

Использование солей и наночастиц серебра для поверхностной стерилизации семян ячменя перед проращиванием *in vitro*

Желтова Анастасия Александровна, к.м.н., в.н.с., ORCID 0000-0002-8078-6407;

Попова Анна Сергеевна, м.н.с., ORCID 0000-0002-5983-4080;

Зайцев Валерий Геннадьевич , zaitsev@vfanc.ru, к.б.н., в.н.с., ORCID 0000-0001-9191-2862, зав.лаб. –
Лаборатория молекулярной селекции –

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН), info@vfanc.ru, 400062, пр. Университетский, 97, Волгоград, Россия

*В настоящее время отсутствует оптимальная методика стерилизации семян ячменя, позволяющая обеспечить максимально возможную степень их стерильности и сохранить их жизнеспособность для проращивания и дальнейшей инициации культуры *in vitro*. Целью нашей работы была оценка возможности использования растворимых солей серебра и наночастиц серебра, полученных с использованием экстрактов фармакопейных лекарственных растений, для поверхностной стерилизации семян ячменя перед проращиванием *in vitro* на стерильной среде Мурашиге-Скуга. Результаты показали, что стерилизация семян ячменя 3% H_2O_2 в течение 15 минут является неэффективной. Обработка семян в течение 30 минут серебряными наночастицами, полученными с использованием растительных экстрактов чабреца, шалфея, эхинацеи и эвкалипта, не обеспечила стерильности проростков. Стерилизация семян ячменя 1% $AgNO_3$ в течение 30 минут позволила получить максимальную степень обеззараживания, но недостаточно высокую всхожесть. Уменьшение времени обработки до 15 минут повысило всхожесть семян при сохранении максимальной стерильности. Для стерилизации семян ячменя наиболее оптимален 0,14% $AgNO_3$, обеспечивающий высокую степень стерильности при сохранении высокой всхожести.*

Ключевые слова: поверхностная стерилизация семян, культура растений *in vitro*, *Hordeum vulgare*, серебряные наночастицы, зеленая химия.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, тема № 0508-2019-0038 «Создание новых генотипов сельскохозяйственных растений с заданными признаками с применением молекулярных маркеров».

Поступила в редакцию: 10.08.2022

Принята к печати: 03.11.2022

Культуры растений *in vitro*, в частности зерновых, позволяют получить улучшенные результаты в таких областях, как исследование процессов развития растений, массовое размножение, выведение безвирусного материала, функциональное исследование генов, ускоренная селекция и разработка новых генетических вариантов с улучшенными потребительскими и агрономическими признаками [17]. Зерновые, в частности ячмень [23] и рожь [9], традиционно считаются растениями, относительно трудно вводимыми в культуру *in vitro*, в том числе из-за проблем получения стерильных эксплантов. Обеспечение стерильности эксплантов является ключевым этапом при первичной инициации культуры растений *in vitro*, причем эффективная деконтаминация не должна достигаться за счет снижения жизнеспособности эксплантов [3; 18]. Необходимость обеспечить максимальную степень обеззараживания поверхности эксплантов требует использования достаточно агрессивных антисептиков, например, хлор- и кислородсодержащих сильных окислителей, спиртов и т.д. [26]. Все эти соединения способны оказывать токсическое воздействие на клетки эксплантов и снижать их уровень приживаемости и частоту регенерации в культуре [18]. Выделение эксплантов из стерильного материа-

ла, полученного при проращивании семян растений в асептических условиях, позволяет улучшить приживаемость эксплантов [8; 6]. В этой ситуации поверхностной стерилизации подвергаются не растущие ткани растений, высокочувствительные к химическим воздействиям, а семена, которые гораздо более устойчивы к агрессивным способам стерилизации.

Тем не менее поверхностная стерилизация не является совершенно безопасной даже для семян растений [2; 4]. В частности, такие популярные антисептики, как $NaOCl$ или $HgCl_2$, способны снижать всхожесть семян ячменя [11; 22]. Определенные преимущества предоставляют многостадийные способы стерилизации, когда последовательно используются антисептики с различными механизмами действия [7]. В последнее время в качестве перспективных антисептиков рассматриваются соли и наночастицы серебра ($AgNPs$ – *Ag-nanoparticles*) [16; 20]. Ионы Ag^+ , образующиеся при растворении солей серебра в воде, давно известны как эффективный антибактериальный агент, в том числе, при поверхностной стерилизации семян злаков [5; 12; 14; 19]. Биоцидное действие $AgNPs$ связано как с длительным выделением ионов Ag^+ , так и с рядом специфических механизмов воздействия на микробные клетки [15; 16; 24]. В последнее десяти-

титетие было разработано большое число протоколов получения AgNPs с использованием методов так называемой «зеленой химии». В этом случае AgNPs синтезируются методом восстановления солей серебра соединениями природного происхождения, например, из экстрактов растений [1; 21; 25]. Такой подход позволяет сделать синтез AgNPs не только экологически дружелюбным (без использования биологически опасных химических соединений), но и относительно недорогим. Более того, было показано, что использование экстрактов растений, обладающих собственной антибактериальной активностью, способно усиливать бактерицидное действие образующихся AgNPs и их стабильность в водных средах за счет модификации биологически активными веществами растительных экстрактов [10; 13].

