



## *In vitro* Callus Induction and Shoot Regeneration System of a Metal Accumulator Plant, *Brassica nigra* L.

Fatma Kusun Memon<sup>1,a</sup>, Abdülrezzak Memon<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Arts, Usak University, 64000 Usak, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 15/07/2021 Accepted : 11/08/2021</p> <p><b>Keywords:</b> <i>Brassica nigra</i> Callus <i>In vitro</i> regeneration Heavy metal accumulator Benzylaminopurine</p>	<p>This study established an efficient <i>in vitro</i> callus formation and plant regeneration protocol for a previously reported Cu accumulator, <i>Brassica nigra</i>, black mustard collected from Diyarbakir (Station site). Node explants from 10-day old mature plants were used for callus formation and shoot regeneration. The highest callus formation frequency (100%) was observed on Murasige Skoog (MS) medium containing 0.1 mg/L Benzylaminopurine (BAP) + 0.5 mg/L Naphthylacetic acid (NAA) (MS 2), 0.6 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA (MS 7), the highest shoot regeneration frequency (100%) was achieved on MS medium containing 0.6 mg/L BAP + 0.05 mg/L Indole butyric acid (IBA) (MS 8), 0.2 mg/L IBA + 0.2 mg/L NAA (MS 10) and the highest number of shoots per explant (3,25) was obtained on MS medium supplemented 0.6 mg/L BAP + 0.05 mg/L IBA (MS 8). After root, stem, and leaf formation from explants in MS medium, these plants were transferred to soil and grown in the plant growth room for one month. A dependable and effective shoot regeneration procedure was developed, laying the groundwork for genetic transformation in <i>Brassica nigra</i>.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 9(11): 1993-1998, 2021

## Metal Akümülatör Bitki olan *Brassica nigra* L.'nin *in vitro* Kallus İndüksiyonu ve Sürgün Gelişimi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 15/07/2021 Kabul : 11/08/2021</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>Brassica nigra</i> Kallus <i>In vitro</i> gelişim Ağır metal akümülatör Benzilaminopürin</p>	<p>Bu çalışmada, Cu akümülatörü olduğu tespit edilen <i>Brassica nigra</i> L. Diyarbakır genotipinin <i>in vitro</i> koşullarda kallus oluşumu ve sürgün gelişimi için etkili bir protokol oluşturulmuştur. Kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu için 10 günlük olgun bitkilerden alınan nod eksplantları kullanılmıştır. En yüksek kallus oluşum yüzdesi (%100) 0,1 mg/L Benzilaminopürin (BAP) + 0,5 mg/L Naftalin asetik asit (NAA) (MS 2), 0,6 mg/L BAP 0,2 mg/L NAA (MS 7) içeren Murasige Skoog (MS) besin ortamlarında gözlenirken, en yüksek sürgün oluşum yüzdesi ise (%100) 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L İndol bütirik asit (IBA) (MS 8), 0,2 mg / L IBA + 0,2 mg / L NAA (MS 10) ortamlarında gözlemlenmiştir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (3,25) 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA (MS 8) takviyeli MS ortamından elde edilmiştir. MS ortamında eksplantlarda kök, gövde ve yaprak oluşumu meydana geldikten sonra, bu bitkiler toprağa aktarılmış, bitki büyüme odasına alınmış ve bir ay büyütülmüştür. Yapılan bu çalışmayla <i>Brassica nigra</i>'da genetik dönüşümün temelini oluşturan güvenilir ve verimli bir sürgün rejenerasyon protokolü oluşturulmuştur.</p>

<sup>a</sup> [1843055001@ogr.usak.edu.tr](mailto:1843055001@ogr.usak.edu.tr)

<sup>id</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3964-2679>

<sup>b</sup> [armemon@usak.edu.tr](mailto:armemon@usak.edu.tr)

<sup>id</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9447-6453>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

