



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Yüksek Lisans Tezi**

**YEMLİK SOYA'DA GDO ANALİZİ VE TUZ STRESİ ALTINDA  
GENOMİK ANALİZLER**

**Olçay ŞAHİN**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

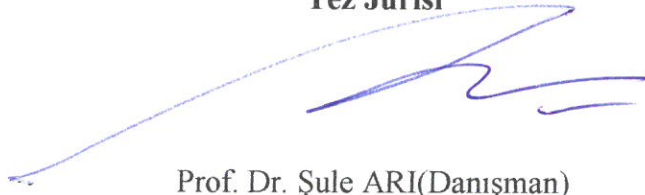
**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Şule ARI**

**Şubat, 2019**

**İSTANBUL**

Bu çalışma, 28.02.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

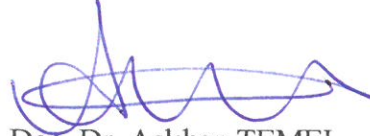
**Tez Jürisi**



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



Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI  
İstinye Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Aslıhan TEMEL  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 22309 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim süresince bana fikirleriyle yol gösteren, hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen, her durumda beni cesaretlendiren danışman hocam **Prof. Dr. Şule ARI**'ya tüm emekleri için en içten dileklerle teşekkür ederim.

**Türkiye Yem Sanayicileri Birliği**'ne çalışma materyalimin teminine katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Deneylerim süresince elinden gelen tüm yardımları yapan **Dr. Elif KARLIK** ve **Sinan MERİÇ**'e bana öğrettikleri ve gösterdikleri her şey için çok teşekkür ederim. İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarındaki çalışanlarına, çok değerli hocam ve arkadaşlarım **Doç. Dr. Aslıhan TEMEL**, **Araş. Gör. Burcu ARIKAN**, **Nagihan TOMBUL**, **Dilan BAL**, **Bereste BALCI**, **Aslıhan ŞENGELEN**, **Utku GÜNEŞ**, **Yunus AKSÜT**, **İlayda GÖKTEPE**, **Bekir Ahmet ILGAR**, **Burcu KARPUZ**, **Gizem ELMALI** ve **Rabia Merve CEYLAN**'a çok teşekkür ederim. Manevi olarak her zaman yanımda olduğunu bildiğim ve hissettiğim değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**'ye çok teşekkür ederim.

Her zaman kararlarımda beni destekleyip mesafelere rağmen yanımda olan **Elif GÜNALAN**, **Resul ÖZBİLGİÇ** ve **Fatma KELLEÇİ**'ye, bana hiçbir zaman yalnız hissettirmedikleri için çok teşekkür ederim.

Bütün bu süreçte büyük fedakarlıklarla ellerindeki tüm imkanları sunmaktan asla çekinmeyen başta annem **Emine TOKSÖZ** ve babam **Memet ŞAHİN** olmak üzere bütün **AİLEM**'e, ayrıca bana inandığını hep gösteren **Önder ŞAHİN**'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Şubat 2019

Olca ŞAHİN

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ .....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xiii
SUMMARY .....	xv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>7</b>
2.1. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLER .....	7
2.2. GENETİK TRANSFORMASYON .....	10
2.3. RİSK DEĞERLENDİRMELERİ .....	12
2.4. SOYA FASULYESİ .....	13
2.4.1. Yemlik Soya .....	15
2.5. TUZLULUK .....	17
2.6. TRANSPOZONLAR .....	18
2.6.1. Retrotranspozonlar .....	19
2.6.2. <i>Sire1</i> .....	20
2.7. RETROTRANSPOZON ANALİZLERİ .....	20
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>22</b>
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	22
3.2. GDO TARAMASI.....	22
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu .....	22
3.2.2. Genomik DNA'nın Kalitatif Ve Kantitatif Analizleri .....	24
3.2.2.1. <i>Agaroz Jel Elektroforezi</i> .....	24
3.2.2.2. <i>Spektrofotometrik Analiz</i> .....	25
3.2.3. Yemlik Soyada CaMV 35S Promotor Ve Nos Terminatör Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Taranması .....	26
3.2.4. GDO Çeşidinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Belirlenmesi.....	27
3.3. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ .....	29

3.4. BİTKİLERE TUZ STRESİ UYGULAMASI.....	29
3.4.1. Hoagland Solüsyonunun Hazırlanması .....	30
3.4.2. Bitkilerin Fizyolojik Analizi .....	30
3.4.3. İstatistiksel Analizler .....	31
3.5. EPSPS GEN ANLATIM ANALİZİ.....	31
3.5.1. RNA İzolasyonu .....	31
3.5.1.1. RNA'nın Miktar ve Saflığının Ölçümü.....	32
3.5.1.2. RNA'nın Jel Elektroforez Analizi.....	33
3.5.2. cDNA Sentezi .....	33
3.5.3. Gerçek Zamanlı (RT) PZR.....	34
3.6. SIRE1 RETROTRANSPOZON ANALİZİ .....	34
3.6.1. IRAP PZR İle Polimorfizm Analizi .....	34
3.6.2. Polimorfizmin Hesaplanması .....	35
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
4.1. YEMLİK SOYANIN DNA MİKTAR VE SAFLIĞI .....	36
4.2. YEMLİK SOYADA GDO TANISI VE ÇEŞİT SAPTANMASI.....	36
4.2.1. 35S Promotoru ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması.....	37
4.2.2. Roundup Ready Çeşidinin PZR İle Saptanması .....	38
4.3. YEMLİK SOYALARDA TUZ STRESİNİN ETKİLERİ .....	39
4.3.1. Gövde Uzunluğu .....	40
4.3.2. Kök Uzunluğu.....	41
4.3.3. Yaprak Alanı.....	41
4.4. ROUNDUP READY ÇEŞİDİNİN GERÇEK ZAMANLI (RT) PZR İLE SAPTANMASI .....	42
4.4.1. RNA'nın Miktar ve Saflığı .....	42
4.4.2. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları.....	43
4.5. IRAP PZR İLE SIRE1 RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ.....	43
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>59</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 1.1: Bitki biyoteknolojisindeki önemli olayların zaman çizelgesi (Francis, Finer ve Grotewold, 2017). .....	1
Şekil 1.2: GD ürünlerin küresel pazardaki değeri, 1996-2017 (Milyar Dolar).....	2
Şekil 2.1: Transgenik ürünlerin yıllar içinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ekim alanlarındaki değişim grafiği. Mavi çizgi, gelişmiş ülkeleri; sarı çizgi, gelişmekte olan ülkeleri temsil etmektedir (James, 2017). .....	9
Şekil 2.2: RoundUp Ready soya çeşidine ait gen kasetinin şematik gösterimi. P-35S: Karnabahar mozaik virüsünün 35S promotör dizisini, CTP4: <i>Petunia hybrida</i> kaynaklı kloroplast transit peptidini, CP4 <i>EPSPS</i> : <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4 suşunun 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz genini, T-nos: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> kaynaklı NOS terminatör dizisini göstermektedir (Querci, 2006). .....	12
Şekil 2.3: Transgenik bitkilerin küresel ekim alanları (James, 2017). .....	18
Şekil 2.4: Transgenik bitkilerin tuzlu topraklardaki ekim alanları. ....	18
Şekil 3.1: Yemlik soyların çimlendirilmeleri .....	29
Şekil 4.1: Yemlik soylardan genomik DNA'nın elektroforez jel görüntüsü. ....	36
Şekil 4.2: Yemlik soya DNA'sında 35S Gradient PZR jel elektroforezi. ....	37
Şekil 4.3: Yemlik soya DNA'sında NOS gradient PZR jel elektroforezi. ....	38
Şekil 4.4: Yemlik soyların RRS PZR jel elektroforez sonucu. ....	38
Şekil 4.5: Optimal koşullarda üç yapraklı aşamaya gelene kadar yetiştirilen 4 günlük soya bitkileri. ....	39
Şekil 4.6: Kontrol ve 14 gün boyunca 80mM, 120mM, 160mM, 200mM tuz stresi uygulanmış bitkilerin 14. gündeki görüntüleri. ....	40
Şekil 4.7: Kontrol ve 14 gün tuz stresine maruz bırakılan 14 günlük bitkilere ait gövde uzunluğu grafiği. ....	40
Şekil 4.8: Kontrol ve 14 gün tuz stresine maruz bırakılan 14 günlük bitkilere ait kök uzunluğu grafiği. ....	41
Şekil 4.9: Kontrol ve 14 gün tuz stresine maruz bırakılan 14 günlük bitkilere ait yaprak alanı grafiği. ....	42

<b>Şekil 4.10:</b> Tuz stresi uygulanmış (80mM, 120mM, 160mM, 200mM) 14 günlük bitkilerin yapraklarından elde edilen RNA izolatlarının örnek agaroz jel görüntüsü .....	42
<b>Şekil 4.11:</b> <i>CTP4-CP4 EPSPS</i> bölgesine ait 120mM tuz konsantrasyonunda yetişen soyanın Gerçek Zamanlı PZR çoğaltım grafiği. ....	43
<b>Şekil 4.12:</b> <i>SIRE1</i> IRAP PZR sonuçları. ....	44
<b>Şekil 4.13:</b> <i>SIRE1</i> IRAP PZR sonuçlarına göre bitkilerin GelJ v.2.0 programı kullanılarak bant profillerine göre kümelmesi. ....	46



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 1.1:</b> GD bitkilere kazandırılan özelliklere göre küresel ekim alanı (James, 2017) .....	3
<b>Tablo 2.1:</b> Transgenik ürün bitkilerinin küresel ekim alanları (James, 2017).....	8
<b>Tablo 2.2:</b> Soyanın taksonomisi. ....	14
<b>Tablo 2.3:</b> 100 gram soyanın içerdiği besin değeri (USDA, Nutrient Database for Standart Reference, 2018).....	14
<b>Tablo 2.4:</b> Türkiye soya arz ve kullanımı, bin ton (Taşçı ve Uçum, 2018).....	15
<b>Tablo 2.5:</b> Biyogüvenlik Kurulu tarafından onaylanan GD soya listesi.....	16
<b>Tablo 3.1:</b> CTAB yönteminde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri .....	22
<b>Tablo 3.2:</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler .....	25
<b>Tablo 3.3:</b> Yemlik soyada GDO analizi için kullanılan primer dizileri.....	26
<b>Tablo 3.4:</b> 35S ve NOS PZR bileşenleri .....	27
<b>Tablo 3.5:</b> 35S Gradient PZR programı.....	27
<b>Tablo 3.6:</b> NOS Gradient PZR programı .....	27
<b>Tablo 3.7:</b> RRS PZR bileşenleri .....	28
<b>Tablo 3.8:</b> RRS PZR programı .....	28
<b>Tablo 3.9:</b> Roundup Ready çeşit belirlenmesinde kullanılan primerler .....	29
<b>Tablo 3.10:</b> Hoagland solüsyonu için gerekli solüsyon içerikleri.....	30
<b>Tablo 3.11:</b> cDNA sentez reaksiyonunun bileşenleri.....	33
<b>Tablo 3.12:</b> cDNA sentez reaksiyonunun koşulları. ....	33
<b>Tablo 3.13:</b> Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri. ....	34
<b>Tablo 3.14:</b> Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları. ....	34
<b>Tablo 3.15:</b> IRAP polimeraz zincir reaksiyon bileşenleri. ....	35
<b>Tablo 3.16:</b> IRAP PZR koşulları. ....	35

**Tablo 3.17:** *SIRE1* IRAP primeri dizisi ve bağlanma sıcaklığı. ....35

**Tablo 4.1:** IRAP-PCR sonuçlarına göre hesaplanan *SIRE1* retrotranspozonuna ait polimorfizm yüzdeleri. ....45



## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
cm <sup>2</sup>	: Santimetrekaare
g	: Gram
°C	: Santigrat Derece
v	: Hacim (“Volume”)
V	: Volt
w	: Ağırlık (“Weight”)

Kısaltmalar	Açıklama
Bç	: Baz çifti
Bt	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus (Karnabahar Mozaik Virüs)
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromür
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincir DNA
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
EPSPS	: 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz
GD	: Genetiği Değiştirilmiş
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GDB	: Genetiği Değiştirilmiş Bitki

<b>GS</b>	: Glutamin sentetaz
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>ISAAA</b>	: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi)
<b>MgCl<sup>2</sup></b>	: Magnezyum klorür
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	: Disodyum etilendiamin tetra asetik asit
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>Nos</b>	: Nopalin sentaz
<b>O.D.</b>	: Optik yoğunluk
<b>PAT</b>	: Fosfinotrisin asetiltransferaz
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>rDNA</b>	: Rekombinant DNA
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>TAE</b>	: Tris-Asetat-EDTA
<b>T-DNA</b>	: Transfer DNA
<b>USDA</b>	: United States Department of Agriculture

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### YEMLİK SOYA'DA GDO ANALİZİ VE TUZ STRESİ ALTINDA GENOMİK ANALİZLER

**Olca ŞAHİN**

**İstanbul Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman : Prof. Dr. Şule ARI**

Küresel nüfusun hızlı artışıyla beraber değişen iklim koşullarındaki olumsuzluklar, su kaynaklarının ve tarımı yapılabilecek arazilerin azalması, artan nüfusun güvenilir ve sürdürülebilir şekilde beslenmesini zorlaştırmıştır. Birim alandan elde edilen verimin artırılması gerekliliği, modern biyoteknoloji yöntemleri sayesinde ürün bitkilerine böceklere, herbisit ve pestisitlere direnç, çevresel stres koşullarına karşı tolerans gibi özelliklerinin kazandırılmasıyla büyük oranda karşılanmıştır. 1996'da ilk defa ticarileştirildiklerinden günümüze kadar ekim alanları ve kullanımları hızlı bir şekilde artan genetiği değiştirilmiş (GD, transgenik) bitkilerin, ürün verimini %22 ve çiftçi kârını %68 artırdığı, kimyasal böcek ilacı kullanımını %37 azalttığı belirlenmiştir. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) in insan, hayvan ve bitki sağlığı açısından güvenlik değerlendirmelerine tabi tutulmaları zorunludur. Ancak mevcut risk değerlendirme yöntemleri, genetik transformasyona bağlı olarak GD organizmaların genomlarında meydana gelen ya da gelebilecek “beklenmeyen etkiler”in belirlenebilmesi için yeterince ayrıntılı bilgi vermemektedir. Genom analizlerine dayalı araştırmalar tarımı yapılan GD bitkilerde biyotik ve abiyotik stres gibi belirli koşulların “beklenmeyen etkiler”in sıklığını artırdığı göstermiştir.

Bu tez çalışmasında GD organizmaların genomunda “beklenmeyen etkiler”in araştırılması amacıyla yemlik GD soyların tuz stresi koşullarında gen anlatımı ve transpozon hareketliliği analizleri gerçekleştirildi. Türkiye Yem Sanayicileri Birliği’nden temin edilen ithal yemlik soylarda 35S promotör ve Nos terminatör bölgelerinin belirlenmesine yönelik bulk Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizi ile GDO taraması yapıldı. GD oldukları saptanan soyların transgen çeşidinin belirlenmesi için, ilk ticari transgenik soya çeşidi olan ve halen günümüzde dünya genelinde en yaygın ekimi yapılan Roundup Ready Soya (RRS) nın içerdiği *EPSPS* gen bölgesine özgü primerler kullanılarak PZR analizi yapıldı, %20 sinin Roundup Ready diğer adıyla GTS-40-3-2 olduğu belirlendi. İthal yemlik soylar ve İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik GDO laboratuvar stoğunda bulunan, tez çalışmasında kontrol olarak kullanılan yerli soylar 14 gün boyunca tuz stresine (80mM, 120mM, 160mM, 200mM) maruz bırakıldı. Süre sonunda denenen farklı tuz konsantrasyonlarından 120mM’ın, her iki gruptaki bitkilerin görünümünde yarattığı etkiler bakımından eşik değer olduğu tespit edildi. Kontrol ve tuzlulukta yetiştirilen 14 günlük bitkilerin yapraklarından *EPSPS* geninin anlatım analizi Gerçek Zamanlı (RT) PZR ile yapıldı. Analiz sonucunda, sadece 120mM tuz konsantrasyonuna maruz kalmış iki bitki RR soya olarak belirlendi. Bu nedenle kontrol ile farklı tuz konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerde *EPSPS* geninin anlatım farklılığı karşılaştırılmadı. Tuzluluğun, GD organizmaların genomunda meydana getirebileceği “beklenmeyen etkiler”den, transpozon hareketliliğinin analizine yönelik olarak 14 gün tuz stresine maruz bırakılan yerli ve 120mM tuz stresinde yetişmiş GD soylarda *SIRE1* retrotranspozonu için IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) PZR yapıldı. *SIRE1* için tuz stresi altında yetiştirilen bitkiler arasındaki polimorfizm oranı %0-90 oranında bulundu. Bu sonuçlara göre *SIRE1* retrotranspozonunun tuzluluk stresi altında hareket ettiği düşünüldü. GD soyada ise kontrole göre *SIRE1* retrotranspozonunun hareketliliğine bağlı olarak %33 polimorfizm artışı gözlemlendi.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, çevresel stres koşullardan biri olan tuzluluğun transpozon hareketliliğini artırmak yoluyla GD bitkilerin genom organizasyonlarını etkileyebileceğini gösterdi. Bu durum, GD organizmaların genomlarında meydana gelen “beklenmeyen etkiler”in daha ayrıntılı bir biçimde araştırılmasının, ticari GD’lerin tarımda sürdürülebilirlikleri bakımından önemli olduğunu düşündürmüştür.

Şubat 2019, 76 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** GDO, Roundup Ready Soya, Tuz stresi, Transpozon analizi

## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **GMO ANALYSIS AND GENOMIC ANALYSIS UNDER SALINITY STRESS IN FEEDER SOYBEAN**

**Olcaş ŞAHİN**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. Şule ARI**

With the rapid increase in the global population, the negativities in the changing climate conditions, the decrease of water supplies and the agricultural terrains have made difficult to feed the growing population reliably and sustainably. By means of biotechnology methods, the necessity to increase the efficiency obtained from the unit area have been met by transferring some traits such as resistance to insects, herbicides and pesticides and tolerance to environmental stress conditions to crop plants. It is determined that transgenic plants whose cultivation areas and uses have been increased rapidly because they have been commercialized for the first time in 1996, have decreased the use of insecticides by 37% and increased the yield by 22% and profit of farmers by 68%. Genetically modified organisms (GMOs) are subject to safety assessments for human, animal and plant health. However, current risk assessment methods cannot provide detailed information to determine the “unexpected effects” that occurred in genomes of GD organisms due to genetic transformation. Genome-based studies have shown that under certain conditions such as biotic and abiotic stress, the frequency of “unexpected effects” may increase.