Целью настоящего исследования была оценка возможности использования растворимых солей серебра и наночастиц серебра, полученных с использованием экстрактов фармакопейных лекарственных растений, для поверхностной стерилизации семян ячменя перед проращиванием *invitro* на стерильной среде Мурашиге-Скуга.

Материалы и методы. В данной работе исследована эффективность деконтаминации и всхожесть семян ячменя (*Hordeum vulgare* L.) ярового сорта Камышинский 23 (получен с Камышинской селекционной станции ФНЦ агроэкологии РАН, урожай 2018 года) *invitro* после поверхностной стерилизации различными агентами: 3% H_2O_2 , $AgNO_3$ в различных концентрациях, суспензиями AgNPs,

полученными с помощью растительных экстрактов, а также их комбинациями.

Экстракты растений, использованные для синтеза AgNPs, получали из фармакопейного сырья четырех видов официальных лекарственных растений: шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), чабреца или тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) и эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.). Экстракты готовились в форме настоев в соответствии с рекомендациями фармакопейной статьи ОФС.1.4.1.0018.15.

Синтез AgNPs проводили путем восстановления нитрата серебра в водной фазе растительными экстрактами в течение 1 ч при температуре 37°C. В процессе синтеза бесцветная реакционная смесь приобретала желто-коричневый цвет в результате образования AgNPs. Суммарная схема приготовления растительных экстрактов и синтеза AgNPs приведена на рисунке 1. AgNPs, полученные с использованием растительных экстрактов далее обозначали как AgNPs-Ч (экстракт чабреца), AgNPs-Ш (экстракт шалфея), AgNPs-Эх (экстракт эхинацеи) и AgNPs-Эв (экстракт эвкалипта). Для подтверждения образования AgNPs определялось наличие специфического пика, ассоциированного с поверхностным плазмонным резонансом, в спектре поглощения суспензии AgNPs, полученной на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec Plus (США). Размер AgNPs оценивали методом динамического светорассеяния на анализаторе Photocor Compact-Z (Россия).