## Giriş

Brassicaceae (Cruciferae) familyası, bitkiler aleminin en büyük familyalarından biridir. Farklı kullanım alanlarına sahip olan Brassicaceae familyası, dünyanın farklı bölgelerine yayılmış olup 338 cinse ait 3709 tür içermektedir (Al-Shehbaz ve ark., 2006; Bailey ve ark., 2006). Bu ailenin türleri gıda (yağ ve sebze), yakıt (biyodizel) gibi birçok farklı alanda kullanılırken ayrıca moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarında kullanılmaktadır. Gıda ve yakıttan, bilimsel araştırmalara kadar pek çok farklı alanda kullanılması; bu aileyi giderek ilgi odağı haline getirmiştir (Al-Shehbaz ve ark., 2006; Koch and Mummenhoff 2006). Bu ailenin bazı türleri yüksek oranda biyokütle üretir ve dokularında yüksek miktarlarda metal biriktirerek bu metalleri tolere ederler (Anjum ve ark., 2012; Nanda Kumar ve ark., 1995) *Brassica*'daki bitki türlerinin birçoğunun Cd, Cu, Ni, Pb, U, Zn gibi toksik metallerin birikimi ve toleransı için kullanıldığı bundan dolayı bu türlerin oldukça etkili toksik metal akümülatörleri olduğu bilinmektedir (Nanda Kumar ve ark., 1995; Ozturk ve ark., 2012). Ayrıca, birçok *Brassica* türü önemli miktarda biyokütle üretebildiğinden (bitki ıslahı için temel bir özellik) ve çeşitli çevresel koşullara adapte olabildiğinden, seçim yolu ve üremeye bitki ıslahı için kullanılıp üstün *Brassica* türlerinin genotiplerini geliştirme potansiyeli vardır (Anjum ve ark., 2012). *Brassica* türlerinden diploid bir tür olan *B. nigra*'nın Diyarbakır (Güney Anadolu) ekotipinde yetiştiği ve Cu akümülatörü olduğu bilinmektedir (Cevher-Keskin ve ark., 2019). *B. nigra*'nın sürgünlerinde kuru ağırlık başına 20.000 ug Cu biriktirmektedir (Kumar ve ark., 2012; Memon, 2014). Son yıllarda çevredeki kirletici maddelerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için yüksek maliyetli teknolojiler yerine bitkiler kullanılmaktadır. Fitoremediasyon olarak adlandırılan bu teknoloji ekonomik, çevre dostu ve her toprak çeşidinde uygulanabilmektedir (Sirpa ve ark., 2000) *B. nigra*'nın Cu, Cd, Zn gibi metalleri yüksek oranda biriktirme kapasitesinden yararlanarak kirli toprakların fitoremediasyonu için kullanılabileceği düşünülmektedir (Cevher-Keskin ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2012).

Mikro çoğaltma, direkt ya da indirekt olgunmamış veya olgunlaşmamış bitki parçalarının *in vitro* çoğaltılması, köklenmesi ve daha sonra toprağa alıştırılarak büyütülme sürecine dayanan popüler biyoteknolojik bir yöntemdir (Babaoglu ve ark., 2002). Bu teknik, bitkilerden hızlı yayılma ve yüksek kaliteli ürünlerin üretimi için yüksek potansiyele sahip özellikler sergiler. Doku kültürü sayesinde yıl boyunca hızlı, kitlesel ve patojensiz üretim yapılmaktadır. *In vitro* kültürde ortamdan bağımsız olarak kontrollü ve steril koşullarda üretimini artırmak mümkündür (Bourgaud ve ark., 2001). Doku kültürü sayesinde verim artarken, nesli tükenmekte olan türlerin korunması da sağlanmaktadır. Metal akümülatör olan *B. nigra*'da verimli bir rejenerasyon sistemi kurmak için optimum BAP, NAA ve IBA konsantrasyonları taranmalıdır. *B. nigra*'da yapılan çalışmalara bakıldığında mikroçoğaltım ve doku kültüründe yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda yapılan bu çalışmanın amacı, *B. nigra*'da uygun ve tekrarlanabilir bir sürgün rejenerasyon protokolü oluşturmak ve doku kültürüyle hızlı üretimini gerçekleştirmektir.

## Materyal ve Yöntem

### Bitki materyali

Denemede *Brassica nigra* bitkisinin 'Station' genotipi kullanılmıştır. Bu bitkinin tohumları Diyarbakır'dan (Güney Anadolu) toplanmıştır.

### Deney planı

Farklı büyüme düzenleyici konsantrasyonunun sürgün rejenerasyonu ve kallus gelişimi üzerindeki etkisi tekrarlı bir deneyde incelenmiştir. Eksplantlar, petri kabı başına dört eksplant olacak şekilde kültürlendi (Şekil 4.a) ve her deneme üç kez tekrarlandı. Eksplant örneklerinin sürgün rejenerasyonu ve kallus gelişimi 6 hafta boyunca gözlenmiştir.

