

**УДК 57.085.23**

## **МОРФОГЕНЕЗ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *ATROPA BELLADONNA* L.**

**Бугара И. А., Омельченко А. В., Жалдак С. Н.**

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: bia.05@mail.ru*

Показана возможность получения и пассирования каллусных культур *A. belladonna* из листовых эксплантов на питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина. Каллусные культуры II-пассажа были способны к морфогенезу и формированию растений-регенерантов на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИУК. Эффективная схема адаптации растений-регенерантов к условиям *in vivo* позволила сохранить все растения, полученные в каллусной культуре.

**Ключевые слова:** *Atropa belladonna* L., морфогенез в каллусной культуре, адаптация *in vivo*.

### **ВВЕДЕНИЕ**

*Atropa belladonna* L. многолетнее травянистое растение семейства Solanaceae, известное с давних времен, как одно из классических ядовитых растений [1]. Листья и плоды растения содержат алкалоиды, которые включают атропин, скополамин и гиосциамин, вызывающие бред и галлюцинации [2]. Атропин ( $C_{17}H_{23}NO_3$ , dl-гиосциамин) является основным алкалоидом *A. belladonna*, определяющим использование растения в медицинской и косметической промышленности [3].

Природным местом произрастания *A. belladonna* является Европа, Северная Африка и Западная Азия. В некоторых странах мира *A. belladonna* растет как сорняк, особенно часто такие посадки встречаются в районах с нарушенными почвами [3]. На территории Российской Федерации имеет природоохранный статус как редкий вид, сокращающийся в численности (2 б). Встречается в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах [4]. В Крыму *A. belladonna* встречается одиночно или небольшими локальными группами в горнолесной зоне в поясе широколиственных лесов [5], растение занесено в Красную книгу Республики Крым [6].

Начиная с 1920-х гг. *A. belladonna* была введена в культуру и промышленно возделывается. В настоящее время заготовки с плантаций полностью удовлетворяют потребности медицины, качество получаемого сырья значительно лучше и дешевле дикорастущего [4]. При этом, основными методами селекционной работы являются традиционные подходы, основанные на индуцированном мутагенезе, гибридизации и отборе [7].

Природоохранный статус *A. belladonna* и важное значение растения для медицинской промышленности являются основополагающими факторами, определяющими стратегию сохранения вида, его массовое размножение и

особенности селекционной работы. В этой связи, использование биотехнологических подходов, основанных на культивировании клеток, тканей и органов растений в условиях *in vitro* несомненно перспективно. Исследования по биотехнологии *A. belladonna* активно проводили в 60-х – 70-х гг. XX-го столетия. Основные направления работы были связаны с получением каллусных и суспензионных культур вида с целью дальнейшей индукции морфогенеза или получения алкалоидов в условиях *in vitro* [8–13]. В настоящее время, также отмечается повышенное внимание исследователей к данной культуре [14, 15], что можно связать с проблемой получения и использования фитобиотиков, препаратов растительного происхождения, обладающим антибиотическим, иммуномодулирующим, противовоспалительным действием на организм животных и человека и являющимися перспективной заменой имеющихся синтетических средств с низкой эффективностью [16, 17].

Актуальность настоящего исследования обусловлена необходимостью разработки биотехнологических методов получения исходного селекционного материала, массового размножения и сохранения вида *A. belladonna*.

Цель работы – определение условий получения каллусных культур и реализации морфогенеза в культуре вегетативных органов *A. belladonna in vitro*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена для получения исходных растений *A. belladonna* были любезно предоставлены сотрудниками Ботанического сада им. Н. В. Багрова. Проращивали семена в чашках Петри на бумажных фильтрах с добавлением 10 мл дистиллированной воды. Поверхностную обработку семян проводили 9 % раствором гипохлорита натрия в течение 7 минут. Чашки Петри с семенами помещали в термостат на 7 суток, при температуре 25 °С без освещения. После 7 суток проростки переносили в пластиковые стаканчики на 200 мл с субстратом из почвы и агроперлита. Полив растений проводили по мере необходимости, но не реже 2-х раз в неделю.

