem.* 61, 125 (1996).
 41. Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C., Jackson P. J.: *Biochem. J.* 295, (1993).
 42. Epple P., Apel K., Bohlmann H.: *FEBS Lett.* 400, 168 (1997).
 43. Epple P., Apel K., Bohlmann H.: *Plant Physiol.* 109, 813 (1995).
 44. Grayer R. J., Harborne J. B.: *Phytochemistry* 37, 19 (1994).
 45. Miyagawa H., Ishihara A., Kuwahara Y., Ueno T., Mayama S.: *J. Pestic. Sci.* 21, 203 (1996).
 46. Tsuji J., Jackson E. P., Gage D. A., Hammerschmidt R., Somerville S. C.: *Plant Physiol.* 98, 1304 (1992).
 47. Moreau R. A., Powell M. J., Whitaker B. D., Bailey B. A., Anderson J. D.: *Physiol. Plant.* 91, 575 (1994).
 48. Rahimi S., Perry R. N., Wright D. J.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49, 49 (1996).
 49. Bravo J. M., Campo S., Murillo I., Coca M., Segundo B. S.: *Plant Mol. Biol.* 52, 745 (2003).
 50. Rahimi S., Perry R. N., Wright D. J.: *Fund. Appl. Nematol.* 16, 549 (1993).
 51. Niemietz C. M., Tyerman S. D.: *FEBS Lett.* 531, 443 (2002).
 52. Zhou Y., Setz N., Niemietz C., Qu H., Offler C. E., Tyerman S. D., Patrick J. W.: *Plant Cell Environ.* 30, 1566 (2007).
 53. Bienert G. P., Moller A. L. B., Kristiansen K. A., Schulz A., Moller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P.: *J. Biol. Chem.* 282, 1183 (2007).
 54. He Y. K., Li J. Y.: *Planta* 212, 641 (2001).
 55. Kai G. Y., Jiang J. H., Zhao D. L., Zhao L. X., Zhang L., Li Z. G., Guo B. H., Sun X. F., Miao Z. Q., Tang K. X.: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 15, 1 (2006).
 56. Amann M., Nagakura N., Zenk M. H.: *Eur. J. Biochem.* 175, 17 (1988).
 57. Mizusaki S., Tanabe Y., Noguchi M., Tamaki E.: *Plant Cell Physiol.* 12, 633 (1971).
 58. Hsieh M. C., Graham T. L.: *Phytochemistry* 58, 995 (2001).
 59. Jones R. M., Jordan P. M.: *Biochem. J.* 299, 895 (1994).
 60. Krizkova S., Ryant P., Krystofova O., Adam V., Galiova M., Beklova M., Babula P., Kaiser J., Novotny K., Novotny J., Liska M., Malina R., Zehnalek J., Hubalek J., Havel L., Kizek R.: *Sensors* 8, 445 (2008).
 61. Ogonczyk D., Tymecki L., Wyzkiewicz I., Koncki R., Glab S.: *Sens. Actuators, B* 106, 450 (2005).
 62. Sisler E. C.: *Biotechnol. Adv.* 24, 357 (2006).
 63. Chen Y. F., Etheridge N., Schaller G. E.: *Ann. Bot.* 95, 901 (2005).
 64. Beyer E. M.: *Plant Physiol.* 58, 268 (1976).
 65. Veen H.: *Sci. Hortic.* 20, 211 (1983).
 66. Eapen S., George L.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 51, 229 (1997).
 67. Escalettes V., Dosba F.: *Plant Sci.* 90, 201 (1993).