In this thesis, so as to study the unexpected effects on the genome of GD organisms, gene expression, and transposon mobility analyzes were carried out under the conditions of salt stress in feed GM soybeans. First, GMO screening was performed with bulk Polymerase Chain Reaction (PCR) for the determination of 35S promoter and Nos terminator regions of imported

feeding soybeans supplied by Feed Industrialists Association of Turkey. In order to determine the transgene events of the soybeans identified as GM, PCR analysis was performed by using primers specific to the *EPSPS* gene region which was the first commercial transgenic soybean event and still present today, the most common commercial event, Roundup Ready soybean (RRS). It was determined that 20% of feed soybeans were Roundup Ready (GTS-40-3-2). Domestic (as control) and imported feed soybeans that are found in the stock of Istanbul University Molecular Biology and Genetic GMO laboratory, were subjected to salt stress for 14 days. At the end of this period, it was determined that 120mM from different salt concentrations tested was the threshold value in the appearance of the plants in both groups. Expression analysis of *EPSPS* gene which is included in RR soybean event was performed by using qPCR on the 14th day of salt stress or control. As a result of the analysis, two out of these plants exposed to the salt stress (120 mM concentration) were determined as RR event soybean. Therefore, the expression differences of plants exposed to different concentration of salt stress could not be compared with the control group which relies on the differences on *EPSPS* gene.

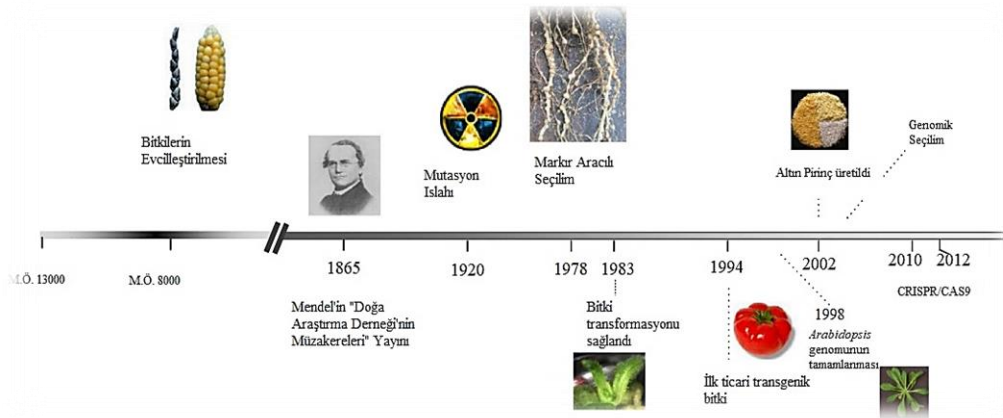
In order to analyze the transposon mobility from the unexpected effects of salinity on the genome of GMOs, IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) PCR was performed for *SIRE1* retrotransposon in domestic and transgenic soybean (Both of them were exposed to 120mM salt stress for 14 days). For *SIRE1* the ratio of polymorphism among the plants which are grown under salt stress found to be 0-90%. Compared to control, depending on the mobility of *SIRE1* retrotransposon on GM plants, 33% increase in polymorphism was observed. These results showed that salinity as an environmental stress condition can affect commercial GM plants. The results from this study revealed the importance of investigating the unexpected effects of the genomes of GMOs in more detail in terms of their sustainability in agriculture.

February 2019, 76 pages.

**Keywords:** GMO, Roundup Ready soybean, Salt stress, Transposon analysis

## 1. GİRİŞ

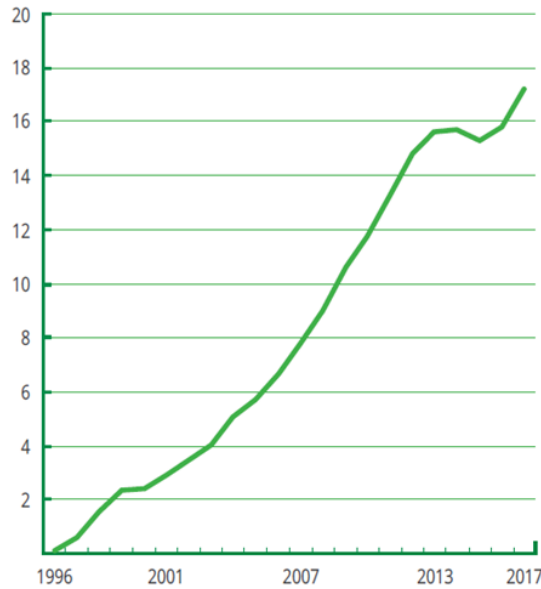
Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization -FAO) nün verilerine göre, küresel düzeyde insan popülasyonunun 2050 yılına kadar 9 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir (FAO, 2018). İnsanoğlu tarafından binlerce yıldır kullanılmakta olan klasik ıslah yöntemleri ile geliştirilen bitkiler, tarımı olumsuz etkileyen kuraklık, tuzluluk, sulama sorunları ve zirai ilaç kullanımına karşı ürün veriminin artırılmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Bitki ıslahının temeli, varyasyonlar arasında, yenebilen kısımların verim ve kalitesi bakımından ekim, hasat ve işleme kolaylığı, çevresel strese tolerans ve zararlılara karşı direnç bakımından daha iyi türlerin seçimidir (Breseghello, 2013). Klasik ıslah yöntemlerinin sürekli biçimde uygulanması, kültür bitkilerinin gen havuzunun daralmasına ve bitkilerin biyotik ve abiyotik strese karşı savunmasız olmasına neden olabilir (Breseghello, 2013). Ayrıca, klasik ıslah yöntemlerinin sadece genetik özellikler bakımından farklı olan yakın türler arasında uygulanabilmesi, sürdürülebilir besin artışı gereksinimini karşılamada yeterli olamamaktadır. Ancak, 1983 yılında bitkilerde Rekombinant DNA teknolojisi ile doğal üreme süreçleri yoluyla mümkün olmayan türler arası gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi (Şekil 1.1) sonucunda elde edilen Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO-transgenik) lar, artan şekilde kullanılarak üretim ve ürün çeşitliliği bakımından tarımda devrim niteliğinde bir uygulama oluşturmuştur. En yaygın üretilen Genetiği Değiştirilmiş (GD) bitkiler soya, mısır, kolza, pamuk ve şeker pancarıdır.



**Şekil 1.1:** Bitki biyoteknolojisindeki önemli olayların zaman çizelgesi (Francis, Finer ve Grotewold, 2017).

GD bitkilere hastalıklara, zararlılara, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslere, herbisit ve pestisitlere karşı dayanıklılık özellikleri kazandırılarak ekim alanlarından elde edilen ürün veriminin artması, üreticilerin korunmasına ve ekonomiye büyük katkı sağlamıştır (James, 2017). 1996'da ilk GD ürünün piyasaya sürülmesinden sonra, dünyada yeni ve hızla büyüyen bir sektör ortaya çıkmış ve GD tohumların ekildiği tarım alanları düzenli olarak artmıştır.

GDO'lar son zamanlarda tarım alanlarına en hızlı adapte olan teknolojik ürünler olarak değerlendirilmektedir. 1996-2015 yılları arasında GD bitkilerin üretimi 100 kat artarak toplam üretim alanı 179,7 milyon hektara ulaşmıştır. 2017'de soya, mısır, pamuk ve kanola, 2016'da da olduğu gibi küresel GD bitkilerin %99'unu oluşturmuştur. Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi (ISAAA) raporuna göre, bu ürünler içinde önemli bir protein ve bitkisel yağ kaynağı olan soya (*Glycine max* L.), küresel GD bitkilerin %50'sini oluşturmaktadır ve üretim alanı 2017'de 94.1 milyon hektara ulaşmıştır. Geçen 21 yılda, 1.04 milyar hektar GD soya yetiştirilmiştir (James, 2017). 1996-2016 yılları arasında GD ürünler artan verimlilik (657.6 milyon ton) ve ekonomik kazançla (186,1 milyar ABD doları) gıda, yem ve lif güvenliğine büyük oranda katkıda bulunurken, 183 milyon hektarlık ekim alanından da tasarruf sağlamıştır (Brookes ve Barfoot, 2018). GD ürünlerin küresel pazardaki değeri, Şekil 1.2'de verildiği üzere yıllar içinde artmıştır.



**Şekil 1.2:** GD ürünlerin küresel pazardaki değeri, 1996-2017 (Milyar Dolar).

ISAAA'nın yayınladığı rapora göre, herbisit toleranslı (HT) 335 çeşit GD ürün bitkisi vardır (James, 2017). 1996-2017 arasındaki zaman diliminde herbisit toleransı, ekimi yapılan GD bitkiler arasında baskın özellik olmuştur (Tablo 1.1). Herbisit toleransı taşıyan GD soya ekim alanı 2017 yılında dünya genelinde 75.4 milyon hektara ulaşmıştır. HT soyaların büyük bir çoğunluğu, bir toprak bakterisi *Agrobacterium*'a ait 5-enol-piruvil-şikimat-3-fosfat sentaz (*EPSPS*) genini içermektedir.

**Tablo 1.1:** GD bitkilere kazandırılan özelliklere göre küresel ekim alanı (James, 2017)

Özellik	Ekim Alanı (Milyon Hektar)	Ekim Alanının Yüzdesi (%)
<i>Herbiseite direnç</i>	88.7	47
<i>Birden çok karakter özelliği</i>	77.7	41
<i>Böcek direnci</i>	23.3	12

GD'lerin tarımsal yararlarına karşın bir yandan da güvenilirlikleriyle ilgili tartışmalar devam etmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), ticari transgeniklerin, pazarda kullanımları öncesi insan, hayvan ve bitki sağlığı bakımından güvenilirliklerinin belirlenmesi için gıda ve yem analizleri, alerji ve toksisite testleri gibi risk değerlendirmelerine tabi tutulmasını zorunlu kılmıştır. Ticari GD tohum, gıda veya yemlerin saflığı, genetik ve fenotipik kararlılığı, ürünler piyasaya çıkmadan önce üretici firmalar tarafından güvence altına alınmalıdır. Bu özellikler, ürünün kullanım ömrü boyunca geçerli ve GD ürünler resmî kurumlar tarafından belirlenmiş metodolojiler ve kurallar gereğince izlenebilir olmalıdır (Naegeli ve diğ., 2017).

AB mevzuatında GDO'lar, biyolojik güvenlik ile ilgili olarak “çevreye kasıtlı salım”, “gıda ya da hayvan yemi olarak tüketim” ve “kapalı kullanım” olmak üzere üç açıdan ele alınmış ve düzenlemeler, bu çerçevede hazırlanmıştır. GD bitkilerin biyogüvenliği kapsamında Türkiye AB mevzuatını benimsemiştir. Bu mevzuata uygun düzenlemelerin Türkiye'ye uyumlu hale getirilmesinde, Biyogüvenlik Kanunu ve ilgili yönetmeliklerinin yürütülmesindeki sorumluluk 02 Ağustos 2018 tarihinde Resmî Gazete'de yayımlanan Cumhurbaşkanlığı 2018/3 sayılı Genelge ile Biyogüvenlik Kurulu'nun görev ve yetkileri Tarım ve Orman Bakanlığı'na verilmiştir. Bu kapsamda Biyogüvenlik Kurulu'nun mülga olması nedeniyle, E.3408293 sayılı

ve 05.12.2018 tarihli Bakan Olur'u ile GDO ve ürünleri ile ilgili yapılan başvuruların değerlendirilmesi, Biyogüvenlik Kanunu ve ilgili yönetmeliklerde belirtilen diğer görevlerin ve Komitelerin sekretarya hizmetlerinin yürütülmesi görevi Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne verilmiştir.

26.09.2010 tarihinde yürürlüğe giren 5977 sayılı "Biyogüvenlik Kanunu" nun amacı; "Bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve ekolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esasları belirlemek" tir. Kanun gereğince GDO ve ürünlerinin onay alınmaksızın piyasaya sürülmesi, kullanılması veya kullanılması, genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı, GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaktır.

Rekombinant DNA teknolojisinin esası, farklı bir organizmaya ait DNA'nın, aktarılmak istenen parçasının, restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilerek DNA ligaz enzimiyle bir vektör içine yerleşmesine dayanmaktadır. Vektör DNA'sı ve içindeki aktarılmak istenen DNA parçasının oluşturduğu yeni DNA molekülü Rekombinant DNA (rDNA)'dır. rDNA teknolojisi uygulamalarının çoğu, yabancı genlerin bakteriler gibi tek hücreli organizmalara aktarılacak ilgili gen ürününün fazla miktarda üretimini sağlamaktır (Glick ve diğ., 2010). Bununla birlikte, rDNA teknolojisinin önemli bir uygulama biçimi de aktarılan yabancı genin konak organizmanın fenotipik özelliklerini değiştirmesidir.

Şimdiye kadar geliştirilen transgenik bitkilerin üretimi için kullanılan yöntemlerin çok büyük bir kısmı güdümlü gen transferini içermemektedir. Değişik *Agrobacterium* türleri (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter*) farklı bitkilerde farklı frekanslarda gen transferi yapabilmektedir. Doğrudan gen aktarım yöntemleriyle, gen dizilerinin transferi bir aracıya ihtiyaç duymadan gerçekleştirilebilmektedir. Her iki uygulamada da transformasyon sonucu yabancı genin çoklu kopyalarının farklı kromozomlara veya kromozomda farklı bölgelere girmesi, genomda "beklenmeyen etkiler-unintended effects" oluşturabilmektedir. Bu etkiler, yabancı genin genomdaki başka bir genin anlatım yapmasına engel olacak şekilde

promotor bölgesinin arasına girmesi, genomdaki hareketli elementler olan transpozonların hareketliliğinde artış meydana gelebilmesi, gen sessizleşmesi ve gen anlatım düzenlenmesinin değişmesi sonucu meydana gelebilecek pleiotropik etkiler şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Freese ve Schubert, 2013). Yüksek toprak tuzluluğu, sıcaklık, kuraklık gibi dünya çapında verimi olumsuz yönde etkileyen en önemli etmenlerden olan abiyotik stres koşullarının, bu “beklenmeyen etkiler”e nasıl etki edebileceği bilinmemekle beraber, genetik kararsızlıklara sebep olabilmektedir (Ahanger ve diğ., 2017). Genetiği değiştirilmiş petunya, pamuk, patates, soya fasulyesi ve buğday gibi bitkiler ile yapılan çalışmalarda bu bitkilerin, çevresel stres koşullarına ön görülemeyen reaksiyonlar verdikleri 2008 yılında Biyoteknolojide Bağımsız Etki Değerlendirmesi Enstitüsü olarak kurulan ve ayrıca AB Şeffaflık Kaydı'na kayıtlı bir kuruluş olan Testbiotech tarafından bildirilmiştir (Testbiotech, 2015). Ticari olarak piyasada bulunan GD bitkilerin herhangi bir iklim değişikliğinden nasıl etkilenebileceğiyle ilgili yeterince veri bulunmamaktadır (Luis ve diğ., 2010). Yakın zamanda yapılan ve Bt toksinine dirençli (MON810) iki farklı ticari mısır çeşidinde sıcaklık ve kuraklık streslerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Bt mısırdaki değişen çevre koşulları ile yabancı gen anlatımı ve protein üretimi arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada, sadece bir çeşitte Bt protein içeriği transgen anlatımıyla ilişkilendirilebilmiştir. Böylece, stres şartlarının etkilerinin ön görülemez olduğu vurgulanmıştır (Trtikova ve diğ., 2015). Bu sonuç genetik mühendisliği ile elde edilen bitkilerin transgen düzenlenmesinin anlaşılmasında önemli eksiklikler olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, transgenik bitki metabolizmasının zorlu veya değişken çevre koşullarından nasıl etkileneceğine ilişkin veriler, bu bitkilerinin tarımında yönlendirici nitelikte olacaktır.

Birleşmiş Milletler Çevre Programı dünyadaki tarımsal arazilerin yaklaşık olarak %20'si ve ekili arazilerin %50'sinin tuz stresi altında olduğunu bildirmektedir (Ruan ve diğ., 2010). Proteince zengin ve küresel öneme sahip ürün bitkilerinden olan soyanın üretiminde de tuzlu topraklar, verimi azaltan en önemli faktörler arasındadır. Tarım verimliliğine katkı sağlayan, ekimi ve ithalatı yapılan en yaygın transgenik bitkilerden soyanın, değişen ve zorlu çevresel etkenler altında kazandığı özellikleri koruyup korumadığının araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, tuzluluğun etkisiyle hem GD hem de GD olmayan soyanın genomlarında transpozon hareketliliğindeki değişimin araştırılması ile elde edilecek sonuçların, GD'lerde

Çevresel etkenler nedeniyle meydana gelebilecek “beklenmeyen etkiler” in önemini ortaya koyması ve böylece GD’lerin tarımdaki yararlarının sürdürülebilirliğine katkı sağlaması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLER

Tarım faaliyetlerinin başladığı tarihten beri çiftçiler, daha verimli ve çevreye uyumlu genotiplerin kademeli olarak seçilip yetiştirilmesiyle klasik ıslah yöntemleri geliştirip uygulamaya başlamıştır. Yıllar içerisinde tarımda yapılan yanlışlardan yoğun gübreleme ve tarım ilaçlarının fazla kullanımı, su kaynaklarının kirlenmesine, erozyona ve toprağın veriminin azalmasına neden olmuştur (Manuel, Machado ve Serralheiro, 2017). Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9 milyar kişiye ulaşacağı tahmin edilmekte ve bu küresel artışa bağlı olarak besin ihtiyacının, ürün bitkilerinin mevcut üretimi ile karşılanamaması, birim alandan alınan ürün miktarının arttırılmasını gerekli hale getirmiştir. 1970’li yılların başından itibaren geliştirilen Rekombinant DNA teknolojisi ile canlıların genetik yapısında geleneksel ıslah metodları ve doğal üreme-çoğalma süreçleri ile elde edilemeyen değişikliklerin yapılması mümkün olmuştur (Campbell, 2008). Artan küresel nüfusun beslenebilmesi için biyoteknolojik gelişmeler büyük önem taşımaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi, gen transformasyonu sayesinde ürün bitkilerine çeşitli özelliklerin aktarılmasıyla birim alandan alınan verimi arttırmaya yardımcı olmuştur. Bu yöntemler ile yabancı genler aktararak “genetik yapıları” değişikliğe uğratan ve bu yabancı genleri genomlarında kararlı şekilde taşıyan özellikleri değiştirilmiş bitki, hayvan ve mikroorganizmalar, “genetik yapısı değiştirilmiş organizma-GDO” olarak adlandırılmaktadır (Ibelgaufts, 1993). İlk kez 1983 yılında, tütün bitkisinde gen aktarımının gerçekleştirilmesiyle günümüzde dünya ekonomisinde önemli bir yere sahip genetiği değiştirilmiş bitkilerin (GDB) üretimi için ilk adım atılmıştır (Budd, 1991). Bitkilerde Rekombinant DNA teknolojisi uygulamalarındaki temel amaçlar ürün kalitesinin iyileştirilmesi, herbisitlere, viral bitki hastalıklarına, böceklere ve abiyotik streslere dayanıklılık geliştirmek gibi özelliklerin bitkilere kazandırılmasıdır.