Подготовку посуды, инструментов, питательных сред и растительного материала, проводили по методике, общепринятой в работах по культивированию изолированных клеток, тканей и органов растений [18].

Культивирование листовых эксплантов и получение каллусных культур *A. belladonna* проводили с использованием на агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [19], содержащей 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,5 мг/л кинетина. Приготовленную питательную среду разливали в химические пробирки 16x150 П-1 и термостойкие стеклянные ёмкости на 250 мл, которые автоклавировали при температуре 115 °С в течение 25 минут.

Поверхностную стерилизацию листовых эксплантов проводили 9% раствором гипохлорита натрия в течение 10 минут, с последующей промывкой в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды, по 15 минут в каждой. Помещение эксплантов на питательную среду выполняли в ламинарном боксе MSC Advantage™ Thermo Fisher Scientific II класса биологической безопасности.

Для индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов, каллусные культуры переносили на питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 2,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л индолилуксусной кислотой (ИУК).

Культуральные сосуды с эксплантами, каллусными культурами и растениями-регенерантами помещали в инкубатор лабораторный Climacell™ MMM Medcenter Einrichtungen GmbH. Условия культивирования: 16-ти часовой фотопериод, освещенность 50% от максимальной, влажность 30 %, температура световой фазы 28 °С, темновой – 24 °С.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При культивировании листовых эксплантов *A. belladonna* на питательной среде МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина первые признаки каллусообразования визуально можно было обнаружить на 20–25 сутки культивирования. Формирующийся каллус имел светло-зеленую окраску и рыхлую консистенцию (рис. 1).



Рис. 1. Каллусная культура *Atropa belladonna* L. 0-пассажа, индуцированная в культуре листовых эксплантов (питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина (25 сутки культивирования)).

Первичный каллус образовывался в местах среза и на поверхности экспланта. Через 60 суток культивирования, каллусная ткань равномерно покрывала поверхность экспланта и каллус был пригоден для пассирования на свежую питательную среду того же состава.

В отличие от каллусных культур 0-пассажа, пассируемые каллусные культуры характеризовались более темной окраской и отличались меньшей интенсивностью роста (рис. 2, а, б). По мере дальнейшего роста каллусной культуры наблюдалось изменение окраски до светло-коричневой или даже коричневой. В отдельных каллусных культурах I-пассажа было отмечено формирование флоральных элементов, в то время, как в каллусных культурах II-пассажа – ризогенез (рис. 2, в, г). Заложение флоральных элементов и ризогенез проходило в разных культуральных сосудах независимо друг от друга и дальнейшего развития с

формированием растений-регенерантов при использовании для пассирования каллуса питательной среды МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина не происходило.

