



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MISIR KÖKENLİ GIDALARDA YABANCI GEN
TARANMASI**

Didem ÖZTÜRK
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Şule ARI

Ağustos, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MISIR KÖKENLİ GIDALARDA YABANCI GEN
TARANMASI**

Didem ÖZTÜRK
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Şule ARI

Ağustos, 2011

İSTANBUL

Bu alışma 15/08/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Yelda ÖZDEN TOKATLI
Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterlięinin 5085 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı değerli hocam Prof.Dr.Şule ARI'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında her türlü yardım ve destekleri ile katkıda bulunan sevgili hocalarım Dr. Neslihan TURGUT KARA ve Dr. Özgür ÇAKIR'a,

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, laboratuvarımızda çalışan bütün araştırmacı arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında bana gösterdikleri destek için AİLEM'e, en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Ağustos 2011

Didem Öztürk

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	V
SEMBOL LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1.BİYOTEKNOLOJİ.....	3
2.2.TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ	4
2.3.GENETİK MODİFİKASYON	7
2.4.TRANSGENİK MISIRLAR	9
2.5.TRANSGENİKLERLE İLGİLİ RİSK DEĞERLENDİRMELERİ, ETİKETLEME VE İZLEME ÇALIŞMALARI	11
2.6.GDO ANALİZİ	17
2.6.1. DNA Temelli Analiz Yöntemleri.....	17
2.6.2. DNA İzolasyonu	18
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
2.6.3.1.Tarama Amaçlı Kalitatif PCR	20
2.6.3.2.Kantitatif 'Real Time' (Gerçek Zamanlı) PCR	21
2.6.3.3.Hatalı Pozitif ve Negatif Sonuçların Önlenmesi	25
3. MALZEME VE YÖNTEM	26
3.1.ÖRNEK TOPLANMASI	26
3.2.DNA İZOLASYONU	26
3.3.DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	28
3.3.1. Spektrofotometrik Analiz.....	28
3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	29

3.4.KALİTATİF PCR ANALİZLERİ.....	29
3.4.1. <i>Zein</i> Geni PCR'I	30
3.4.2. CaMV 35S Promotoru ve Nos Terminatörü PCR'ları.....	31
3.4.3. PCR Ürünlerinin Analizi.....	33
3.5.KANTİTATİF 'REAL TIME' PCR ANALİZLERİ	33
3.5.1. Standart Eğriler	34
4. BULGULAR	35
4.1.DNA İZOLASYONU	35
4.2.KALİTATİF PCR ANALİZLERİYLE YABANCI GEN İÇEREN ÖRNEKLERİN SAPTANMASI	37
4.2.1. <i>Zein</i> Geninin Kalitatif Olarak Saptanması.....	37
4.2.2. 35S Promotoru ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması	37
4.3.'REAL TIME' PCR YÖNTEMİ İLE TRANSGENİK ÜRÜN MİKTARININ SAPTANMASI.....	39
4.3.1. <i>Zein</i> Geninin Kantitatif Olarak Saptanması	40
4.3.2. Nos Terminatörünün Kantitatif Olarak Saptanması	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: 35S ve nos düzenleyici dizilerini içeren MON810 mısırdaki kullanılan <i>cryIA(b)</i> gen kasetinin ve mısır hsp70 intron 1' in şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.2	: PCR reaksiyonuyla DNA'nın çoğaltılma şeması	19
Şekil 2.3	: 35S promotorunun 'real time' çoğaltım grafiği	22
Şekil 2.4	: Ürün oluşumunu izlemek için farklı amplikon spesifik problemler kullanılan 'real time' PCR teknikleri	24
Şekil 4.1	: Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü	36
Şekil 4.2	: Sertifikalı referans materyallerden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	36
Şekil 4.3	: Zein PCR'ı agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 4.4	: Gıda örneklerinde P35S-cf3/P35S-cr4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen 35S promotoruna özgü PCR sonucu.....	38
Şekil 4.5	: Gıda örneklerinde gerçekleştirilen nos terminatörüne özgü PCR sonucu.....	38
Şekil 4.6	: Zein genine ait 'real time' çoğaltım grafiği.....	40
Şekil 4.7	: Zein 'real time' PCR'ına ait standart eğri	41
Şekil 4.8	: Nos terminatör dizisinin 'real time' çoğaltım grafiği.....	42
Şekil 4.9	: Nos 'real time' PCR'ına ait standart eğri	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Transgenik ürünlerin 2010 yılına ait global ekim alanları	6
Tablo 2.2	: Genetiği değiştirilmiş ürünler ve global ekim alanları.....	9
Tablo 2.3	: Genetiği değiştirilmiş mısırların gıda olarak tüketilmeleriyle ilgili çeşitli hayvan türleri üzerinde yapılmış çalışmalar	12
Tablo 2.4	: Avrupa Birliğince onaylanmış genetiği değiştirilmiş mısırlar	14
Tablo 2.5	: Transgenik mısırlarla ilgili alınan Bilimsel Komite kararları	16
Tablo 2.6	: PCR reaksiyonunun güvenilirliğini sınamak için kullanılması gereken kontroller	25
Tablo 3.1	: GDO analizi için kullanılan örnekler	26
Tablo 3.2	: 200 ml CTAB tamponu içeriği (pH 8.0)	27
Tablo 3.3	: 200 ml CTAB çöktürme solüsyonu içeriği (pH 8.0).....	27
Tablo 3.4	: TAE tamponu içeriği pH 8.0 (50X/litre).....	29
Tablo 3.5	: Zein primerleri ve dizisi	30
Tablo 3.6	: Zein PCR'ı reaksiyon karışımı	31
Tablo 3.7	: PCR Programı (Zein_1-L/Zein_1-R)	31
Tablo 3.8	: 35S ve nos primerleri ve dizileri	32
Tablo 3.9	: 35S/nos PCR'I reaksiyon karışımı	32
Tablo 3.10	: PCR Programı (35S ve nos)	32
Tablo 3.11	: 'Real Time' PCR için kullanılan primer ve prob setleri	33
Tablo 3.12	: 'Real Time'e PCR reaksiyon karışımı	34
Tablo 3.13	: 'Real Time' PCR Programı	34
Tablo 4.1	: DNA izolasyonu ve spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	35
Tablo 4.2	: Kalitatif PCR sonuçları	39
Tablo 4.3	: Zein genine özgü primer ve prob setiyle gerçekleştirilen 'real time' PCR sonuçları	41
Tablo 4.4	: Nos dizisine özgü primer ve prob setiyle gerçekleştirilen 'real time' PCR sonuçları	43
Tablo 4.5	: Ürünlerin içerdiği transgen oranları	44

SEMBOL LİSTESİ

bp	: Baz pair (baz çifti)
Bt	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus (Karnıbahar Mozaik Virüsü)
Ct	: Cycle threshold (Eşik değer döngüsü)
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
dH₂O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECB	: European Corn Borer (Avrupa Mısır Kurdu)
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay acid
Epsps	: Gulufosat 5- enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz
GD	: Genetiği Değiştirilmiş
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
HCl	: Hidroklorik asit
Hsp70	: Heat shock protein 70
IRMM	: Institute for Reference Materials and Measurements
ISAAA	: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂EDTA	: Disodyum etilendiamin tetraasetat
Nos	: Nopalin sentaz
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PG	: Poligalakturonaz
rDNA	: Rekombinant deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
SRM	: Sertifikalı Referans Materyal
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ÖZET

MISIR KÖKENLİ GIDALARDA YABANCI GEN TARANMASI

Zararlı organizmalara ve hastalıklara dirençli, herbisitlere toleranslı, ürün kalitesi arttırılmış genetiği değiştirilmiş tarım ürünlerinin global ekim alanları gün geçtikçe artmaktadır. Bu transgenik ürünlerin yetiştirilmesi ülkemizde yasak olmasına karşın ithalat yoluyla ülkemize gelen transgenik ürünler çeşitli denetimlerden geçerek marketlerimize girmektedir.

Bu tez projesi kapsamında transgenik ürünler arasında büyük bir paya sahip olan mısır ve mısırdan üretilmiş gıdaların kalitatif ve kantitatif transgen içerikleri belirlendi. avrupa birliğince onaylanmış pek çok transgenik üründe düzenleyici diziler olarak kullanılan 35S promotorunun ve nos terminatörünün belirlenmesine dayanan PCR analizleri ile çeşitli örnek guruplar kalitatif olarak tarandı. Kalitatif analizler sonucunda GDO ürünlerini içerdiği belirlenen gıdalarda transgen (nos) miktarı kantitatif olarak saptandı. Bu kalitatif ve kantitatif PCR analizlerinin sonucunda, ülkemizde satışa sunulan, bebek maması dahil pek çok gıda örneğinin GDO kökenli ürünleri içerdiği tespit edildi.

SUMMARY

SCREENING OF FOREIGN GENE IN MAIZE DERIVED FOOD

Plantation area of the genetically modified crops which are designated to acquire resistance to pests and diseases, herbicide-tolerance, increased product quality is increasing day by day. Despite the prohibition of growing transgenic crops in our country, the transgenic products are being imported to our country and sold in markets.

Within the context of this thesis project, determined qualitative and quantitative transgene contents of foods derived maize which is one of the mostly produced transgenic in the worldwide. Various sample groups were screened qualitatively by PCR analysis based on determination of 35S promotor and nos terminator which used as regulatory sequences in many transgenic approved by The European Union. The amount of transgene (nos) was quantitatively determined in the samples which are identified as GMO in qualitative analyses. Qualitative and quantitative PCR analysis determined that many food samples, including baby foods sold in our country contain GMO's products.

1. GİRİŞ

Genetik kodun evrensel olması, farklı tür organizmalara ait DNA (deoksiribonükleik asit) dizilerinin moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak birleştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu rekombinant DNA (rDNA) teknolojilerinin uzun yıllardır çeşitli sektörlerde farklı amaçlar için uygulamaları yapılmaktadır ve bu teknolojilerle geliştirilen Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) kendilerine yeni nitelikler sağlayacak ilave proteinler sentezleme özelliğine sahiptirler. Modern biyoteknolojide bu gelişmelerle beraber genetiği değiştirilmiş çok sayıda organizma ticari amaçlar için geliştirilerek dünya pazarlarına sunulmuştur. Tarımda büyük ekonomik kayıplara yol açan zararlı organizmalara ve hastalıklara dirençli, herbisitlere toleranslı, ürün kalitesi ve özellikleri arttırılmış genetiği değiştirilmiş tarım ürünleri günümüzde üreticilere büyük avantajlar sağlamaktadır. Yeni ve gelişmiş özelliklere sahip genetiği değiştirilmiş bitkiler öncelikle Kuzey Amerika’da ve devamında dünyanın çok çeşitli bölgelerinde çiftçiler tarafından benimsenmiş ve geniş alanlarda ekilmeye başlamıştır (Çetiner ve Budak, 2007). Kullanımı giderek yaygınlaşan transgenik bitkilerin ekim alanı 1996 yılından 2010 yılı sonuna kadar 87 kat artmıştır ve 2010 yılında toplam 29 ülke tarafından 148 milyon hektar alanda yetiştirilmiştir (James, 2010).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) biyoteknolojik tarım ürünlerinin, üretim sistemlerinin etkinliğinin geliştirilmesi, gıdaların besin değerlerinin artırılması ve alerjik potansiyellerini azaltılması ile halk sağlığı açısından büyük öneme sahip olduklarının altını çizmektedir (Tan, 2008). Aynı zamanda, biyoteknolojik tarım ürünleri daha az çiftçilik ve pestisit ihtiyacı gerektirdiği için üretim maliyetlerinin düşmesinde, ürün verimliliğinin artmasında ve gıdaların market fiyatlarının düşmesinde de etkin bir role sahiptir (Brookes ve Barfoot, 2009).

Ancak, genetik mühendisliği yöntemleriyle elde edilen yeni çeşitlerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkileri konusundaki endişeler, GDO olarak da bilinen bu bitkilerin üretiminden tüketiciye sunulmasına kadar geçen çeşitli aşamaların sıkı

bir şekilde incelenip risk değerlendirmelerinin yapılmasını, belirli koşullar altında üretilip çoğu zamanda tüketicilerin bilerek tercih yapabilmeleri için etiketlendirilmelerini zorunlu kılan bir dizi düzenlemelerin oluşturulmasına yol açmıştır (Çetiner ve Budak, 2007). Bu nedenle Avrupa Birliği, bilgilendirme ve etiketlemeyi, tüketicilerin bilinçli tercih yapabilmesi için bir araç olarak tanımlar ve 1997’den beri ürünlerin GDO içeriklerinin etiketlendirme ile belirtilmesini zorunlu tutmaktadır (Avrupa Komisyonu, EC 258/97). GDO etiketleme ile ilgili Avrupa Birliğince yapılan en güncel düzenleme Ekim 2003’de yayınlanmıştır, EC 1830/2003 Kanunu GDO’lu gıdaların 2011 yılında da kullanılan etiketleme kurallarını belirlemektedir. Zorunlu etiketleme kuralları, pazarda yer alan GDO’lu tüm ürünlerin üretim ve dağıtım zincirleri boyunca her aşamada izlenebilirliğini sağlayacak şekilde düzenlenmiştir. Ülkemizde ise GDO’lu ürünlerin ithalatı, ihracatı, kullanımı, izlenmesi ve etiketlenmesi “Biyogüvenlik Kanunuyla” düzenlenmiştir. Kanuna göre GDO’ların ithalatına bilimsel esaslara göre yapılacak risk değerlendirmesi sonucu karar verilecektir ve risk değerlendirme sonuçlarına göre risk oluşturmayacağı belirlenen başvurular için verilen kararın geçerlilik süresi on yıl olacaktır (Resmi Gazete, 2010).

Bu tez projesinin odak noktası Avrupa Birliği tarafından onaylanmış transgenik mısırların hemen hemen hepsinde bulunan düzenleyici diziler karnabahar mozaik virüsü 35S promotor (CaMV 35S) ve *Agrobacterium tumefaciens*’e ait nopalın sentaz (nos) terminatör dizilerinin DNA temelli metodlar kullanılarak belirlenmesidir. DNA izolasyonu, kalitatif ve kantitatif PCR (‘Polymerase Chain Reaction’) tekniklerine dayalı analiz yöntemleri uygulanarak ülkemizde yetiştirilmiş veya yurt dışından ithal edilerek ve ülkemizde pazara sunulmuş çeşitli mısır ürünlerinden oluşan örnek gruplarının yabancı gen içerikleri belirlenmiştir. GDO ile ilgili ülkemizde oluşan yeni yasal düzenlemelerle eş zamanlı gelişen bu proje süresince elde edilen veriler, marketlerde bulunan ürünlerin yabancı gen içerikleri ile ilgili etiketleme ve izleme çalışmaları hakkında fikir verebilecek ve bu konuda yürütölen araştırmalara katkı sağlayabilecek niteliktedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOTEKNOLOJİ

Tarım faaliyetlerinin başladığı antik çağlardan beri çiftçiler klasik ıslah yöntemlerini kullanarak bitkileri bilmeden de olsa genetik modifikasyona uğratmakta ve daha gelişmiş çeşitler üretmeye çalışmaktadırlar. Bitkilerin kalitesi ve verimliliğinde meydana gelen bu uzun vadeli ve yavaş gerçekleşen değişimler yaklaşık 10.000 yıllık bir süreçten bu yana izlenmektedir (Parekh ve Gregg, 2004). Bununla birlikte rekombinant DNA teknolojisiyle, istenilen genin türler arasında aktarımının mümkün olması ve bu teknolojinin çeşitli sektörlerde yoğun olarak kullanılmaya başlamasıyla beraber “genetik modifikasyon” kavramı çok daha özel bir anlam kazanmıştır (Huffman, 2004).

Bitkilerin ıslahına yönelik yapılan çalışmalarla ilgili dokümanlara birçok eski uygarlığın bıraktığı eserlerde rastlamak mümkündür. Bitki ve hayvanların evcilleştirilmesinin ardından gelen kentselleşmeyi, hızlı nüfus artışı, besin kıtlıkları ve endüstrileşme izlemiştir. Bu gelişmeler klasik besin fermentasyon endüstrisinin ve bilinen ilk biyoteknoloji uygulamalarının gelişmesine sebep olmuştur. Zamanla daha verimli ve çevreye uyumlu genotiplerin kademeli olarak seçilip yetiştirilmesiyle klasik ıslah yöntemleri geliştirilmiş ve uygulanmaya başlanmıştır. 1860’lar da Mendel’in genetik bilimine yaptığı önemli katkılar, bilimsel ve kontrollü ıslah çalışmalarının başlamasını tetiklemiştir (Budd, 1993). Bu gelişmeler yeşil devrimin oluşum sürecini önemli ölçüde etkilemiştir. 20. yüzyılın ortalarına doğru DNA’nın yapısı ve fonksiyonlarının keşfedilmesiyle beraber biyoteknoloji uygulamaları da yeni bir boyut kazanmıştır (Budd, 1991). Evrensel genetik materyal olan DNA’nın keşfedilmesinden sonra geçen elli sene içerisinde moleküler biyoloji ve biyoteknolojide yaşanan gelişmeler “genetik mühendisliği” olarak tanımlanan yeni bir alanın açılmasına sebep olmuştur. Gelişen bu yeni teknolojiler bilim adamlarının herhangi bir organizmanın ürettiği proteinlerin cinsini ve miktarını kontrol etmesine ve değişiklikler yapmasına olanak sağlamıştır. Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak elde edilen bu yeni organizmalara “genetiği değiştirilmiş organizmalar” denmektedir (USINFO, 2003).

Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (1992) biyoteknolojiyi “özel kullanım amaçlarına yönelik olarak biyolojik sistemleri, yaşayan organizmaları veya türevlerini değiştirmek ya da işlemek için kullanılan teknolojik uygulamaların tümü” olarak tanımlamaktadır. Bu tanım yaygın olarak kabul görmüş olmasına rağmen, peynir ve şarap yapımı gibi biyolojik üretim teknolojileriyle ilgili tüm uygulamaları kapsar. Ancak bu çalışmanın odak noktası olan genetik modifikasyonla ilgili “biyoteknoloji” tanımı daha dardır. Nitekim Cartagena Biyogüvenlik Protokolü (2000) modern biyoteknolojiyi “nükleik asidin hücre veya organel içine doğrudan enjeksiyonunu ve rekombinant deoksiribonükleik asit teknolojisini kapsayan *in vitro* teknikler” ya da “geleneksel melezleme ve seçilim teknikleri kullanılmaksızın, doğal fizyolojik üreme ve rekombinasyon bariyerlerinin aşılaraq farklı familyalara ait hücrelerin birleşmesi (füzyonu)” olarak tanımlamaktadır.