 68. Palmer C. E.: *Plant Cell Reports* 11, 541 (1992).
 69. Songstad D. D., Duncan D. R., Widholm J. M.: *Plant Cell Reports* 7, 262 (1988).
 70. Kong L. S., Yeung E. C.: *Physiol. Plant.* 93, 298 (1995).
 71. Hyde C. L., Phillips G. C.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32, 72 (1996).
 72. Giridhar P., Reddy B. O., Ravishankar G. A.: *Curr. Sci.* 81, 1166 (2001).
 73. Biddington N. L., Sutherland R. A., Robinson H. T.: *Ann. Bot.* 62, 181 (1988).
 74. Bais H. P., Sudha G., Ravishankar G. A.: *Plant Cell Reports* 20, 547 (2001).
 75. Marton L., Browse J.: *Plant Cell Reports* 10, 235 (1991).
 76. Seong E. S., Song K. J., Jegal S., Yu C. Y., Chung I. M.: *Plant Growth Regul.* 45, 75 (2005).
 77. Singh R., Singh P., Pathak N., Singh V. K., Dwivedi U. N.: *Plant Growth Regul.* 53, 137 (2007).
 78. Hobson G. E., Nichols R., Davies J. N., Atkey P. T.: *J. Plant Physiol.* 116, 21 (1984).
 79. Yangkhamman P., Fukai S., Ichimura K.: *J. Japan. Soc. Hortic. Sci.* 74, 337 (2005).
 80. Halevy A. H., Kofranek A. M.: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102, 76 (1977).
 81. Guo H. W., Ecker J. R.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 40 (2004).
 82. Rodriguez F. I., Esch J. J., Hall A. E., Binder B. M., Schaller G. E., Bleecker A. B.: *Science* 283, 996 (1999).
 83. Schaller G. E., Bleecker A. B.: *Science* 270, 1809 (1995).
 84. Zhao X. C., Qu X., Mathews D. E., Schaller G. E.: *Plant Physiol.* 130, 1983 (2002).
 85. Binder B. M., Rodriguez F. I., Bleecker A. B., Patterson S. E.: *FEBS Lett.* 581, 5105 (2007).
 86. Attaaly M. A., Saltveit M. E., Hobson G. E.: *Plant Physiol.* 83, 44 (1987).
 87. Belles J. M., Carbonell J., Conejero V.: *Plant Physiol.* 96, 1053 (1991).
 88. Pua E. C., Sim G. E., Chi G. L., Kong L. F.: *Plant Cell Reports* 15, 685 (1996).
 89. Kong L. S., Yeung E. C.: *Plant Sci.* 104, 71 (1994).
 90. Quartacci M. F., Pinzino C., Sgherri C. L. M., Dalla Vecchia F., Navari-Izzo F.: *Physiol. Plant.* 108, 87 (2000).
 91. Verdoni N., Mench M., Cassagne C., Bessoule J. J.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 382 (2001).
 92. Akermoun M., Testet E., Cassagne C., Bessoule J. J.: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1581, 21 (2002).
 93. Mongrand S., Cassagne C., Bessoule J. J.: *Plant Physiol.* 122, 845 (2000).
 94. Bessoule J. J., Testet E., Cassagne C.: *Eur. J. Biochem.* 228, 490 (1995).
 95. Puigdomenech I., Bergstrom U.: *Nucl. Safety* 36, 142 (1995).