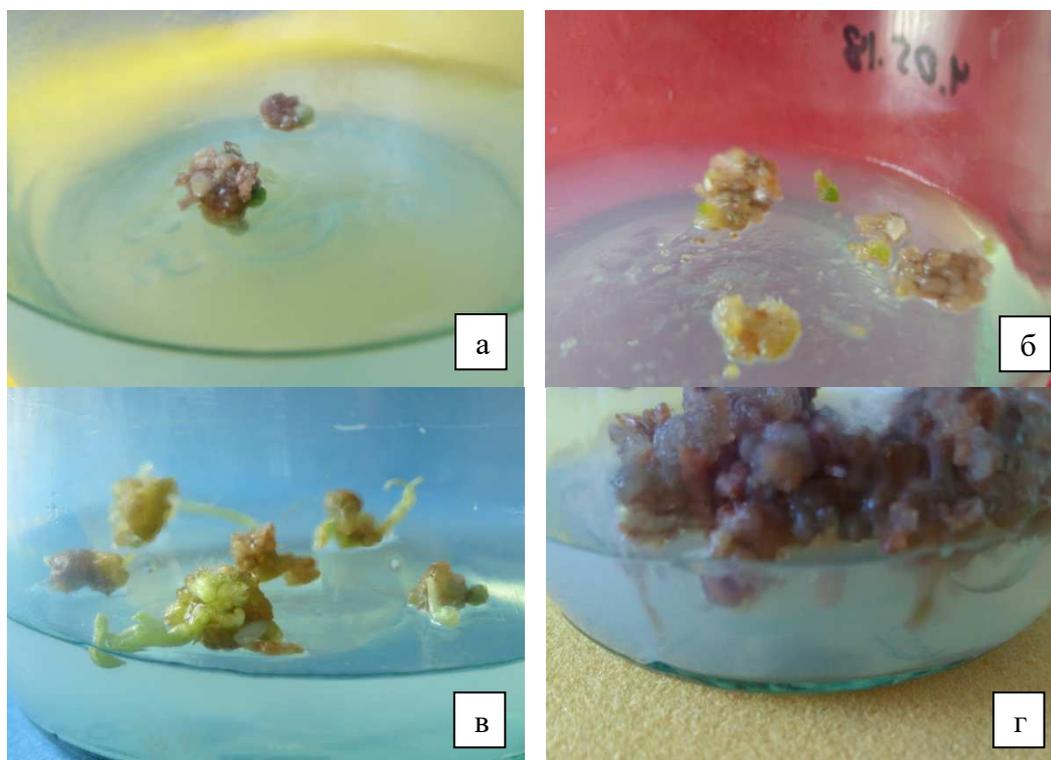


Рис. 2. Каллусные культуры *Atropa belladonna* L.: а – I-пассажа; б – II-пассажа; в – флоральные элементы в каллусных культурах I-пассажа; г – ризогенез в каллусных культурах II-пассажа (питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина).

Одним из ключевых этапов биотехнологического процесса, направленного на сохранение и размножение растений является индукция морфогенеза в каллусных культурах. В данном случае, успех во многом определяется правильным подбором фитогормонов для получения нормально выполненных растений-регенерантов.

В наших исследованиях по индукции морфогенеза, каллусные культуры II-пассажа переносили на питательную среду МС содержащую 2,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИУК. Через 30 суток культивирования можно было визуально отметить признаки морфогенеза, проявляющиеся в закладке листьев и формировании корневой системы. Однако, учитывая время нахождения в культуре *in vitro*, растения-регенеранты еще не были достаточно сформированы для их перевода в условия *in vivo*. Развитие единичных листьев, отсутствие побегообразования и небольшое количество корней, могло стать причиной гибели растений-регенерантов на этапе адаптации (рис. 3).



Рис. 3. Растения-регенеранты в каллусной культуре *Atropa belladonna* L. (питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 6-БАП 2,5 мг/л и ИУК 0,1 мг/л (45 суток культивирования)).

Несомненная значимость каждого экземпляра, полученного в каллусной культуре, обуславливает необходимость правильного выбора сроков перенесения растений-регенерантов из культуры в условия *in vivo*. В наших исследованиях, поддержание растений-регенерантов в культуре *in vitro* на протяжении следующих 45 суток сопровождалось активным ростом побегов, формированием новых листьев и дальнейшим развитием корневой системы (рис. 4, а).



Рис. 4. Растения-регенеранты *Atropa belladonna* L. (а), флоральные элементы (б) (питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 2,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИУК (90 суток культивирования)).

Продолжительное культивирование растений-регенерантов *A. belladonna* в условиях *in vitro* в течение одного пассажа способствовало развитию растений со всеми сформированными органами. Закладка растений-регенерантов проходила компактно, покрывая участки культивируемого каллуса. В одном культуральном сосуде можно было насчитать от 3 до 5 регенерантов. Также было отмечено

формирование отдельных флоральных элементов, но дальнейшего их развития в полноценные растения не происходило (рис. 4, б).

Адаптация растений-регенерантов к условиям *in vivo* является одним из наиболее критических этапов. Необходимо учитывать, что за время культивирования *in vitro* растения, находясь в условиях контролируемого эксперимента, обеспеченные необходимым количеством питательных веществ, освещением, аэрацией, ещё не приобретают нормальной способности регулировать газообмен по средствам эффективного функционирования устьичного аппарата. В связи с этим, работу по извлечению растений из культуральных сосудов и их перенос в условия *in vivo* необходимо проводить как можно быстрее и, если возможно, в несколько этапов, для уменьшения вероятной гибели полученных растений.