### Kültür ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Olgun 'Station' tohumları, Bıçakçı ve Memon (2005) yöntemine göre, %5 sodyum hipoklorit ile 6 dakika sterilize edildikten sonra steril distile su ile 5 dakika boyunca durulanmış ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır (Bıçakçı ve Memon 2005). Tohumlar steril filtre kağıdı ile kurutulmuş, ardından %3 sakkaroz ve %0,6 agar ile takviye edilmiş bazal Murasige ve Skoog (Murashige ve Skoog 1962) ortamında inkübe edilmiştir. 121°C' de 15 dakika otoklavlanmadan önce pH 5,4-5,8 arasına ayarlanmıştır. 10 günlük nod eksplantları kesilmiş ve 10 farklı MS ortamında (Çizelge 1); 0,05 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (MS 1), 0,1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (MS 2), 0,25 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (MS 3), 0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (MS 4), 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA (MS 5), 0,6 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (MS 6), 0,6 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA (MS 7), 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA (MS 8), 0,2 mg/L IBA (MS 9) ve 0,2 mg/L IBA + 0,2 mg/L NAA (MS 10) kültürlenmiştir. Kültürler, 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ışık şiddeti, %70-85 hava nemi ve 19 ± 2°C sıcaklığı ile 16 saat gündüz 8 saat gece fotoperiyotta büyütülmüştür. Her bir kültür 2 hafta aralıklarla alt kültürlerle alınmıştır.

Çizelge 1. Kallus oluşumu ve sürgün gelişimi için kullanılan farklı hormon içeren MS besi ortamları  
Table 1. MS medias containing different hormones for callus development and shoot regeneration

Ortamlar	İçerdiği Hormonlar Ve Seviyeleri
MS 1	0,05 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA
MS 2	0,1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA
MS 3	0,25 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA
MS 4	0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA
MS 5	0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA
MS 6	0,6 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA
MS 7	0,6 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA
MS 8	0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA
MS 9	0,2 mg/L IBA
MS 10	0,2 mg/L IBA + 0,2 mg/L NAA

### Bitkinin toprağa taşınması, aklimizasyonu ve adaptasyonu

Tüm kültürler, 19 ± 2°C' de 16 saat gündüz, 8 saat gece fotoperiyot altında büyütülmüş, 8 hafta sonra tüm bitkilerin kökleri musluk suyu ile yıkanmış (Şekil 4.g) ve saksıların üzeri plastik torbalarla kapatılmış, otoklavlanmış toprak ve torf karışımına (2:1) aktarılmıştır (Şekil 4.h). 2 gün sonra plastik poşetler çıkarılmış ve bitkilerin gelişimi için bitki

büyüme odasında yüksek miktarda nem ve yeterli sıcaklık sağlanmıştır (Şekil 4.i).

### İstatistiksel analiz

Her bir deneme petri başına dört örnek olacak şekilde üç defa tekrar edilmiştir. Bu protokol, rejenerasyon sisteminin kararlılığını belirlemek amacıyla üç kere tekrarlanmıştır. SPSS sürüm 16.0 kullanılarak tüm veriler tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve ortalamalar Tukey'in çoklu aralık testi ( $P<0,05$ ) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2. Farklı MS ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı, kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait Tukey testi sonucu.

Table 2. Tukey test result for the number of shoots per explant, callus formation frequency, and shoot regeneration in different MS media.

Ortamlar	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Kallus oluşturan eksplant %	Sürgün oluşturan eksplant %
MS 1	0,17±0,39 <sup>d</sup>	75±0,0 <sup>bc</sup>	16,67±14,43 <sup>c</sup>
MS 2	1,75±0,87 <sup>bc</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>	83,33±14,43 <sup>ab</sup>
MS 3	0,92±0,90 <sup>cd</sup>	0±0,0 <sup>e</sup>	58,33±14,43 <sup>b</sup>
MS 4	1,00±0,60 <sup>cd</sup>	41,67±14,43 <sup>d</sup>	83,3±28,9 <sup>ab</sup>
MS 5	1,91±1,24 <sup>abc</sup>	66,67±14,43 <sup>c</sup>	75±0,0 <sup>ab</sup>
MS 6	1,67±1,30 <sup>bc</sup>	91,67±14,43 <sup>ab</sup>	66,67±14,43 <sup>ab</sup>
MS 7	2,75±1,71 <sup>ab</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>	75±0,0 <sup>ab</sup>
MS 8	3,08±0,79 <sup>a</sup>	0±0,0 <sup>e</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>
MS 9	0,92±0,29 <sup>cd</sup>	0±0,0 <sup>e</sup>	91,67±14,43 <sup>ab</sup>
MS 10	2,50±0,52 <sup>ab</sup>	0±0,0 <sup>e</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>

Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre besin ortamlarının sürgün sayısı, sürgün oluşturma yüzdesi ve kallus oluşturma yüzdesi üzerine etkisi bulunmuştur. Sürgün sayısı için en başarılı besin ortamı 3,08 adet/eksplant ile MS 8 besin ortamı olmuştur (Şekil 4.e) (Çizelge 2). Bu parametreye göre sürgün sayısı için en başarısız ortam 0,17 adet/eksplant ile MS 1 besin ortamı olmuştur. Tüm ortamlardaki ortalama sürgün sayısı adet/eksplant olarak gösterilmiştir (Şekil 3). Besin ortamlarındaki farklı bitki büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisine bakıldığında Benzilaminpürin'in (BAP) sürgün gelişiminde oldukça önemli olduğu görülmüştür. BAP hormonunun NAA ve IBA ile birlikte kullanıldığı tüm ortamlarda sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. 0,6 mg/L BAP içeren ortamların çoğunda sürgün sayıları diğer ortamlara göre ortalama sürgün sayısı adet/eksplant olarak daha iyi sonuçlar vermiştir (Çizelge 2). Sürgün gelişimini tamamlayan fideler kök gelişimi için hormonsuz besi yerine aktarılmıştır (Şekil 4.f). Kök gelişimini tamamlayan bitkilerin kökleri musluk suyunda yıkanıp (Şekil 4.g) toprağa aktarılmıştır (Şekil 4.h).

Varyans sonuçlarına göre kallus oluşturan eksplant yüzdesi için en başarılı besin ortamı %100 ile MS 2 ve MS 7 (Şekil 4. a, b) ortamları iken, en başarısız %0 ile MS 3, MS 8, MS 9 ve MS 10 ortamları olmuştur (Kallus gelişiminin mikroskopik görüntüsü Şekil 4. d'de gösterilmiştir) (Çizelge 2). Her bir ortamda oluşan kallus yüzdeleri gösterilmiştir (Şekil 1) BAP ve NAA hormonlarının zıt konsantrasyonlarında kallus gelişim yüzdeleri yüksek olmuştur (Şekil 4.c). Bu iki hormon konsantrasyonlarının birbirine yakın olduğu ortamlarda (MS 10) ise kallus gelişimi oldukça düşük yüzdelerde

### Bulgular ve Tartışma

Yapılan bu çalışmada Kara hardal (*B. nigra*) bitkisinde 'Station' çeşidinin nod eksplantları *in vitro* çoğaltım için doku kültüründe kullanılmış ve etkili bir mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur. Nod eksplantları sürgün indüklemeye amacıyla farklı ortamlarda (Çizelge 1) ve her petri kabına dört örnek olacak şekilde kültüre alınmıştır. 10 farklı besin ortamında elde edilen sürgün sayıları, sürgün oluşturma yüzdeleri ve kallus oluşturma yüzdeleri gösterilmiştir (Şekil 1, 2, 3)

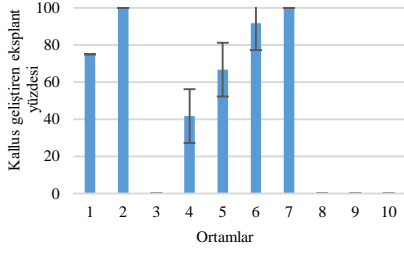
gerçekleşmiştir. NAA hormonunun kallus gelişiminde oldukça etkili bir hormone olduğu görülmüş, bu hormonun olmadığı ortamlarda (MS 8, MS 9) kallusun gelişmediği tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Elde edilen varyans sonuçlarına göre sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri de incelenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi için en başarılı besin ortamları %100 ile MS 8 ve MS 10 olurken en başarısız besin ortamları %16,67 ile MS 1 olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2) Her bir ortamda oluşan sürgün yüzdeleri gösterilmiştir (Şekil 2) IBA hormonunun sürgün gelişiminde gayet etkili bir hormon olduğu anlaşılmıştır. IBA içeren tüm ortamlarda oldukça yüksek sürgün oluşum yüzdeleri elde edilmiştir (MS 8, MS 9, MS 10) (Şekil 2).