S. Křížková^a, V. Adam^b, and R. Kizek^a
(^a *Department of Chemistry and Biochemistry,*
^b *Department of Animal Nutrition and Forage Production,*
Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture
*and Forestry, Brno): **Phytotoxicity of Silver Ions***

Silver in the form of Ag^+ is one of the most toxic heavy metals. At present the effect of silver on processes in plants is intensively investigated. The inhibition of ac-

tion of ethene at the receptor level influences the membrane permeability and, therefore, intake of water and minerals. Inhibition of many plant enzymes and reactive oxygen species by Ag^+ was found. On the other hand, plant species are able to form and deposit silver nanoparticles in their tissues. The effects of Ag^+ on plants are specific, which makes them an important tool in study of plant physiology and in possible practical applications.

1. Inhibice rostlinných enzymů stříbrnými ionty

Stříbrné ionty mohou působit jako inhibitory enzymové aktivity jak v eukaryotních, tak i v prokaryotních organismech. Inhibice enzymové aktivity stříbrnými ionty byla objevena u 560 enzymů (<http://www.brenda-enzymes.info/index.php4>) převážně bakteriálního původu. U enzymů rostlinného původu byla inhibice stříbrnými ionty zjištěna u téměř 70 enzymů, převážně hydrolas, oxidoreduktas a transferas, které jsou shrnuty v tab. I. Jak je z tabulky

zřejmé, stříbrné ionty nejvíce zasahují do biosyntézy a odbourávání di- a polysacharidů (celulasa, chitinasa, lysozym, α - a β -amylasa, chitosanasa, glukosidasa, galaktosidasa, manosidasa, fruktofuranosidasa, atd.), čímž může být vysvětlen zpomalující efekt stříbrných iontů na zrání plodů. Dále ta může být ovlivněna biosyntéza sekundárních metabolitů¹, např. taxolu^{2,3}, berberinu^{4,5}, nikotinu⁵, flavonoidů⁶, hemových sloučenin⁷ a putrescinu⁵. Stříbro je také známý inhibitor ureasy, čehož bylo použito pro konstrukci biosenzoru těžkých kovů^{8–11}.