2.2. TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

18 Mayıs 1994’de piyasaya sürülen Flavr Savr domates ticari olarak satışa sunulan ilk genetiği değiştirilmiş bitkisel üründür (Kramer ve Redenbaugh, 1994). Flavr Savr domateste, poligalakturonaz (PG) enziminin gen anlatımını düzenlemek amacıyla antisens RNA(ribonükleik asit) teknolojisi kullanılmıştır (Sheehy ve diğ., 1987). PG enzimi meyvenin olgunlaşması sırasında pektin metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimdir, olgun domates meyvesinde en bol bulunan proteindir ve meyvenin yumuşamasından sorumlu enzimdir (Hobson, 1965 ; Brady ve diğ., 1985). PG geninin anlatımını azaltacak bir antisens RNA teknolojisi olgunlaşan domateste pektin yıkımının azalmasına neden olduğundan domates uzun süre taze kalabilmektedir (Kramer ve diğ., 1992).

İlk genetiği değiştirilmiş ürünün piyasaya sürülmesinden sonra, dünyada yeni ve hızla büyüyen bir sektör ortaya çıkmış ve genetiği değiştirilmiş (GD) ürünlerin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Amerika Birleşik Devletleri’nde, çiftçiler ilk GD ürünler içerisinde olan böceklere dayanıklı ve herbisit toleranslı tohumları 1990’ların ortasında kullanmaya başlamışlardır ve o tarihten itibaren ürün verimliliğine, ekonomik, çevresel ve sosyal refaha olumlu etkilerinin giderek önem kazanması ve istikrarlı olmasının sonucunda GD ürünlerinin ekim alanları her yıl artan bir grafik

göstermiştir. 1996-2010 yılları arasında GDO'lu ürünlerin üretimi 87 kat artarak toplam üretim alanı 148 milyon hektara ulaşmıştır. Bu nedenle GDO'lu ürünler son zamanlarda tarım alanlarına en hızlı adapte olan ürün teknolojisi olarak görülmektedir. 2009 yılında 25 ülkede GDO'lu ürünler üretilirken 2010 yılında bu sayı 29'a yükselmiştir. Bu 29 ülkenin 19'unu geliştirmekte olan ülkeler kalan 10'unu ise gelişmiş ülkeler oluşturmaktadır. 30 ülke ise GDO lu ürünleri ithal etmektedir, diğer bir deyimle toplam 59 ülke GDO'lu ürünleri üretmek için veya ithal etmek için onaylanmıştır ve bu ülkelerde yaşayan insan nüfusu, toplam dünya nüfusunun %75'ine karşılık gelmektedir (James, 2010).

2010 yılında GDO ekim alanı 1 milyon hektarı aşmış ilk 10 ülke şöyledir; ABD (66.8 milyon hektar), Brezilya (25.4 milyon hektar), Arjantin (22.9 milyon hektar), Hindistan (9.4 milyon hektar), Kanada (8.8 milyon hektar), Çin Halk Cumhuriyeti (3.5 milyon hektar), Paraguay (2.6 milyon hektar), Pakistan (2.4 milyon hektar) Güney Afrika (2.2 milyon hektar), Uruguay (1.1 milyon hektar). Geri kalan 19 ülke ise ekim alanı büyüklüklerine göre şöyle sıralanmaktadır; Bolivya, Avusturalya, Filipinler, Burkina Faso, Myanmar, İspanya, Meksika, Kolombiya, Şili, Honduras, Portekiz, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Mısır, Slovakya, Kosta Rika, Romanya, İsveç ve Almanya (Tablo 2.1., James, 2010).

Tablo 2.1: Transgenik ürünlerin 2010 yılına ait global ekim alanları (James, 2010).

	Ülke	Ekim Alanı (mil. ha.)	Transgenik Ürünler
1	ABD	66.8	Soya, mısır, pamuk, kanola, kabak, papaya, yonca, şeker pancarı
2	Brezilya	25.4	Soya, mısır, pamuk
3	Arjantin	22.9	Soya, mısır, pamuk
4	Hindistan	9.4	Pamuk
5	Kanada	8.8	Kanola, mısır, soya, şeker pancarı
6	Çin	3.5	Pamuk, domates, kavak, papaya, tatlı biber
7	Paraguay	2.6	Soya
8	Pakistan	2.4	Pamuk
9	Güney Afrika	2.2	Mısır, soya, pamuk
10	Uruguay	1.1	Soya, mısır
11	Bolivya	0.9	Soya
12	Avustralya	0.7	Pamuk, kanola
13	Filipinler	0.5	Mısır
14	Myanmar	0.3	Pamuk
15	Burkina Faso	0.3	Pamuk
16	İspanya	0.1	Mısır
17	Meksika	0.1	Pamuk, soya
18	Kolombiya	< 0.1	Pamuk
19	Şili	< 0.1	Mısır, soya, kanola
20	Honduras	< 0.1	Mısır
21	Portekiz	< 0.1	Mısır
22	Çek Cumhuriyeti	< 0.1	Mısır, patates
23	Polonya	< 0.1	Mısır
24	Mısır	< 0.1	Mısır
25	Slovakya	< 0.1	Mısır
26	Kosta Rika	< 0.1	Pamuk, soya
27	Romanya	< 0.1	Mısır
28	İsveç	< 0.1	Patates
29	Almanya	< 0.1	Patates

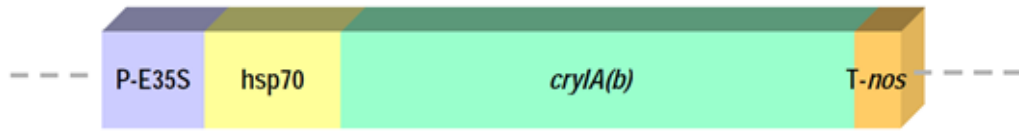
2015 yılı itibari ile Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamaları için Uluslararası Hizmetler Enstitüsü (ISAAA), 40 ülkede, 20 milyon üreticinin toplam 200 milyon hektar alanda transgenik ürünlerin üretileceğini tahmin etmektedir. Transgenik ürünlerin kullanımının devamı ve giderek artış göstermesi özellikle Asya, Latin Amerika ve Afrika'daki gelişmekte olan ülkelerde beklenmektedir. Dikkat çekici bir konu ise transgenik ürünlerin ekim alanlarının % 46'sının gelişmekte olan ülkelere olmasına rağmen, bu oranın 2015 yılından önce daha da artacağı ve gelişmiş ülkelerin payının azalacağını tahmin edilmesidir. Yeni yüzyılda, yüzyılın gelişim hedefi, açlığın ve fakirliğin yarı yarıya azaltılması olarak öngörülmektedir. Transgenik ürünlerin bu hedefin gerçekleşmesinde son derece etkin bir rolü olacağı ve gelecek için katkısının daha da büyük olacağı tahmin edilmektedir (James, 2009).

2.3. GENETİK MODİFİKASYON

Bitkilerde gen transferi doğal olarak meydana gelebilen bir mekanizmadır. Bir bitki patojeni olan gram negatif toprak bakterisi *Agrobacterium tumefaciens* kendi genlerini enfekte ettiği bitkiye aktararak bitki hücresinde kendine ait genlerin anlatım yapmasına neden olmaktadır. Moleküler biyologlar doğal olarak gerçekleşen bu mekanizmayı değiştirerek patojen bakterinin bitkiye kendi genleri yerine farklı bir organizmaya ait, istenilen özellikleri şifreleyen genlerin aktarmasını sağlamışlardır (Chrispeels ve Sadava, 2003). 1980'lerde geliştirilen bu yöntem en eski gen transfer yöntemidir ve birçok bitkinin genetik olarak değiştirilmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Fakat bu yöntemin önemli bir dezavantajı *Agrobacterium*'un yalnızca dikotil bitkileri doğal olarak enfekte etmesidir ve bu nedenle uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda monokotil bitkilere gen aktarımında kullanılması oldukça sınırlıydı. Bu gibi durumlar için biyolistik, elektroporasyon, protoplast füzyonu ve mikroenjeksiyon gibi alternatif doğrudan gen aktarımı yöntemleri geliştirilmiştir (Querci ve diğ., 2006). Fakat *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyon yöntemi kısa sürede monokotil bitkiler için uyarlanmıştır. 1990'ların ortalarına doğru uzun süre *A. tumefaciens* enfeksiyonuna direnç gösteren birçok monokotile bu yöntem başarılı bir şekilde uygulanmıştır ve bu yöntemle transgenik pirinç, mısır ve buğday ırkları elde edilmeye başlanmıştır (Ishida ve diğ., 1996; Cheng ve diğ., 1997). Gen transferinde

kullanılan bu ve bunun gibi başka teknikler tarımda ve yeni çeşitlerin geliştirilmesinde sınırsız olanaklar sunmaktadırlar (Chrispeels ve Sadava, 2003).

Gen aktarılmış bitkide aktarılan genin yüksek düzeyde anlatım yapması ve anlatımının kontrol edilmesi son derece önemlidir. Bu nedenle yeni bir transgenik bitki üretilirken bitkiye yalnızca yapısal genler aktarılmaz, aktarılacak geni düzenleyici promotor ve terminatör diziler ile birlikte aktarılırlar. Bir genin anlatımının yapılabilmesi için transkripsiyonu başlatacak bir promotor diziye ihtiyaç vardır. Günümüzde karnabahar mozaik virüsüne ait 35S promotoru, transgenik bitkilerde yabancı genlerin transkripsiyonunu sağlamak için en yaygın kullanılan promotor dizidir. Bu promotor dizi yüksek transkripsiyon aktivitesinden dolayı birçok bitkide yabancı genin anlatımının yapılmasını sağlar, ancak farklı etkinlik düzeyleri bitki türüne göre değişebilir (Yoshida ve Shinmyo, 2000). Yine karnabahar mozaik virüsüne ait 35S terminatör ve bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens* ait nopalın sentaz terminatörü birçok transgenik bitkide durdurucu dizi olarak kullanılmıştır. Şekil 2.1.'de verilen MON810 transgenik mısıra aktarılan gen kaseti 35S promotörü ve nos terminatörü içermektedir.



Şekil 2.1: 35S ve nos düzenleyici dizilerini içeren MON810 mısırdaki kullanılan *cryIA(b)* gen kasetinin ve mısır hsp70 (heat shock protein 70) intron 1' in şematik gösterimi

GD bir ürününün geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi çok uzun yıllar alan bir süreçtir ve birçok basamaktan oluşmaktadır. GD ürünün gelişim sürecinde ürünün kalitesinin ve bütünlüğünün korunması, GD ürünün tanımlaması ve izlenebilirliği için etkili araçların geliştirilmesi yeni bir GD ürününün başarısı için zincirin esas bileşenlerini oluşturmaktadır (Gupta ve Ram, 2004). Fakat bu zorlu ve uzun süreçlere rağmen 1994'de piyasaya sürülen ilk transgenik ürün olan Flavır Savr domatesten sonra Round-up Ready soya fasulyesi, *Bacillus thuringiensis* (Bt) mısır ve Bt pamuk gibi bir çok transgenik ürün piyasaya sunulmuş ve çok hızlı bir şekilde yayılmıştır (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2: Genetiği değiştirilmiş ürünler ve global ekim alanları (James, 2010).

Bitki	Ekim Alanı (milyon hektar)	% Ekim Alanı
Herbisitlere toleranslı soya fasülyesi	73.3	50
Kombine (stacked) mısır	28.8	19
Bt pamuk	16.1	11
Bt mısır	10.2	7
Herbisitlere toleranslı mısır	7.0	5
Herbisitlere toleranslı kanola	7.0	5
Kombine (stacked) pamuk	3.5	2
Herbisitlere toleranslı pamuk	1.4	1
Herbisitlere toleranslı şeker pancarı	0.5	<1
Herbisitlere toleranslı patates	0.1	<1
Diğerleri	0.1	<1
Toplam	148.0	%100

2.4. TRANSGENİK MISIRLAR

Latince adı *Zea mays* olan mısır *Gramineae (Poaceae)* ailesinin bir üyesidir (İltis, 1972). Mısır, ilk ekildiği bölge olan Meksika ve Orta Amerika'dan Kuzey ve Güney Amerika'ya daha sonrada Avrupa'ya yayılmış bir bitkidir. Avrupa aracılığıyla da Afrika ve Asya'ya ulaşmıştır. Zamanla yerli popülasyonlardan kaliteli agronomik özelliklere sahip ırkların seçilmesi modern varyetelerin temelini oluşturmuştur (Hamaker ve Larkins, 2002).

Yüz yıllardır çiftçiler tarafından seleksiyon yolu ile agronomik özellikleri geliştirilen mısırın, klasik ıslah yöntemleriyle değiştirilmesi mümkün olmayan pek çok özelliği, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak değiştirilebilir. Geçtiğimiz yıllarda bu teknolojinin üstünlüğü böceklerle dayanıklı ve herbisitlere toleranslı mısır varyetelerinin geliştirilmesiyle kanıtlanmıştır (Hamaker ve Larkins, 2002). Fakat bir monokotil olarak mısır bitkisinin *Agrobacterium tumefaciens* tarafından enfekte edilmesi oldukça güçtür. Bu nedenle mısır hücrelerine yabancı gen sokmak için Ti plazmiti (*Agrobacterium tumefaciens*'in bitkiye kendi genlerini aktarmak için kullandığı plazmit) kullanılan ilk girişimler son derece başarısız olmuştur (Graves ve Goldman, 1986; Golovkin ve diğ., 1993). Sonuç olarak mısır genomunu değiştiren ilk deneme, DNA bağlanmış metal partiküllerin gen tabancası yardımı ile embriyonik

hücrelere sokulmasıyla gerçekleştirilmiştir (Sanford ve diğ., 1987). Bu yöntemin yüksek oranda başarılı olduğu kanıtlanmıştır ve günümüze dek birçok transgenik mısırın üretiminde bu teknik kullanılmıştır (Spencer ve diğ., 1992; ; Pareddy ve diğ., 1997; Zhong ve diğ., 1999). Elektroporasyon yöntemi de yabancı DNA'yı mısır hücresine sokmak için kullanılan diğer bir alternatif metottur. Elektroporasyon yöntemi ile plazma membranında porlar oluşur ve bu şekilde aktarılmak istenen DNA'nın hücrenin içine girişi sağlanmış olur (D'Halluin ve diğ., 1992; Pescitelli ve Sukhapinda, 1995). Fakat bu yöntemin etkinliği ve tekrarlanabilirliği çok yüksek olmadığından yaygın bir kullanım alanı yoktur (Hamaker ve Larkins, 2002). 1996'da Ishida ve diğ. *Agrobacterium* aracılıklı transformasyon yöntemini mısır için optimize etmiştir ve yöntem yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır.

1990'da ilk transgenik mısırın geliştirildiği bildirilmiştir (Gordon-Kamm ve diğ., 1990). Böceklerle dirençli mısır ilk başarılı transgenik bitkilerdendir (Armstrong ve diğ., 1995). Bahsi geçen böceklerle dayanıklı çeşitler, bir gram-pozitif toprak bakterisi olan *Bacillus thuringiensis*'e ait, insektisit özelliği kodlayan *cryIA(b)* geninin hedef bitkiye aktarılmasıyla geliştirilmiştir. CRYIA(b) proteini European Corn Borer (ECB) gibi birçok lepidoptere karşı toksik etki gösterirken insanlara, diğer omurgalılara ve yararlı böceklerle karşı toksik etkisi bulunmadığı gösterilmiştir (Lee ve diğ., 1995). Böylelikle elde edilen yeni çeşitler ürettikleri bu yeni protein sayesinde kimyasal ilaç kullanımına ihtiyaç duyulmadan *Lepidoptera* takımına ait zararlılara karşı direnç kazanmışlardır (Huffman, 2004).

1998'de İspanya 22.137 hektarlık alana Bt mısır ekimi yaparak resmi olarak ilk Bt mısır üretimini başlatan ülke olmuştur. Bt mısırın çiftçilere sağladığı önemli faydalarından dolayı ve hayvanlar için daha ekonomik besin kaynağı olduğu için üretim alanı her geçen yıl artış göstermektedir. Şimdilerde ise toplam altı AB ülkesi yaklaşık 91.000 hektar alanda (91.193 ha.) Bt mısır üretimi yapmaktadır (James, 2010).

Bacillus thuringiensis'e ait bitkiye insektisit özelliği kazandıran *cryIA(b)* geninin yanı sıra, mısır bitkisine herbisit tolerans özelliği kazandırmak için *bar* ve *epsps* (gulufosat 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz) genleri transgenik çeşitlerde yaygın olarak

kullanılan genlerdir. Fosfinotrisine direnç geni olan *bar* (Gordon-Kamm ve diğ.; 1990, Fromm ve diğ., 1990) bir toprak bakterisi olan *Streptomyces hygroscopicus*'dan elde edilmiştir. *Bar* geni fosfinotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayarak fosfinotrisinin aktivitesini yok eder. Fosfinotrisin herbisit aktivitesini glutamin sentetazın inhibisyonu ile meydana getirir. Glutamin sentetazın inhibisyonu bitkide yüksek miktarda amonyak birikmesine neden olur ve bitkinin ölümüyle sonuçlanır. PAT, fosfinotrisinin asetilasyonunu katalizler ve böylece herbisit aktivitesini yok eder (Querci ve Mazzara., 2006). Bir diğer herbisit tolerans geni olan *epsps* ise *Agrobacterium tumefaciens CP4* toprak bakterisine aittir. EPSPS fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerin üretiminde yer alan şikimat biyokimyasal yolunda zorunlu bir enzimdir. Glufosat, EPSPS enziminin inhibitörü olarak çalışır ve EPSPS'nin durdurulması büyümenin engellenmesi ve bitkinin ölümüyle sonuçlanır. Transgenik bitkilere aktarılan gen ise bu enzimin bakteri kökenli (*Agrobacterium tumefaciens CP4* suşuna ait) glufosata dirençli versiyonudur bu nedenle inhibisyona uğramaz ve tarlaya glufosat uygulaması yapıldığında yetiştirilen ürüne zarar gelmeden diğer yabancı otlar yok edilebilir (Querci ve Mazzara., 2006).

Herbisitlere toleranslı ve insektisit özelliğine sahip mısır çeşitlerinin hayvan yemi ve gıda olarak dünyanın pek çok bölgesinde yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra bioenerji kaynağı olarak kullanılan bitkilerin başında gelir.

2.5. TRANSGENİKLERLE İLGİLİ RİSK DEĞERLENDİRMELERİ, ETİKETLEME VE İZLEME ÇALIŞMALARI

Genetiği değiştirilmiş gıdalar dünya marketlerine girdiğinden bu yana çevre ve insan sağlığı üzerine olası olumsuz etkileri tartışma konusu olmuştur. Bu nedenle, Avrupa Birliği GDO ile ilgili şüphelere eğilerek bir dizi karar almıştır. 2002 yılında GDO'ların risk değerlendirmelerini yapmak üzere Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kurulmuştur. EFSA, GDO'ların insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkilerini bilimsel esaslar çerçevesinde değerlendirmekte ve son kararı ise Avrupa Birliği Komisyonu vermektedir. Buna göre AB içerisinde satılacak olan GD ürünlerin tüketicinin seçme özgürlüğünün sağlanması için etiketlenmesi gerekmektedir.