На первом этапе адаптации к условиям *in vivo* корневую систему растений-регенерантов отмывали от остатков агаризованной питательной среды. Данную работу проводили в стерильных условиях в шкафу с ламинарным потоком воздуха.

В случае формирования растений-регенерантов в каллусной культуре было невозможно однозначно определить принадлежность корневой системы к определённому побегу или группе побегов. Поэтому, сначала изолировали сформированные побеги друг от друга, перенося их в отдельные чашки Петри, при этом аккуратно разбирая корневые системы препаровальной иглой. Далее, растения-регенеранты переносили в пластиковый сосуд объемом 3 л с подготовленным, проавтоклавированным агроперлитом. На 500 г агроперлита добавляли 100 мл проавтоклавированной дистиллированной воды. В крышке сосуда пробочным сверлом были выполнены отверстия, диаметр которых соответствовал размеру ватно-марлевых пробок (рис. 5).

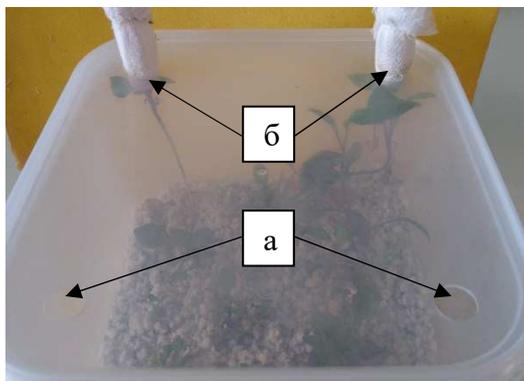


Рис. 5. Растения-регенеранты *Atropa belladonna* L. в пластиковом сосуде с агроперлитом: а – открытые отверстия для вентиляции; б – закрытые ватно-марлевыми пробками отверстия для вентиляции.

Имеющиеся в крышке пластикового сосуда отверстия с ватно-марлевыми пробками позволили обеспечить эффективный воздухообмен для растений-

регенерантов. В данном пластиковом сосуде растения-регенеранты культивировали 30 суток в инкубаторе лабораторном Climacell™. В течение этого времени фиксировали возможные изменения в высоте растений, количестве листьев и средних размерах листовой пластинки (табл. 1).

**Таблица 1.**  
**Изменение некоторых морфологических параметров растений-регенерантов в процессе адаптации к условиям *in vivo***

№ п/п растения	Высота растения, мм		Количество листьев, шт.		Средняя длина листовой пластинки, мм	
	1-е сутки	30-е сутки	1-е сутки	30-е сутки	1-е сутки	30-е сутки
01	72	83	6	6	18,1±2,3	21,3±2,1
02	91	112	7	7	15,2±3,4	18,1±4,3
03	86	92	5	5	11,3±1,9	15,2±3,8
04	25	27	5	5	10,4±1,9	13,1±3,6
05	12	15	5	5	10,5±2,5	12,5±1,8
06	15	21	4	4	13,0±1,3	13,7±2,2
07	7	9	4	4	9,2±1,6	10,2±1,4

Было установлено, что количество листьев у растений-регенерантов не изменилось, увеличилась средняя длина листовой пластинки на 1–3 мм, и высота побегов на 6,9–40%.

Через 30 суток адаптации в закрытом пластиковом сосуде, растения-регенеранты были пересажены в пластиковые стаканы на 200 мл с субстратом из почвы и агроперлита в соотношении 1:1 (рис. 6).



Рис. 6. Растения-регенеранты *Atropa belladonna* L. в условиях *in vivo*.

Таким образом, в ходе выполненных нами исследований показана возможность получения каллусных культур *A. belladonna* из листовых эксплантов и их

дальнейшее пассирование с использованием питательной среды МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина. Подобранный нами состав фитогормонов принципиально отличается от представленных в работах других авторов, которые проводились ранее. Совместное использование ауксина (2,4-Д) и комбинации цитокининов (6-БАП и кинетина) позволило достичь высокой частоты каллусообразования и интенсивного роста как первичного, так и пассируемого каллуса. Однако, избыточную концентрацию 2,4-Д (2,0 мг/л) и присутствие в составе питательной среды двух цитокининов можно считать фактором, способствующим ризогенезу и формированию флоральных элементов в пассируемых каллусных культурах.