Gen aktarımı çalışmalarında aktarılan genin (transgen) bitkide yüksek düzeyde anlatım yapması istenir. Bu nedenle, transgenik bitki üretimi sürecinde bitkilere aktarılabilecek olan ‘gen kaseti’ transgenin yanı sıra genin konakta anlatımını yapabilmesi için gerekli olan düzenleyici promotor ve terminatör bölgelerini de içerir. Ayrıca hangi hücrelerin transgenik olduğunun anlaşılmasını sağlayan gözlenebilen işaret (markır) genler ve aktarılan genin yabancı konakta anlatımını hakkında bilgi sağlanması için raportör genler de gen kasedinin bileşenleri arasındadır

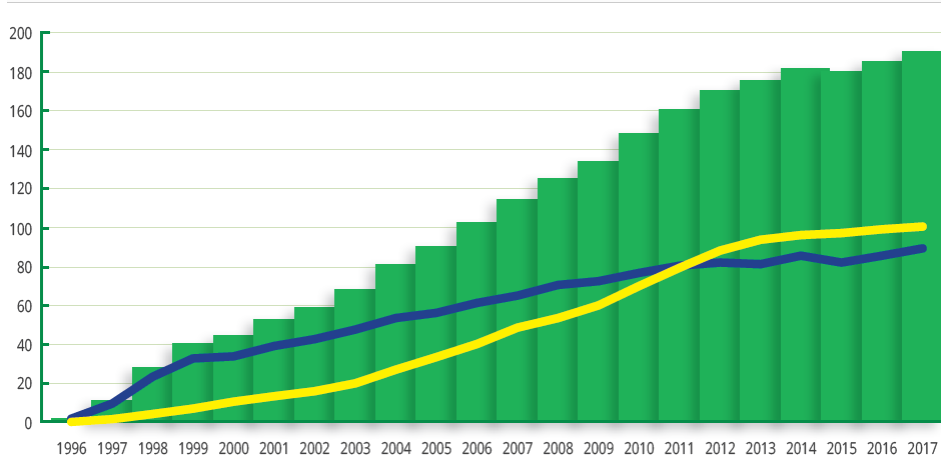
(Michelini ve diğ., 2008). Günümüzde, yüksek transkripsiyon aktivitesinden dolayı CaMV'a ait daima aktif (konstitütif) bir promotor olan 35S ve durdurucu dizi olarak *Agrobacterium tumefaciens*'e ait NOS terminatörü birçok transgenik bitkide kullanılmaktadır (Elenis ve Kalogianni, 2008).

Genetiği değiştirilmiş (GD) bir bitki uzun yıllar ve birçok basamaktan oluşan bir süreç sonucunda pazara sürülebilmektedir. GD bitkide bu süreç boyunca kendisine kazandırılan özelliklerin değişmemesi ve kararlılığını koruması, GD bitkinin tanımlanması ve izlenebilirliğinde esas olan önemli noktalar (Gupta ve Ram, 2004). Bütün bu onay sürecinin başarıyla gerçekleştirilmesiyle 1994'te ilk GD örneği olan FLAVR SAVR™ ticarileştirilmiştir (Kramer ve Redenbaugh, 1994). 1996'da GD bitkilerin ticarileştirilmesinden sonra, dünyada yeni ve hızla büyüyen bir sektör ortaya çıkmış ve GD tohumların ekildiği tarım alanları düzenli olarak artmıştır. Transgenik ürün bitkilerinin ekili alan hektarı 1996 yılında 1.7 milyondan; 2017 yılında, 185.1 milyona ulaşmıştır. Transgenik ürün bitkilerinin ekim alanlarının yıllar içindeki değişimi Tablo 2.1'de verilmiştir. Transgenik ürün bitkilerinin yüksek kabul oranları, düşük üretim maliyetleri, hektar başına daha yüksek verimlilik sağlamaları, sürdürülebilir tarıma katkıda bulunmaları bu artışı açıklamaktadır.

**Tablo 2.1:** Transgenik ürün bitkilerinin küresel ekim alanları (James, 2017).

Yıllar	Ekim Alanı (Milyon Hektar)
1996	1.7
2000	44.2
2004	81
2008	125
2012	170.3
2016	185.1
2017	189.8

2017 yılında, 19 gelişmekte olan ve 5 sanayileşmiş ülke olmak üzere toplam 24 ülke, transgenik bitki yetiştirmiştir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde transgenik bitkilerin ekim alanlarının yıllar içindeki karşılaştırması Şekil 2.1'de verilmiştir.



**Şekil 2.1:** Transgenik ürünlerin yıllar içinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ekim alanlarındaki değişim grafiği. Mavi çizgi, gelişmiş ülkeleri; sarı çizgi, gelişmekte olan ülkeleri temsil etmektedir (James, 2017).

GD bitkilerin ticarileştirildikleri ilk yıllarda yapılan çalışmalarda herbisit toleransı, böcek ve patojen direnci gibi doğrudan çiftçiyi ilgilendiren, tarım bitkilerinin yetiştirilmesine yardımcı özelliklere odaklanılmıştır. Özellikle yaygın olarak kazandırılan herbisit toleransı sayesinde çiftçilerin üretim maliyetleri önemli ölçüde azalmıştır. Herbisitler, tarım alanlarındaki bitkilere zarar veren yabancı otları öldürmek için kullanılan kimyasal maddelerdir ve bitkinin hayatta kalması için gerekli olan metabolik yolları hedefleyerek çalışır. Herbisit etkisinde bu kimyasal maddelerin seçiciliği ve toksisitesi önem taşımaktadır (Öktem, 2016). Bu bağlamda, en etkili herbisitler arasında yer alan glifosat ve glifosata direnç özelliği kazandırılmış transgenik bitkiler tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Glifosat, ticari RoundUp™ herbisitinin etken maddesini oluşturur ve glifosata direnç kazandırılmış transgenik ürünlere de “RoundUp Ready” adı verilmektedir. Glifosat, 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz (*EPSPS*) enzimine bağlanır ve onu inhibe eder. Bu enzim tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik amino asitler de dahil olmak üzere, korizmat türevli metabolitlerin sentezini sağlayan şikimat yolunda çalışmaktadır (Hermann, 1995). *EPSPS* inhibitörü amino asit üretimini inhibe ettiği için hücre, ölüme sürüklenir. Glifosata dirençli transgenik bitki elde edilirken, bitkilerde fonksiyonel olan ancak herbisitlerden etkilenmeyen bir *EPSPS* formu kullanılmıştır. *EPSPS* bitkiler dışında bakterilerde de bulunabilmektedir. Glifosat uygulamasına duyarlı olmadığından herbisit uygulandığında inhibe olmayan *EPSPS* formu *Agrobacterium tumefaciens*'in CP4 suşuna ait bir toprak bakterisinde tanımlanmıştır. Bu sayede hedef bitkiye *EPSPS* geninin aktarılmasıyla glifosat esaslı herbisite karşı tolerans kazandırılmıştır (Korth, 2008). Sonuç olarak tarlada

glifosat uygulaması yapıldığında yetiştirilmekte olan bitkiye zarar gelmemekte, diğer yandan istenmeyen yabancı otlar ise ölmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen bitki kökenli gıdalar 15 yıldan fazla bir süredir güvenli bir şekilde tüketilmelerine karşın, halen dünyada tartışma konusu olmaya devam etmekte ve bunların güvenilirlikleri, çevresel etkileri ve tabi olacakları düzenlemeler hala sorgulanmaktadır. ABD Tarım Bakanlığı (USDA), Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Çevre Koruma Kurumu (EPA) transgenik tarımsal ve hayvansal ürünleri ve bunlardan elde edilen gıdalara dair mevzuatları düzenler. Bu düzenlemeler, insan besinleri, hayvan yemleri ve çevre üzerindeki etkiler dikkate alınarak yapılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gibi uluslararası örgütler, gıda biyoteknolojisinin güvenliği ve faydalarıyla ilişkili kanıtlara dayalı olarak, günümüzde olduğu gibi gelecekte de gıda üretimi ve yetersiz beslenme sorunlarının giderilmesi ve sürdürülebilirliğin sağlanması konularındaki olumlu etkileri nedeniyle biyoteknolojinin kullanılmasını desteklemektedir.

## 2.2. GENETİK TRANSFORMASYON

Genetik transformasyon, yabancı DNA'nın konak hücrenin hücre zarından geçerek doğrudan alınması ve konak genomuna kararlı bir şekilde katılması olarak tanımlanmaktadır (Saeed ve Shahzad, 2016). Gen aktarımı bitkilerde doğal olarak meydana gelebilen bir mekanizmadır. *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerinde bulunan bir plazmidin (Ti plazmidi) küçük bir bölümü (T-DNA), bitkilerde yaralanma ya da hasar oluştuğunda bitki dokularına girip bitki hücrelerine aktarılmakta ve bitki kromozomu ile bütünleşerek "taç tümörü" denilen yapıları oluşturur (Chilton ve diğ., 1980; Willmitzer ve diğ., 1980). T-DNA'nın transkripsiyonu ile tümör oluşumu gerçekleşmektedir. T-DNA'nın bu özelliğinden yararlanılarak sınırları arasına herhangi bir yabancı DNA'yı yerleştirip bitki hücrelerine transfer edilebilmesi sağlanmış, böylece hastalığa neden olan genlerin aktarımı istenen özel DNA dizisi ile değiştirilmesiyle modifiye *Agrobacterium* suşları da elde edilmiştir. Genetik transformasyon yöntemleri doğrudan (Elektroporasyon, Biyolistik, Mikroenjeksiyon gibi) ve dolaylı (*Agrobacterium* ve viruslar aracılığıyla transformasyon) yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır (Rao ve diğ., 2009). Dolaylı yöntemlerde yabancı genin konak hücreye aktarılması için bir aracıya gereksinim vardır; doğrudan transformasyon yöntemlerinde ise bir aracıya gereksinim yoktur (Rao ve diğ.,

2009). Doğrudan yöntemlerden GD bitki üretimi için en fazla tercih edilen Biyolistik (gen tabancası) yöntemi; yaklaşık 2 mikron çapındaki yüksek yoğunluklu taşıyıcı mikropartiküllerin (altın, tungsten ya da platin kaplı) bitki hücrelerine doğru hızla atılması ve hücrelerden geçerken taşıdıkları DNA'yı hücre içine bırakmaları esasına dayanır (Macar ve diğ., 2017).

Temelde genetik transformasyon aşamaları yabancı DNA'nın konak hücreye girişi (insersiyon), konak genomuna bağlanması (entegrasyon), yabancı genin anlatımının yapılması (ekspresyon) ve yabancı genin/kazanılan yeni özelliklerin sonraki nesile aktarımı (transmisyon) aşamalarından oluşur. Bitki transformasyonu birbirini izleyen geçici transformasyon (DNA'nın bitki hücrelerine sokulması) ve kararlı transformasyon (bitki hücresine aktarılan DNA'nın genomla kaynaştığı) şeklinde de sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmaya göre istenen özellikleri sonraki nesillere aktarabilen transgenik bitkilerin üretimi için ikinci aşama şarttır (Altpeter ve diğ., 2016). Genetik transformasyonun başarılı sayılabilmesi için tekrarlanabilir olması gerekli bir temel unsurdur (Macar ve diğ., 2017).

Gen aktarımı çalışmalarında aktarılan genin konak bitki genomunda yüksek düzeyde anlatım yapması ve bu anlatımı kontrol edilmesi istenmektedir. Bu nedenle, transgenik bitki üretimi sürecinde bitkilere aktarılacak olan 'gen kaseti' transgenin yanı sıra genin konakta anlatımını yapabilmesi için gerekli olan düzenleyici promotor ve terminatör bölgelerini ve hangi hücrelerin transgenik olduğunun anlaşılmasını sağlayan gözlenebilen (raportör) bölgeleri de içerir (Michellini ve diğ., 2008). Yüksek transkripsiyon aktivitesinden dolayı yaygın olarak tercih edilen, Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) ne ait daima aktif (konstitütif) bir promotor olan 35S ve durdurucu dizi olarak *Agrobacterium tumefaciens*'e ait NOS terminatörü birçok transgenik bitkide kullanılmaktadır (Elenis ve Kalogianni, 2008).

Her bir genetik transformasyon sonrası oluşan ürün özgündür. Hedef bitki ve aktarılan transgenin aynı olduğu durumlarda bile, söz konusu transgenin genom ile entegrasyonu transformasyona uğratılan her bir hücrede diğerlerinden bağımsız bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu nedenle genetik transformasyon sonucunda oluşan her bir ürün ayrı bir çeşit ("event") tir. Ayrıca, genetik transformasyon sonucu bitkilerde çoklu gen girişleri, transgenin insersiyonuna bağlı beklenmeyen gen anlatımı ve düzenlenme değişiklikleri (genetik kayma) ile genetik ve epigenetik değişiklikler tetiklenebilmektedir (Gray ve diğ., 2015).

ISAAA'ya göre günümüzde 41 transgenik soya çeşidi mevcuttur. Bunlardan “Roundup Ready” ilk ticarileştirilmiş transgenik soya olmakla beraber halen tarımı en çok yapılan çeşittir. RR soya çeşidine ait gen kasedi Şekil 2.2’de verilmiştir.



**Şekil 2.2:** RoundUp Ready soya çeşidine ait gen kasetinin şematik gösterimi. P-35S: Karnabahar mozaik virüsünün 35S promotör dizisini, CTP4: *Petunia hybrida* kaynaklı kloroplast transit peptidini, CP4 EPSPS: *Agrobacterium tumefaciens* CP4 suşunun 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz genini, T-nos: *Agrobacterium tumefaciens* kaynaklı NOS terminatör dizisini göstermektedir (Querci, 2006).

### 2.3. RİSK DEĞERLENDİRMELERİ

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen bitki kökenli gıdalar 15 yıldan fazla bir süredir güvenli bir şekilde tüketilmelerine karşın, halen dünyada tartışma konusu olmaya devam etmekte ve bunların güvenilirlikleri, çevresel etkileri ve tabi olacakları düzenlemeler hala sorgulanmaktadır. Genetiği değiştirilmiş bitki kaynaklı gıdaların pazara girmesi ve kullanımlarının giderek artması yanı sıra insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkileri konusunda endişeleri de beraberinde getirmiştir. Bu endişelerin başında; transgenik bitkilerden yabancı tip akrabalarına gen akışının gerçekleşmesi, alerjik reaksiyonların oluşması, zararlılarda antibiyotik direncinin gelişmesi ve gen havuzunun daralarak biyoçeşitliliğin yok olması gelmektedir (Michelini ve diğ, 2008). Bu nedenle, risk değerlendirmelerinin yapılması ile ilgili düzenlemelerin oluşturulmasına gerek duyulmuştur. ABD Tarım Bakanlığı (USDA), Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Çevre Koruma Kurumu (EPA) transgenik tarımsal ve hayvansal ürünleri ve bunlardan elde edilen gıdalara dair mevzuatları düzenler. Bu düzenlemeler, insan besinleri, hayvan yemleri ve çevre üzerindeki etkiler dikkate alınarak yapılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gibi uluslararası örgütler, gıda biyoteknolojisinin güvenliği ve faydalarıyla ilişkili kanıtlara dayalı olarak, günümüzde olduğu gibi gelecekte de gıda üretimi ve yetersiz beslenme sorunlarının giderilmesi ve sürdürülebilirliğin sağlanması konularındaki olumlu etkileri nedeniyle biyoteknolojinin

kullanılmasını desteklemektedir. 2002 yılında GDO'ların risk değerlendirmelerini yapmak üzere Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kurulmuştur.

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 yönetmelikler analizi yapılacak ilgili ürünün içeriğinde % 0,9'un üzerinde bir değerde GDO var ise o ürünün etiketlenmesini zorunlu tutmakla birlikte bu sınırın altındaki miktarın, tesadüfi veya teknik olarak önlenemeyecek bir bulaşma olduğunu kabul etmektedir. Bu düzenlemeler yalnızca AB pazarına girmesi onaylanan çeşitleri kapsamaktadır, diğer yandan pazara girişi onaylanmamış ürünlerin her durumda piyasada bulunması kesinlikle yasaklanmıştır.

Risk değerlendirmeleri yapılırken tehlikenin tanımlanması, tehlikenin niteliklerinin belirlenmesi, maruz kalma değerlendirmesi, riskin niteliklerinin belirlenmesi önemli ölçütleri oluşturmaktadır. Risk değerlendirmeleri, EFSA'nın 14 Nisan 2011 tarihli "Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerden Elde Edilen Gıda ve Yemde Risk Değerlendirme Rehberi" dikkate alınarak GD bitkilerden elde edilen gıda ve yemin geleneksel ve binlerce yıldır güvenilir olarak insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilen eşdeğerleri ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Bu değerlendirmelerin kapsamına; bazı bileşen (kül, nem, makro ve mikro besinler, doğal toksinler, alerjenler gibi) ler bakımından içeriklerinin, yetiştirme performanslarının, bitki veriminin, çiçeklenme zamanının, olgunlaşma zamanının, polenin canlı kalma zamanının, bitki patojenlerine ve böceklere karşı koyma durumunun, abiotik stres koşullarına duyarlılığın karşılaştırılması girmektedir (Naegeli ve diğ., 2017) Aynı zamanda GD bitkilerin çevresel risk değerlendirmeleri için GD bitkinin sürekliliği ve yayılabilirliği; bitkiden bitkiye gen aktarımı; bitkiden mikroorganizmalara gen aktarımı, GD bitki ile hedef ve hedef dışı canlılar arasındaki etkileşim izlenmelidir (Bektaş, 2013). Ancak mevcut risk değerlendirmeleri içerisinde transgenik bitki genomundaki olası tüm "beklenmeyen etkiler"e yönelik ayrıntılı bir incelemenin mümkün olmamasından kaynaklı rutin olarak genom düzeyinde analizler yer almamaktadır, bu bilimsel araştırmaların konusu olmuştur.

#### **2.4. SOYA FASULYESİ**

Soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merr.), kromozom sayısı  $2n=40$  olan tek yıllık, kazık köklü önemli bir yağ bitkisidir. Soyanın taksonomisi Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2:** Soyanın taksonomisi.