Kısa süre öncesine kadar GDO'ların güvenliği konusunda yayınlanmış yeterli doküman olmadığı için özellikle insan sağlığı üzerine etkileri tam olarak aydınlatılamamıştı. Fakat günümüzde mısır ve soya başta olmak üzere pek çok transgenik bitkinin çevre ve insan sağlığı üzerine etkileri konusunda pek çok çalışma yayınlanmıştır.

Mısırla ilgili yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda 1507 (MacKenzie ve diğ., 2007), 59122 (Malley ve diğ., 2007; Juberg ve diğ., 2009; He ve diğ., 2008), 1507×59122 (Appenzeller ve diğ., 2009), MON 88017 (Healy ve diğ., 2008; Tutel'ian ve diğ., 2008) ve MIR604 (Tutel'ian ve diğ., 2009) transgenik mısırlarının geleneksel mısır kadar güvenli olduğu kanısına varılmıştır. Ancak, NK 603, MON 810 ve MON 863 transgenik mısırlarıyla ilgili yapılan çalışmaların sonuçları, GDO'ların insan sağlığı üzerine olumsuz etkileriyle ilgili endişeleri arttırmıştır (Séralini ve diğ., 2007; de Vendômois ve diğ., 2009, Tablo 2.3.).

Tablo 2.3: Genetiği değiştirilmiş mısırların gıda olarak tüketilmeleriyle ilgili çeşitli hayvan türleri üzerinde yapılmış çalışmalar.

Transgenik mısır çeşidi	Çalışmada kullanılan hayvan türü	Çalışma süresi	Belirlenen etkiler	Referans
MON 863	Sıçan	90 gün	Erkeklerde (% 3.3 azalma) ve dişilerde (% 3.7 artış) hafif ama doza bağlı ağırlık değişimleri. Hepatorenal toksite belirtileri, dişilerde trigliserid artışı (% 24-40) ve erkeklerde idrarla fosfor ve sodyum atılımının azalması (% 31-35).	Séralini ve diğ., 2007
MON 863	Sıçan	90 gün	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Doull ve diğ., 2007
NK 603, MON 810 ve MON863	Sıçan	14 hafta	3 GDO'nun kullanımıyla ilişkili, cinsiyete ve doza bağlı çoğu hepatorenal toksite ile ilgili yan etkiler. Diğer yan etkiler kalp, dalak, böbrek üstü bezleri ve hemopoetik sistemde tespit edildi.	de Vendômois ve diğ., 2009
1507	Sprague-dawley sıçanı	90 gün	Belirlenmiş bir yan etki yok.	MacKenzie ve diğ., 2007
59122	Sıçan	90 gün	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Malley ve diğ., 2007
1507x59122	Sprague-dawley sıçanı	92 gün	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Appenzeller ve diğ., 2009
59122	Fare	28 gün	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Juberg ve diğ., 2009
DAS-59122-7	Sprague-dawley sıçanı	90 gün	Belirlenmiş bir yan etki yok.	He ve diğ., 2008
MON 88017	Sıçan	13 hafta	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Healy ve diğ., 2008
MIR604, MON88107	-	-	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Tutel'ian ve diğ., 2008, 2009
MIR604, MON88107	-	-	Belirlenmiş bir yan etki yok.	Tyshko ve diğ., 2008

Avrupa Birliği, tüketicilerin bilinçli olarak tercih yapabilmesi için GDO’lu ürünlerin etiketlenmesini yasalarla zorunlu hale getirmiştir. Avrupa Komisyonu’nun EC 1830/2003 yönetmeliği “Gıda ve yem kullanım amaçlı GDO’lar, GDO içeren veya GDO olan gıda ve yem, GDO’lardan üretilen veya GDO içeren bileşenlerden üretilen gıda ve yemlerin” piyasaya sürülmesini ve etiketlenmesini düzenlemektedir. Bu yönetmeliklere göre ürünün içeriğinde ancak % 0,9’un üzerinde bir değerde GDO bulunması durumunda etiketlemesi zorunludur bu sınırın altındaki miktardaki karışımın tesadüfi veya teknik olarak önlenemeyecek bir durum olduğunu kabul etmektedir. Bunun yanı sıra bu düzenlemeler sadece AB pazarına girmesi onaylanan çeşitler için geçerlidir, onaylanmamış ürünlerin her ne miktarda ve şekilde olursa olsun piyasada bulunması kesinlikle yasaktır. Avrupa Birliğince onaylanmış birçok transgenik mısır çeşitleri, içerdikleri genler ve onaylandıkları tarihler Tablo 2.4.’de listelenmiştir.

Tablo 2.4: Avrupa Birliğince onaylanmış genetiği değiştirilmiş mısırlar (Avrupa Komisyonu, 2010).

Transformat	Üretici Firma	Aktarılmış gen	Onaylandığı tarih	Onayının sona erdiği tarih
Bt11	Syngenta	<i>cryIAb, bar</i>	27/08/2010	27/07/2020
DAS59122	Pioneer ve Dow AgroSiciences	<i>cry34Ab1, cry3Ab1, bar</i>	24/10/2007	23/10/2017
DAS1507x NK603	Pioneer ve Dow AgroSiciences	<i>cry1F, bar, cp4_epsp</i>	24/10/2007	23/10/2017
DAS1507	Pioneer ve Dow AgroSiciences	<i>cry1F, bar</i>	03/03/2006 (gıdalarda kullanımı için)16/03/2006 (hayvan yemlerinde kullanımı için)	02/03/2016 (gıdalarda kullanımı için) 15/03/2016 (hayvan yemlerinde kullanımı için)
GA21	Syngenta	<i>m_epsp</i>	28/03/2008	27/03/2018
MON810	Monsanto	<i>cry1Ab</i>	Onay yenilenmesi devam ediyor	Onay yenilenmesi devam ediyor
MON863	Monsanto	<i>cry3Bb1, nptII</i>	13/01/2006 (gıdalarda kullanımı için) 10/08/2005 (hayvan yemlerinde kullanımı için)	12/01/2016 (gıdalarda kullanımı için) 09/08/2015 (hayvan yemlerinde kullanımı için)
NK603	Monsanto	<i>cp4_epsp</i>	03/03/2005 (gıdalarda kullanımı için) 18/10/2004 2005 (hayvan yemlerinde kullanımı için)	02/03/2015 (gıdalarda kullanımı için) 17/10/2014 (hayvan yemlerinde kullanımı için)
NK603x MON810	Monsanto	<i>cry1Ab, cp4_epsp</i>	24/10/2007	23/10/2017
T25	Bayer	<i>bar</i>	Onay yenilenmesi devam ediyor	Onay yenilenmesi devam ediyor
MON88017	Monsanto	<i>cry3Bb1, cp4_epsp</i>	30/10/2009	29/10/2019
MON89034	Monsanto	<i>cry1A.105, cry2Ab2</i>	30/10/2009	29/10/2019
59122x NK603	Pioneer	<i>cry34Ab1, cry35Ab1, bar, c4_epsp</i>	30/10/2009	29/10/2019
MIR604	Syngenta	<i>cry3A, pmi</i>	30/11/2009	29/11/2019
MON863x MON810x NK603	Monsanto	<i>cry3Bb1, cry1Ab, c4_epsp, nptII</i>	02/03/2010	01/03/2020
MON863x MON810	Monsanto	<i>cry3Bb1, cry1Ab, nptII</i>	02/03/2010	01/03/2020
Bt11xGA21	Syngenta	<i>cry1Ab, bar, m_epsp</i>	28/07/2010	27/07/2020
MON88017x MON810	Monsanto	<i>cry1Ab, Cry3Bb1, c4_epsp</i>	28/07/2010	27/07/2020
MON863x NK603	Monsanto	<i>cry3Bb1, c4_epsp, nptII</i>	02/03/2010	01/03/2020
MON89034x NK603	Monsanto	<i>cry1A.105, cry2Ab2, c4_epsp</i>	28/07/2010	27/07/2020
59122x1507x NK603	Pioneer	<i>cry1F, cry34Ab1, cry35Ab1, c4_epsp</i>	28/07/2010	27/07/2020
1507x59122	Pioneer	<i>cry1F, cry34Ab1, cry35Ab1, bar</i>	28/07/2010	27/07/2020

Ülkemizde ise GDO ile ilgili yasal düzenlemeler son yıllarda oluşturulmuştur. “Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik” 26 Ekim 2009 tarih ve 27388 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanmış ve 28 Nisan 2010 tarihinde ise yönetmelikte değişiklik yapılmıştır. Söz konusu değişiklik kapsamında ticarete konu olan ve risk değerlendirmesi yapılması sonucu Avrupa Birliği’nde tüketime uygun olduğuna dair onaylanmış genler hakkında değerlendirme yapmak ve yapılan değerlendirme sonucu bu onaylı genler arasından uygun görülenleri belirlemek amacıyla bir Bilimsel Komite tayin edilmiştir. Transgenik çeşitlerle ilgili risk değerlendirmesi yapan kuruluşların (EFSA, WHO, FAO) ve bilimsel araştırmalarının sonuçları (allerjenik ve toksijenik etki analizleri, genetik modifikasyonun stabilitesi, morfolojik ve agronomik özellikler, hedef dışı organizmalara etkisi vb.) ile farklı ülkelerde üretim ve tüketim durumlarını göz önünde bulundurarak belirli transgenik ürünlerle ilgili alınan Bilimsel Komite Kararları Bakanlıkça onaylanmıştır. Aşağıda mısır ürünleriyle ilgili alınan Bilimsel Komite Kararları listelenmiştir (Tablo 2.5.). Söz konusu Komite Kararına göre gıda ve yem ürünlerinin GDO’lu olarak değerlendirilmesi ve etiketlenmesi için GDO oranının %0.9 eşik değerinden fazla olması gerekmektedir. Tanımlanmamış ve risk değerlendirmeleri yetkili kurullar tarafından (EFSA, Bilimsel Komite vb.) yapılmamış yabancı genleri içeren ürünler için bu eşik değer % 0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.5: Transgenik mısırlarla ilgili alınan Bilimsel Komite kararları (Bilimsel Komite, 2011)

Transgenik Bitkinin Adı	Bilimsel Komite Kararı
Bt11	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
DAS1507	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
GA21	Yem ve gıda olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
MON810	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
MON863	Sadece yem olarak kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.
MON863 X NK603	Sadece yem olarak kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.
MON863 X MON810	Sadece yem olarak kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.
NK603	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
NK603 X MON810	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
T25	Yem ve gıda olarak kullanımının uygun olmayacağı kanısına varılmıştır.
DAS59122	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
DAS1507 X NK603	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
MON89034	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
MON88017	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
59122 X NK603	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
MIR604	Yem ve gıda (taze, konserve, un, irmik ve mamulleri gibi doğrudan tüketim dışında) olarak kullanıldığında herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır.
MON863 X MON810	Sadece yem olarak kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Bunun yanı sıra 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan “Biyogüvenlik Kanunu” nun esaslarına göre ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin Kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı ve GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmıştır.

2.6. GDO ANALİZİ

Genetiği değiştirilmiş tarım ürünlerinin belirlenmesinde protein ve DNA temelli yöntemler olmak üzere başlıca iki yaklaşım söz konusudur. Protein temelli yaklaşımlarda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en yaygın kullanılan yöntemdir. Antijen antikor arasındaki bağlanma özelliğine dayalı olarak özel proteinlerin (yabancı genin ürünü olan proteinlerin) varlığı belirlenir. Bunun yanı sıra, DNA temelli yöntemler daha hassas ve güvenilir sonuçlar verdiği için genetiği değiştirilmiş ürünlerin analizinde daha yaygın kullanılırlar (Querci, M., 2010). PCR tekniğine dayalı yöntemler istenen verimde kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlar (Anklam ve diğ., 2002).

2.6.1.DNA Temelli GDO Analiz Yöntemleri

DNA temelli GDO analiz prosedürleri genellikle üç aşamadan oluşur: Tarama, tanımlama ve miktar tayini.

- 1) Tarama: Amaç bir ürünün GDO içerip içermediğini tespit etmektir. Sonucu pozitif ya da negatif olabilir. Çıkan sonucun kesin ve hatasız olduğundan emin olmak için kullanılan metod çok hassas ve güvenilir olmalıdır.
- 2) Tanımlama: Bu aşamada amaç ürünün kaç farklı GDO içerdiğini ve bu içeriklerin onaylı GDO’lar olup olmadığını bulmaktır. GDO tanımlaması için spesifik dizi bilgisine ihtiyaç vardır. Avrupa Birliği Joint Research Center (JRC) tarafından bilimsel verilere dayanan uygun moleküler tanımlama metodları geliştirilmiştir.

- 3) Miktar tayini: Eğer bir üründe GDO varlığı belirlendiyse yönetmeliğe uygun miktarlarda olup olmadığını belirlemek için kantitatif analizler yapılır (Laura ve diğ., 2001).

2.6.2. DNA İzolasyonu

Örneklerden yüksek kalitede ve saflıkta DNA izolasyonu GDO analizinin birinci adımındır. Kalitatif ve kantitatif PCR metodlarının uygulanabilmesi için DNA'nın yeterli saflıkta, kalitede ve miktarda elde edilmesi gerekmektedir. DNA izolasyonu için CTAB DNA izolasyon metodu ve firmaların ürettiği kitler kullanılmaktadır.

DNA izolasyonu ekstraksiyon ve saflaştırma olmak üzere iki temel aşamadan meydana gelmektedir. DNA ekstraksiyonu hücrelerin parçalanması, hücresel nükleazların inaktivasyonu, DNA dışındaki nükleik asitlerin parçalanması ve DNA'nın geri kalan maddelerden ayrılması olarak özetlenebilir. Bu aşamada mekanik, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin hepsine ya da birkaçına başvurulur (Çetiner ve Budak 2006).

Genel olarak bitkisel materyalden DNA izole etmek için aşağıdaki basamakları başarılı bir şekilde uygulamak gereklidir:

- Örnek homojenizasyonu ve hücre duvarının parçalanması (genellikle kuru buzla veya sıvı nitrojenle öğütülerek ya da havanda dövülerek yapılır).
- Hücre membranının her DNA ekstraksiyon tamponu için gerekli bir bileşen olan deterjanla [CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) ya da SDS (sodium dodecyl sulfate) olabilir] bozulması.
- Deterjanlar, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ve birçok enzim için zorunlu bir kofaktör olan Mg^{2+} 'un kelatörleri (bağlayıcı moleküller) ile nükleazların inhibisyonu.
- Proteinaz K eklenerek proteinlerin inhibisyonu ve parçalanması.
- İnhibe edici polisakkaritlerin DNA'dan ayrılması (CTAB içeren solüsyonda diferansiyel çözünme yoluyla meydana gelir).
- Hidrofobik hücre bileşenlerinin (lipit gibi) kloroform gibi organik çözücülerle DNA'dan ayrılması.

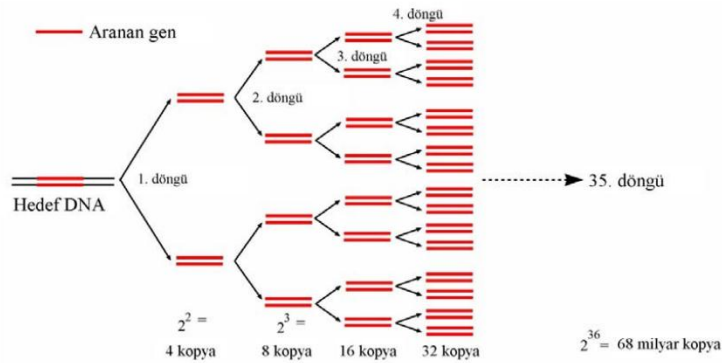
- Alkolle DNA'nın deterjandan ayrılması ve yoğunlaştırılması.
- Alternatif olarak, DNA bağlayıcı silika kolonlar kullanılarak DNA'nın diğer hücre bileşenlerinden ayrılması (Spath ve Strauss, 1999; Melzak ve diğ., 1996).

Son zamanlarda, GDO analizlerinde bitki kökenli materyallerden DNA izole etmek için en fazla kullanılan üç farklı yöntem mevcuttur: CTAB metodu, DNA bağlayıcı silika kolon metodu (birçok ticari DNA izolasyon kiti) ya da bu iki yöntemin kombinasyonu.

CTAB metodu ilk kez 1980'de Murray ve Thompson tarafından yayınlanmıştır. İşlenmiş ve işlenmemiş gıdalara uygulanması için birçok modifikasyonu geliştirilmiştir (Hupfer ve diğ., 1998; Hotzel ve diğ., 1999; Poms ve diğ., 2001). Bu prosedür bitkiden ve bitki kökenli gıdalardan DNA izole etmek için çok etkin bir yöntemdir ve DNA'yı polisakkaritlerden çok etkili bir biçimde ayırır. GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (EURL-GMFF), mısır ve soya gibi pek çok gıda türü için CTAB metodunun uygulanabilirliğini onaylamıştır (CRL-GMFF, 2007, 2008)

2.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR reaksiyonu iki primer (hedef dizinin her iki ucuna da komplementer sentetik oligonükleotitler) arasındaki hedef DNA parçasının milyonlarca kopyasının oluşturulmasına imkan tanır. Tekrarlanan bir seri kademeli termal döngüler boyunca DNA polimeraz enzimiyle çoğaltım gerçekleşir ve primer çifti arasındaki DNA dizilerinin hızlı bir şekilde çoğaltımı sağlanır (Şekil 2.2., Somma ve Querci, 2010).



Şekil 2.2: PCR reaksiyonuyla DNA'nın çoğaltılma şeması (Somma ve Querci, 2010)

Prensip olarak PCR üç farklı sıcaklık derecesinin ardışık döngülerinden oluşan bir işlemdir. Bu döngüler boyunca hedef dizinin sayısı üssel olarak artar. Her döngüde üç farklı sıcaklık derecesi, reaksiyonda üç farklı basamağa karşılık gelir. İlk basamakta, çift zincirli DNA denatürasyon için denatürasyon sıcaklığına (~94°C) ısıtarak tek zincir haline getirilir. İkinci basamakta, primerlerin hedef dizilere bağlanması için sıcaklık 50-65°C'ye (GC içeriğine göre değişir) düşürülür. Primer molekülleri fazla olduğu için bu sıcaklıkta DNA-DNA hibridizasyonu yerine primer hibridizasyonu gerçekleşir. Üçüncü basamakta ise hedef diziye bağlanmış primerler optimum sıcaklıkta (72°C) genellikle *Thermus aquaticus* (Taq) polimeraz enzimi tarafından uzatılır. Primerlerin uzatılmasıyla hedef dizinin kopyası oluşturulmuş olur. Döngüler DNA miktarına bağlı olarak ve çoğaltılan DNA parçasının uzunluğuna bağlı olarak 20-50 kez tekrar edilebilir (Laura ve diğ., 2001). Son olarak da geleneksel PCR'da elde edilen PCR ürünlerinin analizi için örnekler agaroz jel elektroforez sistemi ile görüntülenir. Agaroz jel elektroforezinde, jele yüklenen DNA parçaları jelin içinde büyüklüklerine göre ayrılırlar ve analiz edilebilirler.