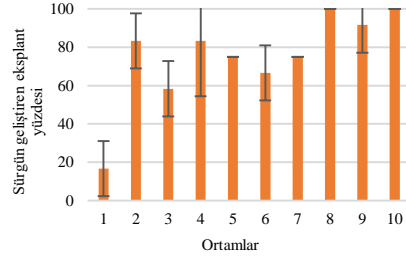
*Brassica nigra* bitkisine ait yapılmış çok fazla *in vitro* çalışma bulunmamakla birlikte yapılmış *in vitro* kültür çalışmalarının çoğunda, 5-10 günlük *Brassica* fideleri kallus rejenerasyon için kullanılmıştır (Sharma, Bhojwani, ve Thorpe 1991)

Yapılan bir çalışmada *B. nigra* nın hipokotil eksplantlarının protoplastları kullanılarak kinetin (KIN) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren MS besi ortamında kallus oluşumu gerçekleştirilmiştir (Gupta ve ark., 1990).

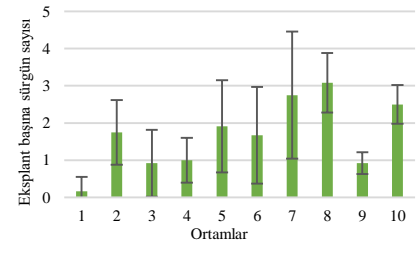
*Brassica* türlerinden *B. rapa* bitkisinde yapılmış bir çalışmada 4 günlük bitkiden alınan kotiledon eksplantları 1,0 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA ile takviye edilmiş MS besi ortamında kültürlendiğinde yüksek frekanslı (%77,14) sürgün rejenerasyonu sergilenmiştir. Yine aynı çalışmada en yüksek rejenerasyon frekansı (%85,40) ve eksplant başına maksimum sürgün sayısı (1,79) 2,0 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA içeren ortamda elde edilmiştir (Zhao ve ark., 2021). Yapılan bu çalışma *B. nigra* ile yaptığımız çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Çizelge 2).



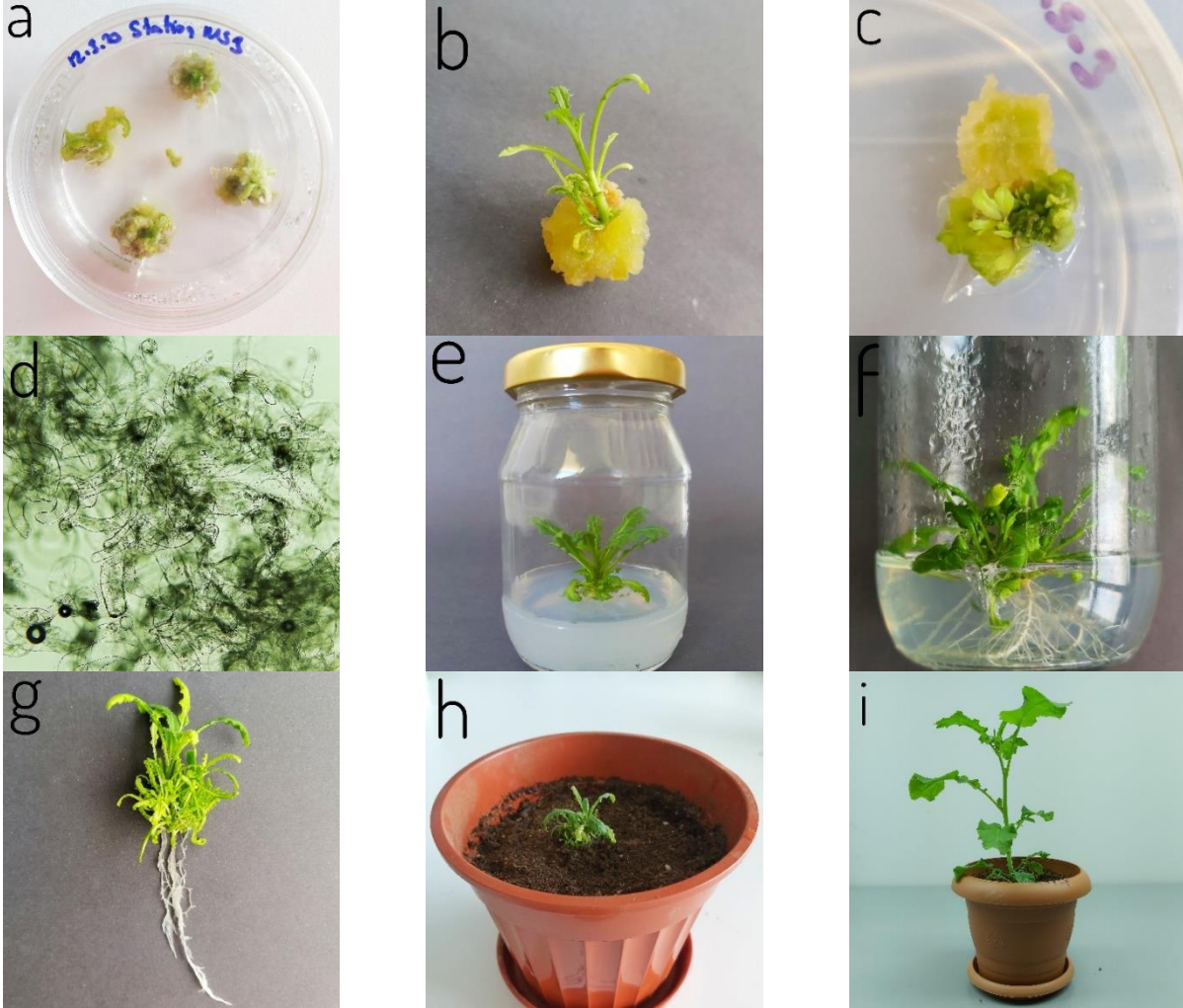
Şekil 1. Farklı MS ortamlarında kallus gelişiren eksplantların yüzdesi  
Figure 1. Callus development frequency in different MS media