<b>Alem</b>	<b><i>Plantae – Bitkiler</i></b>
Altalem	Cornobionta
Şube	Spermatophyta - Tohumlu bitkiler
Altşube	Magnoliophyta - Angiospermae - Kapalı tohumlu bitkiler
Sınıf	Magnoliopsida- Dicotyledoneae- Çift çenekliler
Altsınıf	Archichlamydae
Takım	Rosales
Alttakım	Leguminosinae
Aile	Leguminosae
Altaile	Fabaceae - Papilionaceae - Baklagiller
Cins	<i>Glycine</i>
Tür	<i>Glycine max</i>

Türkiye’de ilk kez 1930’lu yıllarda üreilmeye başlanan soya, o yıllarda sadece Karadeniz Bölgesi’nde tarımı yapılmıştır. Günümüzde ise ağırlıklı olarak Akdeniz Bölgesi’nde yetiştirilmektedir. Soya içeriği bakımından oldukça zengindir ve %18-20 oranında yağ, %40-45 oranında protein, %30 karbonhidrat ve %5 oranında mineral, çok sayıda vitamin ve değerli aminoasitler içermektedir. Başta yağ ve yem olmak üzere süt, peynir, sos, dondurma, et gibi pek çok gıdanın ve biyoyakıtın üretiminde yoğun olarak kullanılmaktadır. Besleyici ve doymuş yağ içeren hayvansal proteinlere alternatif olması nedeniyle oldukça faydalı olarak nitelendirilen soyanın tüketim miktarı da üretimle paralellik göstermektedir. Türkiye’de soya üretilmesi için gerekli iklimsel şartlar mevcuttur. Ancak aynı şartlarda yetiştirilen diğer alternatif ürünler ile ekonomik olarak rekabet edemediği için üretimi sınırlı düzeyde kalmaktadır (Taşçı ve Uçum, 2018).

Soyanın besin değerine ait içerik Tablo 2.3’te verilmiştir.

**Tablo 2.3:** 100 gram soyanın içerdiği besin değeri (USDA, Nutrient Database for Standart Reference, 2018).

<b>İçeriği</b>	<b>Miktarı</b>
Su	8.54 g
Enerji	446 kcal
Protein	36.49 g
Yağ	19.94 g
Karbonhidrat	30.16 g
Şeker	7.33 g

Kalsiyum	277 mg
Demir	15.70 mg
Magnezyum	280 mg
Fosfor	704 mg
Potasyum	1797 mg
Sodyum	2 mg
Çinko	4.86 mg

Soya, Türkiye’de en çok hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, son yıllarda soya dan, biyodizel hammadde olarak yararlanılmaya başlanmasının da etkisiyle soyaya olan talep sürekli artmaktadır (Onat, 2012). Türkiye’de soya kullanımındaki değişim, Tablo 2.4.’te (Taşçı ve Uçum, 2018) verilmiştir. Türkiye’nin soya ticaretinin 2005-2014 yılları arasında, 1 ile 2 milyon ton arasında değiştiği belirtilmiştir (TUIK, 2014).

**Tablo 2.4:** Türkiye soya arz ve kullanımı, bin ton (Taşçı ve Uçum, 2018).

	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
Ekim alanı (bin da)	433	343	367	382	317
Verim (kg/da)	416	437	438	432	442
Yurtiçi Tohum Üretimi	180	150	161	165	140
İthal Tohum	1608	2197	2283	2271	2250
Toplam tohum ihtiyacı	2668	2828	3071	3323	3183
TOPLAM ARZ	1807	2496	2802	2709	2702
TOPLAM KULLANIM	1807	2496	2802	2709	2702

#### 2.4.1. Yemlik Soya

Hayvan beslenmesinde kullanılan yemler 7.7.1973 tarihli Yem Kanunu’nda, madde ve enerji bakımından hayvanın yaşama ve verim ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla ve belli sınır ve şartlarda yedirildiği zaman hayvan sağlığına zararlı olmayan organik ve inorganik maddeler veya bunların karışımları olarak tanımlanmıştır (Bayraktar, 1999). Ülkemizde mevcut besi hayvanlarının otlayacağı çayır-mera alanlarının yeterli olmaması ve tarla bitkileri ekim alanları içerisinde yem bitkilerinin az yer kaplaması, hayvanlar için yeterli ve dengeli beslenme sağlanmasını zorlaştırmaktadır. Yem bitkilerinin iyi bir şekilde tanıtılmaması, yetiştiricilikten

elde edilen ürünü kurutma ve saklamadaki hatalar, yem açığının başlıca nedenlerindedir (Ergin ve Aydemir, 2018).

Yem olarak kullanılabilen bitkilerden soyanın en önemli özelliği, diğer bitki ve hayvan yem kaynaklarına göre, birim alandan daha fazla, ucuz ve hayvansal proteine en yakın proteini sağlıyor olmasıdır. Soya tohumlarının yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan soya küspesi, protein ve lizin bakımından zengin, metionin bakımından fakir, biyolojik değeri yüksek bir yem ürünüdür. İthal küspelerin yerli üretime göre protein oranları daha fazladır. Soya ve soya ürünlerinin nerede ise tamamını üretimin tüketimi karşılamada yeterli düzeyde olmaması ve iç piyasadaki talebin yüksek olması nedeniyle ithal etmek durumunda olan Türkiye’de TEPGE (Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü) verilerine göre bu ürünlere ihtiyaç, kanatlı yemi üretiminin artışı oranında artmaktadır (Taşçı ve Uçum, 2018). Yemlik olarak ithal edilen bu soyaların transgenik olanları da içirme ihtimalinin yüksek oluşu Bölüm 2.3’te anlatıldığı üzere takip ve değerlendirmelerini de zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle ithal olarak alınan soyalardan transgenik olanlarının halihazırda sadece Biyogüvenlik Kurulu tarafından onaylanmış çeşitlerinin yem olarak kullanımına izin verilmektedir. Yem amacıyla kullanımına onay verilen GD soya çeşitleri, 11 Ocak 2018 tarihi itibarıyla sayı olarak 10’a ulaşmıştır ve Tablo 2.5’te verilmiştir.

**Tablo 2.5:** Ağustos 2018 tarihine kadar Biyogüvenlik Kurulu tarafından onaylanan GD soya listesi

<b>Transgenik çeşit</b>	<b>Kazandırılan özellik</b>
A2704-12, 2011	Glufosinat herbisitine tolerans
A5547-127	Glufosinat herbisitine tolerans
MON 87701, 2015	Böcek direnci
MON 87701XMON 89788	Böcek direnci ve glifosat herbisitine tolerans
MON 87705	Yüksek oleik asit içeriği
GTS 40-3-2 (RR SOYA)	Glifosat herbisitine tolerans
DP356043	Glifosat herbisitine ve ALS inhibe eden herbisitlere tolerans
MON89788	Glifosat herbisitine tolerans
BPS, CV 127-9, 2017	İmidazolinon herbisitlerine tolerans
MON87708, 2017	Dicamba herbisitine tolerans

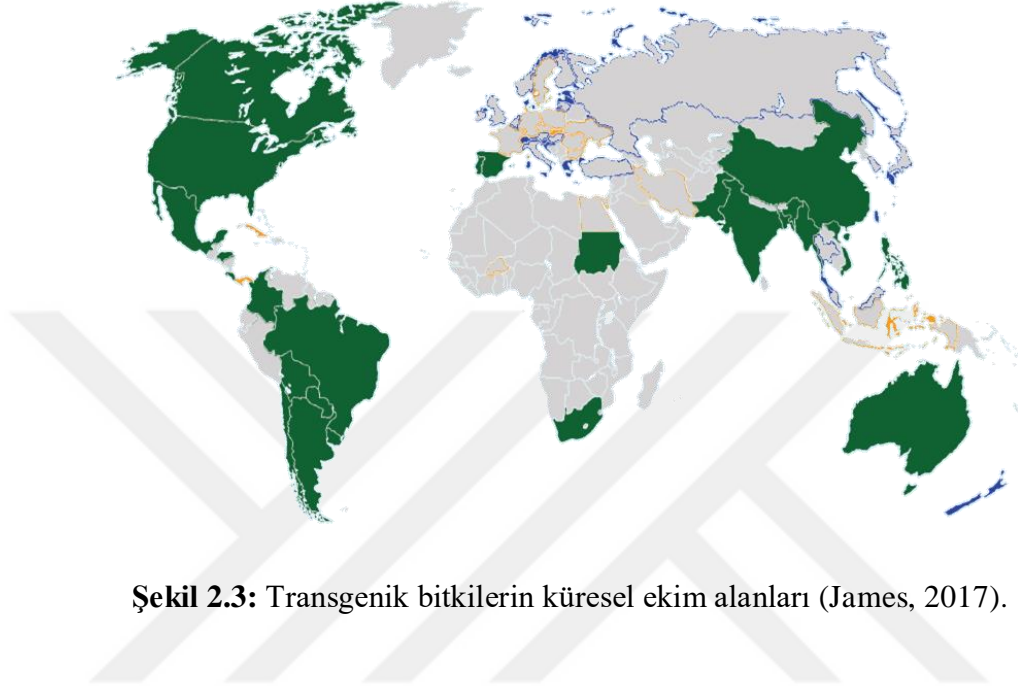
## 2.5. TUZLULUK

Yüksek tuzluluk, normal bitki büyümesini ve gelişimini önemli şekilde etkileyen ve toprak tuzlanmasına karşı duyarlı kültür bitkilerinin verimlerinde azalmaya neden olan en önemli abiyotik stresler arasındadır. Dünyada verimli ekili arazileri etkisi altına alan tuz stresi, bitkilerin gelişimini yapısal, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarında değişimlere neden olarak etkileyebilmektedir (Zhang ve diğ., 2018). Tuz stresinin bitki üzerindeki etkisi ve yaralanma derecesi bitki türüne, bitkinin gelişim aşamalarına, tuz konsantrasyonuna ve strese maruz kalınan süreye bağlı olarak değişmekle beraber hemen her bitkinin büyüme ve gelişmesini engellemektedir (Manuel, Machado ve Serralheiro, 2017).

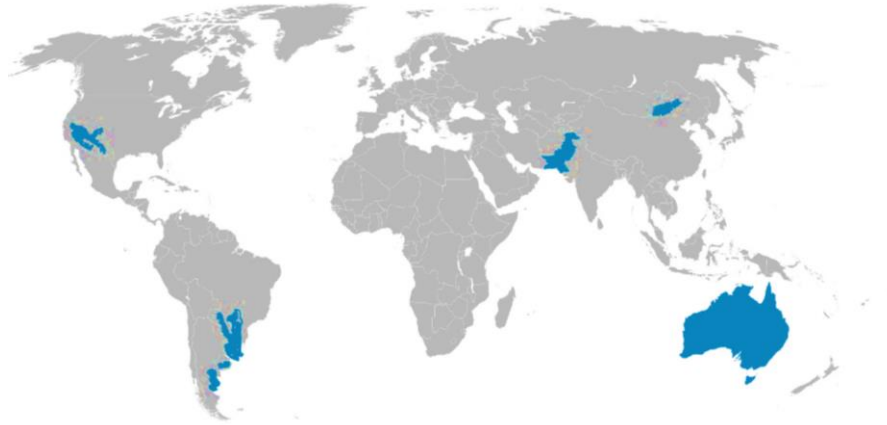
Stres ile birlikte bitkilerde iyonik toksisite ve kullanılabilir su potansiyelini düşürerek hiperosmotik şok oluşur. Ortamda artan  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{NO}^{-3}$  gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girmesi, bitkilerde besin eksikliği meydana getirerek bitki büyümesini ve gelişmesini engeller (Parida ve Das, 2005). Fazla tuz hücrelerde protein yapısını korumak için gerekli olan hidrofobik elektrostatik dengeyi bozduğu için çoğu enzimi inhibe ederken hücre bölünmesini de etkiler. Bitkilerde kök ve gövdede hücre sayısının ve mitotik aktivitenin azalmasına neden olur (Bursens, Beeckman ve Montagu, 2000). Bunun sonucunda bitkinin gövde ile kök uzunluğunda kısalma; yapraklarda küçülme ile sayılarında azalma meydana gelmektedir.  $\text{NaCl}$  stresinin bir diğer etkisi olarak fotosentezin azalması ile birlikte yaprakların da renginin yeşilden sarıya dönmesi de söz konusudur (Serrano ve diğ., 1999).

2050 yılında ekilebilir arazinin %50'sinden fazlasında tarımda yapılan hatalar (tarımsal alanların aşırı sulanması, hayvanların aşırı otlatılması ve toprakların tuzluluğa sebep olan kimyasallarla kontaminasyonu gibi) ve küresel ısınmanın da etkisiyle tuzluluğunun artacağı tahmin edilmektedir (Shrivastava ve Kumar, 2015). Diğer yandan, tarımda her geçen gün kullanımları artan transgenik bitkilerin ekim alanlarının da bu artan toprak tuzluluğundan etkilenmesi kaçınılmazdır. Şekil 2.3'te transgeniklerin küresel ekim alanları (yeşil renkli

alanlar) ve Şekil 2.4'te transgenik bitkilerin ekim alanlarının tuzlu topraklara karşılık gelen bölümü (mavi renkli alanlar) verilmiştir.



Şekil 2.3: Transgenik bitkilerin küresel ekim alanları (James, 2017).



Şekil 2.4: Transgenik bitkilerin tuzlu topraklardaki ekim alanları.

## 2.6. TRANSPOZONLAR

Transpozonlar ilk defa 1948 yılında Barbara McClintock tarafından (McClintock, 1950) mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde, bazı mısır tanelerinin pigmentasyonu için gerekli genlere bağlı olan bu elementlerin hareket ederek genlerin işlevini etkilediğinde fark edilmiştir (Starlinger ve

Döring, 1984). Bu lineer ve çift iplikli hareketli elementlerin genomda bir kromozomdan diğerine, aynı kromozom üzerinde bir bölgeden başka bir bölgeye yer değiştirmesine transpozisyon denilmektedir.

Transpozonlar kullandıkları transpozisyon araçlarına göre, RNA ara ürünü aracılığıyla hareket eden Sınıf I elementleri olan retrotranspozonlar (Wicker ve Schulman, 2007) ve transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanmayan buldukları kromozomal bölgeden çıkarak yeni hedef bölgeye insersiyon yapan Sınıf II transpozonları yani DNA transpozonlar olarak ayrılır.

Genomda girdikleri bölgelerde mutasyonlara neden olarak yeni allellerin oluşumuna katkıda bulunan bu hareketli DNA parçaları evrimsel süreç boyunca yeni varyetelerin ve hatta türlerin ortaya çıkmasını sağlamışlardır. Transpozonların genomdaki yüzdeleri, türler arasında hatta aynı türün varyeteleri arasında değişiklik göstermektedir. Prokaryotların çoğunda transpozon miktarı %1-3 arasında değişmektedir. Mayada ise transpozonların, genomun yaklaşık %3'ünü oluşturduğu bilinmektedir. Hayvanlarda genomun %3-45 kadarını oluşturan transpozonlar, memeli genomunun %25-45'ini kapsar. Bitkiler en yüksek transpozon yüzdesine (%50-98) sahip olan canlılardır (Batzer ve Deininger, 2002).

Transpozonlar gen anlatımının düzenlenmesinde büyük bir öneme sahiptir. Genlerin ekzon ve intron bölgelerine veya genlerin promotör bölgelerine yakın konumlara girerek (özellikle LTR-Retrotranspozonları) genin protein ürününü değiştirebilir, genleri tamamen işlevsiz hale getirebilir, ilgili genin anlatımını durdurabilirler. Bir diğer yandan, LTR bölgelerinde taşıdıkları promotörler komşu genler için alternatif bir transkripsiyon başlangıç bölgesi sağlayabilir ve bu komşu genin anlatımını arttırabilir. (Kashkush, Feldman ve Levy, 2003).

### **2.6.1. Retrotranspozonlar**

Retrotranspozonlar hücre içinde sentezledikleri revers transkriptaz enzimi sayesinde bir mRNA ara ürünü kullanıp kendi cDNA kopyalarını genoma entegre ederler. Retrotranspozonlar her iki ucunda da uzun uç tekrarları olan "Long Terminal Repeats" (LTR) Retrotranspozonlar ve uç tekrarlara sahip olmayıp 3' ucunda bir poliadenilat dizisi içeren LTR'siz Retrotranspozonlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Huang ve diğ., 2009). Retrotranspozonlar 6000-15000 bp uzunluğundadır (Malik ve Hutchinson, 2014)

Retrotranspozonlar, bitki genomunda geniş yayılım göstermektedir ve genomun evrimi sürecinde sahip oldukları rol, bu süreci devam ettirmek için hala önemlidir. Bilinen çoğu bitki retrotranspozonu optimal koşullarda büyüme ve gelişme boyunca inaktif durumda olmakla birlikte abiyotik ve biyotik stres koşullarında hareketli duruma geçirilebilirler (Mansour, 2014). Bu durum farklı biyotik ve abiyotik etkenlere olan stres cevabı olarak değerlendirilebilir (Ansari ve diğ., 2007).

### 2.6.2. *Sire1*

“Soybean Interspersed Element 1” (*SIRE1*), soyada bulunan *Ty1-Copia* retrotranspozon ailesinin sirevirüsler sınıfına ait ve tipik *Ty1-Copia* retroelementlerinden farklı olarak *pol* geni bitişiğinde retrovirüslere özgü *env* genini gerçek bir biçimde temsil etmemekle beraber *env* benzeri gen taşıyan tek üyesidir (Bousios ve diğ., 2012). İlk olarak soyada tanımlanan *SIRE1* retrotranspozonu daha sonrasında 36 bitki türünde daha belirlenmiştir (Bousios ve diğ., 2012). *SIRE1* elementinin soya bitkileri arasında farklılık göstermekle beraber yaklaşık 2000 kopya sayısında bulunmakta olduğu görülmüştür (Chesnay, Kumar ve Pearce, 2007). *SIRE1* retrotranspozonu soya bitkisinde 7036-9805 bp arasında genom boyutuna, 902-1205 bp arasında LTR dizilerine sahip halen aktif bir elementtir (Laten ve diğ., 2014).

## 2.7. RETROTRANSPOZON ANALİZLERİ

Moleküler genetik uygulamalarında; gen klonlama, transgenik organizmaların eldesi, klasik antibiyotik-direnç markırı gibi amaçlar için transpozonlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Bergman ve Quesneville, 2007). Retrotranspozonların genom dinamiğini insersiyon, delesyon, duplikasyon gibi durumları etkileyerek yeni özellikleri içeren bireyler arasında oluşturduğu insersiyonel polimorfizmlerin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Kalendar, 2010).