2.6.3.1. Tarama Amaçlı Kalitatif PCR

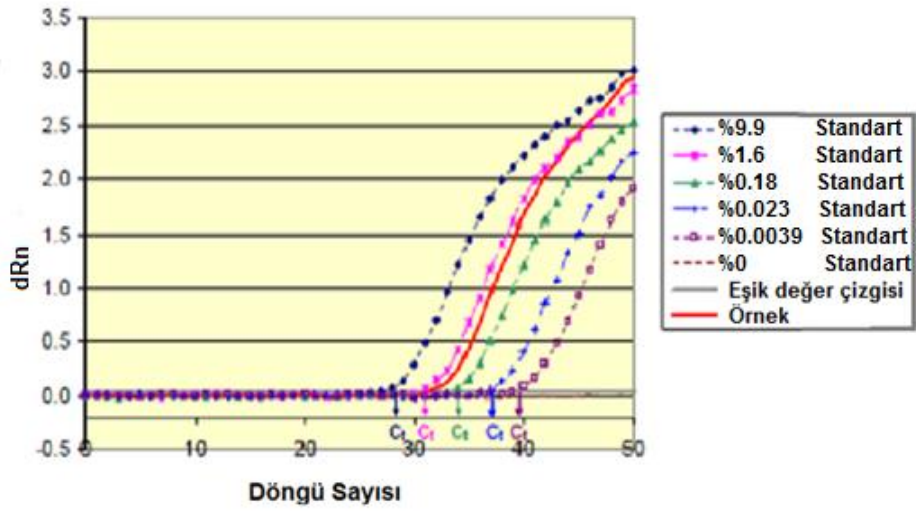
Bitkiye Özgü Kalitatif PCR: GDO içeriği tanımlanmak istenilen bitkiye özgü PCR GDO analizinin ilk basamağıdır. Bitkiye özgü PCR, izole edilen DNA'nın kalitesinden, PCR için uygunluğundan ve total DNA içinde GDO analizi yapılacak bitkinin DNA'sının varlığından emin olmak için gereklidir. Kullanılan hedef gen dizisi yalnızca hedef bitki türüne özgü olmalıdır. *Adh1*, *hmgA*, *ivr1*, *itp*, *maize-ppi-ppf*, *zein* ve *zSSIIb* genleri mısır bitkisini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan hedef dizilerdir (GMDD, 2011).

Yabancı Gene Özgü Kalitatif PCR: Tarama amaçlı rutin GDO analizinde, odaklanılan hedef diziler taranan grup için karakteristik diziler olmalıdır. İlk GDO tarama metodu 1997'de İsviçreli ve Alman bilim adamları tarafından geliştirilmiştir ve karnabahar mozaik virüsü 35S promotörü ve *Agrobacterium tumefaciens* nos terminatorü genetik elementlerinin tespit edilmesine dayalı bir metottur (Pietsch ve diğ., 1997). 35S ve nos bugün marketlerde sunulan birçok GDO'lu üründe genetik kontrol elementleri olarak bulunmaktadır ve günümüzde tarama amaçlı GDO analizlerinde yaygın olarak kullanılan hedef dizilerdir (Hemmer, 1997).

2.6.3.2. *Kantitatif ‘Real time’ (Gerçek Zamanlı) PCR*

‘Real time’ PCR tekniği ilk kez 1992’de Higuchi ve arkadaşları tarafından bir çift zincir DNA boyası olan Etidyum Bromür (EtBr) kullanılarak geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda birçok ‘real time’ PCR aletlerinin piyasaya sürülmesiyle ve kolay kullanım ayarları sayesinde kısa sürede çok popüler bir teknik haline gelmiştir. Bu PCR tekniğini diğerlerinden ayıran özelliği hedef DNA dizisinin çoğaltımının tüm reaksiyon boyunca izlenebilmesidir. Yani klasik PCR çoğalan ürün miktarı arttıkça şiddeti de artan sürekli ve izlenilebilir sinyaller elde etmek için adapte edilmiştir (Laura ve diğ., 2001).

PCR üç aşamadan oluşur; üssel artış fazı, lineer faz ve durağan faz. Geleneksel PCR’da bitiş noktasında oluşan son ürünün analizi yapılır ve miktarsal bir veri elde etme imkanı çok sınırlıdır. Bu nedenle geleneksel PCR yalnızca GDO’ların kalitatif analizi için kullanılabilir. ‘Real time’ PCR’da ise devam eden çoğaltım işlemi sırasında miktar artışı gözlenebilir, üssel artış fazı sırasında çoğaltılan ürünün miktarsal ölçümü yapılır (Heild ve diğ., 1996). Eşik değerin üzerinde anlamlı bir sinyal oluşması için gerekli PCR döngüsünün sayısı bir ölçü olarak alınır ve eşik değer döngüsü (Ct=Cycle threshold) değeri olarak adlandırılır. Ct değeri etkinliğin sürdüğü PCR evresi süresince ölçülür ve bu değer hedef moleküllerin başlangıç miktarıyla ters orantılıdır (Laura ve diğ., 2001, Şekil 2.3).



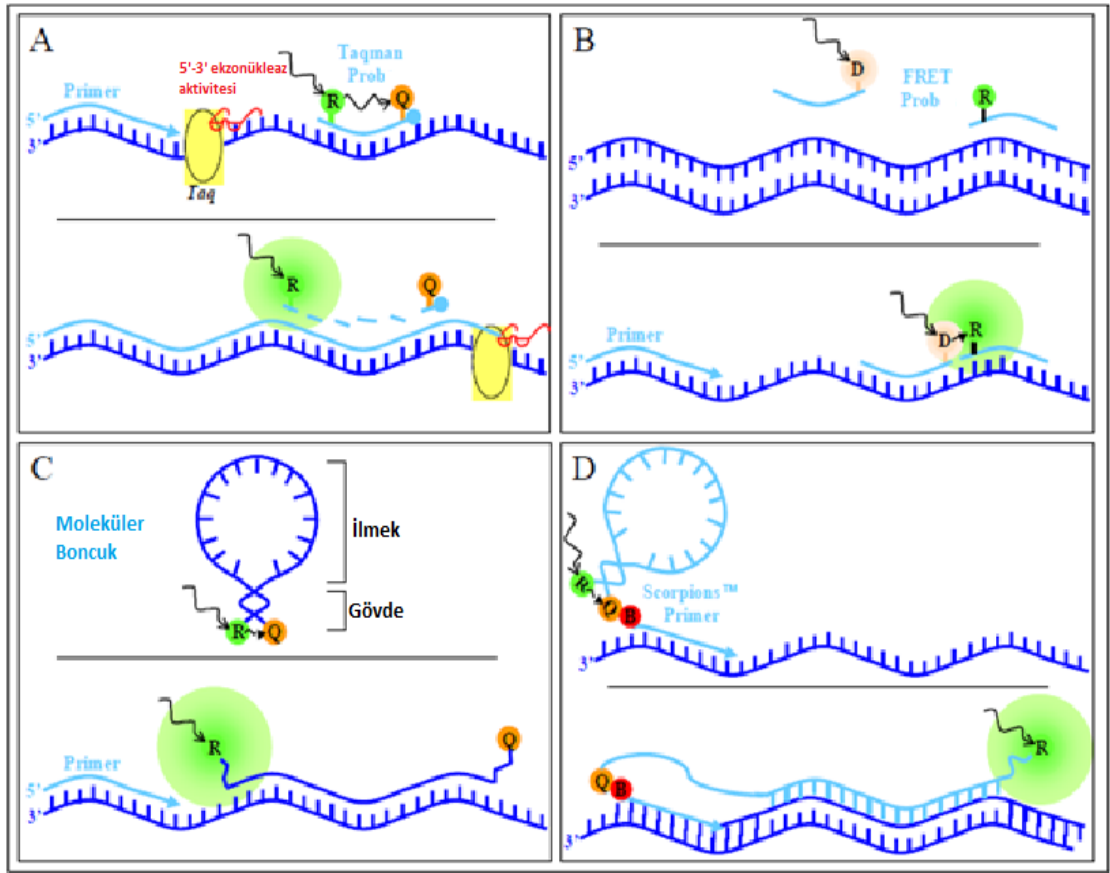
Şekil 2.3: 35S promotorunun ‘real time’ çoğaltım grafiği (Anklam ve diğ., 2002): Grafik altı farklı standart ve bir örneğe ait 35S promotorunun çoğaltımını gösterilmektedir. PCR ürününün oluşumu her döngüde floresan ışımaya miktarları (dRn) alınarak eş zamanlı olarak görüntülenir. Ct değeri başlangıçtaki örnek konsantrasyonuna bağlıdır. Ct değeri örnekteki hedef dizi kopya sayısı ile ters orantılıdır.

PCR ürününün dolaylı izlenmesine yönelik çalışmalarda EtBr (Higuchi ve diğ., 1992) yerine kullanılan yine bir çift zincir DNA boyası olan SYBR Green yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir ve bu yöntem ürün oluşumunun daha iyi görüntülenmesine imkan vermektedir (Wittwer ve diğ., 1997). Fakat primer dimerleri gibi istenmeyen ürünlerin oluşumundan dolayı deneysel hatalar meydana gelebilir. Bu tür ürünlerin oluşumundan kaynaklanan yanlış sonuçlar erime eğrisi analizleri ile giderilebilir (Ririe ve diğ., 1997).

Özgün prob yöntemleri özgün olmayan çift zincir DNA boyalarına göre daha güvenilir sonuçlar verdiği için GDO analizlerinde daha çok tercih edilirler. FRET (fluorescence resonance energy transfer) problemleri (Didenko, 2001), moleküler boncuklar (Tyagi ve Kramer, 1996) ve Scorpion problemleri (Whitcombe ve diğ., 1999) GDO analizinde kullanılan özgün prob yöntemleridir. Ancak en yaygın kullanılan özgün prob yöntemi TaqMan ya da 5'-ekzonükleaz olarak adlandırılan yöntemdir (Şekil 2.4.). TaqMan problemleri tek zincir DNA parçalarıdır ve kalıp DNA zincirinde iki primer arasında kalan bölgedeki belirli bir nükleotit dizisine bağlanacak şekilde tasarlanırlar. Problemlerin 5' ucu raportör bir boya ile 3' uçları ise baskılayıcı bir boya ile işaretlenmiştir. Prob bozulmadan önce raportör boya baskılayıcı boya tarafından baskılanır böylece ışımaya meydana getirmez. Hibridizasyon meydana geldiğinde, çoğaltımın uzama evresinde

Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi probu ayırır. Ayrılma baskılamanın etkisini azaltır ve raportör boyanın floresan ışıması oluşan ürün miktarının ölçüsü haline gelir (Laura ve diğ., 2001). Yalnızca her iki primerin ve problemlerin hedef diziye bağlanması durumunda raportör sinyallerde artış meydana geleceği için prob kullanılan 'real time' PCR tekniklerinin özgünlüğü çift zincir DNA boyaları kullanılan tekniklere göre oldukça yüksektir.

'Real time' PCR'da hedef dizinin oransal miktarının tayini, GDO oranı bilinen Sertifikalı Referans Materyaller (SRM) kullanılarak oluşturulan bir standart eğrinin hazırlanmasıyla mümkün olur. SRM'ler Avrupa Birliği'nin resmi kuruluşu olan Referans Malzemeleri ve Ölçümleri Enstitüsü (IRMM) tarafından belirli GD ürünlerin GD olmayan ürünlerle belli oranlarda (ağırlık/ağırlık esasına dayanarak) karıştırılması ile hazırlanan standartlardır.



Şekil 2.4: Ürün oluşumunu izlemek için farklı amplikon spesifik prob lar kullanılan 'real time' PCR teknikleri: A) TaqMan Probu B) FRET Probu: Probun 3' ucu donör (verici) bir fluoroforla işaretlenmiştir, yakınındaki diğer bir probun 5' ucu ise alıcı bir fluoroforla işaretlenmiştir. Her PCR döngüsünün bağlanma evresinde prob lar hedefe bağlanır ve FRET sistemi ölçülebilir bir floresan sinyaller oluşturur. C) Moleküler Boncuklar: Saç tokası şeklindeki oligonükleotitlerin yuvarlak uç kısımları hedef diziye tamamlayıcıdır ve yanlarda kısa bir gövde oluşturmak için birbirine komplementer diziler içeren iki kol (5-7 baz çifti uzunluğunda) mevcuttur. Kollardan biri raportör bir boya ile diğeri ise baskılayıcı bir boya ile işaretlenmiştir. Moleküler boncuklar solüsyonun içinde serbestken kollar birbirine bağlıdır böylece baskılayıcı boya raportör boyayı etkileyerek ışımaya yapmasını engeller. Her PCR döngüsünün bağlanma evresinde moleküler boncukların yuvarlak uç kısmı hedef diziyle hibridize olur ve baskılayıcı boya raportör boyadan ayrılır. Bu durumda raportör boyanın floresan ışması ölçülecektir. D) Scorpions primerler: Scorpions primerleri 5' ucuna bir blokerla (engelleyici) beraber moleküler boncuk benzeri bir molekül bağlanmış olan PCR primerleridir. PCR süresince Scorpions primerler uzatılır ve moleküler boncuklara bağlanmış spesifik prob lar aynı DNA kolu üzerindeki komplementer dizilerine bağlanabilirler. Moleküler boncukta olduğu gibi, bu bağlanma olayı saç tokası kıvrımlarını açar ve raportör boya baskılayıcı boyayla daha fazla baskılanmaz böylece oluşan sinyaller gözlenebilir. Primer ve moleküler boncuk arasındaki bloker ise moleküler boncuk kısmının okunmasını engeller (Laura ve diğ., 2001).

2.6.3.3.Hatalı Pozitif ve Hatalı Negatif Sonuçların Önlenmesi

PCR işlemi sırasında eser miktarda dahi DNA kontaminasyonu hedef dizi olarak algılanabilir ve yanlış nükleik asit dizisinin çoğaltımına ve “hatalı pozitif” sonucun ortaya çıkmasına yol açabilir. Bu nedenle PCR bileşenlerinin ve PCR karışımını hazırladığımız ortamın DNA’dan arındırılmış olması son derece önemlidir.

İlgilenilen bölgenin başarılı bir şekilde çoğaltılması hedef DNA’nın miktarı ve kalitesine, reaksiyon bileşenlerinin tam ve doğru miktarda karıştırılmasına ve reaksiyonun hassasiyetine bağlıdır. Reaksiyon koşulları çok düşük miktardaki hedef DNA’yı bile çoğaltabilecek şekilde optimize edilmelidir. Aksi takdirde “hatalı negatif” sonuçlar ortaya çıkabilir. Güvenilir sonuçlar elde etmek için PCR reaksiyonu sırasında hem pozitif hem de negatif kontroller kullanmak gereklidir (Tablo 2.6.).

Tablo 2.6: PCR reaksiyonunun güvenilirliğini sınamak için kullanılması gereken kontroller.

Pozitif kontrol	PCR reaksiyonunun verimliliği sınamak için hedef diziyi içerdiği bilinen bir örnek pozitif kontrol olarak kullanılmalıdır
Negatif kontrol	Reaksiyon hassasiyetini ve özgünlüğünü ölçmek için hedef diziyi içermediği bilinen bir DNA negatif kontrol olarak kullanılmalıdır
Kalıpsız kontrol	Reaksiyon karışımında oluşabilecek kontaminasyon riskine karşı DNA yerine su kullanılan kalıpsız bir kontrol kullanılmalıdır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEK TOPLANMASI

Bu proje kapsamında Türkiye’de pazara sunulmuş mısır içeren gıda örnekleri kullanıldı. İşlenmemiş mısır tanesinden yüksek işlenmişlik seviyelerine kadar çok çeşitli gıda türleri ve markaları analiz edilmek üzere İstanbul’daki çeşitli marketlerden satın alındı. Tablo 3.1.’de kullanılan örnekler listelenmiştir.

Tablo 3.1: GDO analizi için kullanılan örnekler

Örnek 1	Mısır unu (marka 1)
Örnek 2	Mısır unu (marka 2)
Örnek 3	Mısır gevreği (marka 1)
Örnek 4	Mısır gevreği (marka 2)
Örnek 5	Mısır nişastası
Örnek 6	Mikrodalga cın mısır
Örnek 7	Cın mısır
Örnek 8	Bebek maması (marka 1)
Örnek 9	Mısır cipsi
Örnek 10	Bebek maması (marka 2)
Örnek 11	Bebek maması (marka 3)
Örnek 12	Mısır turşusu (baby corn)
Örnek 13	Tatlı mısır

3.2. DNA İZOLASYONU

Örneklerden ve Sertifikalı Referans Materyallerden (ERM-BF412a, ERM-BF412b, ERM-BF412c, ERM-BF412d, ERM-BF412e, ERM-BF412f) CTAB DNA izolasyon yöntemiyle DNA izole edildi. İşlemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek için her örnek için DNA izolasyonu üç kez tekrar edildi ve işlem sırasında ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyon riskine karşı bir tüpte örnek yerine su kullanılarak (izolasyon kontrolü [extraction blank]) işlem basamakları uygulandı.

İşlem sırasında kullanılan CTAB tamponu ve CTAB çöktürme solüsyonu içerikleri Tablo 3.2. ve 3.3.’ de verilmiştir.

Tablo 3.2: 200 ml CTAB tamponu içeriği (pH 8.0)

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
CTAB (Sigma, H5882)	20 g/l	4 g
NaCl (Riedel, D30926)	1,4 M	16.4 g
Tris HCl (Sigma, T5816)	0.1 M	3.15 g
Na ₂ EDTA (Sigma, E5134)	20 mM	1.5 g

Tablo 3.3: 200 ml CTAB çöktürme solüsyonu içeriği (pH 8.0)

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
CTAB (Sigma, H5882)	5 g/l	1 g
NaCl (Riedel, D30926)	0.04 M	0.5 g

Cin mısıırı, tatlı mısıır ve mısıır turşusu örneklerinin DNA miktarını arttırmak amacıyla, mısıır tanesindeki endosperm kısmı bistüri yardımı ile ayrılarak uzaklaştırıldı. Homojenizasyon için örnekler prosedürde belirtildiği miktarda (100 mg) havana alındı, dH₂O (300 µl) ve CTAB tamponu (500 µl) eklenerek havan içerisinde ezildi ve 1.5 ml’lik reaksiyon tüplerine aktarıldı. İşlemin diğer basamakları (4. basamaktan itibaren) prosedürde ki gibi uygulandı. Mısıır gevreği ve mısıır cipsi örnekleri ise havanda dövölerek homojenize edildikten sonra işlem basamakları uygulandı. Diğer örnekler herhangi bir ön işlem gerektirmemektedir.