Şekil 2. Farklı MS ortamlarında sürgün gelişiren eksplantların yüzdesi  
Figure 2. Shoot regeneration frequency in different MS media



Şekil 3. Farklı MS ortamlarında başına gelişen ortalama eksplant sayıları  
Figure 3. Number of shoot development frequency in different MS media



Şekil 4. a. *B. nigra* Station çeşidinin nod eksplantından 0,1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (MS 2) içerikli MS ortamında kallus gelişimi b. 0,6 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA (MS 7) MS ortamında 14 günlük kallus gelişimi c. 0,6 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (MS 6) MS ortamında 14 günlük kallus gelişimi d. *B. nigra* Station çeşidinin organize olmamış kallus hücrelerinin ışık mikroskopundaki görüntüleri e. 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA (MS 8) MS ortamında direkt sürgün gelişimi f. Hormonsuz MS ortamında kök gelişimi için alt kültüre alınmış fideler g. Hormonsuz besin ortamında kök gelişimini tamamlamış bitki h. Kök gelişimini tamamlamış fidenin toprağa aktarılması i. Toprağa uyum göstermiş 20 günlük bitki

Figure 4. a. Callus regeneration from node explants of *B. nigra* Station variant cultured in MS media containing 0.1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA (MS 2) b. 14-day old callus development after of culturing on media containing 0.6 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA (MS 7) c. Callus development in media containing 0.6 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA (MS 6) d. Light microscopy images of unorganized callus cells of *B. nigra* (100X) e. Shoot regeneration without callus formation on media containing 0.6 mg/L BAP + 0.05 mg/L IBA (MS 8) f. Seedling that are sub-cultured for root development in hormone-free MS media g. Plant that has completed its root development in hormone-free media. h. Transplanting regenerated plant in pot. i. 20 day-old plant that has adjusted to the soil.

*Brassica campestris* için kotiledon eksplantları kullanılarak yüksek sürgün rejenerasyon verimliliğinin 2 mg/L BAP ve 1 mg mg/L NAA kombinasyonu ile elde edildiğini bulunmuştur (Hachey, Sharma, ve Moloney 1991).

*Brassica oleraceae* ile yapılan bir çalışmada hipokotil ve kotiledon eksplantları 8,8 µM BAP ve 0,53 µM NAA içeren besiyerine yerine alınmış ve bu hormon konantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu için en etkili seviye olduğunu tespit etmişlerdir (Gerszberg, Hnatuszko-Konka, ve Kowalczyk 2015)

*Brassica napus* bitkisiyle yapılan çalışmada kallus oluşumu ve büyümesi için 6 mg/L 2, 4-D ve 2 mg/L BAP içeren MS ortamın en uygun olduğu, sürgün rejenerasyonu için 1 mg/L IBA ve 1 mg/L BAP konsantrasyonlu MS besiyerinin olduğu ve kök gelişimi için en uygun MS ortamının 1 mg/L NAA ve 0,5 mg/L KIN içerikli ortamın olduğu belirlenmiştir (Chamandoosti 2007).