Bitkilerde kullanılan bu markır tekniklerinin en yaygın olanları; retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi (“Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” - IRAP), retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi (“Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism” - REMAP), retrotranspozon temelli insersiyonel polimorfizm (“Retrotransposon Based Insertional Polymorphism” - RBIP), diziye özgü çoğaltım

polimorfizmi (“Sequence Specific Amplified Polymorphism” - SSAP) ve primer bağlanma bölgeleri arası çoğaltım (“Inter Primer Binding Site Amplification” - IPBS)’dir (Kalendar, 2010).

Bunlardan IRAP, iki LTR-Retrotranspozon arasında kalan intergenomik bölgenin PZR ile çoğaltılması tekniğinde PZR ürünleri agaroz jelde ayrıldıktan sonra örnekler arasındaki polimorfik bantlar belirlenerek çıkarılan bant profilinden polimorfizm oranı hesaplanır. IRAP uygulanabilirliği bakımından kolay ve hızlı bir yöntem olduğu için yakın türler arasındaki genetik ilişkinin araştırılması (Guo, Zhang ve Luo, 2006), gen haritalarının oluşturulması (Schulman ve Manninen, 2000) bitkilerde somaklonal varyantların belirlenmesi (Evrensel ve diğ., 2011) gibi çeşitli kullanım alanları da mevcuttur.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi GDO Laboratuvarı tohum stoğunda bulunan yerli soylar ve 2014 senesinde Türkiye Yem Sanayicileri Birliği'nden temin edilen yemlik soylar kullanıldı.

#### 3.2. GDO TARAMASI

Genetiği değiştirilmiş organizmaların çoğunda Karnabahar Mozaik Virüsü (CaMV) 35S promotör (P-35S) ve *Agrobacterium tumefaciens* nopalin sentaz (T-Nos) terminatör dizileri bulunduğu için, bitki kökenli tohum, yem ve gıdalarda yabancı genlerin tarama yöntemiyle tanımlanmasında bu hedef diziler yaygın olarak kullanılır (Holst-Jensen ve diğ., 2003). Bu hedef dizilere özgü bulk PZR analizinde kullanılmak üzere; GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans laboratuvarı (EURL-GMFF) mın soyadan genomik DNA izolasyonu için onayladığı (CRL-GMFF, 2007) CTAB yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.

##### 3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için modifiye CTAB (Somma, 2006) yöntemi kullanıldı. İzolasyonda kullanılan CTAB solüsyonlarının içeriği Tablo 3.1'de gösterildi. Solüsyonlar hazırlandıktan sonra 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlandı.

**Tablo 3.1:** CTAB yönteminde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.

Solüsyon Adı	Solüsyon İçeriği
CTAB Tamponu	20 g/l CTAB (Setiltrimetil amonyum bromür), 1.4 M NaCl (Sodyum klorür), 0.1 M Tris-HCl (Tris-Hidroklorür, Sigma, T5816), 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA (Etilen daimin tetraasetik asit disodyum, Sigma, E5134)
CTAB Çöktürme Tamponu	5g/l CTAB (Sigma, H5882), 0.04 M NaCl
NaCl	1.2 M NaCl (Riedel, D30926), distile su içinde

CTAB tamponu 1.5 ml'lik steril Eppendorf tüplerine bölünerek, tüpler 60<sup>0</sup>C'de ısıtıcı bloğa yerleştirildi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yemlik ve yerli soyalar DNA izolasyonuna başlanmadan önce en az 1 saat boyunca distile su içinde bekletildi, süre sonunda her birinden, 100 mg'a karşılık gelen yaklaşık 20'şer adet embriyo çıkarılarak bir araya getirildi. Daha sonra bulk PZR analizinde kullanılacak olan bu embriyolar, steril ve oda sıcaklığında bekleyen havanlara alınıp aşağıdaki basamaklar izlendi. İzolasyon sırasında ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyon kontrolü için negatif kontrol olarak, örnek yerine distile su kullanıldı.

Havanlardaki embriyoların üzerine,

1. 300 µl steril dH<sub>2</sub>O eklendi ve havan eli yardımıyla ezildi.
2. 300 µl CTAB tamponu eklendi ve ezme işlemine devam edildi.
3. Daha sonra 300 µl daha CTAB tamponu eklenerek homojenat 1.5ml'lik steril Eppendorf tüpüne aktarıldı. Eğer havanlarda örnek kaldıysa 200 µl daha CTAB tamponu eklenerek santrifüj tüpüne ilave edildi.
4. Örneklerin üstüne, 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma, P2308) eklendi, 65 <sup>0</sup>C'de ısıtıcı blokta 90 dakika inkübe edildi. Bu süreçte tüpler her 10 dakikada bir yavaşça ters düz edildi.
5. Tüplere, 20 µl RNaz A (10 mg/ml) (Sigma, R4642) eklendi, çalkalandı ve 65 <sup>0</sup>C'de ısıtıcı blokta 10 dakika inkübe edildi.
6. 16.000 xg'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant yeni Eppendorf tüpüne alındıktan sonra üstüne 4 <sup>0</sup>C'deki 500 µl kloroform (Sigma, C2432) eklendi ve örnekler süt rengini alana kadar 30 saniye yavaşça ters düz edildi.
8. 16.000 xg'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi.
9. Üst fazın 500 µl'si 500 µl 4 <sup>0</sup>C'deki kloroform içeren santrifüj tüpüne aktarıldı ve yavaşça ters düz edildi. Bu aşamada ters düz etme işlemi sonrasında 2 faz birbirine karışmamaktadır.
10. Tüpler 16.000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
11. Üst faz temiz tüplere transfer edildi.
12. Üst faz hacmi kadar (v/v) CTAB çöktürme solüsyonu eklendi ve pipetleme yapıldı.

13. Tüpler 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Optimizasyon sırasında, belli durumlarda DNA izolasyon sonuçlarına göre bu aşamada, 45 dakika oda sıcaklığında, 15 dakika 4 °C'de inkübasyon uygulandı.
14. 16.000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edildi.
15. Süpernatant atıldı.
16. Pellet 300 µl 1.2 M NaCl içersinde pipetaj yapılmadan nazikçe çözdürüldü.
17. Tüplere, 350 µl 4 °C'deki kloroform eklendi ve yavaşça 30 saniye ters düz edildi.
18. 16.000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi.
19. Üst faz temiz tüplere aktarıldı.
20. Üst fazın 0.6 hacim kadarı (v/v) -20 °C'deki izopropanol (Sigma, I9516) eklendi ve yavaşça ters düz edildi.
21. 16.000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edildi.
22. Süpernatant atıldı.
23. Tüplere, 500 µl %70'lik (v/v) 4 °C'deki etanol (Sigma, E7023) eklendi ve dikkatlice çalkalandı.
24. 16.000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edildi.
25. Süpernatant atıldı.
26. Pellet kurutulduktan sonra 100 µl steril dH<sub>2</sub>O içinde çözdürüldü ve ileri aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### 3.2.2. Genomik DNA'nın Kalitatif Ve Kantitatif Analizleri

İzole edilen DNA'ların kalitatif analizi için agaroz jel elektroforezi, saflığının belirlenmesi ve kantitatif analizi için de spektrofotometrik analizler yapıldı.

#### 3.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Genomik DNA'ların kalitatif analizi % 1.2'lik, agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanıldı. % 1.2'lik jel için 0.48 g agaroz (Sigma, A5073) tartılıp üzerine stok 50X TAE tamponunun; (Tablo 3.1) 490ml ddH<sub>2</sub>O'ya 10ml 50X TAE tamponu şeklinde sulandırılmasıyla hazırlanan, 40 ml 1X TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında 1.5-2 dakika süre ile çözüldürüldü. Oda sıcaklığında yaklaşık 40 °C'ye kadar soğutulan jelle 32 µl EtBr eklenip kırmızı renk

kayboluncaya kadar karıştırıldı. Jel, tarağın yerleşmiş olduğu yatay elektroforez kasedine (BioRad, 1704416EDU) dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaştıran agaroz jel, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 5 µl DNA örneği, 1 µl 6X DNA Yükleme boyası (Thermo Scientific, R0611) ile karıştırıldıktan sonra taraqlarla oluşturulan kuyulara yüklenerek 85 V sabit akımda, 50 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör cihazına (Vilber Lourmat, ECX-F26.M) yerleştirilip görüntü alınması için ayarlandı ve fotoğraflandı.

**Tablo 3.2:** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Adı	İçeriği
50X TAE Tamponu	2 M Tris bazı (Sigma, T8524), %0.0571 Glasiyal asetik asit (Sigma, A9967), 50 mM EDTA (pH 8.0)
10 mg/ml EtBr	10 mg EtBr, 1 ml distile su
6X Yükleme Tamponu	100 mM EDTA (pH 8.0), %1 SDS, %60 Gliserol, %0.03 Bromofenol mavisi, %0.03 Ksilen siyanol FF

### 3.2.2.2. Spektrofotometrik Analiz

Yemlik ve yerli soyalardan izole edilen genomik DNA'ların miktarının hesaplanması ve saflıklarının kontrol edilmesinde Thermo Scientific NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazı kullanıldı. Bu cihaz ile 260nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri, Denklem 3.1 yardımıyla DNA miktarlarının hesaplanmasında kullanıldı. Öncelikle DNA, distile su içinde çözüldüğü için cihaza 1.5µl distile su cihaza yüklenerek "blank" ölçüm alındı. Daha sonra ise aynı miktardaki örnekler yüklenerek miktar hesaplaması yapıldı. Saflık kontrolü için ise DNA'nın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığını soğurma değerlerinin oranı (A260/A280) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında ise genomik DNA'nın saf olduğu, değer aralığının dışında ise genomik DNA'nın saf olmadığı kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

$$\text{DNA } (\mu\text{g /ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım kat sayısı} \times 50 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

### 3.2.3. Yemlik Soyada CaMV 35S Promotor Ve Nos Terminatör Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Taranması

DNA izolasyonunu takiben CaMV 35S promotor ve Nos terminatör hedef dizilerine özgü PZR ile GDO tanısı yapıldı. Analizin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği için analizler her örnekten üçer kez tekrar edildi. Bu düzenleyici dizi bölgelerine uygun primer bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için European Commission GMO EU Database of Reference Methods (Avrupa Komisyonu GDO Tespit Yöntemleri Veritabanı) referans alınarak ve primerlerin özellikleri dikkate alınarak seçilen 8 farklı sıcaklıkta gradient PZR yapıldı. Gradient PZR’de, 2 farklı 35S (P35S-cf3 ve P35S-cr4, 35S-FTM ve 35S-RTM) ve Nos primer çiftleri kullanıldı. Primer dizileri ve beklenen PZR ürün boyutları Tablo 3.3’te gösterilmiştir. 35S ve Nos PZR Bileşenleri Tablo 3.4’te, PZR programı ise Tablo 3.5 ve 3.6’da verilmiştir. PZR analizi sırasında analizin doğruluğu için, hedef gen bölgesini içerdiği bilinen Sertifikalı Referans Materyallerden (%2 GD soya) temin edilmiş DNA, pozitif kontrol olarak; herhangi bir bulaşmanın tespiti için de DNA örneği yerine eşit miktarda distile su, negatif kontrol olarak kullanıldı.

**Tablo 3.3:** Yemlik soyalarda GDO analizi için kullanılan primer dizileri.

Hedef	Primer adı	Hedef Primer Nükleotid Dizisi (5'-3')	Beklenen PZR ürün boyutu (bp)
35S promotör bölgesi	P35S-cf3	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG	123
	P35S-cr4	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	
35S promotör bölgesi	35S-FTM	GCCTCTGCCGACAGTGGT	82
	35S-RTM	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	
Nos terminatör bölgesi	tNOS 2-5'	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151
	tNOS 2-3'	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT	

**Tablo 3.4:** 35S ve NOS PZR bileşenleri.

Bileşen adı	Miktarı (µl)	Son Konsantrasyon
Steril dH <sub>2</sub> O	16.9	
10X PZR Tamponu	2.5	1X
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5mM
10mM dNTP	1	0.08mM
10µM ileri primer	0.5	0.2µM
10µM geri primer	0.5	0.2µM
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0.1	0.2U
DNA (100ng)	1	4ng/µl

**Tablo 3.5:** 35S Gradient PZR programı.

Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	5dk	1
Denatürasyon	95	30sn	
Bağlanma	55-65	30sn	35
Uzama	72	30sn	
Son Uzama	72	5dk	1
Bekleme	4	∞	

**Tablo 3.6:** NOS Gradient PZR programı.

Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	5dk	1
Denatürasyon	95	30sn	
Bağlanma	59-65	30sn	35
Uzama	72	30sn	
Son Uzama	72	5dk	1
Bekleme	4	∞	

### 3.2.4. GDO Çeşidinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Belirlenmesi

Transgenik soylar arasında piyasada ekimi en çok yapılan ve hala günümüzde en yaygın olarak kullanılan *Agrobacterium tumefaciens*'in CP4 soyuna ait 5-enolpirüvilşikimat-3-fosfat-sentaz

enzimi (CP4epsps) glufosinat böcek ilacına direnç geni aktarılmış “Roundup Ready” (RR), diğer adıyla ülkemizde de onaylanan çeşitlerden olan “GTS 40-3-2” çeşidini belirleyebilmek için, GMDD (GMO Detection Method Database, <http://gmdd.shgmo.org>)’den edinilen RR soya gen kasedine özgü primerler ile gradient PZR yapıldı. PZR’nin optimizasyonu sırasında özgün olmayan bantların uzaklaştırılması için DMSO kullanılmıştır. RRS PZR bileşenleri Tablo 3.7’de, PZR programı Tablo 3.8’de verilmiştir. RRS primer dizileri ve beklenen PZR ürün boyutları Tablo 3.9’da verilmiştir.

**Tablo 3.7:** RRS PZR bileşenleri.

Bileşen adı	Miktarı (µl)	Son Konsantrasyon
Steril dH <sub>2</sub> O	15.65	
DMSO	1.25	
10X PZR Tamponu	2.5	1X
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5mM
10mM dNTP	1	0.08mM
10µM ileri primer	0.5	0.2µM
10µM geri primer	0.5	0.2µM
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0.1	0.2U
DNA (100ng)	1	4ng/µl

**Tablo 3.8:** RRS PZR programı.

Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	10dk	1
Denatürasyon	95	30sn	
Bağlanma	62	30sn	35
Uzama	72	30sn	
Son Uzama	72	8dk	1
Bekleme	4	∞	

**Tablo 3.9:** Roundup Ready çeşit belirlenmesinde kullanılan primerler.

Hedef	Primerler	Baz dizilimi 5'-3'	Ürün Uzunluğu (bp)
EPSPS	RRS01-5	CCTTTAGGATTTTCAGCATCAGTGG	121
	RRS01-3	GACTTGTCGCCGGGAATG	

### 3.3. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ

Soyalar, cam beherler içine aktarılarak akan suyun altında 1 saat yıkandı ve çimlendirilmeleri için tabanı ıslak hidrofil pamuk kaplı 15 cm x 10 cm'lik plastik kaplarda (Şekil 3.1) 20'şerli olacak şekilde 30°C de 16 saat ışık/ 8 saat karanlık periyoduna sahip (1400 lux) bitki büyütme kabinine yetiştirildi. 7-10 gün boyunca düzenli olarak gözlenen soyalardan çimlenenler ayrı bir kaba aktarılarak dormant olanlar elendi. 3 yapraklı aşamaya gelen bitkiler, (6cm x 8cm x 4cm) yarısına kadar perlit doldurulmuş siyah plastik viyol kaplarına alındı ve bitki büyütme kabinine yerleştirildi.

**Şekil 3.1:** Yemlik Soyalarnın Çimlendirilmeleri.

### 3.4. BİTKİLERE TUZ STRESİ UYGULAMASI

Üç yapraklı aşamaya geldiğinde viyol kaplara aktarılan soya bitkileri, 3'erli deney setleri halinde 4 farklı tuz konsantrasyonu içeren (80mM, 120mM, 160mM ve 200mM) Hoagland solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) ile 14 gün boyunca tuz stresine maruz bırakıldı. Tuz stresi uygulanan deney gruplarındaki Hoagland solüsyonlarına, son tuz konsantrasyonları sırasıyla 80mM, 120mM, 160mM ve 200mM NaCl olacak şekilde 58.44 g/mol moleküler

ağırlığına sahip NaCl tartılarak eklendi. Buharlaştırma sebebiyle sıvı azalmasının engellenmesi için 3-4 günde bir her deney setine yeni Hoagland solüsyonu eklendi.

### 3.4.1. Hoagland Solüsyonunun Hazırlanması

Hoagland solüsyonu için öncelikle Tablo 3.10'da içerikleri verilen solüsyonlar 6 farklı otoklav şişesinde hazırlandı ve tabloda belirtilen miktarda kullanılarak Hoagland solüsyonu yapıldı.

**Tablo 3.10:** Hoagland solüsyonu için gerekli solüsyon içerikleri.

Solüsyon adı	Moleküler ağırlık (g/mol)	Stok konsantrasyonu (gr/L)	Hoagland solüsyonundaki final konsantrasyonu (ml/L)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	236.1	236.1	7
KNO <sub>3</sub>	101.1	101.1	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.1	136.1	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246.5	246.5	2
İz elementler			1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.8	2.8	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	197.9	1.8	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287.6	0.2	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249.7	0.1	
NaMoO <sub>4</sub>	205.9	0.025	
FeEDTA*			1
EDTA.2Na	338.2	10.4	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278.0	7.8	
KOH	56.1	56.1	

\*Bu solüsyon için önce, 500 ml KOH hazırlandı ve pH 12.9'dan %100'lük/saf H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 5.5'e düşürüldükten sonra, tabloda belirtilen miktarda FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve EDTA.2Na eklendi.

### 3.4.2. Bitkilerin Fizyolojik Analizi

Farklı zamanlarda 3 tekrar şeklinde 14 gün boyunca tuz stresine maruz kalan 4 deney grubuna ait bitkilerin cetvel yardımıyla gövde uzunluğu ve kök uzunluğu ölçümleri alındı. Denklem 3.2'de (Wu ve diğ., 2018) verilen formül kullanılarak yaprak alanı hesaplanan her bir tuz

konsantrasyonuna ait bitkinin, eldiven ve pens yardımıyla yaprak kısımları gövdelerinden ayrılarak ileri aşamalarda kullanılmak için steril folyolara sarıldı ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

$$\text{Yaprak yüzeyi} = (\pi r + 2r) \cdot \lambda \quad (\text{Denklem 3.2})$$

$r$  = yaprak yarıçapı,  $\lambda$  = yaprak uzunluğu

### 3.4.3. İstatistiksel Analizler

Fizyolojik ölçüm değerleri Ezanova programı yardımıyla Tek-Yönlü-ANOVA testi uygulanarak istatistiksel olarak değerlendirildi ve GraphPad Prism 7 programı ile veriler grafiğe dönüştürüldü.