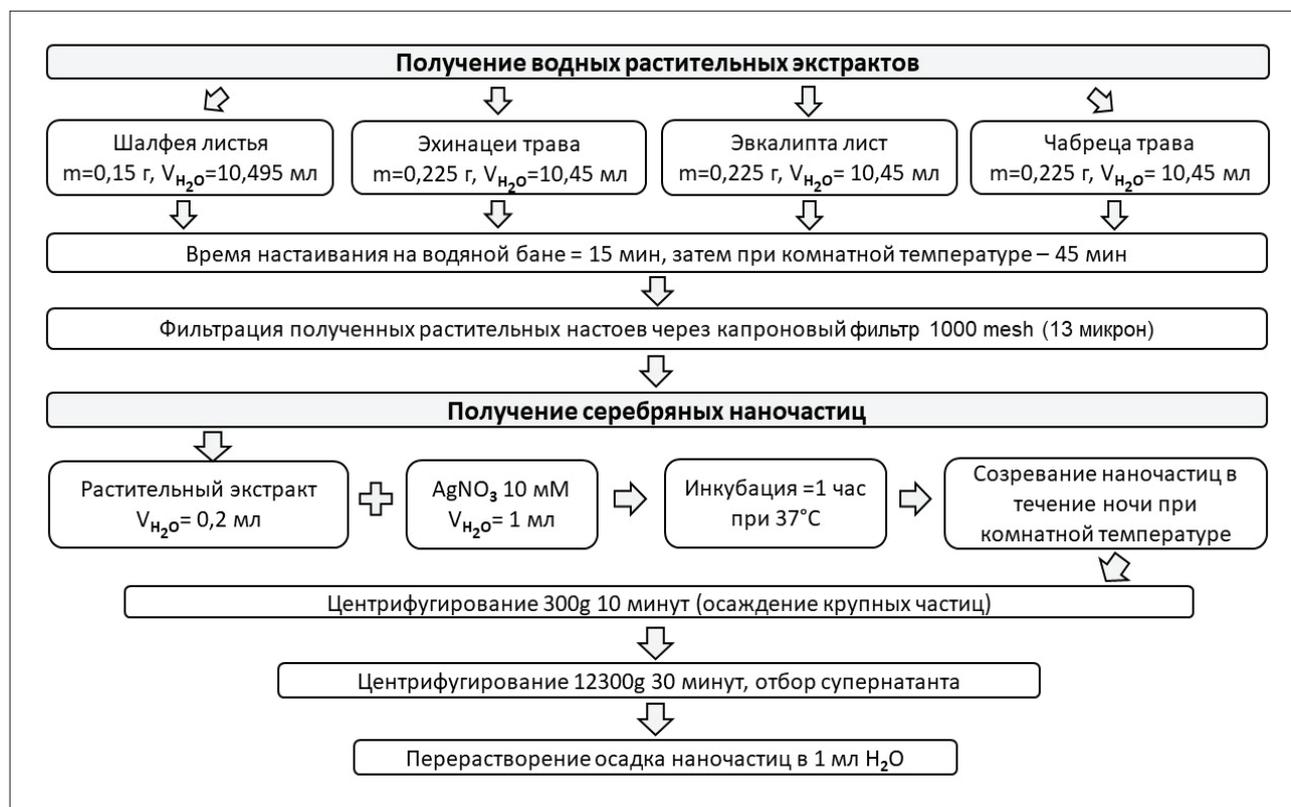


Рисунок 1. Схема приготовления растительных экстрактов и синтеза наночастиц серебра (AgNPs) с их помощью

Протокол поверхностной стерилизации семян различными исследуемыми агентами и их комбинациями приведен на рисунке 2. После окончания стерилизации семена переносили на культуральную среду Мурашиге-Скуга (без витаминов)

в чашки Петри для дальнейшего проращивания в стерильных условиях. Учет всхожести семян и эффективности деконтаминации проводили на 5-е сутки инкубации при температуре 20°C.