Tabulka I

Rostlinné enzymy, u nichž byla zjištěna inhibice Ag^+ , Ag^{2+} a AgNO_3 .

Upraveno podle <http://www.brenda-enzymes.info/index.php4>

Inhibitor	EC klasifikace	Název	Organismus
Ag^+	1.1.3.5	hexosaoxidasa	<i>Citrus sinensis</i> ¹²
	1.5.1.2	pyrrolin-5-karboxylátreduktasa	<i>Cucurbita moschata</i> ¹³ , <i>Cucurbita maxima</i> ¹⁴
	1.13.11.28	2,3-dihydroxybenzoát 2,3-dioxygenasa	<i>Tecoma stans</i> ^{15,16}
	1.14.16.3	anthranilát 3-monooxygenasa	<i>Tecoma stans</i> ¹⁷
	2.1.1.53	putrescin <i>N</i> -methyltransferasa	<i>Nicotiana tabacum</i> ⁵
	2.3.1.23	1-acylglycerofosfocholin <i>O</i> -acyltransferasa	<i>Allium porrum</i> ¹⁸
	2.4.1.1	fosforylasa	<i>Solanum tuberosum</i> ¹⁹
	2.4.1.13	sacharosasyntasa	<i>Pisum sativum</i> ²⁰
	2.4.1.25	4- α -glukanotransferasa	<i>Ipomoea batatas</i> ²¹
	2.4.1.35	fenol β -glukosyltransferasa	<i>Carica papaya</i> ²²
	2.4.1.67	galaktinol:rafinoza-galaktosyltransferasa	<i>Cucurbita pepo</i> ²³
	2.4.1.82	galaktinol:sacharosa-galaktosyltransferasa	<i>Vicia faba</i> ²⁴
	2.4.1.99	sacharosa:sacharosa-fruktosyltransferasa	<i>Asparagus officinalis</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Helianthus tuberosus</i> , <i>Agave americana</i> ²⁵ , <i>Cynara scolymus</i> ²⁶ , <i>Allium cepa</i> ²⁷
	2.4.1.100	2,1-fruktan:2,1-fruktan 1-fruktosyltransferasa	<i>Cichorium intybus</i> ²⁸ , <i>Allium cepa</i> ²⁹
	2.4.1.190	luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid 2"- <i>O</i> -glukuronosyltransferasa	<i>Secale cereale</i> ³⁰
	2.4.1.207	xyloglukan:xyloglukosyl-transferasa	<i>Actinidia deliciosa</i> ³¹
	2.4.1.243	6G-fruktosyltransferasa	<i>Asparagus officinalis</i> ³² , <i>Allium cepa</i> ²⁹
	2.5.1.2	thiaminpyridinylasa	<i>Marsilea drummondii</i> ³³
	2.8.2.24	desulfoglukosinolátsulfotransferasa	<i>Lepidium sativum</i> ³⁴
	3.1.3.2	kyselá fosfatasa	<i>Triticum aestivum</i> ^{35,36} , <i>Hordeum vulgare</i> ³⁷
3.1.27.1	ribonukleasa T2	<i>Lycopersicon esculentum</i> ³⁸	
3.2.1.2	β -amylasa	<i>Ipomoea batatas</i> ³⁹ , <i>Oryza sativa</i> ⁴⁰ , <i>Sinapis alba</i> ⁴¹ , <i>Hordeum vulgare</i> ⁴² , <i>Hordeum vulgare</i> ⁴³	
3.2.1.4	celulasa	<i>Phaseolus vulgaris</i> ⁴⁴	
3.2.1.14	chitinasa	<i>Brassica oleracea</i> ⁴⁵ , <i>Ananas comosus</i> ⁴⁶	