### 3.5. *EPSPS* GEN ANLATIM ANALİZİ

Tuz stresinin *EPSPS* gen anlatımını etkileyip etkilemediğini analiz etmek için Gerçek Zamanlı PZR yapıldı. *EPSPS* genine uygun primer çiftleri (Tablo 3.9) kullanılarak transgen anlatımı, göreceli olarak  $\Delta\Delta\text{Ct}$  yöntemi ile hesaplanması için housekeeping gen olarak *ELF1B* (elongation factor 1-beta) geni kullanıldı. Bu işlem için BioRAD cihazı ve SYBR Green I Master Mix yöntemi kullanıldı. Örnekler Tablo 3.13'te belirtildiği gibi hazırlanıp 96 kuyulu qRT-PZR kaplarına (Roche, 04729692001) yüklendi. Reaksiyon koşulları Tablo 3.14'te verildi.

#### 3.5.1. RNA İzolasyonu

Kontrol ve 4 farklı tuz konsantrasyonunda farklı zamanlarda 3 defa tekrar edilen deney setlerindeki her bitkinin yapraklarından ayrı ayrı total RNA izolasyonu ticari TRIzol® (Thermo Scientific, 15596018) kiti kullanılarak aşağıdaki aşamalara göre gerçekleştirildi.

#### Faz Ayrımı

1. Her bir yaprak örneği ayrı ayrı steril ve soğuk porselen havanlarda, havaneli yardımıyla homojenize edildi. Havanlara bir miktar sıvı azot eklenerek örnekler toz haline getirildi ve 1ml TRIzol® kiti içindeki lizasyon solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Örnekler, steril Eppendorf tüplerine aktarıldı.

2. Tüplere 200'er µl 4 °C'ye kadar soğutulmuş kloroformdan (Sigma, C2432) eklenip yavaşça karıştırıldı ve tüpler, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Tüpler, 12.000 xg'de 4 °C'de 15 dakika santifüj edildi.
4. Tüplerde gözlemlenen 3 fazdan en üstteki şeffaf faz yeni Eppendorf tüplerine aktarıldı.

### **RNA Ayırma**

5. Yeni tüplere alınan şeffaf fazın üzerine 500'er µl izopropanol (Sigma, I9516) eklendi ve tüpler, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
6. Tüplere, 12.000 xg'de 4 °C'de 10 dakika santifügasyon uygulandı.

### **RNA Yıkama**

7. Santrifüj sonrası tüplerdeki üst faz döküldü.
8. Santrifikasyondan sonra tüplerde kalan pellet üzerine bütünlüğü bölmeyecek şekilde 1'er ml 4 °C'deki %75 EtOH eklenip dikkatlice pipetleme ile pellet yıkandı.
9. Tüpler, 7.500 xg'de 4 °C'de 5 dakika santifüj edildi.

### **RNA'nın Yeniden Süspanse Edilmesi**

10. Santrifüj sonrası tüplerdeki üst faz atıldı ve pellet ağzı açık Eppendorf tüpler içinde 55°C'ye ayarlı ısıtıcı bloğa (Biosan, TS-100C) yerleştirildi ve kurumaya bırakıldı.
11. Bu süre sonrasında RNA'nın tamamen çözdürülmesi için 20'şer µl kit içeriğindeki nükleaz içermeyen dH<sub>2</sub>O'dan tüplere eklendi ve pipetleme yapıldı.
12. Tüpler, 55 °C'ye ayarlı ısıtıcı bloğa yerleştirilerek 15 dakika inkübe edildi ve RNA'nın tamamen çözünmesi sağlandı.

#### **3.5.1.1. RNA'nın Miktar ve Saflığının Ölçümü**

İzole edilen RNA'ların saflıkları ve miktarları Bölüm 3.1.2.2'de anlatıldığı gibi 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri ölçülerek belirlendi. Bu ölçüm, nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific, nanodrop 2000) cihazında yapıldı. Formülde (Denklem 3.3) çift zincirli DNA için 50 olan katsayı tek zincirli RNA için 40 olarak kullanıldı.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{A260} \times \text{sulandırım kat sayısı} \times 40 \quad (\text{Denklem 3.3})$$

### 3.5.1.2. RNA'nın Jel Elektroforez Analizi

İzole edilen RNA'ların ileri analizlerde kullanılmasından önce kırık olup olmadıklarının agaroz jel elektroforez sisteminde doğrulanması için, %1'lik 40 ml agaroz jel bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi hazırlandı. Jel 90 V'ta 25 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

### 3.5.2. cDNA Sentezi

RNA izolatlarından gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere cDNA eldesi için iScript™ cDNA Synthesis Kiti (Bio Rad, 1708891) kullanıldı. Reaksiyon karışımı Tablo 3.11'de verildiği şekilde bileşenlerin dikkatlice steril Eppendorf tüpüne aktarılması ve her bileşenden sonra çok iyi bir şekilde pipetleme yapılması ile hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı T100 Thermalcycler (Bio Rad, T100) cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.12'de verilen şekilde sıcaklık ve döngülerde cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi.

**Tablo 3.11:** cDNA sentez reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	16.7 µl
iScript II Reaction Mix (5X)	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
Kalıp RNA (1000 ng)	

**Tablo 3.12:** cDNA sentez reaksiyonunun koşulları.

Reaksiyon Sıcaklığı	Döngü Süresi
25°C	5'
46°C	20'
95°C	1'

### 3.5.3. Gerçek Zamanlı (RT) PZR

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Biorad Cfx Connect Real Time cihazı kullanılarak yapıldı, analizin reaksiyon bileşenleri Tablo 3.13'te, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.14'te verildi.

**Tablo 3.13:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	5 µl
Forward ve Reverse Primer (10 µM)	0.75 µl
Maxima SYBR Green Master Mix (2X)	12.5 µl
cDNA	1 µl

**Tablo 3.14:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
50°C	2'	40
95°C	10'	
95°C	15''	
62°C ( <i>ELF1B</i> , <i>RRS</i> )	30''	
72°C	30''	

### 3.6. *SIRE1* RETROTRANSPOZON ANALİZİ

14 gün tuz stresine maruz bırakılan ve tuz uygulaması yapılmamış kontrol grubu yerli soylar ile 14 gün 120mM tuz stresi uygulanmış ve RR soya olduğu belirlenmiş yemlik soyadan *SIRE1* transpozon analizi yapıldı.

#### 3.6.1. IRAP PZR İle Polimorfizm Analizi

14 gün tuz stresi uygulanmış soya bitkilerinde ve 120mM tuz stresinde yetişmiş RR soyada *SIRE1* retrotranspozon analizi için IRAP PZR yapıldı. PZR, MyFi Enzim Mix (Bioline, BIO-21117) kullanılarak, Tablo 3.14'te verilen bileşenler ile Tablo 3.15'te verilen koşullarda gerçekleştirildi. Kullanılan IRAP primeri dizisi Tablo 3.16'da verilmiştir (Chesnay, Kumar ve Pearce, 2007). PZR reaksiyonu için Bio-Rad T100TM Thermal Cycler cihazı kullanıldı.

**Tablo 3.15:** IRAP polimeraz zincir reaksiyon bileşenleri.

Bileşen adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyon
5X MyFi Reaction Buffer	4	1 X/µl
Primer (10 µM/µl)	2	1 µM/µl
Kalıp (10 ng/µl)	2	1 ng/µl
MyFi DNA Polymerase (2 U/µL)	1.2	1.2 U
dH <sub>2</sub> O	9.8	
Toplam	20	-

**Tablo 3.16:** IRAP PZR koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10'	1
Denatürasyon	95	30'	
Bağlanma	47	30'	40
Uzama	72	2'	
Son uzama	72	7'	1

**Tablo 3.17:** *SIREI* IRAP primeri dizisi ve bağlanma sıcaklığı.

Primer Adı	Dizisi (5'→3')	T (°C)
<i>SIREI</i> IRAP	GCAGTTATGCAAGTGGGATCAGC	47

### 3.6.2. Polimorfizmin Hesaplanması

IRAP-PCR sonuçları, Jaccard Benzerlik Katsayısı kullanılarak değerlendirildi (Jaccard, 1908). Bu amaçla jelde belirgin olarak görülen homomorfik ve polimorfik bantlar sayıldı. Örnekler arasındaki % benzerlik oranları hesaplandı.

$$J (\text{Jaccard Benzerlik Katsayısı}) = \frac{M_{AB}}{(M_B + M_A + M_{AB})} \quad (\text{Denklem 3.4})$$

MB: A bireyinde olmayan, B bireyinde var olan bant sayısı, MA: A bireyinde var olan, B bireyinde olmayan bant sayısı, MAB: Hem A, hem de B bireyinde var olan bant sayısı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. YEMLİK SOYANIN DNA MİKTAR VE SAFLIĞI

Tuz stresi çalışmalarında kullanılacak olan yemlik soyanın GDO olup olmadıklarının belirlenmesi için bulk analiz yapıldı. Soyalardan modifiye CTAB (Somma, 2016) yöntemiyle izole edilen DNA'nın miktar ve saflığı Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlendi. Bulk DNA'nın miktar ve saflıklarının GDO tanısı için yapılacak PZR analizinde kullanılacak yeterlilikte oldukları belirlendi. Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilen bir bulk DNA örneğinin miktarı 724.5 ng/μl, saflığı A260/280 1.94; A260/230 2.03 olarak ölçüldü.



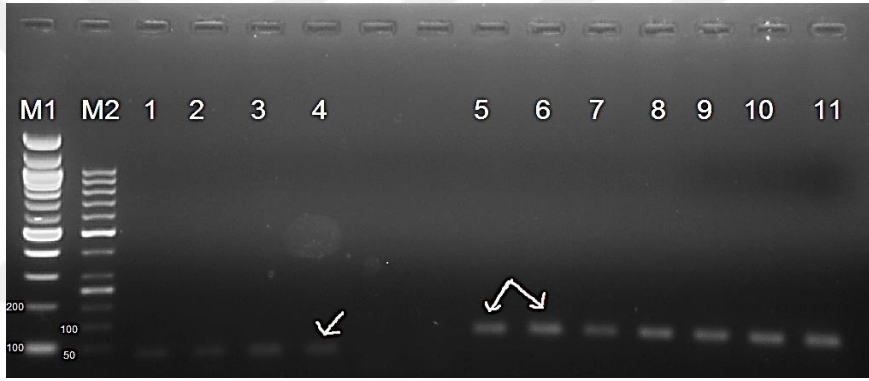
**Şekil 4.1:** Yemlik soyalardan genomik DNA'nın elektroforez jel görüntüsü. 1) Yemlik soya DNA'sı, M) GeneRuler, 1kb DNA Ladder, SM0311.

### 4.2. YEMLİK SOYADA GDO TANISI VE ÇEŞİT SAPTANMASI

Genetiği değiştirilmiş organizmaların çoğunda Karnabahar Mozaik Virüsü (CaMV) 35S promotör (P-35S) ve *A. tumefaciens* nopalin sentaz (T-Nos) terminatör dizileri bulunduğundan, genomik DNA'da, bu düzenleyici dizi bölgelerine özgü PZR analizi yapıldı.

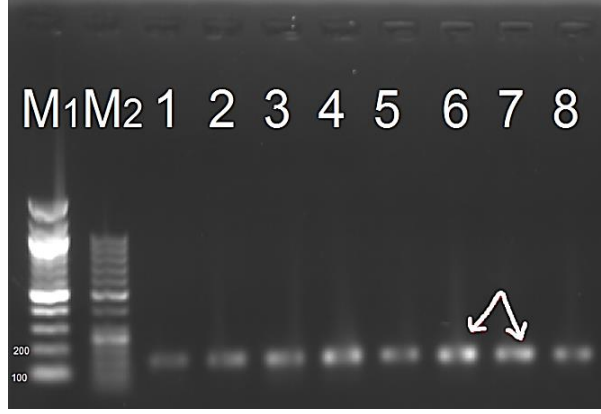
#### 4.2.1. 35S Promotoru ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması

Yemlik soyada 35S promotör hedef bölgesinin varlığı denenen iki farklı primer çifti ile de yapılan PZR sonucu tespit edildi. Bu primer çiftlerinden; 35S-FTM ve 35S-RTM primerleri ile yapılan PZR’de beklendiği gibi 82bç lik, P35S-cf3 ve P35S-cf4 primerleri ile ise yine beklendiği gibi 123bç lik bant görüntüsü elde edildi. Gradient PZR denemelerinin jel görüntüsünde en belirgin bantlar, 35S-FTM ve 35S-RTM primer çifti için bağlanma sıcaklığının 56.9° C, P35S-cf3 ve P35S-cf4 primer çifti için de bu değerin 65° C ve 64.3° C’ler olduğu örneklerde gözlemlendi (Şekil 4.2). Nos terminatör bölgesi için kullanılan primer çifti ile beklendiği gibi 151 bç’lik PZR bantı, en belirgin olarak primer bağlanma sıcaklıklarının 60.2°C ve 59.4 °C’lik örneklerde belirlendi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.2:** Yemlik soya DNA’sında 35S Gradient PZR jel elektroforezi.

1-4 numaralı kuyucuklardaki primerler 35S-FTM ve 35S-RTM primerleri; 5-11 numaralı kuyularda kullanılan ise P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleridir. 1) 35S-FTM ve 35S-RTM primerleri 50° C bağlanma sıcaklığı 2) 35S-FTM ve 35S-RTM primerleri, 53.8° C bağlanma sıcaklığı 3) 35S-FTM ve 35S-RTM primerleri, 56.1° C bağlanma sıcaklığı 4) 35S-FTM ve 35S-RTM primerleri, 56.9° C bağlanma sıcaklığı, 82 bç bant 5) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 65° C bağlanma sıcaklığı, 123 bç bant 6) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 64.3° C bağlanma sıcaklığı, 123 bç bant 7) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 63° C bağlanma sıcaklığı 8) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 61.1° C bağlanma sıcaklığı 9) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 58.8° C bağlanma sıcaklığı 10) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 56.9° C bağlanma sıcaklığı 11) P35S-cf3 ve P35S-cr4 primerleri, 55.7° C bağlanma sıcaklığı M1) GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, SM0241 M2) GeneRuler, 50 bp DNA Ladder, SM037.



**Şekil 4.3:** Yemlik soya DNA'sında NOS gradient PZR jel elektroforezi.

1) 65° C bağlanma sıcaklığı 2) 64.6° C bağlanma sıcaklığı 3) 63.8° C bağlanma sıcaklığı 4) 62,7° C bağlanma sıcaklığı 5) 61.3 ° C bağlanma sıcaklığı 6) 60.2 ° C bağlanma sıcaklığı, 7) 59.4 ° C bağlanma sıcaklığı, 8) 59 ° C bağlanma sıcaklığı M1) GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, SM0241 M2) GeneRuler, 50 bp DNA Ladder, SM037.

#### 4.2.2. Roundup Ready Çeşidinin PZR İle Saptanması

ISAAA'ya göre 40 adet GD soya eventü bulunmaktadır. Bunlar arasında, ticari olarak ilk kabul edilen ve hala günümüzde ekimi en yaygın olarak yapılan transgenik soya *Agrobacterium tumefaciens*'in CP4 soyuna ait 5-enolpirüvilşikimat-3-fosfat-sentaz enzimi (*EPSPS*) glufosinat böcek ilacına direnç geni aktarılmış "Roundup Ready (RR)" soyudur. Bu nedenle GD olduğu belirlenen yemlik soyalarda çeşit tayini için RR soya gen kasedine özgü primerler ile gradient PZR yapıldı. Bağlanma sıcaklığı 62°C olarak belirlenen RRS01-5 ve RRS01-3 primerlerinin denenen konsantrasyonlarından 10µM'ın beklendiği gibi 121 bç'lik bant belirgin bir şekilde gözlemlendi. Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4'te verildi.



**Şekil 4.4:** Yemlik soyanın RRS PZR jel elektroforez sonucu.

1) 5µM primer konsantrasyonu 2) 10µM primer konsantrasyonu 3) 10µM primer konsantrasyonu ve DMSO 4) 20µM primer konsantrasyonu 5) 20µM primer konsantrasyonu ve DMSO, M) GeneRuler, 100 bp DNA Ladder, SM0241

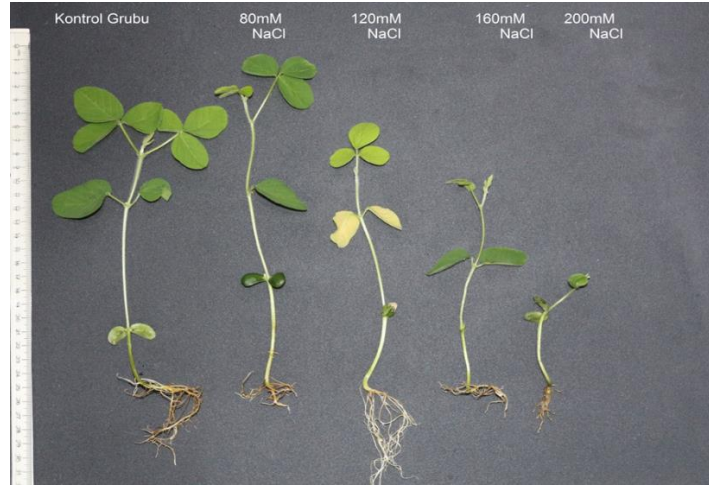
### 4.3. YEMLİK SOYALARDA TUZ STRESİNİN ETKİLERİ

Tuz stresi uygulaması için çimlendirilen soya lar üç yapraklı aşamaya geldiğinde (Şekil 4.5), farklı zamanlarda üç tekrarlı olacak şekilde kontrol ve deney grupları oluşturuldu. Deney gruplarına sırasıyla 80, 120, 160 ve 200mM tuz konsantrasyonu uygulaması 14 gün boyunca uygulandı.