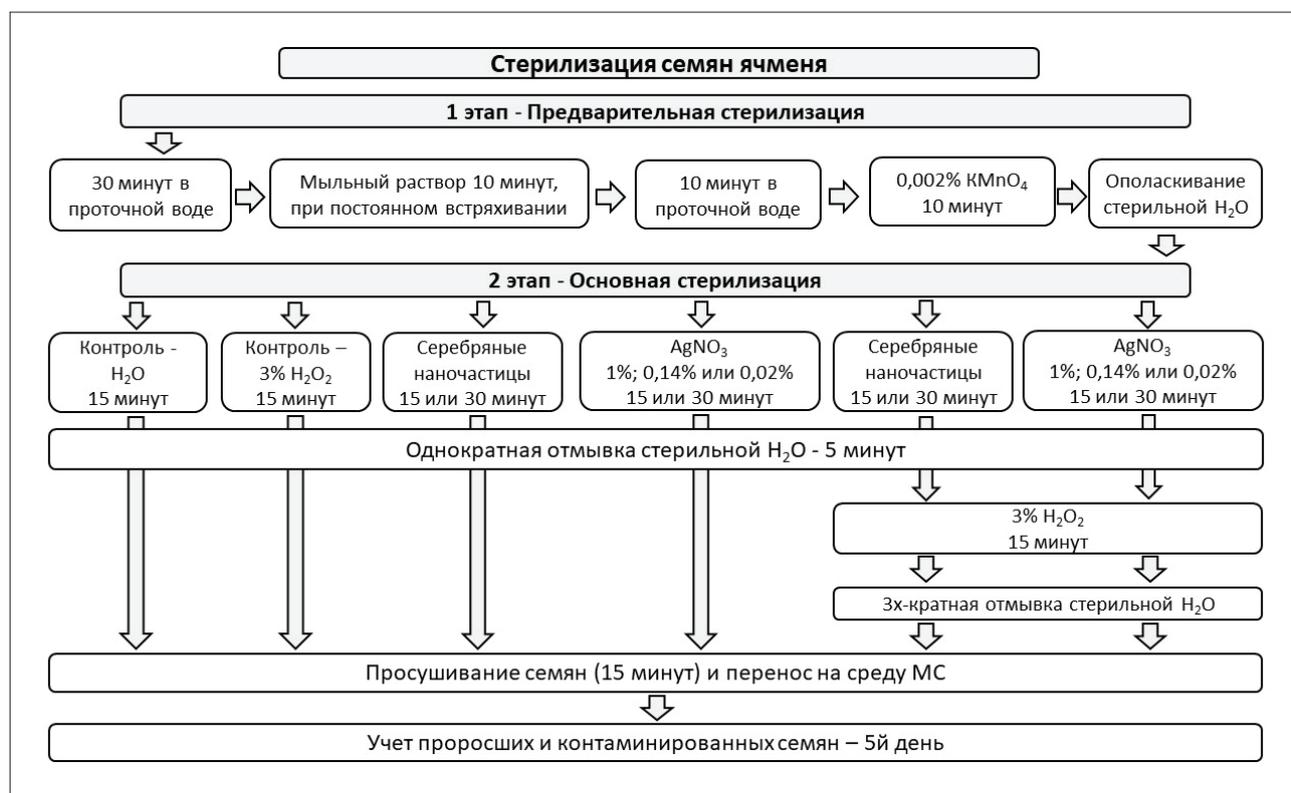


Рисунок 2. Схема протокола поверхностной стерилизации семян для сравнительного анализа различных дезинфицирующих агентов

Показатели в группах после статистической обработки выражали в виде пропорций с указанием границ 95-процентного доверительного интервала (95%ДИ). Различия пропорций между группами оценивали с помощью z-теста.

Результаты и обсуждение. Стерилизация семян ячменя обработкой 3% H_2O_2 в течение 15 мин оказалась неэффективной, поскольку на 5 день культивирования были поражены все семена – также, как и при обработке водой, использованной в качестве негативного контроля (таблица 1). Это согласуется с результатами исследования, в котором было показано полное отсутствие эффекта стерилизации семян ячменя даже после семичасовой обработки 3% H_2O_2 [19].

С использованием растительных экстрактов были получены четыре типа наночастиц: AgNPs-Ч (размер частиц 58-77 нм), AgNPs-Ш (69-70 нм), AgNPs-Эв (56-65 нм), AgNPs-Эх (32-93 нм). Суспензии всех наночастиц обладают спектрами поглощения, характерными для поверхностного плазмонного резонанса серебра, с максимумами поглощения от 427 до 462 нм. При обработке семян ячменя ни один тип наночастиц не обеспечил получения стерильных проростков ни сам по себе, ни в сочетании с последующей обработкой 3%

H_2O_2 (таблица 1). Таким образом, было показано, что эффективность стерилизации семян ячменя под действием AgNPs, H_2O_2 или их комбинаций не отличалась статистически значимо ($p > 0,05$) от отсутствия стерилизации (обработка семян стерильной водой).

Поскольку одним из основных механизмов биоцидного действия AgNPs считается высвобождение ими ионов Ag^+ , можно предполагать, что AgNPs, приготовленные с использованием экстрактов фармакопейных растений, обладают слишком низкой скоростью высвобождения ионов серебра для обеспечения эффективного бактерицидного действия. Возможным путем достижения нужного эффекта могло бы быть получение суспензии AgNPs с более высокой концентрацией серебра, что требует дополнительных исследований.

Использование $AgNO_3$ в качестве стерилизующего агента для семян ячменя описано в очень небольшом числе статей (таблица 2). Приведенные в этих работах данные об эффективности стерилизации и влиянии нитрата серебра на всхожесть семян ячменя неоднозначны. Кроме того, ни в одной из указанных работ стерилизация семян ячменя не использовалась в целях получения культуры растений *in vitro*.

Таблица 1 – Эффективность стерилизации и всхожесть семян ячменя после обработки пероксидом водорода и наночастицами серебра, полученными с помощью растительных экстрактов

Обработка	Время обработки, мин	Число семян	Процент стерильных (95%ДИ)	Процент проросших (95%ДИ)
H ₂ O (негативный контроль)	15	40	0,0 (0,0-10,9)	57,5 (41,0-72,6)
3% H ₂ O ₂	15	40	0,0 (0,0-10,9)	65,0 (48,3-79,0)
AgNPs-Эх	30	20	0,0 (0,0-20,1)	80,0 (55,7-93,4)
AgNPs-Эх + 3% H ₂ O ₂	30 + 15	20	0,0 (0,0-20,1)	75,0 (50,6-90,4)
AgNPs-Эв	30	20	0,0 (0,0-20,1)	75,0 (50,6-90,4)
AgNPs-Эв + 3% H ₂ O ₂	30 + 15	20	0,0 (0,0-20,1)	80,0 (55,7-93,4)
AgNPs-Ч	30	19	0,0 (0,0-20,1)	79,0 (53,9-93,0)
AgNPs-Ч + 3% H ₂ O ₂	30 + 15	20	0,0 (0,0-20,1)	75,0 (50,6-90,4)
AgNPs-Ш	30	20	0,0 (0,0-20,1)	90,0 (66,9-98,3)
AgNPs-Ш + H ₂ O ₂	30 + 15	20	0,0 (0,0-20,1)	55,0 (32,1-76,2)

Таблица 2 – Концентрации нитрата серебра, использованные в более ранних исследованиях для поверхностной стерилизации семян ячменя