CTAB DNA İzolasyon Prosedürü

1. 100mg homojenat, 1.5 ml lik steril eppendorf tüplerine aktarılır.
2. 300 µl dH₂O eklenir ve ters düz edilerek karıştırılır.
3. 500 µl CTAB tamponu eklenir ve ters düz edilerek karıştırılır.
4. 200 µl proteinazK (20 mg/ml) (Sigma, P2308) eklenir, çalkalanır ve 65 °C de 30-90 dk inkübe edilir.
5. 20 µl RNaz A (10 mg/ml) (Sigma, R4642) eklenir, çalkalanır ve 65 °C de 5-10 dk inkübe edilir.
6. 16,000 x g de yaklaşık 10 dk (faz ayrımı meydana gelene kadar) santrifüj edilir.

7. Üst faz 500 µl kloroform (Sigma, C2432) içeren eppendorf tüpüne transfer edilir ve 30 sn çalkalanır.
8. 16,000 x g de yaklaşık 10 dk (faz ayrımı meydana gelene kadar) santrifüj edilir.
9. Üst fazın 500 µl si 500 µl kloroform içeren eppendorf tüpüne aktarılır ve çalkalanır.
10. 16,000 x g de 5 dk santrifüj edilir.
11. Üst faz temiz tüplere transfer edilir.
12. İki volüm CTAB çöktürme solüsyonu eklenir ve pipetaj yapılır.
13. 60 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
14. 16,000 x g de 5 dk santrifüj edilir.
15. Üst faz atılır.
16. Çökeltin 350 µl 1.2 M NaCl (Riedel, D30926) içersinde çözülür.
17. 350 µl kloroform eklenir ve 30 sn çalkalanır.
18. 16,000 x g de yaklaşık 10 dk (faz ayrımı meydana gelene kadar) santrifüj edilir.
19. Üst faz temiz tüplere transfer edilir.
20. 0.6 volüm isopropanol (Sigma, I9516) eklenir ve çalkalanır.
21. 16,000 x g de 10 dk santrifüj edilir.
22. Üst faz atılır.
23. 500 µl %70 lik etanol (Sigma, E7023) eklenir ve dikkatlice çalkalanır.
24. 16,000 x g de 10 dk santrifüj edilir.
25. Üst faz atılır.
26. Çökelti kurutulur ve DNA 100 µl steril dH₂O içinde çözülür.

3.3. DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ

İzole edilen DNA'lar spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler kullanılarak analiz edildi.

3.3.1 Spektrofotometrik Analiz

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonlarının ve saflıklarının belirlenmesi amacıyla spektrofotometre cihazında (Nanodrop, Thermo) örneklerin, 260 – 280 nm dalga boyundaki absorbansları ölçüldü. 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerine göre DNA'ların konsantrasyonları ng/µl olarak elde edildi ve 260/280 oranıyla DNA'ların saflık kontrolü yapıldı.

3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

%1 agaroz jel elektroforezi ile izole edilen genomik DNA'ların kalitatif analizi yapıldı. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 1X Tris-asetat (TAE) tampon sistemi kullanıldı (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4: TAE tamponu içeriği pH 8.0 (50X/litre)

Bileşen	Miktar
Tris-base (Sigma, T8524)	241 g
Glasiyel asetik asit (Sigma, A9967)	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0) (Sigma, E 5134)	100ml

0.4 g agaroz (Sigma, A5073) 40 ml 1XTAE içinde mikrodalga fırında eritildikten sonra 50-60 °C'ye kadar soğutuldu. 2 µl EtBr (10 mg/ml) ilave edildikten sonra jel kasetine dökülerek soğumaya bırakıldı. Polimerize olan jel, yürütme tampon çözeltisinin (1XTAE) bulunduğu tanka alındı. 8 µl örnek, 2 µl yükleme tamponu (Fermentas, R0611) ile karıştırılarak agaroz jele yüklendi. 80 V'da 45 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör ile görüntülendi.

3.4. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ

Mısıra özgü *zein* geni, CaMV 35S promotörü ve nos terminatorü kalitatif PCR'la belirlendi. İşlemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla her örnek için PCR'lar üç kez tekrar edildi ve her reaksiyon için pozitif, negatif ve kalıpsız kontroller kullanıldı. Kullanılan kontroller aşağıda açıklanmıştır.

Pozitif kontrol: DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonunun verimliliği ölçmek için hedef diziyi içerdiği bilinen bir örnek pozitif kontrol olarak kullanıldı. Zein PCR'ı için geleneksel mısırdan izole edilmiş DNA [mısır unu (marka 1) aynı zamanda pozitif kontrol olarak kullanıldı], 35S ve nos PCR'ı içinse GDO içeriği bilinen Sertifikalı

Referans Materyallerden (% 0.1-5 GD mısır) izole edilmiş DNA pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Negatif kontrol: Primer özgünlüğünü ve reaksiyon hassasiyetini ölçmek için hedef diziyi içermediği bilinen bir DNA negatif kontrol olarak kullanıldı. Zein PCR'ı için arpadan (İstanbul Üniversitesi'nden temin edildi) izole edilen DNA, 35S ve nos PCR'ı içinse GDO içermediği bilinen Sertifikalı Referans Materyalden (% 0 GD mısır) izole edilmiş DNA negatif kontrol olarak kullanıldı.

Kalıpsız kontrol: Reaksiyon karışımının hazırlanması sırasında hedef nükleik asit dizisini taşıyan bir kontaminasyonun oluşma riskine karşı her PCR için kalıp DNA hariç diğer tüm PCR bileşenlerini içeren bir örnek (DNA yerine su kullanılarak) kalıpsız kontrol olarak kullanıldı.

3.4.1. Zein Geni PCR'ı

Zein mısır bitkisine özgü bir gendir ve mısır bitkisinin PCR'la tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır. Mısır içeren örneklerden izole edilmiş DNA'da, mısır DNA'sının varlığından ve elde edilen DNA'nın PCR için uygunluğundan emin olmak için *zein* genine ait 104 bp.'lik bir bölge, Zein_1-L ve Zein_1-R primerleri (Tablo 3.5.) kullanılarak çoğaltıldı. Zein PCR'ı için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.6.'da, kullanılan PCR programı ise Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Tablo 3.5: Zein primerleri ve dizisi

Primer ismi	Dizisi
Zein_1-L (ileri)	GCCATTGGGTACCATGAACC
Zein_1-R (geri)	AGGCCAACAGTTGCTGCAG
Ürün boyutu	104 bp.

Tablo 3.6: Zein PCR'ı reaksiyon karışımı

	Tek örnek için mastermix	Son konsantrasyon
dH₂O	16.7 µl	
10x PCR Tamponu	2.5 µl	1x
25 mM MgCl₂	2.5 µl	2.5 mM
2 mM dNTP	1 µl	80 µM
10 µM ileri primer	0.6 µl	0.24 µM
10 µM geri primer	0.6 µl	0.24 µM
Taq DNA polimeraz	0.1 µl	0.02 U/µl
DNA	1 µl	50 ng
Toplam	25 µl	

Tablo 3.7: PCR Programı (Zein_1-L/Zein_1-R)

	Sıcaklık	Zaman
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	95 °C	30 sn
Bağlanma	60 °C	30 sn
Uzama	72 °C	30 sn
Döngü sayısı: 40		
Son uzama	72 °C	5 dk
Bekleme	4 °C	∞

3.4.2. CaMV 35S Promotoru ve Nos Terminatörü PCR'ları

Mısır içeren ürünlerde yapılan bu tarama çalışmasında, 35S promotörünün saptanması için p35S-cf3/p35S-cr4 ve p35S-1-5'/p35S-1-3' primer çiftleri, nos terminatörünün saptanması için ise NOS ter 2-5'/NOS ter 2-3' primer çifti kullanıldı (Tablo 3.8.). 35S ve nos PCR'ı için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.9.'da, kullanılan PCR programı Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.8: 35S ve nos primerleri ve dizileri

Hedef	Primer	Dizi (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp)
35S promotor	p35S-cf3 (ileri) p35S-cr4 (geri)	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	123
	P35S-1-5' (ileri) P35S-1-3' (geri)	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT	101
Nos terminatör	NOSter2-5' (ileri) NOSter2-3' (geri)	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG CGCTATATTTTGTTCCTATCGCGT	151

Tablo 3.9: 35S/nos PCR'ı reaksiyon karışımı

	Tek örnek için mastermix	Son konsantrasyon
dH₂O	18 µl	
10x PCR Tamponu	2.5 µl	1x
25 mM MgCl₂	1.5 µl	1.5 mM
2 mM dNTP	0.3 µl	24 µM
10 µM ileri primer	0.3 µl	0.12 µM
10 µM geri primer	0.3 µl	0.12 µM
Taq DNA polimeraz	0.1 µl	0.02 U/µl
DNA	2 µl	100 ng
Toplam	25 µl	

Tablo 3.10: PCR Programı (35S ve nos)

	Sıcaklık	Zaman
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	96 °C	30 sn
Bağlanma	61 °C	30 sn
Uzama	72 °C	30 sn
Döngü sayısı: 35		
Son uzama	72 °C	5 dk
Bekleme	4 °C	∞

3.4.3. PCR Ürünlerinin Analizi

PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Agaroz jelde yürütme işlemi için 1X TAE tampon sistemi kullanıldı. PCR ürünlerinin analizinde kullanılan agaroz jel Bölüm 3.3.2.'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

40 ml hacimli % 2 Agaroz jel içeriği aşağıdaki gibidir;

- 0.8 g Agaroz (Sigma, A5073)
- 40 ml 1X TAE tamponu
- 2 µl EtBr (10 mg/ml)

3.5. KANTİTATİF 'REAL TIME' PCR ANALİZLERİ

'Real time' PCR analizleri nos terminatörü ve *zein* genine özgü primer ve TaqMan prob setleri kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.11.). PCR koşulları Kuribara ve diğ. (2002) çalışmasında belirtildiği gibi uygulandı. Her örnek için GDO ve endojen referans gen miktarları, uygun olarak hazırlanmış standart eğrilerle ölçüldü. 'Real time' PCR için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.12.'de, kullanılan PCR programı ise Tablo 3.13.'de verilmiştir.

Tablo 3.11: 'Real time' PCR için kullanılan primer ve prob setleri: 'real time' PCR için FAM (raportör) ve TAMRA (baskılayıcı) boylarıyla işaretlenmiş TAqMan problemleri kullanıldı.

Hedef	Primer/Prob	Dizi (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp)
Nos terminatörü	NOSter2-5' (ileri primer) NOSter2-3' (geri primer) NOS-Taq (prob)	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA	151
Zein geni	Zein_1-L (ileri primer) Zein_1-R (geri primer) Zein_1-P (prob)	GCCATTGGGTACCATGAACC AGGCCAACAGTTGCTGCAG FAM-AGCTTGATGGCGTGTCCTCCCT-TAMRA	104

Tablo 3.12: ‘Real time’ PCR reaksiyon karışımı

	Tek örnek için mastermix	Son konsantrasyon
dH₂O	8.8 µl	
TaqMan universal mastermix (Roche, 04673450001)	12.5 µl	
10 µM ileri primer	1.25 µl	0.5 µM
10 µM geri primer	1.25 µl	0.5 µM
25 µM prob	0.2 µl	0.2 µM
DNA	1 µl	50 ng
Toplam	25 µl	

Tablo 3.13: ‘Real time’ PCR Programı

	Sıcaklık	Zaman
*UNG	50 °C	2 dk
İlk denatürasyon ve aktivasyon	95 °C	10 dk
Denatürasyon	95 °C	30 sn
Bağlanma ve uzama	60 °C	1 dk
Döngü sayısı: 45		

* UNG: Uracil-DNA N-Glycosylase

3.5.1. Standart Eğriler

GDO analizi için oluşturulan standart eğri, Referans Malzemeler ve Yöntemler Enstitüsü (IRMM) tarafından hazırlanmış beş farklı konsantrasyonda (% 0.1; 0.5; 1; 2; 5) GDO içeriğine sahip Bt-11 Sertifikalı Referans Materyali (SRM) kullanılarak oluşturuldu. Mısır içeriğinin belirlenmesi için yine beş farklı konsantrasyonda (% 0.1; 1; 10; 50; 100) mısır DNA’sı içeren örnekler hazırlandı. Farklı konsantrasyonda mısır örnekleri, %100 mısır DNA’sı ve % 100 arpa DNA’sı içeren örneklerin çeşitli oranlarda karıştırılmasıyla elde edildi. Bunlara ek olarak işlemin güvenilirliğini test etmek ve deneysel hataları önlemek için her primer/prob seti için kalıpsız negatif kontrol kullanıldı ve örnekler çift tekrarlı yüklendi.

4. BULGULAR

4.1. DNA İZOLASYONU

Marketlerden toplanan on üç gıda örneği ve sertifikalı referans materyallerin hepsinden CTAB DNA izolasyon prosedürüne uygun olarak başarıyla DNA izole edildi. Ancak elde edilen DNA'ların konsantrasyonu, saflığı ve kalitesi gıda örneklerin çeşidine ve işlenmişlik düzeylerine göre farklılık gösterdi. Örneklerin işlenmişlik düzeyleri arttıkça elde edilen DNA'nın konsantrasyonunun ve kalitesinin azaldığı gözlemlendi.

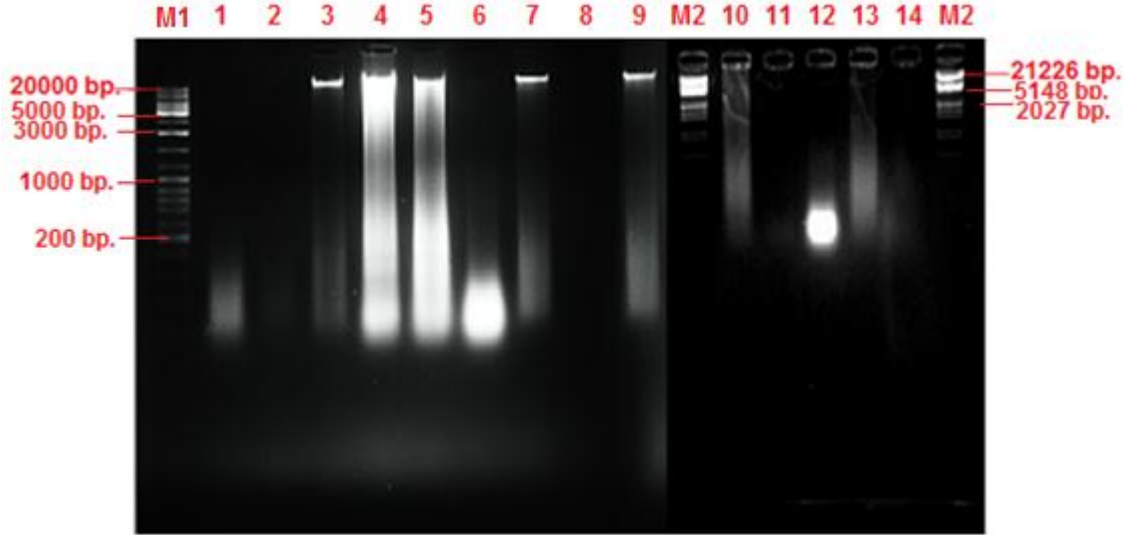
Spektrofotometrik ölçümlerde tüm örneklerde DNA varlığı tespit edildi (Tablo 4.1). Buna göre, örneklerin büyük çoğunluğunun 100 ng/μl'nin üzerinde DNA içerdiği gözlemlendi. En düşük DNA konsantrasyonuna sahip örnek ise 29,1 ng/μl ile nişasta olarak belirlendi.

Tablo 4.1: DNA izolasyonu ve spektrofotometrik ölçüm sonuçları.

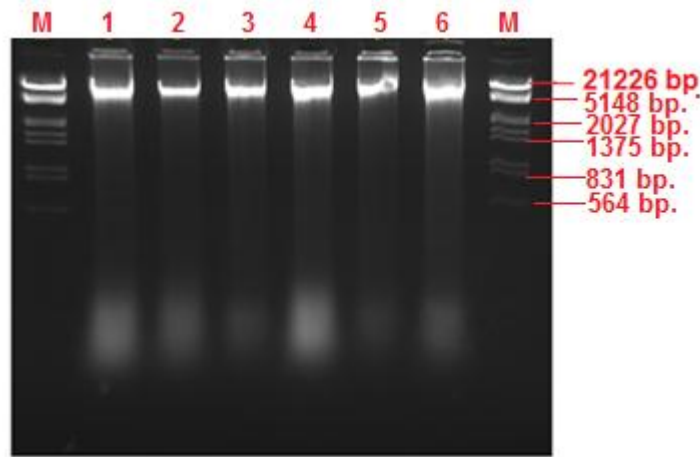
Sample ID*	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Samp
Örnek_1	86 ng/μl		1,72	1,766	0,97	0,18	DNA
Örnek_2	105,4 ng/μl		2,109	1,872	1,13	0,24	DNA
Örnek_3	456,2 ng/μl		9,124	8,051	1,13	0,31	DNA
Örnek_4	174,3 ng/μl		3,487	2,774	1,26	0,4	DNA
Örnek_5	29,1 ng/μl		0,583	0,977	0,6	0,08	DNA
Örnek_6	2481,5 ng/μl		49,631	25,672	1,93	1,63	DNA
Örnek_7	2552,2 ng/μl		51,045	26,542	1,92	1,55	DNA
Örnek_8	361,7 ng/μl		7,234	4,908	1,47	0,51	DNA
Örnek_9	151,5 ng/μl		3,03	3,162	0,96	0,2	DNA
Örnek_10	272,8 ng/μl		5,456	3,029	1,8	1,5	DNA
Örnek_11	35,3 ng/μl		0,706	0,414	1,7	1,14	DNA
Örnek_12	235,2 ng/μl		4,703	2,606	1,8	1,9	DNA
Örnek_13	139,8 ng/μl		2,797	1,616	1,73	0,83	DNA
0_SRM	309,9 ng/μl		6,199	3,088	2,01	2,22	DNA
1_SRM	189,3 ng/μl		3,786	1,894	2	2,21	DNA
2_SRM	204,1 ng/μl		4,082	2,134	1,91	2,2	DNA
3_SRM	289,2 ng/μl		5,784	2,887	2	2,23	DNA
4_SRM	141,9 ng/μl		2,837	1,535	1,85	2,12	DNA
5_SRM	187,8 ng/μl		3,756	1,963	1,91	2,18	DNA

*Örnek_1: Mısır unu (marka 1), Örnek_2: Mısır unu (marka 2), Örnek_3: Mısır gevreği (marka 1), Örnek_4: Mısır gevreği (marka 2), Örnek_5: Mısır nişastası, Örnek_6: Mikrodalga çin mısır, Örnek_7: Çin mısır, Örnek_8: Bebek maması (marka 1), Örnek_9: Mısır çipsi, Örnek_10: Bebek maması (marka 2), Örnek_11: Bebek maması (marka 3), Örnek_12: Mısır turşusu (baby corn), Örnek_13: Tatlı mısır, 0_SRM: %0 SRM, 1_SRM: %1 SRM, 2_SRM: %2 SRM, 3_SRM: %3 SRM, 4_SRM: %4 SRM, 5_SRM: %5 SRM