Несомненным успехом работы можно считать не прямой органогенез в пассируемых каллусных культурах. Применение питательной среды МС, дополненной 2,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИУК позволило в течение 90 суток культивирования получить растения-регенеранты, способные адаптироваться к условиям *in vivo*. Используемая нами схема адаптации позволила исключить гибель растений-регенерантов на данном этапе, который является критическим в биотехнологии растений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л кинетина возможно использовать для получения и пассирования каллуса *A. belladonna* в условиях *in vitro*.
2. Показано, что пассирование каллусных культур *A. belladonna* на питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2,5 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИУК обеспечивает развитие растений со всеми сформированными органами в течение 90 суток культивирования.

*Работа выполнена в рамках реализации проекта программы развития ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» на 2015–2024 годы: «Разработка новой междисциплинарной модульной магистерской программы «Биотехнология, биохимия и биоинформатика».*

### Список литературы

1. Lee MR. Solanaceae IV: *Atropa belladonna*, deadly nightshade / MR. Lee // The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh. – 2007. – 37(1). – P. 77–84.
2. Arraez-Roman D. Characterization of *Atropa belladonna* L. compounds by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry. / D. Arraez-Roman, G. Zurek, C. Baessmann, A. S. Carretero, A. Fernandez-Gutierrez // Electrophoresis. – 2008. – 29(10). – P. 2112–2116.
3. Datta A. An updated overview on *Atropa belladonna* L. / A. Datta, P. Rita // International research journal of pharmacy. – 2011. – 2(11). – P. 11–17.
4. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Министерство природных ресурсов и экологии РФ; Федеральная служба по надзору в сфере природопользования; РАН; Российское ботаническое общество; МГУ им. М. В. Ломоносова; Гл. редкол.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2008. – 855 с.

## МОРФОГЕНЕЗ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *ATROPA BELLADONNA* L.

- Вахрушева Л. П. Пространственная и возрастная структура ценопопуляций *Atropa belladonna* L. в фитоценозах Крымского государственного заповедника / Л. П. Вахрушева // Заповедники Крыма на рубеже тысячелетий. – Симферополь, 2001. – С. 24–26.
- Красная книга Республики Крым: Растения, водоросли и грибы / отв. ред. А. В. Ена, А. В. Фатерьяга. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2015. – 480 с.
- Басалаева И. В. Оценка и создание исходного материала для селекции белладонны (*Atropa belladonna* L.) в Нечерноземной зоне РФ [Текст] : автореферат дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.06 : защищена 28.11.2013 / И. В. Басалаева; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва), Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии им. Д. Н. Прянишникова (Москва). – Москва, 2013. – 24 с.
- Raj Bhandary S.B. Root, callus, and cell suspension cultures, from *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna*, cultivar lutea Döll / S.B. Raj Bhandary, H.A. Collin, E. Thomas, H.E. Street // *Annals Bot.* – 1969. – 33(4). – P. 647–656.
- Thomas E. Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cultivar lutea Döll / E. Thomas, H. E. Street // *Annals Bot.* – 1970. – 34(3). – P. 657–669.
- Thomas E. Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of *Atropa belladonna* / E. Thomas, H. E. Street // *Annals Bot.* – 1972. – 36(2). – P. 239–247.
- Konar R.N. The diversity of morphogenesis in suspension cultures of *Atropa belladonna* L. / R. N. Konar, E. Thomas, H. E. Street // *Annals Bot.* – 1972. – 36(2). – P. 249–258.
- Eapen S. Morphogenetic and biosynthetic studies on tissue cultures of *Atropa belladonna* L. / S. Eapen, T. S. Rangan, M.S. Chadha, M.R. Heble // *Plant Science Letters.* – 1978. – 13(1). – P. 83–89.
- Eapen S. Biosynthetic and cytological studies in tissue cultures and regenerated plants of haploid *Atropa belladonna* / S. Eapen, T.S. Rangan, M.S. Chadha, M.R. Heble // *Canadian Journal of Botany.* – 1978. – 56(21). – P. 2781–2784.
- Asha Rani N. S. Comparison studies on callus induction of fresh and reused explants of *Atropa belladonna* / N. S. Asha Rani, M. P. Prasad // *Asian Journal of Plant Science and Research.* – 2014. – 4(2). – P. 50–53.
- Elshorbagy M. I. Tropane alkaloids production from callus culture of *Atropa belladonna* L. as affected by elicitors and precursor feeding / M. I. Elshorbagy, S. M. Ibrahim, K. A. Abo El-Seoud, A. I. Abd El-Maksoud // *Int. Res. J. Pharm.* – 2018. – 9(7). – P. 116–125.
- Grashorn M.A. Use of phytobiotics in broiler nutrition – an alternative to infeed antibiotics? / M. A. Grashorn // *Journal of Animal and Feed Sciences.* – 2010. – 19. – P. 338–347.
- Fallah R. A review of the role of five kinds of alternatives to infeed antibiotics in broiler production / R. Fallah, A. Kiani, A. Azarfar // *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.* – 2013. – V. 5(11). – P. 317–321.
- Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
- Murashige T. The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. A. Skoog // *Phisiol. Plant.* – 1962. – V. 15(13). – P. 473–497.