Авторы работы	Концентрация AgNO ₃ и время обработки	Эффективность деконтаминации, %	Всхожесть семян, %	Цель деконтаминации	Источник
Hoeyetal.	0,1-0,3% 20 мин	100	94-97 (6 сут)	перед выделением ферментов	[11]
Højetal.	0,2%, 20 мин	не указано		перед выделением РНК	[12]
Munkageretal.	1%, 5 мин	83 ± 7%	52 ± 7% (7 сут)	в изучении микробиома	[19]

Несмотря на то, что AgNO₃ является эффективным стерилизующим агентом, установлено, что с увеличением концентрации AgNO₃ прослеживается заметное снижение всхожести семян [19]. Поэтому для оценки эффективности стерилизации и влияния нитрата серебра на всхожесть семян ячменя были выбраны растворы AgNO₃ трех различных концентраций: 0,02% (1,25 мМ); 0,14% (8,3 мМ) и 1% (58,8 мМ). Концентрация 1% выбрана как максимальная из использовавшихся для поверхностной стерилизации семян ячменя по литературным данным; при этом обеспечивалась хорошая степень деконтаминации при относительно невысокой всхожести [19]. Концентрация 0,14% соответствовала расчетной концентрации серебра в суспензии AgNPs. Поскольку по литературным данным AgNO₃ даже в концентрации 0,1% обла-

дал высокой эффективностью, мы дополнительно протестировали сниженную до 0,02% концентрацию для ослабления вероятного прямого эффекта Ag⁺ на семена.

Мы обнаружили, что стерилизация семян AgNO₃ без дальнейшей обработки либо с последующей обработкой 3% H₂O₂ при одинаковых концентрациях нитрата серебра и времени статистически значимо не отличались друг от друга ни по эффективности стерилизации, ни по всхожести семян (табл. 3).

Обработка семян 1% AgNO₃ в течение 30 минут обеспечивала 100% стерильность проростков, однако существенно снижала всхожесть семян ячменя. Уменьшение времени обработки до 15 минут практически двукратно повышало всхожесть семян (отличия между длительностью обработки 15 мин

и 30 мин статистически значимы, $p=0,037$) при сохранении максимальной стерильности ($p=1,0$). Полученные нами результаты сходны с описанными в [19], но мы выявили несколько более высокую эффективность стерилизующего действия. Снижение концентрации нитрата серебра с 1% до 0,02% при сохранении времени обработки (15 минут) не привело к статистически значимому увеличению всхожести (обработка 0,02% против 1% AgNO_3 , $p=0,144$), но существенно снизило эффективность стерилизации. В то же время использование промежуточной концентрации нитрата серебра (0,14%) при

длительности обработки 30 минут позволило достичь 95% стерильности, что статистически значимо не отличается от стерильности после обработки 1% AgNO_3 . Всхожесть семян ячменя при обработке 0,14% AgNO_3 оказалась статистически значимо лучше, чем при обработке 1% нитратом серебра в течение 30 мин ($p=0,002$) и статистически неотличимой от всхожести при обработке 1% AgNO_3 в течение 15 мин ($p=0,289$). Показатели эффективности обработки семян ячменя 0,14% AgNO_3 , установленные в настоящей работе, были близки к таковым для обработки 0,1-0,3% из работы [11].

Таблица 3 – Эффективность стерилизации и всхожесть семян ячменя после обработки пероксидом водорода и растворами нитрата серебра с различными концентрациями

Обработка	Время обработки, мин	Число семян	Процент стерильных (95%ДИ)	Отличия от негативного контроля, $p =$	Процент проросших (95%ДИ)	Отличия от негативного контроля, $p =$
H_2O (негативный контроль)	15	40	0,0 (0,0-10,9)	-	57,5 (41,0-72,6)	-
3% H_2O_2	15	40	0,0 (0,0-10,9)	1	65,0 (48,3-79,0)	0,4902
0,02% AgNO_3	15	20	40,0 (20,0-63,6)	<0,00001	85,0 (61,1-96,0)	0,03318
0,02% AgNO_3 + 3% H_2O_2	15 + 15	19	47,4 (25,2-70,5)	<0,00001	68,4 (43,5-86,4)	0,42372
0,14% AgNO_3	30	20	95,0 (73,1-99,7)	<0,00001	80,0 (55,7-93,4)	0,08544
0,14% AgNO_3 + 3% H_2O_2	30 + 15	20	85,0 (61,1-96,0)	<0,00001	70,0 (45,7-87,2)	0,34722
1% AgNO_3	15	20	100,0 (80,0-100,0)	<0,00001	65,0 (41,0-83,7)	0,57548
1% AgNO_3 + 3% H_2O_2	15 + 15	19	94,7 (71,9-99,7)	<0,00001	63,2 (38,6-82,8)	0,6818
1% AgNO_3	30	19	100,0 (79,1-100,0)	<0,00001	31,6 (13,6-56,5)	0,06288
1% AgNO_3 + 3% H_2O_2	30 + 15	19	100,0 (79,1-100,0)	<0,00001	52,6 (29,5-74,8)	0,72634