Spektrofotometrik ölçümlerde tüm örneklerde DNA varlığı tespit edilmesine rağmen bazı örnekler agaroz jelde bant görüntüsü vermedi, bazılarında ise sürüklenme görüntüsü elde edildi (Şekil 4.1. ve 4.2)



Şekil 4.1: Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü: 1) Mısır gevreği (marka 1); 2) Mısır gevreği (marka 2); 3) Mısır unu (marka 1); 4) Mikrodalga cin mısır; 5) Cin mısır; 6) Mısır cipsi; 7) Mısır unu (marka 2); 8) Mısır nişastası; 9) Bebek maması (marka 1); 10) Bebek maması (marka 2); 11) Bebek maması (marka 3); 12) Mısır turşusu (baby corn); 13) Tatlı mısır; 14) İzolasyon kontrolü (extraction blank); M1) Markır 1 (Fermentas GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20,000 bp, SM1331); M2) Markır 2 (Fermentas Lambda DNA/EcoRI+HindIII, SM0193)

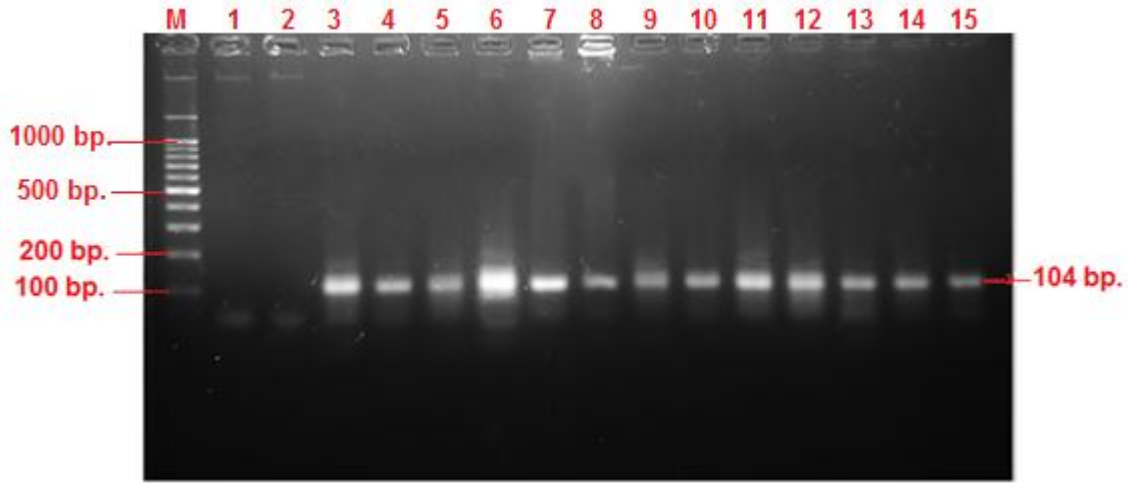


Şekil 4.2: Sertifikalı referans materyallerden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü: 1) % 0 SRM; 2) % 0.1 SRM; 3) % 0.5 SRM; 4) % 1 SRM; 5) % 2 SRM; 6) % 5 SRM; M) Markır (Fermentas Lambda DNA/EcoRI+HindIII, SM0193)

4.2. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ İLE YABANCI GEN İÇEREN ÖRNEKLERİN SAPTANMASI

4.2.1. Zein Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

Örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen zein PCR'ı sonucunda tüm örnekler içerisinde mısır DNA'sının var olduğu ve elde edilen DNA'ların PCR için yeterli kalitede olduğu saptandı. Zein_1-L ve Zein_1-R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda *zein* geninin 104 bp.'lik bir bölgesi başarıyla çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Zein PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 1) Kalıpsız kontrol; 2) Arpa (Negatif Kontrol); 3) Mısır unu (marka 1); 4) Mısır unu (marka 2); 5) Mısır gevreği (marka 1); 6) Mısır gevreği (marka 2); 7) Mısır nişastası; 8) Mikrodalga cin mısır; 9) Cin mısır; 10) Bebek maması (marka 1); 11) Mısır cipsi; 12) Bebek maması (marka 2); 13) Bebek maması (marka 3); 14) Mısır turşusu (baby corn); 15) Tatlı mısır; M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bp, SM0323).

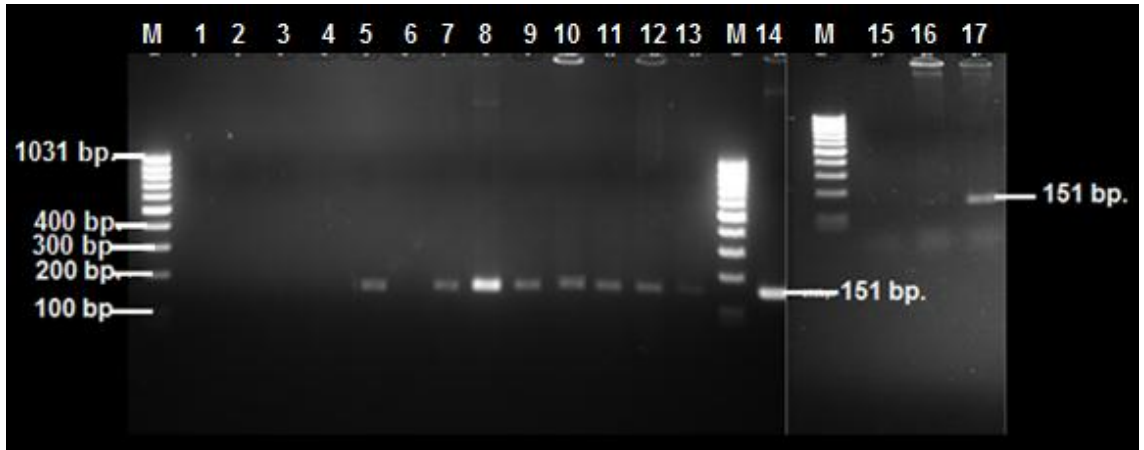
4.2.1. 35S Promotoru ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması

P35S-cf3/P35S-cr4 ve P35S-1-5'/P35S-1-3' primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen 35S promotoruna özgü PCR reaksiyonları sonucunda hiçbir örnekte 35S dizisinin varlığı saptanamadı. %0.1-5 SRM'ler (pozitif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda beklenen büyüklüklerde bantlar elde edilmesi bu durumun, PCR karışımından ya da PCR koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını göstermektedir. Şekil 4.4.'de P35S-cf3/P35S-cr4 primer çifti ile yapılan PCR'a ait örnek agaroz jel görüntüsü verildi.



Şekil 4.4: Gıda örneklerinde P35S-cf3/P35S-cr4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen 35S promotoruna özgü PCR sonucu: 1) Mısır unu (marka 1); 2) Mısır unu (marka 2); 3) Mısır gevreği (marka 1); 4) Mısır gevreği (marka 2); 5) Mısır nişastası; 6) Mikrodalga cin mısır; 7) Cin mısır; 8) Bebek maması (marka 1); 9) Mısır cipsi; 10) Bebek maması (marka 2); 11) Bebek maması (marka 3); 12) Mısır turşusu (baby corn); 13) Tatlı mısır; 14) Kalıpsız kontrol; 15) % 0 SRM (negatif kontrol); 16) % 0.1 SRM (pozitif kontrol); 17) % 0.5 SRM (pozitif kontrol); 18) % 1 SRM (pozitif kontrol); 19) % 2 SRM (pozitif kontrol); 20) % 5 SRM (pozitif kontrol) M) Markır (Fermentas MassRuler Low Range DNA Ladder, 80-1031bp.,SM0383)

Gıda örneklerinde NOSTer2-5'/NOSTer2-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilen nos terminatörüne özgü PCR sonucunda on üç örnekten sekizinde [mısır nişastası, cin mısır, mısır cipsi, bebek maması (marka 1,2,3), mısır turşusu, tatlı mısır] beklenen 151 bp.'lik bir bölgenin çoğaltılabilmesi nedeniyle nos terminatör dizisinin varlığı belirlendi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5: Gıda örneklerinde gerçekleştirilen nos terminatörüne özgü PCR sonucu:

1) Mısır unu (marka 1); 2) Mısır unu (marka 2); 3) Mısır gevreği (marka 1); 4) Mısır gevreği (marka 2); 5) Mısır nişastası; 6) Mikrodalga cin mısır; 7) Cin mısır; 8) Bebek maması (marka 1); 9) Mısır cipsi; 10) Bebek maması (marka 2); 11) Bebek maması (marka 3); 12) Mısır turşusu (baby corn); 13) Tatlı mısır; 14) % 5 SRM (pozitif kontrol); 15) Kalıpsız kontrol; 16) % 0 SRM (negatif kontrol); 17) % 0.1 SRM (pozitif kontrol); M) Markır (Fermentas MassRuler Low Range DNA Ladder, 80-1031bp., SM0383).

Kalitatif PCR sonuçları Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2: Kalitatif PCR sonuçları

ID	Örnek türü	<i>Zein</i>	Nos	35S
Örnek 1	Mısır unu (marka 1)	+	–	–
Örnek 2	Mısır unu (marka 2)	+	–	–
Örnek 3	Mısır gevreği (marka 1)	+	–	–
Örnek 4	Mısır gevreği (marka 2)	+	–	–
Örnek 5	Mısır nişastası	+	+	–
Örnek 6	Mikrodalga cin mısır	+	–	–
Örnek 7	Cin mısır	+	+	–
Örnek 8	Bebek maması (marka 1)	+	+	–
Örnek 9	Mısır cipsi	+	+	–
Örnek 10	Bebek maması (marka 2)	+	+	–
Örnek 11	Bebek maması (marka 3)	+	+	–
Örnek 12	Mısır turşusu (baby corn)	+	+	–
Örnek 13	Tatlı mısır	+	+	–
Pozitif Kontrol		+	+	+
Negatif Kontrol		–	–	–
Kalıpsız Kontrol		–	–	–

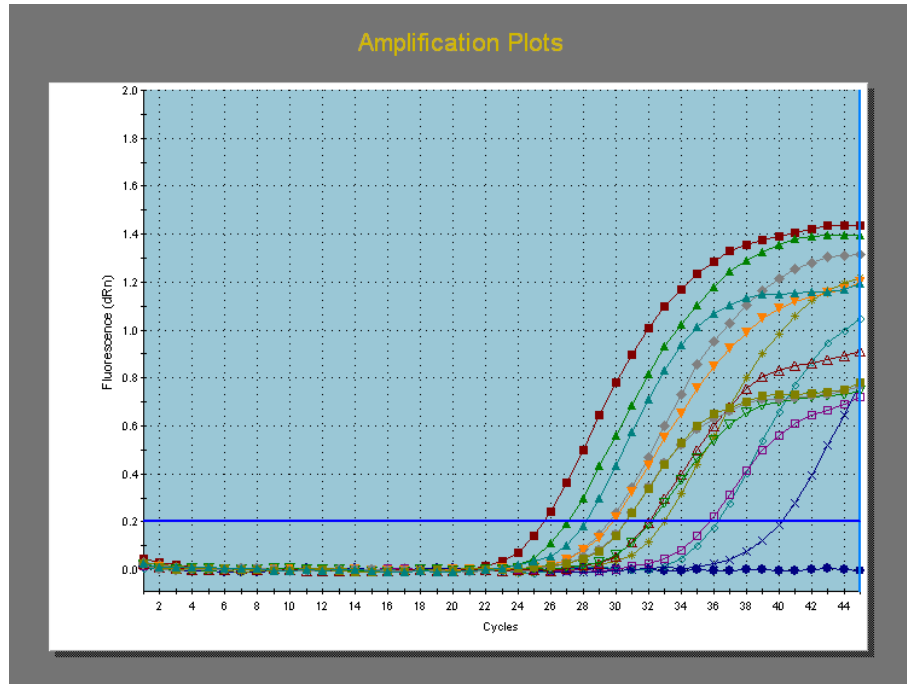
4.3. ‘REAL TIME’ PCR YÖNTEMİ İLE TRANSGENİK ÜRÜN MİKTARININ SAPTANMASI

Kalitatif PCR analizleri sonucunda hiçbir örnekte 35S promotorunun varlığı tespit edilemediği için ‘real time’ PCR analiziyle yalnızca nos terminatör dizisine özgü primer ve prob seti kullanılarak sekiz üründe (kalitatif analizde nos içerdiği belirlenen ürünler) total yabancı gen oranı belirlendi. Örneklerdeki mısır içeriklerini ölçmek için *zein* genine özgü primer ve prob seti kullanıldı. Tüm ‘real time’ analiz sonuçları Bölüm

3.5.1.'de anlatıldığı gibi uygun standartlar kullanılarak oluşturulmuş standart eğrilerle değerlendirildi. İşlem sırasında çift tekrarlı yüklenen örnekler, Ct değerlerinin ortalamaları alınarak değerlendirildi.

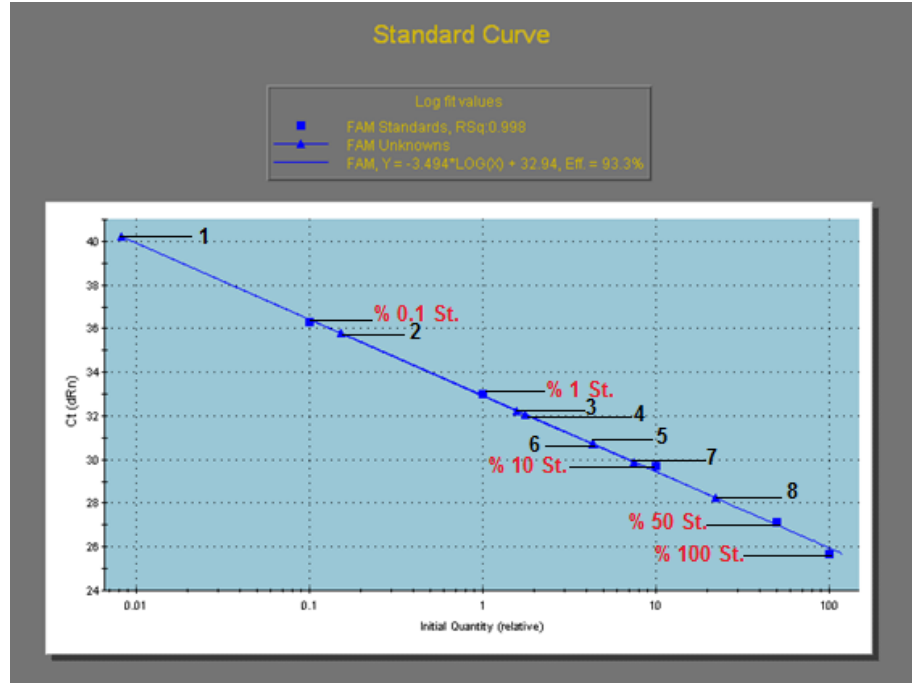
4.3.1. Zein Genin Kantitatif Olarak Saptanması

Zein genine özgü 'real time' PCR analiziyle ürünlerin içeriğindeki total mısır oranı tespit edildi. Tüm örneklerin ve standartların, ışınım miktarı (dRn) eşik değeri çizgisini geçerek anlamlı bir Ct değeri verdi (Şekil 4.6). Ancak ürün içeriği %100 mısır olan bazı örneklerin (mısır unu, cin mısır, tatlı mısır, mısır turşusu) %100'lük standarttan daha geç Ct verdiği gözlemlendi. Bu durumun örneklerin DNA kalitesinin standartlara göre daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.6: *Zein* genine ait 'real time' çoğaltım grafiği; ●: NTC ◆: %100'lük standart; ▲: %50'lik standart; ♦: %10'luk standart; *: %1'lik standart; ○: %0.1'lik standart; ▲: Tatlı mısır; ▲: Cin mısır; ▲: Mısır cipsi; ◆: Mısır turşusu; ○: Bebek maması (marka_3); ▲: Bebek maması (marka_2); ◇: Mısır nişastası; +: Bebek maması (marka_1)

Zein geninin miktarının belirlenmesi için, % 0.1, 1, 10, 50, 100 mısır DNA'sı içeren standartlar kullanılarak standart eğri oluşturuldu ve örneklerin içerdiği *zein* geni oranları belirlendi (Şekil 4.7). Tablo 4.3'de *zein* 'real time' PCR'ına ait sonuçlar özetlenmiştir.



Şekil 4.7: Zein ‘real time’ PCR’ına ait standart eğri: 1) Bebek maması (marka 1); 2) Mısır nişastası; 3) Bebek maması (marka 2); 4) Mısır cipsi; 5) Mısır turşusu (baby corn); 6) Bebek maması (marka 3); 7) Cin mısır; 8) Tatlı mısır

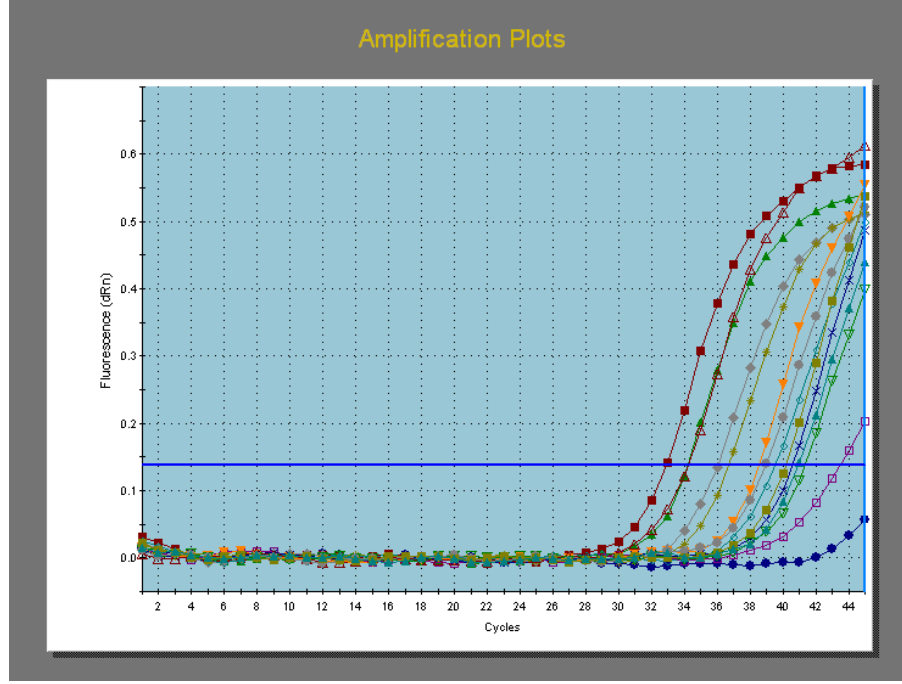
Tablo 4.3: Zein genine özgü primer ve prob setiyle gerçekleştirilen ‘real time’ PCR sonuçları