*Brassica* familyasına ait bir diğer tür olan *B. juncea* ile yapılan bir çalışmada ise kallus rejenerasyonu için en iyi MS ortamının 0,2 mg/L BAP, 0,2 mg/L NAA ve 0,2 mg/L 2,4-D içerikli ortamın olduğu gösterilmiştir (Shekhawat ve ark., 2010).

Yapılan bu çalışmada *Brassica nigra* da genetik dönüşümün temelini oluşturan güvenilir ve verimli bir sürgün rejenerasyon protokolü oluşturduk. Literatür taramasında *Brassica nigra* ile ilgili oldukça az *in vitro* doku kültür çalışmaları bulunmaktadır. Geliştirdiğimiz bu rejenerasyon sistemi ile *Brassica nigra* ya ait önemli genotiplerinin hızlı çoğaltılması mümkün olabilecektir. Ayrıca gen aktarımından sonra kültüre alınacak eksplantların hızlı rejenerasyonu için faydalı olabilecektir. Geliştirilen bu protokol *in vitro* kültürde *B. nigra* çoklu üretimi yapılabilecek ve elde edilen tohumlarla ağır metallerce kirlenmiş toprakların temizlenmesi mümkün olacaktır.

## Sonuç

u çalışmada *B. nigra* için bitki rejenerasyonu ve kallus oluşumunda etkili bir protokol geliştirdik. *B. nigra* 'Station' çeşidinin nod eksplantlarını kullanarak ve farklı büyüme düzenleyici hormon kombinasyonlarını seçerek, kallus gelişim yüzdesini, sürgün gelişim yüzdesini ve eksplant başına düşen sürgün sayısını arttırdık. En yüksek kallus oluşum yüzdesi 0,1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 0,6 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA, 0,6 mg/L BAP + 0,2 mg/L NAA MS ortamlarında, en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi 0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA, 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA, 0,2 mg/L IBA + 0,2 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlemlenmiştir. Ayrıca en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi 0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA, 0,6 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA, 0,2 mg/L IBA + 0,2 mg/L NAA içeren MS ortamlarında meydana gelmiştir. Elde ettiğimiz bu protokol ile *B. nigra* üretimini hızlandırmayı ve ağır metallerce kirlenmiş toprakları fitoremediasyon teknolojisi ile temizlenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca *B. nigra* için oluşturulan bu protokol, güvenilir, başarılı bir *in vitro* çoğaltma metodolojisi sağlayıp ve *B. nigra*'nın daha fazla genetik transformasyonuna ve yeni çeşitlerin üremesine yardımcı olacaktır.