Хотя 30-минутная обработка семян 0,14% AgNO_3 не показывает отличий ни по одному из параметров эффективности в сравнении с 15-минутной обработкой 1% AgNO_3 (рисунок 3), использование 0,14% нитрата серебра может иметь ряд преимуществ. Во-первых, известно, что растворимые соли серебра могут проявлять определенное фитотоксическое действие в отношении побегов и корней проростков растений [27; 28]. Следовательно, использование существенно более низкой концентрации нитрата серебра поможет ослабить его вероятное токсическое действие. Кроме того, использование более низкой концентрации AgNO_3 позволит значительно снизить стоимость обработки семян.

Заключение. Полученные нами результаты показали, что обработка семян ячменя растворами нитрата серебра, в отличие от обработки

суспензией серебряных наночастиц, обеспечивает эффективную поверхностную стерилизацию семян при сохранении их высокой всхожести. Ни один из исследованных препаратов серебряных наночастиц не проявил какого бы то ни было стерилизующего действия при времени обработки до 30 минут. В данной работе впервые был проведен сравнительный анализ деконтаминирующего эффекта различных концентраций AgNO_3 . Мы продемонстрировали, что оптимальной концентрацией AgNO_3 для поверхностной стерилизации семян ячменя является 0,14%. Таким образом, результаты нашего исследования позволяют рекомендовать растворы нитратов серебра в качестве монокомпонентного антисептика для высокоэффективной поверхностной стерилизации семян ячменя без потери всхожести перед их проращиванием *in vitro*.

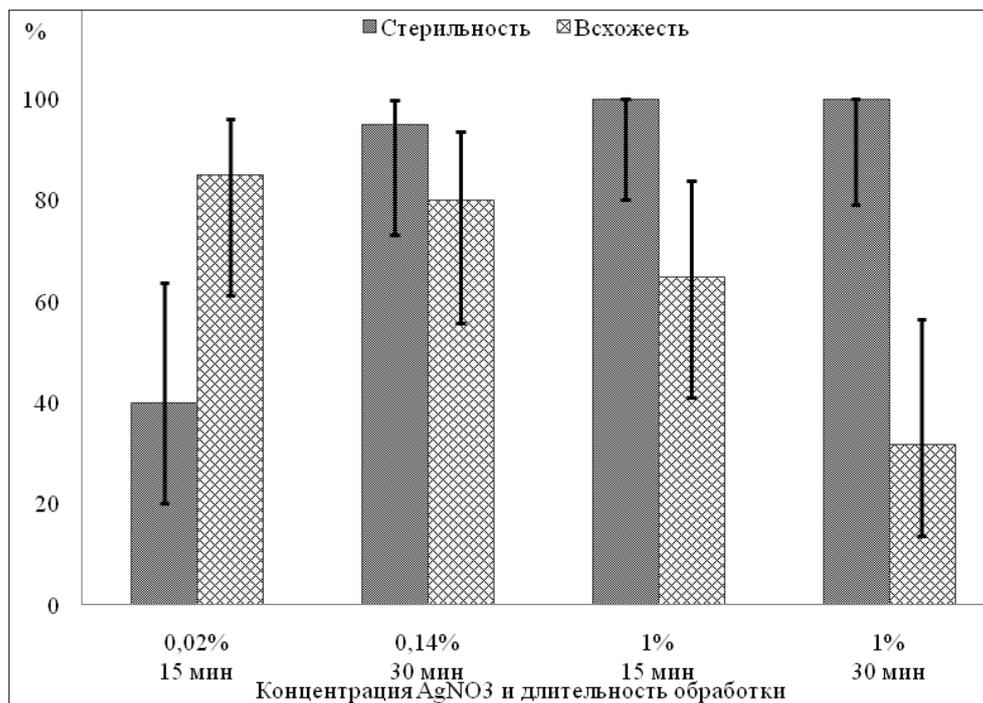


Рисунок 3. Эффективность стерилизации и всхожесть семян ячменя после обработки растворами нитрата серебра различной концентрации

Литература:

- Ahmad S., Munir S., Zeb N., Ullah A., Khan B., Ali J., Bilal M., Omer M., Alamzeb M., Salman S.M., Ali S. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles – an ecofriendly approach. *Int. J. Nanomedicine*. 2019. V.14. P.5087-5107. DOI: 10.2147/IJN.S200254.
- Akbari M., Akbari D., Sajedi N.A. Influence of sodium hypochlorite on seed germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) variety Tarum. *Res. Crops*. 2012. V13. №1. P.11-15.
- Askari N., Wang Y.G., de Klerk G-J. In tissue culture of *Lilium* explants may become heavily contaminated by the standard initiation procedure. *Propag. Ornament. Plants*. 2014. V14. №2. P.49-56.
- Barampuram S., Allen G., Krasnyanski S. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant. Cell Tiss. Organ Cult.* 2014. V.118. P.179-185. DOI: 10.1007/s11240-014-0472-x.
- Barras F., Aussel L., Ezraty B. Silver and antibiotic, new facts to an old story. *Antibiotics* (Basel). 2018. V.7. №3. P.79. DOI:10.3390/antibiotics7030079.
- Bhadane B.S., Patil R.H. Data on the cost effective surface sterilization method for *C. carandas* (L.) seeds and callus induction from aseptic seedling. *Data Brief*. 2016. V.7. P.1551-1555. DOI: 10.1016/j.dib.2016.04.047.
- Cardoso J.C., Teixeira da Silva J.A. Gerbera micropropagation. *Biotechnol. Adv.* 2013. V.31. №8. P.1344-1357. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.008.
- Darçın E.S., Kolsarıcı Ö., Yıldız M. Establishment of efficient regeneration protocol for three rapeseed cultivars. *Biotechnol. Equip.* 2014. V.28. №1. P.21-26. DOI: 10.1080/13102818.2014.901668.
- Haliloglu K., Aydin M. Efficient regeneration system from rye leaf base segments. *Springerplus*. 2005. V.5. №1. DOI: 10.1186/s40064-016-3689-9.
- Helmy A., El-Shazly M., Seleem A., Abdelmohsen U., Salem M.A., Samir A., Rabeh M., Elshamy A., Singab A.N.B. The synergistic effect of biosynthesized silver nanoparticles from a combined extract of parsley, corn silk, and gum arabic: in vivo antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Mater. Res. Express*. 2020. V.7. 025002. DOI: 10.1088/2053-1591/ab6e2d.
- Hoy J.L., Macauley B.J., Fincher G.B. Cellulases of plant and microbial origin in germinating barley. *J. Inst. Brewing*. 1981. V.87. №2. P.77-80. DOI:10.1002/j.2050-0416.1981.tb03990.x.
- Høj P. B., Hartman D.J., Morrice N.A., Doan D.N.P., Fincher G.B. Purification of (1—3)- β -glucanendohydrolase isoenzyme II from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone. *Plant Mol. Biol.* 1989. V.13. P.31-42. DOI: 10.1007/BF00027333.
- Hussein E.A.M., Mohammad A.A.H., Harraz F.A., Ahsan M.F. Biologically synthesized silver nanoparticles for enhancing tetracycline activity against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2019. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180266.
- Jung W.K., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V.74. №7. P.2171-2178. DOI: 10.1128/AEM.02001-07.
- Kędziora A., Speruda M., Krzyżewska E., Rybka J., Łukowiak A., Bugla-Płoskońska G. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V.19. №2. P.444. DOI: 10.3390/ijms19020444.
- Kim D.H., Gopal J., Sivanesan I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Adv*. 2017. V.7. №58. P.36492-36505. DOI: 10.1039/C7RA07025J.
- Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. An introduction to plant tissue culture: Advances and perspectives. *Methods Mol. Biol.* 2018. V.1815. P.3-13. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4_1.
- Mahmoud S.N., Al-Ani N.K. Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. *Int. J. Res. Studies Biosci.* 2016. V.4. №1. P.4–9. DOI: 10.20431/2349-0365.0401002.
- Munkager V., Vestergård M., Prieme A., Altenburger A., Visser E., Johansen J.L., Ekelund F. AgNO₃ sterilizes grains of barley (*Hordeum vulgare*) without inhibiting germination

– A necessary tool for plant-microbiome research. *Plants (Basel)*. 2020. V.9. №3. E372. DOI: 10.3390/plants9030372.

20. Peiris M.K., Gunasekara C.P., Jayaweera P.M., Arachchi N.D., Fernando N. Biosynthesized silver nanoparticles: are they effective antimicrobials? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2017. V.112. №8. P.537-543. DOI: 10.1590/0074-02760170023.

21. Rafique M., Sadaf I., Rafique M.S., Tahir M.B. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017. V.45. №7. P.1272-1291. DOI: 10.1080/21691401.2016.1241792.

22. Ramakrishna N., Lacey J., Smith J.E. Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 1991. V.13. №1. P.47-54. DOI: 10.1016/0168-1605(91)90135-C.