Replicate*	Well Name	Well Type	Threshold (dRn)	Ct (dRn)	Quantity (relative)%
1	ZEIN	NTC	0,2038	No Ct	No Ct
2	ZEIN	Standard	0,2038	25,67	100
3	ZEIN	Standard	0,2038	27,13	50
4	ZEIN	Standard	0,2038	29,69	10
5	ZEIN	Standard	0,2038	33	1
6	ZEIN	Standard	0,2038	36,31	0,1
7	ZEIN	Unknown	0,2038	35,79	0,1532
8	ZEIN	Unknown	0,2038	29,89	7,49
9	ZEIN	Unknown	0,2038	40,22	0,008249
10	ZEIN	Unknown	0,2038	32,07	1,78
11	ZEIN	Unknown	0,2038	32,24	1,59
12	ZEIN	Unknown	0,2038	30,69	4,43
13	ZEIN	Unknown	0,2038	30,72	4,34
14	ZEIN	Unknown	0,2038	28,23	22,37

*1) Kalıpsız kontrol; 2) %100'lük standart; 3) %50'lik standart; 4) %10'luk standart; 5) %1'lik standart; 6) %0.1'lik standart; 7) Mısır nişastası; 8) Cin mısır; 9) Bebek maması (marka 1); 10) Mısır cipsi; 11) Bebek maması (marka 2); 12) Bebek maması (marka 3); 13) Mısır turşusu (baby corn); 14) Tatlı mısır

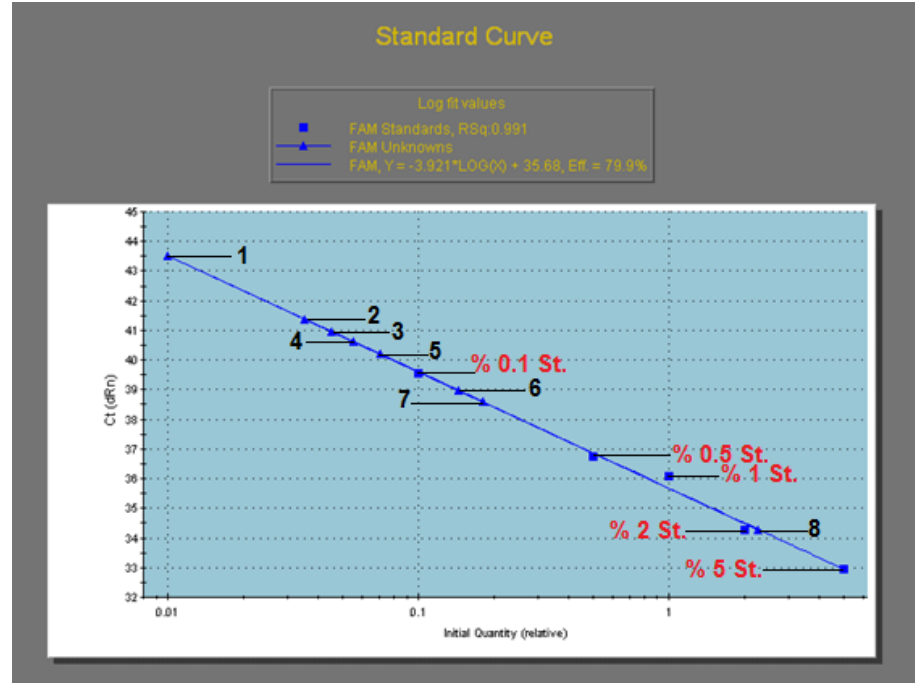
4.3.2. Nos Terminatörünün Kantitatif Olarak Saptanması

Nos terminatörüne özgü ‘real time’ PCR analizi ile ürünlerin içeriğinde bulunan total yabancı gen oranı belirlendi. Tüm örneklerin ve standartların, ışınım miktarı (dRn) eşik değeri çizgisini geçerek anlamlı bir Ct değeri verdi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Nos terminatör dizisinin ‘real time’ çoğaltım grafiği; ●: NTC; ◆: %5’lik SRM; ▲: %2’lik SRM; ♦: %1’lik SRM; *: %0.5’lik SRM; ○: %0.1’lik SRM; ▲: Mısır cipsi; ▲: Cin mısır; ●: Bebek maması (marka_3); ◆: Mısır turşusu; +: Bebek maması (marka_1); ▲: Tatlı mısır; ▲: Bebek maması (marka_2); ◆: Mısır nişastası

Nos terminatörünün miktarının belirlenmesi için, % 0.1, 0.5, 1, 2, 5 GDO içeren standartlar kullanılarak standart eğri oluşturuldu ve örneklerin içerdiği yabancı gen oranları belirlendi (Şekil 4.9). Buna göre, mısır nişastası % 0.009, cin mısır 0.181, bebek maması (marka 1) 0.055, mısır cipsi 2.27, bebek maması (marka 2) 0.035, bebek maması (marka 3) 0.145, mısır turşusu (baby corn) 0.07, tatlı mısır 0.045 oranında yabancı gen (nos dizisi) içermektedir. Tablo 4.4’de nos ‘real time’ PCR’ına ait sonuçlar özetlenmiştir.



Şekil 4.9: Nos 'real time' PCR'ına ait standart eğri: 1) Mısır nişastası; 2) Bebek maması (marka 2); 3) Tatlı mısır; 4) Bebek maması (marka 1); 5) Mısır turşusu (baby corn); 6) Bebek maması (marka 3); 7) Cin mısır; 8) Mısır cipsi

Tablo 4.4: Nos dizisine özgü primer ve prob setiyle gerçekleştirilen 'real time' PCR sonuçları

Replicate *	Well Name	Well Type	Threshold (dRn)	Ct (dRn)	Quantity (relative)%
1	NOS	NTC	0,1379	No Ct	No Ct
2	NOS	Standard	0,1379	32,95	5
3	NOS	Standard	0,1379	34,25	2
4	NOS	Standard	0,1379	36,07	1
5	NOS	Standard	0,1379	36,75	0,5
6	NOS	Standard	0,1379	39,57	0,1
7	NOS	Unknown	0,1379	43,53	0,009992
8	NOS	Unknown	0,1379	38,59	0,1812
9	NOS	Unknown	0,1379	40,62	0,05501
10	NOS	Unknown	0,1379	34,29	2,27
11	NOS	Unknown	0,1379	41,38	0,03524
12	NOS	Unknown	0,1379	38,97	0,1452
13	NOS	Unknown	0,1379	40,19	0,07084
14	NOS	Unknown	0,1379	40,95	0,04527

*1) Kalıpsız kontrol; 2) %5'lik SRM; 3) %2'lik SRM; 4) %1'lik SRM; 5) %0.5'lik SRM; 6) %0.1'lik SRM; 7) Mısır nişastası; 8) Cin mısır; 9) Bebek maması (marka 1); 10) Mısır cipsi; 11) Bebek maması (marka 2); 12) Bebek maması (marka 3); 13) Mısır turşusu (baby corn); 14) Tatlı mısır.

Tablo 4.4.'de kalitatif ve kantitatif PCR analizleri sonucunda ürünlerin belirlenen GDO içeriği listelenmiştir.

Tablo 4.4: Ürünlerin içerdiği transgen oranları

ID	Örnek türü	% GDO
Örnek 1	Mısır unu (marka 1)	0
Örnek 2	Mısır unu (marka 2)	0
Örnek 3	Mısır gevreği (marka 1)	0
Örnek 4	Mısır gevreği (marka 2)	0
Örnek 5	Mısır nişastası	0.009
Örnek 6	Mikrodalga cin mısır	0
Örnek 7	Cin mısır	0.181
Örnek 8	Bebek maması (marka 1)	0.055
Örnek 9	Mısır cipsi	2.27
Örnek 10	Bebek maması (marka 2)	0.035
Örnek 11	Bebek maması (marka 3)	0.145
Örnek 12	Mısır turşusu (baby corn)	0.07
Örnek 13	Tatlı mısır	0.045

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genetiği değiştirilmiş gıdalar yaklaşık 15 yıl önce dünya marketlerine girmiştir ve kullanımı hızla yaygınlaşmıştır. Ancak, genetik mühendisliği yöntemleriyle elde edilen bu yeni çeşitlerin insan sağlığı ve çevre üzerine olası olumsuz etkileri konusundaki endişeler, bu ürünlerin üretiminden tüketiciye sunulmasına kadar geçen çeşitli aşamaların sıkı bir şekilde incelenip risk değerlendirmelerinin yapılmasını ve belirli koşullar altında üretilip çoğu zaman da tüketicilerin bilerek tercih yapabilmeleri için etiketlendirilmelerini zorunlu kılan bir dizi düzenlemelerin oluşturulmasına yol açmıştır.

Günümüzde GDO'ların risk değerlendirmeleriyle ilgili yapılan çalışmalar, birçok transgenik çeşidin insan sağlığına etkileri ile ilgili şüphelere ışık tutmaktadır. Özellikle bu tez çalışmasının odak noktası olan transgenik mısırlar, risk değerlendirmesi yapılan bitki gruplarının başında yer almaktadır. Nitekim Avrupa Birliği tarafından onaylanmış ve marketlerimizde yer alan pek çok transgenik mısır çeşidiyle ilgili çalışmalar yapılmış ve çoğunun geleneksel mısır kadar güvenli olduğu kanısına varılmıştır (Domingo ve Bordonaba, 2011). Ancak, Séralini ve diğ. (2007) ve de Vendômois ve diğ. (2009)'nin memeli hayvanlar üzerinde yaptığı çalışmalar GDO'ların insan sağlığı üzerine olumsuz etkileriyle ilgili endişeleri artmıştır. NK 603, MON 810 ve MON 863 transgenik mısır çeşitleriyle yapılan çalışmalarda, transgeniklerle beslenmeye bağlı olarak hepatorenal toksite ve çeşitli yan etkiler gözlenmiştir. Bu sonuçlar, gıda olarak tüketilen mısır ürünlerinin içerisinde farklı transgenik çeşitlerin bulunması olasılığı nedeniyle GDO analizi çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır.

Avrupa birliği, tüketicilerin bilinçli tercih yapmasını sağlamak için GDO'ların etiketlendirilmesini zorunlu tutmaktadır. Avrupa Komisyonu'nun EC 1830/2003 yönetmeliği GDO'ların piyasaya sürülmesini ve etiketlenmesini düzenlemektedir. Bu düzenlemelere göre ürünün ancak % 0,9'un üzerinde bir değerde GDO içermesi durumunda etiketlenmesi gerekmektedir. Son yıllarda ülkemizde de bu konuda yeni yasal düzenlemeler yapılmıştır (Resmi Gazete 2009, 2010). 26 Mart 2010 tarihli, 27533 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Biyogüvenlik Kanunuyla GDO'ların ithalatı, kullanımı ve üretimi düzenlenmiştir. Bu düzenlemelerle birlikte ülkemizde GDO'lu bitkilerin yetiştirilmesi engellenmiştir fakat GDO içeren gıda maddeleri ithalat yolu ile

ülkemize girebilir ve çeşitli denetimlerden geçerek marketlerimizde sunulabilir. Avrupa Birliği'nin yasal düzenlemelerine benzer olarak ülkemizde de ithal edilen GDO'lu ürünlerin içeriğindeki GDO oranının %0.9'un üzerinde olması halinde etiketleme kurallarına göre etiketlenmeleri zorunlu tutulmuştur, %0.9'un altında bulunan GDO oranlarının ise önlenemeyecek kontaminasyonlardan kaynaklanabileceği kabul edilmektedir. Fakat bu oran yalnızca Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bilimsel Komite tarafından değerlendirilmiş ve kullanım alanları belirlenmiş transgenik çeşitler için geçerlidir. Transgeniklerin belirlenen kullanım alanlarının dışında kullanılması ve bebekler için üretilen gıdalarda kullanımı ise tamamen yasaklanmıştır.

Bu tez çalışmasında, DNA temelli yöntemler kullanılarak hem Türkiye'de üretilen hem de yurtdışından ithal edilip marketlerimizde piyasaya sunulan mısır kökenli gıdaların GDO içerikleri belirlendi. İşlenmişlik düzeyi çok düşük olan mısır unu ve cin mısırı gibi örneklerden, mısır gevreği, mısır içeren bebek mamaları gibi yüksek işlenmişlik düzeyine sahip örnekler kadar çeşitli gruplardan ürünler yabancı genler bakımından tarandı. GDO içerdiği belirlenen örneklerde, transgen miktarı kantitatif analizlerle ölçüldü.

CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen DNA izolasyonları sonucunda, elde edilen DNA'ların kalitesinin ve miktarının gıda türüne ve işlenmişlik düzeyine bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Özellikle bazı bebek maması çeşitlerinde ve nişasta örneğinde DNA veriminin düşük olmasının, üretim aşamalarındaki ayrıştırma ve saflaştırma işlemlerden dolayı DNA'nın büyük kısmının kaybedilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mısır unu, mısır cipsi, mısır gevreği örneklerinde ise konsantrasyon bakımından daha verimli fakat düşük saflıkta DNA'lar elde edildi. Bu ürünler daha yüksek oranda yağ, protein ve karbonhidrat içeriğine sahiptirler (hem mısır tanesinin besin kısmından hem de mısır dışı bileşenlerden kaynaklanan) ve DNA izolasyonu sırasında bu bileşenlerin tamamı uzaklaştırılmadığı için bu ürünlerden elde edilen DNA'lar saflık bakımından daha kalitesizdir. Buna karşılık, cin mısırı, tatlı mısır ve mısır turşusu gibi daha az işlenmiş ya da işlenmemiş ürünler ise DNA'nın kaybedilmesine ya da yapısının bozulmasına neden olacak işlemlere maruz kalmamaktadır. Ayrıca bu örneklerde, DNA izolasyonu işlemi için mısır tanesinin yalnızca embriyo kısmı (DNA'nın yoğun olarak bulunduğu) kullanıldığı için diğer örnekler göre çok daha yüksek saflıkta ve miktarda

DNA'lar elde edildi. Benzer şekilde yağ, nişasta, mısır gevreği gibi işlenmiş ürünlerde işlenmemiş ya da az işlenmiş ürünlere göre DNA'nın daha düşük verimde elde edilmesi bitkilerden üretilen gıdalarda rastlanan bir durumdur (Çetiner ve Budak, 2007; Berdal ve Host-Jensen, , 2001).

Bu tez çalışmasında kullanılan CTAB DNA izolasyon yöntemi, bazı bebek maması çeşitleri ve nişasta gibi DNA verimi az olan örnekler için bile, daha sonra PCR'la GDO analizi yapılması için güvenilirdir. Birçok PCR'a dayalı GDO analiz çalışmasında bu yöntemin başarıyla kullanıldığı literatürde gösterilmiştir (Lipp ve diğ., 1999; Jankiewicz ve diğ.,1999; Berdal ve Host-Jensen, 2001).

Yukarıda bahsedilen mısır ürünlerinde, yabancı genlerin varlığı ve miktarı, Avrupa Birliği tarafından onaylanmış pek çok transgenik mısırdaki bulunan düzenleyici diziler olan CaMV 35S promotor ve nos terminatör dizilerinin kalitatif ve kantitatif PCR analizleriyle araştırıldı. Günümüzde ekimi yapılan transgenik ticari mısır çeşitlerinin tamamı [Bt11, 59122-7, MON809, GA21, MON810, MON863, NK603, NK603xMON810, T25, MON88017, MON89034, 59122xNK603, MIR604, MON863xMON810, Bt11xGA21, MON88017xMON810, MON863xMON603, MON89034xNK603, 59122x1507xNK603, 59122x1507, MON863xMON810xNK603 (CERA, 2011)] bu dizilerin her ikisini ya da en az birini içermektedir.

35S dizisinin varlığının belirlenmesine yönelik iki farklı primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif PCR sonucunda hiçbir örnekte 35S varlığı tespit edilemedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan %0.1-5 GDO içeren Bt11 SRM örneklerinde istenilen büyüklükte bant elde edilmesi bu durumun PCR reaksiyonu koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını gösterdi. Örneklerde 35S varlığının tespit edilememesi; 35S dizisini içeren DNA miktarının tespit edilme limitinin altında olmasından, örneklerin DNA kalitesinin 35S promotor dizisinin saptanması için yeterli olmamasından (35S bölgesinde oluşan DNA kırılmaları) ya da söz konusu örneklerde GA21 ve MIR604 gibi nos terminatörünü içeren fakat 35S promotorunu içermeyen mısır çeşitlerinin (CERA, 2011) kullanılmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Nos dizisinin varlığını belirlemeye yönelik yapılan kalitatif PCR'lar sonucunda ise on üç örnekten sekizinde nos terminatör dizisinin varlığı tespit edildi ve bu sekiz gıdanın üç tanesi ülkemizde GDO kullanımının yasak olduğu bebek maması örnekleridir.

Kalitatif PCR ile GDO içeriği bakımından pozitif sonuç veren örneklerin kantitatif analizleri 'real time' PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. Çok düşük miktarda DNA içeriğini bile belirleyebilecek kadar hassas bir yöntem olan 'real time' PCR tekniği GDO analizi için çok güvenilir ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Kuribara ve diğ., 2002; Berdal ve Host-Jensen, 2001).

Kalitatif PCR analizlerinin sonucunda örneklerde 35S varlığı tespit edilemediği için 'real time' PCR analizlerinde yalnızca nos terminatör dizisine özgü primer ve prob seti kullanıldı. Kalitatif PCR analizleriyle nos dizisi içerdiği belirlenen sekiz gıda örneği ile gerçekleştirilen 'real time' PCR analiz sonuçlarına göre yalnızca bir mısır cipsi örneğinde yabancı gen oranının etiketleme eşik değeri olan %0.9'un üzerinde olduğu saptandı. Mısır nişastası, cin mısır, mısır turşusu ve tatlı mısır örneklerinde ise yabancı DNA miktarının etiketleme eşik değerinin altında olduğu saptandı. Bunun yanı sıra Biyogüvenlik Kanunu'na göre GDO kullanımının yasak olduğu bebek maması ürünlerinin % 0.03-0.15 oranında GDO içerdiğinin belirlenmesi dikkat çekici bir bulgudur.

Nos terminatörü GDO tarama çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir hedef dizidir ve piyasalardaki birçok GD ürünün yabancı gen içeriği nos dizisinin PCR'la çoğaltılmasıyla belirlenebilir. Nos terminatörü çok geniş yelpazede transgenik üründe gen anlatımının tamamlanmasını sağlayan düzenleyici dizi olarak kullanıldığı için, GDO tarama çalışmalarında çok kullanışlı ve güvenilir bir genetik elementtir. Nitekim bir çok çalışmada transgenik ürünlerin belirlenmesi için bu dizi kullanmıştır (Kuribara ve diğ., 2002; Kodama ve diğ., 2009).

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, yakın zamanda yürürlüğe girmiş olan Biyogüvenlik Kanunu gereği ülkemizde GDO'ların izlenmesi ve etiketlenmesiyle ilgili daha hassas denetimlere ihtiyaç duyulduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmanın sonucunda GDO'lu olduğu belirlenen gıdalarda, transgenik mısır çeşitlerinin ticari

tiplerinin ayırt edilebilmesi için “çeşide özel (event spesifik)” PCR analizleri ileriki çalışmalarda yapılabilir. Böylece Türkiye’de yaygın olarak kullanılan transgenik mısır çeşitleri belirlenebilir. Özellikle Avrupa Birliği’nce onaylanıp marketlerimize girdiği halde, yapılan risk değerlendirmeleri sonucunda insan sağlığı açısından çok fazla güvenilir olmadığı sonucuna ulaşılan NK 603, MON 810 ve MON 863 mısır çeşitlerinin kullanımının yaygınlığı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

ANKLAM, E., GADANI, F., HEINZE, P., PIJNENBURG, H. ve EEDE G.V.D., 2002, Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*, 214(1), 3-26.