Tabulka I
Pokračování

Inhibitor	EC klasifikace	Název	Organismus	
Ag ⁺	3.2.1.20	α-glukosidasa	<i>Allium fistulosum</i> ⁴⁷	
	3.2.1.21	β-glukosidasa	<i>Vanilla planifolia</i> ⁴⁸ , <i>Glycine max</i> ⁶	
	3.2.1.22	α-galaktosidasa	<i>Vicia faba</i> ⁴⁹ , <i>Arachis hypogaea</i> ⁵⁰ , <i>Medicago sativa</i> ^{49,51} , <i>Cucurbita pepo</i> ⁵² , <i>Prunus amygdalus</i> ⁴⁹ , <i>Lupinus angustifolius</i> ⁵³ , <i>Saccharum officinarum</i> ⁵⁴	
	3.2.1.23	β-galaktosidasa	<i>Raphanus sativus</i> ⁵⁵	
	3.2.1.24	α-mannosidasa	<i>Medicago sativa</i> ⁵⁶ , <i>Prunus serotina</i> ⁵⁷ , <i>Helianthus annuus</i> ⁵⁸	
	3.2.1.25	β-mannosidasa	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> ⁵⁹	
	3.2.1.26	β-fruktofuranosidasa	<i>Cicer arietinum</i> ⁶⁰ , <i>Lycopersicon esculentum</i> ⁶¹ , Nakagawa, 1975 #360, <i>Lilium longiflorum</i> ⁶² , <i>Avena sativa</i> ⁶³ , <i>Bambusa edulis</i> ⁶⁴	
	3.2.1.31	β-glukuronidasa	<i>Secale cereale</i> ⁶⁵ , <i>Scutellaria baicalensis</i> ⁶⁶	
	3.2.1.37	xylan-1,4-β-xylosidasa	<i>Saccharum officinarum</i> ⁶⁷ , <i>Cucumis sativus</i> ⁶⁸	
	3.2.1.52	β-N-acetylhexosaminidasa	<i>Triticum aestivum</i> ⁶⁹ , <i>Glycine max</i> ⁷⁰ , <i>Trigonella foenum-graecum</i> ⁷¹ , <i>Canavalia ensiformis</i> ⁷²	
	3.2.1.55	α-N-arabinofuranosidasa	<i>Spinacia oleracea</i> ⁷³	
	3.2.1.119	vicianin β-glukosidasa	<i>Davallia trichomanoides</i> ⁷⁴	
	3.2.1.132	chitosanasa	<i>Ananas comosus</i> ⁴⁶	
	3.2.1.147	thioglukosidasa	<i>Raphanus sativus</i> ⁷⁵	
	3.2.1.161	β-apiosyl-β-glukosidasa	<i>Cicer arietinum</i> ⁷⁶	
	3.2.2.3	uridin-nukleosidasa	<i>Phaseolus aureus</i> ⁷⁷	
	3.4.11.5	prolyl-aminopeptidasa	<i>Triticum aestivum</i> ⁷⁸	
	3.4.22.6	chymopapain	<i>Carica papaya</i> ⁷⁹	
	3.5.1.13	aryl-acylamidasa	<i>Glycine max</i> ⁸⁰	
	3.5.5.1	nitrilasa	<i>Hordeum vulgare</i> ⁸¹	
	4.2.1.9	dihydroxykyselina-dehydratasa	<i>Spinacia oleracea</i> ⁸²	
	Ag ²⁺	2.5.1.61	hydroxymethylbilansynthasa	<i>Arabidopsis thaliana</i> ⁷
		3.2.1.21	β-glukosidasa	<i>Manihot esculenta</i> ⁸³
3.2.1.23		β-galaktosidasa	<i>Marchantia polymorpha</i> ⁸⁴ , <i>Vigna radiata</i> ⁸⁵	
AgNO ₃	3.2.1.22	α-galaktosidasa	<i>Oryza sativa</i> ⁸⁶	
	1.1.1.14	L-iditol 2-dehydrogenasa	<i>Malus domestica</i> ⁸⁷	
	1.1.1.38	malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylující)	<i>Mangifera indica</i> ⁸⁸	
	1.1.1.90	aryl-alkoholdehydrogenasa	<i>Secale cereale</i> , <i>Triticum turgidum</i> , <i>Secale montanum</i> , <i>Secale sylvestre</i> , <i>Dasypyrum villosum</i> , <i>Triticum baeoticum</i> , <i>Elytrigia repens</i> ⁸⁹	
	1.1.1.91	arylalkoholdehydrogenasa (NADP ⁺)	<i>Secale cereale</i> , <i>Triticum turgidum</i> , <i>Secale montanum</i> , <i>Secale sylvestre</i> , <i>Dasypyrum villosum</i> , <i>Triticum baeoticum</i> , <i>Elytrigia repens</i> ⁸⁹	
	1.1.1.200	aldosa-6-fosfát reduktasa (NADPH)	<i>Malus domestica</i> ⁹⁰	
	1.8.1.8	protein-disulfidreduktasa	<i>Pisum sativum</i> ⁹¹	
	3.2.1.1	α-amylasa	<i>Tulipa gesneriana</i> ⁹²	
	3.2.1.17	lysozym	<i>Triticum aestivum</i> ⁹³	