## MORPHOGENESIS IN CALLUS CULTURE OF *ATROPA BELLADONNA* L.

*Bugara I. A., Omelchenko A. V., Galdak S. N.*

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*  
*E-mail: bia.05@mail.ru*

*Atropa belladonna* L. a perennial herb of the Solanaceae family. The leaves and fruits of the plant contain alkaloids: atropine, scopolamine and hyoscyamine, causing delusions

and hallucinations. Atropine is the main alkaloid of *A. belladonna*, which determines the use of the plant in the medical and cosmetic industry.

The natural habitat of *A. belladonna* is Europe, North Africa and West Asia. The plant is included in the Red Book of the Russian Federation and in the Red Book of the Republic of Crimea. The conservation status of plant and the importance of for the medical industry are fundamental factors determining the conservation strategy and mass reproduction of *A. belladonna*. In this regard, the use of biotechnological approaches based on the cultivation cells, tissues and organs of plants *in vitro* is undoubtedly promising.

Cultivating leaf explants *A. belladonna* on MS nutrient medium containing 2.0 mg/L 2.4-D, 0.5 mg/L BA and 0.5 mg/L kinetin, promoted of callus formation on 20 – 25 days of cultivation. After 60 days of cultivation, the callus tissue evenly covered the surface of the explant and the callus was suitable for passaging on fresh nutrient medium of the same composition. The first and second passages of callus cultures were characterized by dark color and had a lower growth rate.

For the induction of morphogenesis, callus cultures of the second passage were transferred to the nutrient medium MS containing 2.5 mg/L BA and 0.1 mg/L IAA. After 90 days of cultivation on this nutrient medium were received from 3 to 5 regenerants in each cultural vessel.

At the first stage of adaptation to *in vivo* conditions, the root system of regenerated plants was washed from the remnants of the agar nutrient medium. Next, the regenerated plants were transferred to a 300 ml plastic vessel with prepared, auto-autoclaved agropperlite. For 500 g of agropperlite, 100 ml of auto-autoclaved distilled water was added. In the lid of the vessel, the cork drill made holes, the diameter of which corresponded to the size of cotton-gauze plugs. After 30 days of adaptation in a closed plastic vessel, regenerated plants were transplanted with plastic glasses of 200 ml with the substrate from the soil and agropperlite in a 1: 1 ratio.

Thus, in the course of our research, the possibility of obtaining *A. belladonna* callus cultures from leaf explants and their further passage using the MS medium containing 2.0 mg/L 2.4-D, 0.5 mg/L BA and 0.5 mg/L kinetin. Indirect organogenesis in passaged callus cultures can be considered an undoubted success of the work. The use of the nutrient medium MS, supplemented with 2.5 mg/L BA and 0.1 mg/L IAA allowed for 90 days of cultivation to obtain regenerated plants capable of adapting to *in vivo* conditions.