## Kaynaklar

- Al-Shehbaz, I. A., M. A. Beilstein, and E. A. Kellogg. 2006. "Systematics and Phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An Overview." *Plant Systematics and Evolution* 259 (2-4): 89-120. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0415-z>.
- Anjum, NA, SS Gill, I Ahmad, AC Duarte, and Umar S. 2012. "Metals and Metalloids Accumulation Variability in Brassica Species: A Review." In *Phytotechnologies*, 162-75. <https://doi.org/10.1201/b12954-12>.
- Anjum, Naser A., Sarvajeet S. Gill, Iqbal Ahmad, M. Pacheco, Armando C. Duarte, Shahid Umar, Nafees A. Khan, and M. Eduarda Pereira. 2012. "The Plant Family Brassicaceae: An Introduction," 1-33. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3913-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3913-0_1).
- Babaoğlu, S, M Yorgancıoğlu, MA Akbudak - Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, and undefined 2002. n.d. "Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri: Bitki Biyoteknolojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları."
- Bailey, C. Donovan, Marcus A. Koch, Michael Mayer, Klaus Mummenhoff, Steve L. O'Kane, Suzanne I. Warwick, Michael D. Windham, and Ihsan A. Al-Shehbaz. 2006. "Toward a Global Phylogeny of the Brassicaceae." *Molecular Biology and Evolution* 23 (11): 2142-60. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl087>.
- Bicakci, E., and A. R. Memon. 2005. "An Efficient and Rapid *in vitro* Regeneration System for Metal Resistant Cotton." *Biologia Plantarum* 49 (3): 415-17. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-0018-5>.
- Bourgau, F., A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier. 2001. "Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective." *Plant Science* 161 (5): 839-51. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
- Cevher-Keskin, Birsen, Yasemin Yıldızhan, Bayram Yüksel, Eda Dalyan, and Abdul Razaque Memon. 2019. "Characterization of Differentially Expressed Genes to Cu Stress in Brassica Nigra by Arabidopsis Genome Arrays." *Environmental Science and Pollution Research* 26 (1): 299-311. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3577-7>.
- Chamandoosti, F. 2007. "Effect of Sodium Chloride on Establishment of Callus and Organogenesis in Brassica Napus L." *Pakistan Journal of Biological Sciences : PJBs* 10 (21): 3880-84. <https://doi.org/10.3923/PJBs.2007.3880.3884>.
- Gerszberg, A., K. Hnatuszko-Konka, and T. Kowalczyk. 2015. "In Vitro Regeneration of Eight Cultivars of Brassica Oleracea Var. Capitata." *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant : Journal of the Tissue Culture Association* 51 (1): 80-87. <https://doi.org/10.1007/S11627-014-9648-7>.
- Gupta, Vibha, Abha Agnihotri, V Jagannathan, and E D Earle. 1990. "Plant Cell Reports Plant Regeneration from Callus and Protoplasts of Brassica Nigra (IC 257) through Somatic Embryogenesis." *Plant Cell Reports*. Vol. 9.
- Hachey, John E., Kiran K. Sharma, and Maurice M. Moloney. 1991. "Efficient Shoot Regeneration of Brassica Campestris Using Cotyledon Explants Cultured *in vitro*." *Plant Cell Reports* 1991 9:10 9 (10): 549-54. <https://doi.org/10.1007/BF00232329>.
- Koch, M. A., and K. Mummenhoff. 2006. "Editorial: Evolution and Phylogeny of the Brassicaceae." In *Plant Systematics and Evolution*, 259:81-83. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0433-x>.
- Kumar, Vinay, Monika Mahajan, and Sudesh K. Yadav. 2012. "Toxic Metals Accumulation, Tolerance and Homeostasis in Brassica oilseed Species: Overview of Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms." In , 171-211. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3913-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3913-0_7).
- Memon, Abdul Razaque. 2014. "Genomics and Transcriptomics Analysis of Cu Accumulator Plant Brassica Nigra L." 8 (2): 1-8.

- Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Nanda Kumar, P. B.A., Viatcheslav Dushenkov, Harry Motto, and Ilya Raskin. 1995. "Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils." *Environmental Science and Technology* 29 (5): 1232–38. <https://doi.org/10.1021/es00005a014>.
- Ozturk, Munir, Abdul R. Memon, Salih Gucl, and M. Serdal Sakcali. 2012. "Brassicas in Turkey and Their Potential Role for Degraded Habitats' Remediation." In , 265–87. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3913-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3913-0_10).
- Sharma, Kiran K., Sant S. Bhojwani, and Trevor A. Thorpe. 1991. "The Role of Cotyledonary Tissue in the Differentiation of Shoots and Roots from Cotyledon Explants of Brassica Juncea (L.) Czern." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1991 24:1 24 (1): 55–59. <https://doi.org/10.1007/BF00044266>.
- Shekhawat, GS, K Verma, S Jana, K Singh, P Teotia, and A Prasad. 2010. "In Vitro Biochemical Evaluation of Cadmium Tolerance Mechanism in Callus and Seedlings of Brassica Juncea." *Protoplasma* 239 (1–4): 31–38. <https://doi.org/10.1007/S00709-009-0079-Y>.
- Sirpa, Kärenlampi, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JA, van der Lelie D, Mergeay M, and Tervahauta AI. 2000. "Genetic Engineering in the Improvement of Plants for Phytoremediation of Metal Polluted Soils." *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 107 (2): 225–31. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00141-4).
- Zhao, Ying, Shengnan Huang, Yun Zhang, Fengyan Shi, Xuyao Liu, Sai Du, and Hui Feng. 2021. "Establishment of an Efficient Shoot Regeneration System in Vitro in Brassica Rapa." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2021, March, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11627-021-10175-3>.