APPENZELLER, L.M., MALLEY, L., MACKENZIE, S.A., HOBAN, D. ve DELANEY, B., 2009, Subchronic feeding study with genetically modified stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DAS-Ø15Ø7-1×DAS-59122-7) maize grain in Sprague–Dawley rats, *Food Chem Toxicol*, 47(7), 1512–1520.

ARMSTRONG, C.L., PARKER, G.B., PERSHING, J.C., BROWN S.M., SANDERS, P.R., DUNCAN, D.R., STONE, T., DEAN, D.A., DEBOER, D.L., HART, J., HOWE, A.R., MORRISH, F.M., PAJEAUM, M.E., PETERSEN, W.L., REICH, B.J., RODRIGUEZ, R., SANTINO, C.G., SATO, S.J., SCHULER, W., SIMS, R., STEHLING, S., TAROCHIONEL, L.J. ve FROMM, M.E., 1995, Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*, *Crop Sci*, 35(2), 550–557.

Avrupa Komisyonu, 1997, EC 258/97 the Novel Foods Regulation.

Avrupa Komisyonu, 2003, EC 1830/2003 Genetically modified food and feed: concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.

Avrupa Komisyonu, 2010, *EU register of genetically modified food and feed*, http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm [Ziyaret Tarihi: 22.11.2010]

BERDAL, K.G. ve HOST-JENSEN, A., 2001, Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses, *Eur Food Res Technol*, 213, 432–438.

Birleşmiş Milletler Biyoçeşitlilik Sözleşmesi, 1992, Rio de Janerio.

Bilimsel Komite, 2011, GDO Bilimsel Komite Kararı, http://www.tagem.gov.tr/pdf/gdo_komite.pdf, [Ziyaret Tarihi: 02.07.2011]

BRADY, C.J., MCGLASSON, W.B., PEARSON, J.A., MELDRUM, S.K. ve KOPELIOVITCH, E., 1985, Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium, and firmness in tomato fruit, *J Am Soc Hortic Sci*, 110 (2), 254-258.

BROOKES, G. ve BARFOOT, P., 2009, *GM Crops: Global Socio-economic and Environmental Impacts 1996-2007*, P.G. Economics Ltd, Dorchester, UK, 1-109

BUDD, R., 1991, Biotechnology in the 20th century, *Soc. Stud. Sci.*, 21(3), 415–457.

BUDD, R., 1993, 100 years of biotechnology, *Biotechnology (NY)*, 11, 14–15.

Cartagena Biyogüvenlik Protokolü, 2000, Montreal.

CERA (The Center for Environmental Risk Assessment), <http://cera-gmc.org/>, [Ziyaret Tarihi: 10.06.2011]

CHENG, M., FRY, J., PANG, S., ZHOU, H., HIRONAKA, C.M., DUNCAN, D.R., CONNER, T.W. ve WAN, Y., 1997, Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Physiol*, 115(3), 971–980.

CHRISPEELS, M. J. ve SADAVA, D. E., 2003, *Plants, Genes and Crop Biotechnology*, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 0-7637-1586-7.

CRL-GMFF (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed), 2007, Maize seeds sampling and DNA extraction- Report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds, <http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm> [Ziyaret Tarihi: 06.07.2011]

CRL-GMFF (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed), 2008, Report on the validation of a DNA extraction method from soybean seeds, http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON89788_Soya_DNAExtrSampl_report.pdf, [Ziyaret Tarihi: 06.07.2100]

ÇETİNER, S. ve BUDAK, H., 2007, *Genetiği değiştirilmiş (transgenik) ürünlerin moleküler analizi ve tüketim zincirindeki izlenebilirliğine yönelik tekniklerin geliştirilmesi ve uygulanması*, TÜBİTAK projesi, proje No: 1050072.

De VENDÔMOIS J.S., ROULLIER, F., CELLIER, D. ve SÉRALINI, G., 2009, A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health, *Int J Biol Sci*, 5(7), 706–726.

D'HALLUIN, K., BONNE, E., BOSSUT, M., De BEUCKELEER, M. ve LEEMANS J., 1992, Transgenic maize plants by tissue electroporation, *Plant Cell*, 4(12), 1495–1505.

DIDENKO, V.V., 2001, DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Designs and applications, *Biotechniques*, 31(5), 1106-1121.

DOMINGO, J.L. ve BORDONABA, J.G., 2011, A literature review on the safety assessment of genetically modified plants, *Environ Int*, 37(4), 734-742.

DOULL, J., GAYLOR, D., GREİM, H.A., LOVELL, D.P., LYNCH, B. ve MUNRO, I.C., 2007, Report of an expert panel on the reanalysis by Séralini et al. (2007) of a 90-day study conducted by Monsanto in support of the safety of a genetically modified corn variety (MON 863), *Food Chem Toxicol*, 45(11), 2073–2085.

FROMM, M.E., MORRISH, F., ARMSTRONG, C., WILLIAMS, R., THOMAS, J. ve KLEIN, T.M., 1990, Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants, *Biotechnology (N Y)*, 8, 833–839.

GMDD: a database of GMO detection methods, <http://gmdd.shgmo.org/primer/list>, [Ziyaret Tarihi: 13.06.2011].

GORDON-KAMM, W.J., SPENCER, T.M., MANGANO, M.L., ADAMS, T.R., DAINES, R.J., START, W.G., O'BRIEN, J.V., CHAMBERS, S.A., ADAMS JR, W.R., WILLETTS, N.G., RICE, T.B., MACKEY, C.J., KRUEGER, R.W., KAUSCH, A.P. ve LEMAUX P.G., 1990, Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, *Plant Cell*, 7(2), 603-618.

GOLOVKIN, M.V., ABRAHIM, M., MEROCZ, S., BOTTKA, S., FEHER, A. ve DUDITS, D., 1993, Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts, *Plant Sci*, 90, 41-52.

GRAVES, A.C.F. ve GOLDMAN, S.L., 1986, The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol Biol*, 7(1), 43-50.

GUPTA, M. ve RAM, R., 2004, *Development of Genetically Modified Agronomic Crops*, (ed.) PAREKH, S.R., The GMO handbook : genetically modified animals, microbes, and plants in biotechnology, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1-59259-801-3.

HAMAKER, B.R. ve LARKINS, B.A., 2002, Maize Food and Feed: A Current Perspective and Consideration of Future Possibilities, (ed.) KHACHATOURIAN, G.G. ve diğ., *Transgenic plants and crops*, Marcel Dekker, New York, 0-8247-0545-9.

HE, X.Y., HUANG, K.L., LI, X., QIN, W., DELANEY, B. ve LUO, Y.B., 2008, Comparison of grain from corn rootworm resistant transgenic DAS-59122-7 maize with non-transgenic maize grain in a 90-day feeding study in Sprague-Dawley rats, *Food Chem Toxicol*, 46(6), 1994-2002.

HEALY, C., HAMMOND, B. ve KIRKPATRICK, J., 2008, Results of a 13-week safety assurance study with rat fed grain from corn rootworm-protected, glyphosate-tolerant MON 88017 corn, *Food Chem Toxicol*, 46(7), 2517-2524.

HEILD, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J. ve WILLIAMS P.M., 1996, Real-time quantitative PCR, *Genome Res*, 6(10), 986-994.

HEMMER, W., 1997, *Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*, BATS-Report 2/1997, Basel, Switzerland.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S. ve GRIFFITH, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *BioTechnology*, 10, 413-417.

HOBSON, G.E., 1965, The ripening of tomato fruit as affected by the injection of certain chemicals, *J Exp Bot*, 16(3), 411-422.

HOTZEL, H., MULLER, W. ve SACHSE, K., 1999, Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients, *Eur Food Res Technol*, 209 (3-4), 192-196.

- HUFFMAN, W.E., 2004, Production, identity preservation, and labeling in a marketplace with genetically modified and non-genetically modified foods. *Plant Physiol*, 134 (1), 3-10.
- HUPFER, C., HOTZEL, H., SACHSE, K. ve ENGEL, K.H., 1998, Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206(3), 203-207.
- ILTIS, H.H., 1972, The taxonomy of *Zea mays* (Gramineae), *Phytol*, 23(2), 248-249.
- ISHIDA, Y., SAITO, H., OHTA, S., HIEI, Y., KOMARI, T. ve KUMASHIRO, T., 1996, High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Nat Biotechnol*, 14, 745-750.
- JAMES, C., 2009, *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009*, ISAAA Brief No.41, ISAAA, Ithaca, NY.
- JAMES, C., 2010, *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010*, ISAAA Brief No.42, ISAAA, Ithaca, NY.
- JANKIEWICZ, A., BROLL, H. ve ZAGON, J., 1999, The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG § 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer), *Eur Food Res Technol*, 209, 77-82.
- JUBERG, D.R., HERMAN, R.A., THOMAS, J., BROOKS, K.J. ve DELANEY, B., Acute and repeated dose (28 day) mouse oral toxicology studies with Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Bt proteins used in coleopteran resistant DAS-59122-7 corn, 2009, *Regul Toxicol Pharmacol*, 54(2), 154-163.
- KODAMA, T., KURIBARA, H., MINEGISHI, Y., FUTU, S., WATAI, M., SAWADA, C., WATANABE, T., AKIYAMA, H., MAITANI, T., TESHIMA, R., FURUI, S., HINO, A. ve KITTA, K., 2009, Evaluation of Modified PCR Quantitation of Genetically modified maize and soybean using reference molecules: interlaboratory study, *J AOAC Int*, 92(1), 223-233.
- KRAMER, M., SANDERS, R., BOLKAN, H., WATERS, C., SHEENY, R.E. ve HIATT, W.R., 1992, Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance, *Postharvest Biol Technol*, 1(3), 241-255.
- KRAMER, M.G. ve REDENBAUGH K., 1994, Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story, *Euphytica*, 79(3), 293-297.
- KURIBARA, H., SHINDO, Y., MATSUOKA, T., TAKUBO, K., FUTU, S., AOKI, N., HIRAO, T., AKIYAMA, H., GODA, Y. TOYADA, M. ve HINO, A., 2002, Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, *J AOAC Int*, 85(5), 1077-1089.

LAURA, B., PETRA, H., SIMON, K. ve GUY V.E., 2001, *Review of GMO detection and quantification techniques*, European Commission Joint Research Centre (JRC), Ispra.

LEE, T.C., ZENG, J., BAILEY, M., SIMS, S.R., SANDERS, P.R. ve FUCHS, R.L., 1995, Assessment of the equivalence of the *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1 protein produced in *Escherichia coli* and European Corn Borer resistant, *Plant Physiol Suppl*, 108, 151.

LIPP, M., BRODMANN, P., PIETSCH, K., PAUWELS, J. ve ANKLAM, E., 1999, IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder, *J AOAC Int*, 82(4), 923-928.

MACKENZIE, S.A., LAMB, I., SCHMIDT, J., DEEGE, L., MORRISEY, M.J., HARPER, M., LAYTON, R.J., PROCHASKA, L.M., SANDERS, C., LOCKE, M., MATTSSON, J.L., FUENTES, A. ve DELANEY B., 2007, Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-Ø15Ø7-1 in Sprague–Dawley rats, *Food Chem Toxicol*, 45(4), 551–562.

MALLEY, L.A., EVERDS, N.E., REYNOLDS, J., MANN, P.C., LAMB, I., ROOD, T., SCHMIDT, J., LAYTON, R.J., PROCHASKA, L.M., HINDS, M., LOCKE, M., CHUI, C.F., CLAUSSEN, F., MATTSSON, J.L. ve DELANEY, B., 2007, Subchronic feeding study of DAS-59122-7 maize grain in Sprague–Dawley rats, *Food Chem Toxicol*, 45(7), 1277–1292.

MELZAK, K.A., SHERWOOD, C.S., TURNER, R.F.B. ve HAYNES, C.A., 1996, Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions, *J Colloid Interface Sci*, 181(2), 635–644.

MURRAY, H.G. ve THOMPSON, W.F., 1980, Rapid extraction of high molecular weight DNA, *Nucleic Acids Res*, 8(19), 4321–4325.

PAREDDY, D., PETOLINO, J., SKOKUT, T., HOPKINS, N., MILLER, M., WELTER, M., SMITH, K., CLAYTON, D., PESCIPELLI, S. ve GOULD, A., 1997, Maize transformation via helium blasting, *Maydica*, 42(2), 143-154.

PAREKH, S.R. ve GREGG, A., 2004, *Introduction*, (ed.) PAREKH, S.R., The GMO handbook : genetically modified animals, microbes, and plants in biotechnology, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1-59259-801-3.

PESCIPELLI, S.M. ve SUKHAPINDA K., 1995, Stable transformation via electroporation into maize Type II callus and regeneration of fertile plants, *Plan Cell Rep*, 14(11), 712–716.

PIETSCH, K., WAIBLINGER, H.U., BRODMANN, P. VE WURZ, A., 1997, Screening methods for identification of genetically modified food of plant origin, *Dtsch Lebensm Rundsch*, 93(2), 35–38.

POMS, R.E., GLOSSL, J. ve FOISSY, H., 2001, Increased sensitivity for detection of specific target dna in milk by concentration in milk fat, *Eur Food Res Technol*, 213 (4-5), 361-365.

QUERCI, M., 2010, *El Kitabının Sunumu, Çalışma Yöntemleri ve Kurs Bilgileri, Bölüm-2*, (ed.) QUERCI, M. ve diğ., Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs Elkitabı, Avrupa Birliği, Luxembourg.

QUERCI, M., VAN den EEDE, G. ve JERMINI, M., 2006, *Overview, General introduction on genetically modified organisms (GMOs), Session-1, EU Legislation*, (ed.) QUERCI, M. ve diğ., Training course on: The Analysis of Food Samples for The Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, European Communities, Luxembourg.

QUERCI, M. ve MAZZARA, M., 2006, *Characteristics of Roundup Ready Soybean, MON810 Maize and Bt-176*, Seseion-7, (ed.) QUERCI, M. ve diğ., Training course on: The Analysis of Food Samples for The Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, European Communities, Luxembourg.

Resmi Gazete, 2009, Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik.

Resmi Gazete, 2010, Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik.

Resmi Gazete, 2010, Biyogüvenlik Kanunu, Kanun no.5977.

RIRIE, K.M., RASMUSSEN, R.P. ve WITTEWER, C.T., 1997, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal Biochem* 245(2), 154-160.

SANFORD, J.C, KLEIN, T.M. ve WOLF, E.D., 1987, Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process, *Particulate Sci Technol*, 5(1), 27-37.

SÉRALINI, G., CELLIER, D. ve De VENDOMOIS, J.S., 2007, New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity, *Arch Environ Contam Toxicol*, 52(4), 596-602.

SHEEHY, R.E., PEARSON, J., BRADY C.J. ve HIATT, W.R., 1987, Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase, *Mol Gen Genet*, 280(1-2), 30-36.

SOMMA, M., 2006, *Extraction and Purification of DNA, Session-4*, (ed.) QUERCI, M. ve diğ., Training course on: The Analysis of Food Samples for The Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, European Communities, Luxembourg.

SOMMA, M. ve QUERCI, M., 2010, *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Bölüm-6*, (ed.) QUERCI, M. ve diğ., Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs Elkitabı, Avrupa Birliği, Luxembourg.

SPENCER, T.M., O'BRIEN, J.V., START, W.G., ADAMS, T.R., GORDON-KAMM, W.J. ve LEMAUX, P.G., 1992, Segregation of transgenes in maize, *Plant Mol Biol*, 18(2), 201–210.

SPOTH, B. ve STRAUSS, E., 1999, Screening for genetically modified organisms in food using Promega's wizard resin, *Promega Notes Magazine*, 73, 23–25.

TAN, T., 2008, GM crops a viable option for food crisis, The Strait Times, Singapore, http://www.gmac.gov.sg/News/2008/2008_05_12.html [Ziyaret Tarihi: 12.05.2008].

TUTEL'IAN, V.A., GAPPAROV, M.M.G., AVRENIEVA, L.I., AKSYUK, I.N., GUSEVA, G.B., KRAVCHENKO, L.V., L'VOVA, L.S., SAPRYKIN, V.P., TYSHKO, N.V. ve CHERNYSHEVA, O.N., 2008, Medical and biological safety assessment of genetically modified maize event MON 88017. Report 1. Toxicologo-hygienic examinations, *Vopr Pitan*, 77(5), 4-12.

TUTEL'IAN, V.A., GAPPAROV, M.M.G., AVRENIEVA, L.I., AKSYUK, I.N., GUSEVA, G.B., KRAVCHENKO, L.V., L'VOVA, L.S., SAPRYKIN, V.P., TYSHKO, N.V. ve CHERNYSHEVA, O.N., 2009, Medical and biological safety assessment of genetically modified maize event MIR604:Report 1. Toxicologo-hygienic examinations, *Vopr Pitan*, 78(2), 24–32.

TYAGI, S. ve KRAMER, F.R., 1996, Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization, *Nat Biotechnol*, 14, 303–308.

TYSHKO, N.V., BRITSINA, M.V., GMOSHINSKY, I.V., ZHANATAEV, A.K., ZAKHAROVA, N.S., ZORIN, S.N., MAZO, V.K. ve SEMENOV, B.F., 2008, Medical and biological safety assessment of genetically modified maize event MON 88017. Report 2. Genotoxicologic, immunologic and allergologic examinations, *Vopr Pitan*, 77(5), 13–7.

USINFO, 2003, *Biyoteknoloji Terimleri Sözlüğü*, Amerika Birleşik Devletleri Dışişleri Bakanlığı.

WHITCOMBE, D., THEAKER, J., GUY, S.P., BROWN, T., LITTLE, S., 1999, Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, *Nat Biotechnol*, 17, 804–807.

WITTEWER, C.T., HERRMAN, M.G., MOSS, A.A., RASMUSSEN, R.P., 1997, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle dna amplification, *Biotechniques*, 22(1), 130–134.

YOSHIDA, K. ve SHINMYO, A., 2000, Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor, *J Biosci Bioeng*, 90 (4), 353-362.

ZHONG, G.Y., PETERSON, D., DELANEY, D.E., BAILEY, M., WITCHER, D.R., REGISTER, J.C., BOND, D., LI, C.P., MARSHALL, L., KULISEK, E., RITLAND, D., MEYER, T., HOOD, E.E. ve HOWERD, J.A., 1999, Commercial production of aprotinin in transgeneic maize seeds, *Mol Breed*, 5, 345–356.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara’da doğdum. Orta ve Lise öğrenimimi sırasıyla Mustafa Kemal Lisesi ve Eryaman Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2002 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimime başladım. 2008 yılında lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik AnaBilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimime başladım.