Tabulka I
Pokračování

Inhibitor	EC klasifikace	Název	Organismus
AgNO ₃	3.2.1.21	β-glukosidasa	<i>Podophyllum peltatum</i> ⁹⁴
	3.2.1.39	glukan-endo-1,3-β-D-glukosidasa	<i>Nicotiana tabacum</i> ⁹⁵
	3.2.1.52	β-N-acetylhexosaminidasa	<i>Oryza sativa</i> ⁹⁶ , <i>Zea mays</i> ⁹⁷
	4.1.2.10	mandelonitrillyasa	<i>Prunus lyonii</i> ⁹⁸
	4.1.2.11	hydroxymandelonitrillyasa	<i>Ximenia americana</i> ⁹⁹
	4.2.1.65	3-kyanoalaninhydratasa	<i>Lupinus angustifolius</i> ¹⁰⁰

LITERATURA

- He Y. K., Li J. Y.: *Planta* 212, 641 (2001).
- Kai G. Y., Jiang J. H., Zhao D. L., Zhao L. X., Zhang L., Li Z. G., Guo B. H., Sun X. F., Miao Z. Q., Tang K. X.: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 15, 1 (2006).
- Kai G. Y., Zhao L. X., Zhang L., Li Z. G., Guo B. H., Zhao D. L., Sun X. F., Miao Z. Q., Tang K. X.: *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 668 (2005).
- Amann M., Nagakura N., Zenk M. H.: *Eur. J. Biochem.* 175, 17 (1988).
- Mizusaki S., Tanabe Y., Noguchi M., Tamaki E.: *Plant Cell Physiol.* 12, 633 (1971).
- Hsieh M. C., Graham T. L.: *Phytochemistry* 58, 995 (2001).
- Jones R. M., Jordan P. M.: *Biochem. J.* 299, 895 (1994).
- Krizkova S., Ryant P., Krystofova O., Adam V., Galiova M., Beklova M., Babula P., Kaiser J., Novotny K., Novotny J., Liska M., Malina R., Zehnalek J., Hubalek J., Havel L., Kizek R.: *Sensors* 8, 445 (2008).
- Narinesingh D., Mungal R., Ngo T. T.: *Anal. Chim. Acta* 292, 185 (1994).
- Ogonczyk D., Tymecki L., Wyzkiewicz I., Koncki R., Glab S.: *Sens. Actuators, B* 106, 450 (2005).
- Sumner J. B., v knize: *The Enzymes*. Vol. 1, str. 873. Academic Press, New York 1951.
- Bean R. C., Porter G. G., Steinber. Bm: *J. Biol. Chem.* 236, 1235 (1961).
- Rena A. B., Splittstoesser W. E.: *Phytochemistry* 14, 657 (1975).
- Splittst S., Splittst W.: *Phytochemistry* 12, 1565 (1973).
- Sharma H. K., Vaidyanathan C. S.: *Eur. J. Biochem.* 56, 163 (1975).
- Sharma H. K., Vaidyanathan C. S.: *Phytochemistry* 14, 2135 (1975).
- Nair P. M., Vaidyana C. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 110, 521 (1965).
- Akermoun M., Testet E., Cassagne C., Bessoule J. J.: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1581, 21 (2002).
- Shivaram K. N.: *Z. Naturforsch.(C)* 31, 424 (1976).
- Sung H. Y., Su J. C.: *J. Chin. Biochem. Soc.* 6, 22 (1977).
- Suganuma T., Setoguchi S., Fujimoto S., Nagahama T.: *Carbohydr. Res.* 212, 201 (1991).
- Keil U., Schreier P.: *Phytochemistry* 28, 2281 (1989).
- Gaudreault P. R., Webb J. A.: *Phytochemistry* 20, 2629 (1981).
- Lehle L., Tanner W.: *Eur. J. Biochem.* 38, 103 (1973).
- Yun J. W.: *Enzyme Microb. Technol.* 19, 107 (1996).
- Hellwege E. M., Gritscher D., Willmitzer L., Heyer A. G.: *Plant J.* 12, 1057 (1997).
- Shiomi N., Kido H., Kiriyama S.: *Phytochemistry* 24, 695 (1985).
- VandenEnde W., VanWongerghem D., Verhaert P., Dewil E., VanLaere A.: *Planta* 199, 493 (1996).
- Fujishima M., Sakai H., Ueno K., Takahashi N., Onodera S., Benkeblia N., Shiomi N.: *New Phytol.* 165, 513 (2005).
- Schulz M., Weissenbock G.: *Phytochemistry* 27, 1261 (1988).
- Schroder R., Atkinson R. G., Langenkamper G., Redgwell R. J.: *Planta* 204, 242 (1998).
- Shiomi N.: *Carbohydr. Res.* 99, 157 (1982).
- McCleary B. V., Chick B. F.: *Phytochemistry* 16, 207 (1977).
- Glendening T. M., Poulton J. E.: *Plant Physiol.* 94, 811 (1990).
- Waymack P. P., Vanetten R. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 621 (1991).
- Joyce B. K., Grisolia S.: *J. Biol. Chem.* 235, 2278 (1960).
- Panara F., Pasqualini S., Antonielli M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1037, 73 (1990).
- Abel S., Kock M., v knize: *Ribonucleases*, Pt A, 2001; Vol. 341, str. 351.
- Chang C. T., Liou H. Y., Tang H. L., Sung H. Y.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24, 13 (1996).
- Matsui H., Chiba S., Shimomura T.: *Agric. Biol. Chem.* 41, 841 (1977).
- Subbaramaiah K., Sharma R.: *Phytochemistry* 29, 1417 (1990).
- Yoshigi N., Okada Y., Maeba H., Sahara H., Tamaki T.: *J. Biochem.* 118, 562 (1995).