23. Rostami H., Giri A., Nejad A.S.M., Moslem A. Optimization of multiple shoot induction and plant regeneration in Indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars using mature embryos. *Saudi J. Biol. Sci.* 2013. V.20. №3. P.251-255. DOI: 10.1016/j.sjbs.2013.02.008.

24. Sarmast M.K., Salehi H. Silver nanoparticles: An

influential element in plant nanobiotechnology. *Mol. Biotechnol.* 2016. V.58. №7. P.441-449. DOI: 10.1007/s12033-016-9943-0.

25. Tarannum N., Divya, Gautam Y.K. Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: a state-of-the-art review. *RSC Adv.* 2019. V.9. №60. P.34926-34948. DOI: 10.1039/C9RA04164H.

26. Teixeira da Silva J.A., Winarto B., Dobranszki J., Zeng S. Disinfection procedures for in vitro propagation of *Anthurium*. *Folia Hort.* 2015. V.27. №1. P.3-14. DOI: 10.1515/fhort-2015-0009.

27. Tripathi A., Liu S., Singh P.K., Kumar N., Pandey A.C., Tripathi D.K., Chauhan D.K., Sahi S. Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene.* 2017. V.11B. P.255-264. DOI: 10.1016/j.plgene.2017.07.005

28. Vishwakarma K., Shweta, Upadhyay N., Singh J., Liu S., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Tripathi D.K., Sharma S. Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica* sp. *Front. Plant Sci.* 2017. №8. P.1501. DOI: 10.3389/fpls.2017.01501.

DOI: 10.34736/FNC.2022.119.4.014.94-100

The Use of Salts And Nanoparticles of Silver for Barley Seeds Surface Sterilization Before Germination in Vitro

Anastasia A. Zheltova, K.M.N., Leader Researcher; ORCID 0000-0002-8078-6407;

Anna S. Popova, Junior Researcher, ORCID 0000-0002-5983-4080;

Valery G. Zaitsev, K.B.N., e-mail: zaitsev@vfanc.ru, Leader Researcher, ORCID 0000-0001-9191-2862, Head of Molecular Breeding Laboratory

Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences» (FSC of Agroecology RAS), e-mail: info@vfanc.ru, 400062, Universitetskiy Prospekt, 97, Volgograd, Russia

Abstract. Currently, there is no optimal method of barley seeds sterilization, which allows to ensure the maximum possible degree of their sterility and preserve their viability for germination and further initiation of culture in vitro. The purpose of our work was to evaluate the possibility of using soluble silver salts and silver nanoparticles obtained using extracts of pharmacopoeial medicinal plants for surface sterilization of barley seeds before germination in vitro on a sterile Murashige-Skuga environment. The results showed that sterilization of barley seeds with 3% H₂O₂ for 15 minutes is ineffective. Seed treatment for 30 minutes with silver nanoparticles obtained using plant extracts of thyme, sage, echinacea and eucalyptus did not ensure the seedlings sterility. Sterilization of barley seeds with 1% AgNO₃ for 30 minutes allowed to obtain the maximum degree of disinfection, but germination

is not high enough. Reducing the processing time to 15 minutes increased the germination of seeds while maintaining maximum sterility. For the sterilization of barley seeds, 0.14% AgNO₃ is the most optimal, providing a high degree of sterility while maintaining high germination.

Keywords: surface sterilization of seeds, plant culture in vitro, *Hordeum vulgare*, silver nanoparticles, environmentally friendly chemistry

The work was carried out within the framework of the State task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, topic No. 0508-2019-0038 "Creation of new genotypes of agricultural plants with specified characteristics using molecular markers".

Received: 10.08.2022

Accepted: 03.11.2022

Цитирование. Желтова А.А., Попова А.С., Зайцев В.Г. Использование солей и наночастиц серебра для поверхностной стерилизации семян ячменя перед проращиванием in vitro // Научно-агрономический журнал. 2022. №4(119). С. 94-100. DOI: 10.34736/FNC.2022.119.4.014.94-100

Авторский вклад. Авторы настоящего исследования принимали непосредственное участие в планировании, выполнении и анализе данного исследования, ознакомились и одобрили представленный окончательный вариант.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Citation. Zheltova A.A., Popova A.S., Zaitsev V.G., The Use of Salts And Nanoparticles of Silver for Barley Seeds Surface Sterilization Before Germination in Vitro. *Scientific Agronomy Journal*. 2022. 4(119). pp. 94-100. DOI: 10.34736/FNC.2022.119.4.014.94-100

Author's contribution. Authors of this research paper have directly participated in the planning, execution, or analysis of this study. Authors of this paper have read and approved the final version submitted.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.