**Şekil 4.5:** Optimal koşullarda üç yapraklı aşamaya gelene kadar yetiştirilen 4 günlük soya bitkileri.

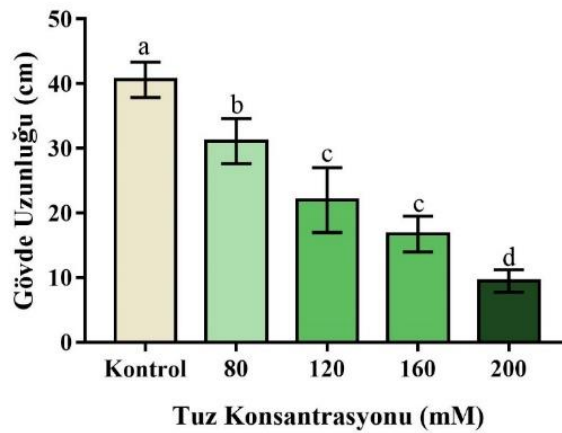
Tuz stresi 14 gün boyunca uygulanmış bitkilerin kontrol grubuna oranla gövde uzunluğu, kök uzunluğu ve yaprak alanı ölçümleri alındı. Artan tuz konsantrasyonu bitkilerin gelişimini belirgin ölçüde olumsuz yönde etkiledi. 120mM tuz konsantrasyonunun, tuz stresinden etkilenmede eşik değer olarak kabul edilebileceği, gövde gelişimindeki gerileme esas alınarak belirlendi. Tuzun artan konsantrasyonlarının bitki gelişimi üzerinde, gövde boyunda azalma, yaprak boyutunun küçülmesi, yaprakların renginde sararma şeklinde etkilere sebep olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** Kontrol ve 14 gün boyunca 80mM, 120mM, 160mM, 200mM tuz stresi uygulanmış bitkilerin 14. gündeki görüntüleri.

#### 4.3.1. Gövde Uzunluğu

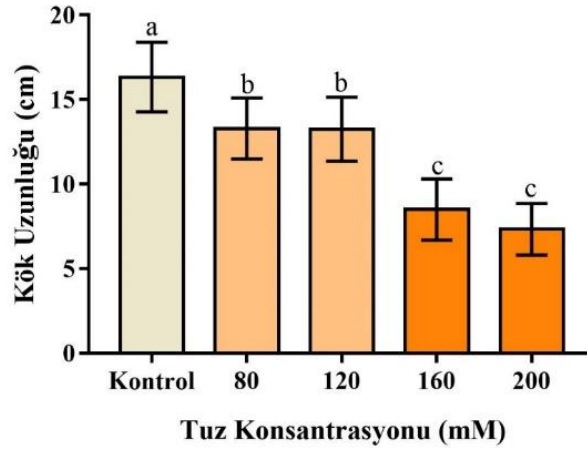
Artan tuz konsantrasyonuna paralel olarak gövde uzunluğunun azaldığı saptandı. Kontrole göre, deney gruplarının hepsinin anlamlı farklılık ortaya koyduğu belirlendi. En az etki 80mM’da gözlemlendi. 120mM ve 160mM konsantrasyonları kendi arasında anlamlı bir farklılık oluşturmamışken bu 2 konsantrasyonun da 80mM’dakinden daha etkili ancak 200mM’den daha az etkili bir sonuç ortaya koyduğu gözlemlendi. Gövde uzunluğunu en çok azaltan konsantrasyonun 200mM olduğu belirlendi. Bu verilere ait grafik, Şekil 4.7.’de verildi.



**Şekil 4.7:** Kontrol ve 14 gün tuz stresine maruz bırakılan 14 günlük bitkilere ait gövde uzunluğu grafiği.

### 4.3.2. Kök Uzunluğu

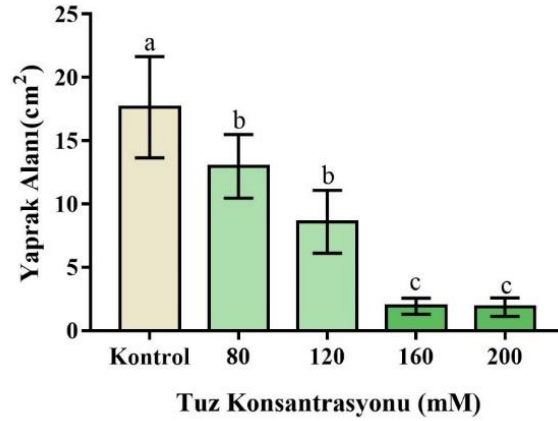
Kontrol ve deney gruplarındaki bitkilerin kök uzunluğu ölçümlerinin istatistik sonuçlarına göre artan tuz stresinin kontrol grubuna göre anlamlı farklar yarattığı görüldü. 80mM ve 120mM'ın birbirlerine yakın sonuçlar oluşturduğu gözlemlendi. Bu konsantrasyonların kök uzunluğu üzerinde etkisi, 160 ve 200mM'ınki kadar olmasa da kontrole göre anlamlı farklılık oluşturdu. En yüksek etki 160 ve 200mM konsantrasyonlarında gözlemlendi. Bu verilere ait grafik, Şekil 4.8'de verildi.



**Şekil 4.8:** Kontrol ve 14 gün tuz stresine maruz bırakılan 14 günlük bitkilere ait kök uzunluğu grafiği.

### 4.3.3. Yaprak Alanı

Kontrol ve deney gruplarındaki bitkilerin yaprak alanı ölçümlerinin istatistik sonuçlarına göre artan tuz stresinin kontrol grubuna göre anlamlı farklar yarattığı görüldü. 80mM ve 120mM'ın kök uzunluğunda da olduğu gibi birbirlerine yakın sonuçlar oluşturduğu gözlemlendi. Bu konsantrasyonların yaprak alanı üzerinde etkisi, 160 ve 200mM'ınki kadar olmasa da kontrole göre anlamlı farklılık oluşturdu. En yüksek etki 160 ve 200mM konsantrasyonlarında gözlemlendi. Bu verilere ait grafik, Şekil 4.9'da verildi.

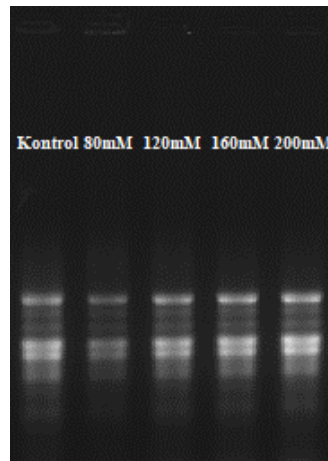


**Şekil 4.9:** Kontrol ve 14 gün tuz stresine maruz bırakılan 14 günlük bitkilere ait yaprak alanı grafiği.

#### 4.4. ROUNDUP READY ÇEŞİDİNİN GERÇEK ZAMANLI (RT) PZR İLE SAPTANMASI

##### 4.4.1. RNA'nın Miktar ve Saflığı

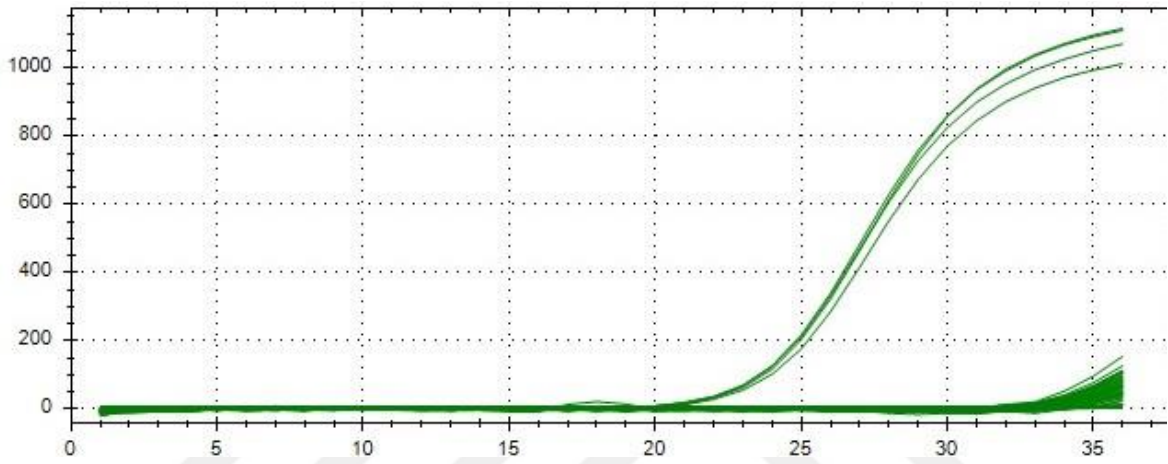
Tuz stresi uygulanmış (80mM, 120mM, 160mM, 200mM) 14 günlük bitkilerin yapraklarından elde edilen RNA izolatlarının, kontrol ve tüm deney gruplarında sağlam ve saf ve cDNA sentezinde kullanılmak için uygun olduğu belirlendi ve RNA'ların agaroz jel elektroforezine ait örnek görüntü Şekil 4.10'da verildi.



**Şekil 4.10:** Tuz stresi uygulanmış (80mM, 120mM, 160mM, 200mM) 14 günlük bitkilerin yapraklarından elde edilen RNA izolatlarının örnek agaroz jel görüntüsü.

#### 4.4.2. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

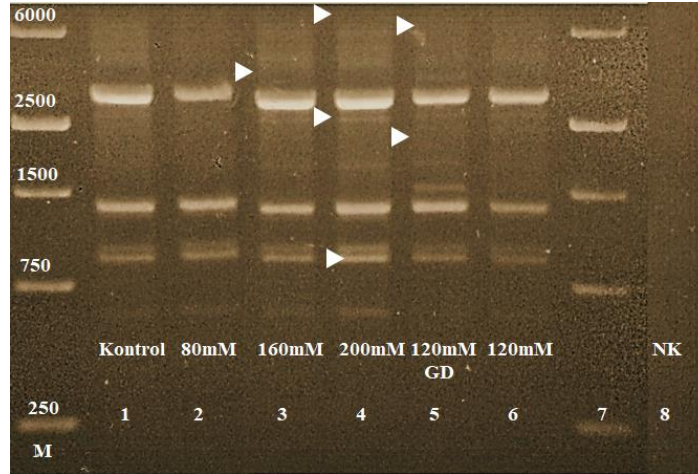
Tuz stresinin transgen anlatımı üzerindeki etkisinin incelenmesi için Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılmak üzere, kontrol ve 14 gün tuzluluk uygulaması yapılan bitkilerinin yapraklarından izole edilen RNA’lar, cDNA’ya çevrildi. *EPSPS* genine ait primerlerle RT-PZR sonrası sadece 120mM’a ait bitkilerde bu genin çoğaldığı gözlemlendi. Farklı zamanlardaki teknik tekrarlarından biri örnek olarak Şekil 4.11’de verildi.



**Şekil 4.11:** *CTP4-CP4 EPSPS* bölgesine ait 120mM tuz konsantrasyonunda yetişen soyanın Gerçek Zamanlı PZR çoğaltım grafiği.

#### 4.5. IRAP PZR İLE *SIRE1* RETROTRANSPOZON POLİMORFİZMİ

*SIRE1* retrotranspozonuna ait polimorfizm oranları her bitki, diğer bitkiler ile karşılaştırılarak hesaplandı. 250 bç ile 6000 bç arasındaki bant profil örnekleri arasındaki yüzde polimorfizm oranı Jaccard Benzerlik Katsayısı formülü ile hesaplandı (Denklem 3.4). Daha büyük bantlar jelde iyi bir şekilde ayırlamadığı için değerlendirmeye alınmadı. Jaccard Benzerlik Katsayısı formülü ile hesaplanan polimorfizm sonuçlarına göre, en yüksek polimorfizm yüzdesinin 160mM ile 200mM arasında (%90) arasında olduğu görüldü. 120mM GD ve 120mM GD olmayan kontrolü karşılaştırıldığında aradaki polimorfizm oranı %33 olarak hesaplandı. Bitkilerde karşılaştırılan bantların varlığı (+) ve yokluğu (-) Şekil 4.12’de verildi.



**Şekil 4.12:** *SIRE1* IRAP PZR sonuçları.

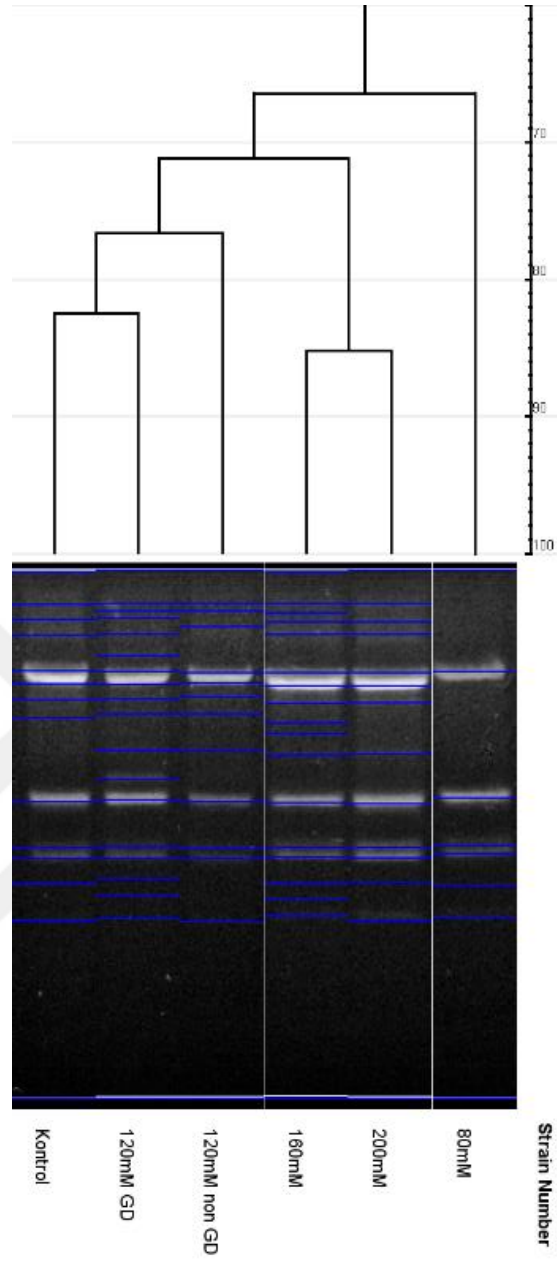
M) 1Kb GeneRuler, 1) Kontrol, 2) 80mM, 3) 160mM, 4) 200mM, 5) 120mM GD bitki, 6) 120mM, 7) 1Kb GeneRuler, 8) Negatif kontrol. Beyaz oklar polimorfik bantları işaret etmektedir.

Kontrol ve 80mM arasında 6 homomorfik – 6 polimorfik bant; Kontrol ve 120mM arasında 11 homomorfik – 1 polimorfik bant, kontrol ve 160mM arasında 12 homomorfik – 4 polimorfik bant, kontrol ve 200mM arasında 11 homomorfik – 1 polimorfik bant, 80mM ve 120mM arasında 5 homomorfik -8 polimorfik bant, 80mM ve 160mM arasında 6 homomorfik -10 polimorfik bant, 80mM ve 200mM arasında 6 homomorfik – 6 polimorfik bant, 120mM ve 160mM arasında 12 homomorfik – 4 polimorfik bant, 120mM ve 200mM arasında 9 homomorfik – 6 polimorfik bant, 160mM ve 200mM arasında 12 homomorfik - 4 polimorfik bant; 120mM GD bitki ve 120mM kontrol arasında 11 homomorfik – 7 polimorfik bant gözlemlendi.

**Tablo 4.1:** IRAP-PCR sonuçlarına göre hesaplanan *SIRE1* retrotranspozonuna ait polimorfizm yüzdeleri.

	Kontrol	80mM	160mM	200mM	120mM GD	120mMM
Kontrol	-					
80mM	50	-				
160mM	41	36	-			
200mM	45	40	90	-		
120mM GD	42	19	35	29	-	
120mM	55	50	41	45	33	-

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi kontrol bitkilerinde %55’e varan varyasyon görülmüştür. 80mM tuz uygulanmış bitkilerde, polimorfizm yüzdesi %19 ile %50 arasında değişmektedir. Buna karşın kontrol ile 80mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %50, kontrol ile 120mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %55, kontrol ile 160mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %41, kontrol ile 200mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %45 polimorfizm gözlenmiştir. 80mM tuz uygulanmış bitkiler ile 120mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %50, 80mM tuz uygulanmış bitkiler ile 160mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %50, 80mM tuz uygulanmış bitkiler ile 200mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %50, 120mM tuz uygulanmış bitkiler ile 160mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %41, 120mM tuz uygulanmış bitkiler ile 200mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %45, 160mM tuz uygulanmış bitkiler ile 200mM tuz uygulanmış bitkiler arasında %90 polimorfizm gözlenmiştir.



**Şekil 4.13:** *SIRE1* IRAP PZR sonuçlarına göre bitkilerin GelJ v.2.0 programı kullanılarak bant profillerine göre kümelmesi.

GelJ programında, UPGMA kümeleme metodu kullanılarak bant profil benzerliklerine göre çizilen dendrogramda (Şekil 4.13) bireyler 2 ana sınıf altında toplanmıştır. Buna göre 80mM'a ait bitki bir grupta geriye kalan bitkiler ise diğer gruba yerleştirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

GD bitkiler üretildikleri ilk yıllardan beri yoğun ilgi görmüş ve her geçen gün GD bitkilerin tarımda kullanımları artmıştır (James, 2017). Elde edilmelerinden pazara sunulmalarına kadar GD bitkiler uzun risk değerlendirme ve test süreçlerinden süreçlerden geçseler de sahada kullanımlarında çevresel stres koşulları dahil birçok etmenle karşı karşıya kalırlar. Ayrıca GD bitkilerin genomlarında, genetik transformasyonun bir sonucu olarak, transformasyon ve doku kültürü sürecinde meydana gelen rastgele mutasyonlardan veya eklenen proteinin pleiotropik etkilerinden kaynaklanabilen “beklenmeyen etkiler” oluşabilir. Bu etkilerden ötürü transgen kararlılığı da değişim gösterebilir. Tarımdaki yararlarının sürdürülebilir şekilde devam ettirilmesi için pazara sunulan GD bitkilerin transgen kararlılığının izlenmesi gereklidir. Bu tez çalışmasının amacı pazardaki GD bitkilerin çevresel stres koşullarından biri olan tuzlulukta transgen kararlılığını koruyup korumadığının incelenmesi ve transformasyonun GD bitki genomunda yaratabileceği “beklenmeyen etkiler” den biri olan transpozon hareketliliğinin tuz stresinde nasıl davrandığının araştırılmasıdır.

2008’de GD ticari tohum çeşitlerinde yapılan pazarlama sonrası ilk kararlılık analizinde CryIA(b) protein anlatım düzeylerinin, enzime bağlı immünosorbent ile belirlenmesinde, analiz edilen 26 çeşitten yirmi dördünün beklenen kararlılık özelliklerini karşıladığı belirlenmiştir (Aguilera ve diğ., 2008). Ancak, MON 810 konstraktının değiştirildiği ARISTIS BT ve CGS4045 çeşitlerinde kararsızlık gözlenmiştir. DNA ve protein temelli yöntemlerden elde edilmiş sonuçlar, ARISTIS BT çeşidinde GD insertinin olmadığını gösterdiği için; bu durum ARISTIS BT’nin yaşamı boyunca veya daha sonraki nesiller boyunca transgen bölgesini kaybeden bir çeşit olabileceğini düşündürmüştür (Aguilera ve diğ., 2008).