**Keywords:** *Atropa belladonna* L., morphogenesis in callus culture, adaptation *in vivo*.

#### References

1. Lee MR. Solanaceae IV: *Atropa belladonna*, deadly nightshade, JRCPE, **37** (1), (2007).
2. Arraez-Roman D., Zurek G., Baessmann C., Carretero A. S., Fernandez-Gutierrez A. *Characterization of Atropa belladonna L. compounds by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry*, Electrophoresis, **29** (10), (2008).
3. Datta A., Rita P. *An updated overview on Atropa belladonna L.*, IRJP, **2** (11), (2011).
4. Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby) Ministerstvo prirodnikh resursov i ekologii RF; Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere prirodopol'zovaniya; RAN; Rossiyskoye botanicheskoye

- obshchestvo; MGU im. M.V. Lomonosova; Gl. redkoll.: YU.P. Trutnev i dr.; Sost. R.V. Kamelin i dr., 855 (M.: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2008).
5. Vakhrusheva L. P. *Prostranstvennaya i vozrastnaya struktura tsenopopulyatsiy Atropa belladonna L. v fitotsenozakh Krymskogo gosudarstvennogo zapovednika*, Zapovedniki Kryma na rubezhe tsysyacheletiy, 24 (Simferopol, 2001).
  6. Krasnaya kniga Respubliki Krym rasteniya vodorosli I griby. Otv. Red. A. V. Ena, A. V. Fateryga, 480 (It. 'Arial', Simferopol, 2015).
  7. Basalaeva I. V. *Otsenka i sozdaniye iskhodnogo materiala dlya seleksii belladonny (Atropa belladonna L.) v Nechernozemnoy zone RF* (avtoref. dis. kand. s.-h. nauk, 24, 2013).
  8. Raj Bhandary S.B. Collin H.A., Thomas E., Street H.E. *Root, callus, and cell suspension cultures, from Atropa belladonna L. and Atropa belladonna, cultivar lutea Döll*, Annals Bot., **33**(4), (1969).
  9. Thomas E., Street H.E. *Organogenesis in cell suspension cultures of Atropa belladonna L. and Atropa belladonna cultivar lutea Döll*, Annals Bot. **34**(3), (1970).
  10. Thomas E., Street H.E. *Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of Atropa belladonna*, Annals Bot., **36**(2), (1972).
  11. Konar R.N., Thomas E., Street H.E. *The diversity of morphogenesis in suspension cultures of Atropa belladonna L.*, Annals Bot., **36**(2), (1972).
  12. Eapen S., Rangan T.S., Chadha M.S., Heble M.R. *Morphogenetic and biosynthetic studies on tissue cultures of Atropa belladonna L.*, Plant. Sci. Lett., **13**(1), (1978).
  13. Eapen S., Rangan T.S., Chadha M.S., Heble M.R. *Biosynthetic and cytological studies in tissue cultures and regenerated plants of haploid Atropa belladonna*, Can. J. Bot., **56**(21), (1978).
  14. Asha Rani N. S., Prasad M.P. *Comparison studies on callus induction of fresh and reused explants of Atropa belladonna*, AJPSKY, **4**(2), (2014).
  15. Elshorbagy M. I., Ibrahim S. M., Abo El-Seoud K. A., Abd El-Maksoud A. I. *Tropane alkaloids production from callus culture of Atropa belladonna L. as affected by elicitors and precursor feeding*, Int. Res. J. Pharm., **9**(7), (2018).
  16. Grashorn M.A. *Use of phytobiotics in broiler nutrition – an alternative to infeed antibiotics?*, J. Anim. Feed Sci., 19, (2010).
  17. Fallah R., Kiani A., Azarfar A. *A review of the role of five kinds of alternatives to infeed antibiotics in broiler production*, JVMAH, **5**(11), (2013).
  18. Kalinin. F. L., Sarnackaya V.V., Polishchuk V.E. *Metody kultury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij*, 488 (Naukova Dumka, Kiev, 1980).
  19. Murashige T., Skoog F. *The revised medium for rapid growth, and bioassays with tobacco tissue culture*, Physiol. Plant, **15**(13), (1962).