43. Yoshigi N., Okada Y., Sahara H., Koshino S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1080 (1994).
44. Lew F. T., Lewis L. N.: *Phytochemistry* 13, 1359 (1974).
45. Chang C. T., Hsueh Y. L., Sung H. Y.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40, 417 (1996).
46. Hung T. H., Chang Y. M., Sung H. Y., Chang C. T.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 4666 (2002).
47. Suzuki Y., Uchida K.: *Agric. Biol. Chem.* 48, 1343 (1984).
48. Odoux E., Chauwin A., Brillouet J. M.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 3168 (2003).
49. Dey P. M., Pridham J. B.: *Adv. Enzym. Rel. Areas Mol. Biol.* 36, 91 (1972).
50. Bryant R. J., Rao D. R.: *J. Food Biochem.* 25, 139 (2001).
51. Itoh T., Shimura S., Adachi S.: *Agric. Biol. Chem.* 43, 1499 (1979).
52. Gaudreault P. R., Webb J. A.: *Plant Physiol.* 71, 662 (1983).
53. Plant A. R., Moore K. G.: *Phytochemistry* 21, 985 (1982).
54. Chinen I., Nakamura T., Fukuda N.: *J. Biochem.* 90, 1453 (1981).
55. Sekimata M., Ogura K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y., Yamamoto S.: *Plant Physiol.* 90, 567 (1989).
56. Curdel A., Petek F.: *Biochem. J.* 185, 455 (1980).
57. Waln K. T., Poulton J. E.: *Plant Sci.* 53, 1 (1987).
58. Lopezvalbuena R., Jorin J., Polanco A., Tena M.: *Plant Sci.* 62, 11 (1989).
59. McCleary B. V.: *Methods Enzymol.* 160, 589 (1988).
60. Asthir B., Singh R.: *Indian J. Biochem. Biophys.* 34, 529 (1997).
61. Nakagawa H., Ogura N., Takehana H., Kawasaki Y.: *Agric. Biol. Chem.* 36, 18 (1972).
62. Miller W. B., Ranwala A. P.: *Physiol. Plant.* 92, 247 (1994).
63. Pressey R., Avants J. K.: *Plant Physiol.* 65, 136 (1980).
64. Liu C. C., Huang L. C., Chang C. T., Sung H. Y.: *Food Chem.* 96, 621 (2006).
65. Schulz M., Weissenbock G.: *Phytochemistry* 26, 933 (1987).
66. Ikegami F., Matsunae K., Hisamitsu M., Kurihara T., Yamamoto T., Murakoshi I.: *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1531 (1995).
67. Chinen I., Oouchi K., Tamaki H., Fukuda N.: *J. Biochem.* 92, 1873 (1982).
68. Mujer C. V., Miller A. R.: *Physiol. Plant.* 82, 367 (1991).
69. Barber M. S., Ride J. P.: *Plant Sci.* 60, 163 (1989).
70. Gersbarlag H., Bartz I., Rudiger H.: *Phytochemistry* 27, 3739 (1988).
71. Bouquelet S., Spik G.: *Eur. J. Biochem.* 84, 551 (1978).
72. Li S. C., Li Y. T.: *J. Biol. Chem.* 245, 5153 (1970).
73. Hirano Y., Tsumuraya Y., Hashimoto Y.: *Physiol. Plant.* 92, 286 (1994).
74. Lizotte P. A., Poulton J. E.: *Plant Physiol.* 86, 322 (1988).
75. Jwanny E. W., Elsayed S. T., Rashad M. M., Mahmoud A. E., Abdallah N. M.: *Phytochemistry* 39, 1301 (1995).
76. Hosel W., Barz W.: *Eur. J. Biochem.* 57, 607 (1975).
77. Achar B. S., Vaidyana Cs.: *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 356 (1967).
78. Waters S. P., Dalling M. J.: *Plant Physiol.* 73, 1048 (1983).
79. Kunimits D., Yasunobu K. T.: *Biochimica Et Biophysica Acta* 139, 405 (1967).
80. Hoagland R. E., Graf G.: *Can. J. Biochem.* 52, 903 (1974).
81. Thimann K. V., Mahadevan S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 133 (1964).
82. Kanamori M., Wixom R. L.: *J. Biol. Chem.* 238, 998 (1963).
83. Yeoh H. H.: *Phytochemistry* 28, 721 (1989).
84. Konno H., Yamasaki Y., Katoh K.: *Plant Sci.* 44, 97 (1986).
85. Li S. C., Han J. W., Chen K. C., Chen C. S.: *Phytochemistry* 57, 349 (2001).
86. Kim W. D., Kobayashi O., Kaneko S., Sakakibara Y., Park G. G., Kusakabe I., Tanaka H., Kobayashi: *Phytochemistry* 61, 621 (2002).
87. Negm F. B. H., Loescher W. H.: *Plant Physiol.* 64, 69 (1979).
88. Srivatava G. C., Yanru Z. Y., Pandey M., Prasad N. K.: *Indian J. Exp. Biol.* 34, 575 (1996).
89. Jaaska V., Jaaska V.: *Biochem. Physiol. Pflanzen* 179, 21 (1984).
90. Negm F. B., Loescher W. H.: *Plant Physiol.* 67, 139 (1981).
91. Hatch M. D., Turner J. F.: *Biochem. J.* 76, 556 (1960).
92. Ranwala A. P., Miller W. B.: *Physiol. Plant.* 109, 388 (2000).
93. Audy P., Trudel J., Asselin A.: *Plant Sci.* 58, 43 (1988).
94. Dayan F. E., Kuhajek J. M., Canel C., Watson S. B., Moraes R. M.: *BBA-Proteins Proteomics* 1646, 157 (2003).
95. Kato K., Yamada A., Noguchi M.: *Agric. Biol. Chem.* 37, 1269 (1973).
96. Jin Y. L., Jo Y. Y., Kim K. Y., Shim J. H., Kim Y. W., Park R. D.: *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 313 (2002).
97. Oikawa A., Itoh E., Ishihara A., Iwamura H.: *J. Plant Physiol.* 160, 991 (2003).
98. Xu L. L., Singh B. K., Conn E. E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 322 (1986).
99. Kuroki G. W., Conn E. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6978 (1989).
100. Castric P. A., Conn E. E., Farnden K. J. F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 62 (1972).