Yapılan bir diğer çalışmada ise mısır MON 810 ticari çeşitlerinde transgenin ve komşu dizilerinin DNA değişkenliğini analiz edilmiştir. Southern emdirimi analizleri, ıslahın, 10 yıldan daha önceki ilk transformasyondan bu yana herhangi bir yeni düzenlemeyle sonuçlanmadığını göstermiştir. DNA yanlış eşleşmelerinin (mismatch) endonükleaz enzimleri kullanılarak nükleotid düzeyindeki DNA değişkenliği üzerine yapılan ayrıntılı bir analizde de transgende polimorfizm olmadığını göstermiştir. Bu nedenle transgenin mutasyon hızının mısır endojen genlerinde gözlenenden önemli ölçüde farklı olmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada *Zeon1* retrotranspozon uzun terminal tekrarına karşılık gelen 50 yan dizide altı SNP

gözlenmiş, bu altı SNP'nin tümünün de transgenin yerleştirilme noktasının yukarısında 500 bç'den daha uzun bir mesafede yer aldığı belirlenmiştir. Yine, yan komşu bölgenin mutasyon oranı, mısırdaki tekrarlı bir dizi sekansı için beklenenine benzer bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada farklı transgenik çeşitlerin yapraklarındaki sitozin metilasyon düzeyleri araştırılmış, farklı transgenik çeşitlerin karşılaştırılmasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Diğer yandan yaprak gelişimi sırasında cryIAb mRNA birikiminde bir azalma belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan bu ticari çeşitler farklı üreticiler tarafından farklı yıllarda pazara sunulan çeşitler olduğundan, bu çalışma mevcut MON 810 hatlarının geniş bir temsilini de sağlamıştır (Luis ve diğ., 2010).

Ticari GD bitkilerde transgenlerin tüm bitki kısımlarında ve tüm iklim koşullarında yüksek düzeyde ve sürekli olarak anlatım yapması beklenir. Pazara sunulan GD bitkilerin çevresel stres koşullarındaki kararlılıklarıyla ilgili yakın zamanda yapılan Bt toksinine dirençli (MON810) aynı transgeni taşıyan iki farklı ticari mısır çeşidinin optimal ve stres koşulları (sıcak/kurak ve soğuk/sulak) altında yetiştirilmiştir. Bu çalışmada, Bt mısırdaki değişen çevre koşulları ile yabancı gen anlatımı ve protein üretimi arasındaki ilişki incelenmiştir. Bitkilerin yaprakları qRT-PCR ile transgen anlatımını, ELISA ile de Bt protein içeriği bakımından karşılaştırılmak için kullanılmıştır. Optimal koşullarda iki çeşit arasında transgen anlatımı bakımından fark saptanmazken, Bt protein içeriği bakımından önemli farklar gözlenmiştir. Bt proteinin, soğuk/sulak stres koşulu uygulanmış durumda yetiştirilenlerin optimal koşulda yetiştirilenlere göre 4 kat fazla olduğu bulunmuştur. Transgenik bitkilerden sadece bir çeşitte Bt protein içeriği transgen anlatımıyla ilişkilendirilebilmiştir ve Bt gen anlatımı ile protein içeriği uyumlu bulunmuştur. Stres koşullarında transgen anlatımı optimal koşullardakinden farklı bulunmazken, protein miktarı farklıdır. Bu sonuçlar, protein içeriğinin sadece transgen anlatımı ile kontrol edilmediğini, aynı zamanda mısır çeşidinin genotipine de bağlı olduğunu göstermiştir. Stres koşulları altında Bt protein içeriğindeki değişimin açıklanabilmesi ise daha zordur. Böylece, stres şartlarının etkilerinin ön görülemez olduğu vurgulanmıştır (Trtikova ve diğ., 2015). Bu sonuç genetik mühendisliği ile elde edilen bitkilerin transgen düzenlenmesinin anlaşılmasında önemli eksiklikler olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, transgenik bitki metabolizmasının zorlu veya değişken çevre koşullarından nasıl etkileneceğine ilişkin veriler, bu bitkilerinin tarımında yönlendirici nitelikte olacaktır.

Bu çalışmalar tarımı yapılan GD bitkilerde biyotik ve abiyotik stres gibi belirli koşulların “beklenmeyen etkiler”in sıklığını artırabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, GD organizmaların genomunda “beklenmeyen etkiler”in araştırılması amacıyla yemlik GD soyların tuz stresi koşullarında gen anlatımı ve transpozon hareketliliği analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, öncelikle Yem Sanayiciler Birliği’nden alınan ithal yemlik soyların GDO taraması gerçekleştirildi. Yemlik soyların GDO taraması CaMV 35S promotor ve Nos terminatör bölgeleri hedeflenerek PZR ile başarılı bir şekilde yapıldı. GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (EURL-GMFF), GDO taramasında PZR moleküler analizinin, etkin bir biçimde uygulanabilirliğini belirtmektedir (CRL-GMFF, 2007, 2008). PZR analizi ile GDO taraması sonucunda, yemlik soyların %20’sinin GD oldukları saptandı. Türkiye’de GDO taraması, Tarım ve Orman Bakanlığı’na bağlı devlet laboratuvarlarında, bakanlık ve Türk Akreditasyon Kurumu tarafından yetkilendirilmiş özel gıda kontrol laboratuvarlarında yapılmaktadır. İthal edilen yemlerin sadece %20’sinin GD olarak saptanmış olması, GDO taramalarındaki numunelerin hepsinin GD olmayabileceğini düşündürmüştür. ISAAA’ya göre GD soyların %80’i herbisit toleransı taşımaktadır. Mevcut transgenik soya çeşitlerinden 35S promotor ve Nos terminatör düzenleyici gen bölgelerinin ikisini de içeren Roundup Ready aynı zamanda ilk ve hala en yaygın GD soya çeşididir. Aynı zamanda Türkiye’de bu çeşidin yem olarak kullanımına izin verilmiştir. Bu nedenle GD olarak saptanan yemlik soyların çeşidinin belirlenmesi için Roundup Ready soyanın içerdiği *EPSPS* genine özgü PZR analizi yapıldı ve RR soya oldukları tespit edilerek öngörü onaylandı.

Yemlik soylar ve kontrol olarak kullanılan yerli soylar daha sonra tuz stresi uygulanmak üzere yetiştirildi ancak yemlik soyların çok düşük bir oranının yetiştirilebilmiş olması, Biyogüvenlik Kanunu dikkate alındığında GD bitkilerin Türkiye’de sadece yem olarak kullanımlarına izin verilip ekimlerinin yasak olması ve bu soyların yem amaçlı kullanımlarında canlılığın aranmadığını da destekler niteliktedir. Yetiştirilen soylar 14 gün boyunca sırasıyla 80, 120, 160 ve 200mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakıldı. Gerek yerli soylarda gerekse ithal yemlik soylarda 120mM’in bitkilerin kök ve gövde uzunluğu ve yaprakların rengi bakımından değişikliklerin izlenmesinde eşik değer olduğu görülmüştür. Artan tuz konsantrasyonuyla deney gruplarının hepsinin kontrole göre, anlamlı derecede bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir. Gövde uzunluğunun azalmasında en belirgin etki, 200mM tuz konsantrasyonunda gözlenmiştir. Bitkilerin kök uzunluğu ölçümlerinin istatistik sonuçlarına göre ise artan tuz stresinin kontrol grubuna göre anlamlı

farklar yarattığı, en yüksek etkinin 160 ve 200mM konsantrasyonlarında olduğu belirlenmiştir. Artan tuzun yaprak alanında yaptığı, etki kök uzunluğu üzerindeki etkiyle aynı şekilde olmuştur. Tuzluluğun bitki görünümünde yarattığı bu etkiler önceki çalışmalarda da benzer şekilde olmuştur. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Tokak varyetesinde 100 mM tuz stresinde yetiştirilen arpaların gövde uzunluklarında %37.3 oranında azalma ve kök uzunluklarında %24.63 oranında azalma olduğu (Demirkıran, 2012) ve yine arpada 80, 120, 160 ve 200 mM tuz konsantrasyonlarının sürgün uzunluğunda ciddi azalmaya neden olduğu (Uçarlı, 2016) görülmüştür.

Çevresel stres koşullarında ticari GD bitkilerin transgen anlatımının nasıl etkileceğinin araştırılması amacıyla yemlik soya bitkilerinde 14 gün tuz stresi uygulaması ardından; tuzluluğun, soyalarda Roundup Ready çeşidine özgü *EPSPS* geninin anlatımına olan etkisinin incelenmesi için Gerçek Zamanlı PZR analizi yapıldı. İncelenen 15 bitkiden, sadece 120mM tuz uygulamasına maruz bırakılan 2 bitkinin Roundup Ready soya olduğu belirlendiğinden; gen anlatımının tuz stresinden kontrol grubundaki bitkilere göre nasıl etkilendiği karşılaştırılmadı. Kalan 13 bitkinin, Roundup Ready çeşidi dışında Türkiye'ye ithaline izin verilen transgenik soya çeşitlerinden biri olabileceği düşünüldü. Tuzluluk koşulunda transgen özelliklerinin korunması, her ne kadar mevzuat kapsamında Türkiye'de transgeniklerin sadece yem olarak kullanımına izin veriliyor olması nedeniyle yetiştirilmeleri yasak olsa bile transgeniklerin ekiminin yapıldığı bölgeler için önemlidir.

“Beklenmeyen etkiler” arasındaki transpozon hareketliliği bitki genomunun evrimsel sürecinde hangi tür retrotranspozonların ne kadarının var olduğu, hangi transpozonların ne kadarının aktif olduğu ve transpozisyon hızlarındaki farklılıklar gibi açılardan etkileriyle çok önemli bir rol oynamıştır. Bugüne kadar nitelendirilen aktif bitki transpozonlarının çoğu, optimal koşullardaki normal gelişim sırasında büyük ölçüde durgunluk gösterir, ancak abiyotik stresler tarafından indüklenebilir (Todorovska, 2007). Genom dinamiği için önemli bir etken olan transpozonların tuz stresinde nasıl davrandıklarının anlaşılması, özellikle değişen çevre koşulları nedeniyle tarımı yapılan alanlarda tuzluluğun gittikçe artması nedeniyle araştırılmalıdır. Bir diğer yandan ticari transgeniklerin, pazarda kullanımları öncesi insan, hayvan ve bitki sağlığı bakımından güvenilirliklerinin tespiti için Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), bazı risk değerlendirmelerine tabi tutulmasını zorunlu kılmıştır. Ancak olası tüm “beklenmeyen etkiler”in tespit edilebilmesi için uzun ve ayrıntılı araştırmalar olan genom düzeyinde

analizlerin risk değerlendirmelerinde rutin olarak yapılmasının mümkün olmaması, rutinden ayrı olarak bu etkilerin aydınlatılması bilimsel araştırmaların bir konusudur.

Kaya ve arkadaşları (2013) transformasyon sırasında ortaya çıkabilecek retrotranspozon temelli genetik çeşitliliği araştırmak için *dehE* geni ile transforme edilmiş 5 transgenik tütün bitkisine IRAP analizi gerçekleştirmiştir. Bireyler arasında doğal olarak oluşan bir polimorfizm olup olmadığının anlaşılması için ayrıca 3 transgenik olmayan tütün bitkisini kontrol olarak kullanmışlardır. IRAP PZR sonucunda kontrol bitkileri arasında herhangi bir polimorfik bant tespit etmediklerinden Tto1 retrotranspozonunun doğal polimorfizme neden olmadığı sonucuna varmışlardır. 5 transgenik tütün bitkisinin IRAP sonuçları ise tüm bireylerin farklı bant düzenlerine sahip olduğunu göstermiştir. Kontrol bitkileri arasında herhangi bir polimorfizm olmamasına karşın, transgenik olanlarda bu oran %0- %20 arasındadır. Bu polimorfizm oranları, *dehE* gen transformasyonunun retrotranspozisyon polimorfizmine neden olabileceğini kanıtlamıştır (Kaya ve diğ., 2013).

Daha yakın bir zamanda GD bitkilerin transpozon hareketliliğine dair bir çalışmada Gd pirinçte transformasyonun transpozon hareketleri üzerine etkileri incelenmiş, bu amaçla *Houba* retrotranspozonuna özgü IRAP-PZR kullanılarak GD ve GD olmayan pirinç tohumlarında transpozon hareketliliği karşılaştırılmıştır. Farklı kaynaklardan toplanan toplam 71 pirinç tohumunda Gerçek Zamanlı PZR analizi ile 35S, NOS, FMV, *bar*, *pat*, *cryIab/ac* genleri tespit edilememiş, ancak 6 tanesinde hpt geni bulunmuştur. Transgenik pirinçte *Houba* retrotranspozon hareketleri kontrolleri ile incelenmiş ve tüm örneklerde %0-56 polimorfizm oranları gözlenmiştir. Ayrıca, transgenik örnekler arasında %0-25, kontrol transgenik pirincinde %19 ve kontrol dışı transgenik pirinç için %19 olduğunu bulunmuştur (Yüzbaşıoğlu, Maraklı ve Gözükırmızı, 2017).

Bu tez çalışması kapsamında da genetik transformasyonun GD organizmanın genomunda oluşturabileceği “beklenmeyen etkiler”den transpozon hareketinin tuz stresi altında nasıl bir değişim göstereceği araştırılmıştır. 14 gün tuz stresine maruz bırakılan yerli soylar ve 120mM tuz stresinde yetişmiş GD soylarda *SIREI* retrotranspozonu için IRAP PZR analizi yapıldı. Yerli soylarda kontrol ve deney grupları arasında *SIREI* polimorfizmini %0-55 aralığında değiştiği belirlendi. Deney grupları arasında 160mM ve 200mM konsantrasyonlarındaki bitkilerde en yüksek polimorfizm oranı %90 olarak görüldü. 120 mM tuz konsantrasyonda yetişen GD soyada ve yine 120mM tuz stresinde yetişen yerli soya kontrol grubuna göre *SIREI*

retrotranspozonunun hareketliliğine baēlı olarak %33 polimorfizm artışı gözlemlendi. Bu sonuçlar, ticari GD'lerin çevresel stres koşullardan biri olan tuzluluktan etkilenebileceğini göstermiştir. Literatürdeki çalışmalar da bu sonucu destekler niteliktedir.

Transgenik bitkilerin transformasyon sonucu genom dinamiğinin anlaşılması için mevcut bilimsel araştırmalar yeterli değildir. Bu tez çalışmasından çıkan sonuçlar transgenik genomunun optimal olmayan bir çevre koşulunda nasıl davranacağını anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Tarımdaki çok sayıda yararlarının sürdürülebilir olarak devam etmesinde transgeniklerin optimal olmayan saha koşullarında transgen özelliklerini koruyup korumadığını, protein ürününün azalıp azalmadığını, genom dinamiğinin anlaşılması için ilerleyen zamanlarda daha çok araştırmanın yapılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Ahanger, M.A., Akram, N.A., Ashraf, M., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., ve Ahmad, P., 2017, Plant responses to environmental stresses — from gene to biotechnology, *AoB Plants*, 9(4).
- Altpeter, F., Springer, N., Bartley, L., 2016, Advancing crop transformation in the era of genome editing, *The Plant Cell*, tpc-00196.
- Ansari, K.I., Walter, S., Brennan, J.M., Lemmens, M., Kessans, S., Mcgahern, A., Egan, D., ve Doohan, F.M., 2007, Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and non-mycotoxigenic-associated Fusarium stress, *Theoretical and Applied Genetics*, 114(5) 927–937.
- Batzer, M. ve Deininger, P. L., 2002, Alu repeats and human genomic diversity, *Nature reviews genetics*, 3(5), 370.
- Bayraktar, F., 1999, *Türkiye Kalkınma Bankası A.Ş. Sektörel Araştırmalar*.
- Bektaş, M., 2013. GDO ve Diğer Biyoteknolojilerde Risk Değerlendirmesi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara, Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2016.
- Bergman, C.M. ve Quesneville, H., 2007, Discovering and detecting transposable elements in genome sequences, *Briefings in bioinformatics*, 8 (6), 382–392.
- Bousios, A., Kourmpetis, Y.A.I., Pavlidis, P., Minga, E., Tsaftaris, A., ve Darzentas, N., 2012, The turbulent life of Sirevirus retrotransposons and the evolution of the maize genome: more than ten thousand elements tell the story, *The Plant Journal*, 69 (3), 475–488.
- Breseghele, F. ve Coelho, A.S.G., 2013, Traditional and Modern Plant Breeding Methods with Examples in Rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (35), 8277–8286.
- Briefs, ISAAA, 2017, Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years.
- Brookes, G. ve Barfoot, P., 2017, Farm income and production impacts of using GM crop technology 1996–2015, *GM Crops & Food*, 8 (3), 156–193.
- Budd, R., 1991, Biotechnology in the 20th century, *Soc. Stud. Sci.*, 21(3), 415–457.
- Burssens, S., Beeckman, T. ve Montagu, M. Van, 2000, Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 211(5), 632-640.
- Campbell ve Reece, 2008, Biyoloji, Çev. Prof. Dr. Ertunç Gündüz, Prof. Dr. Ali Demirsoy ve Prof. Dr. İsmail Türkan, *Palme Yayıncılık*.

- Chesnay, C., Kumar, A., ve Pearce, S.R., 2007, Genetic diversity of *Sire-1* retroelements in annual and perennial glycine species revealed using SSAP, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 12 (1), 103–110.
- Chilton, M. D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P., & Quetier, F., 1980, T-DNA from *Agrobacterium Ti* plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 4060-4064.
- CRL-GMFF, CRLVL13/05XP, E.C., 2007, Soybean Seeds Sampling and DNA Extraction Report on the Validation of a DNA Extraction Method from Soybean Seeds.
- Demirkıran, A., 2012, Doku kültüründe tuz (NaCl) stres koşullarında yetiştirilen arpa (*Hordeum vulgare* cvs. L.) bitkilerinde genetik ve epigenetik analizler, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Elenis, D.S. ve Kalogianni, D.P., 2008, Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(3), 347-354.
- Ergin, N. ve Aydemir, S.K., 2018, Soya Bitkisinin Hayvan Beslenmesindeki Yeri ve Önemi, *International Journal of Eastern Mediterranean Agricultural Research*, 1(1), 144-158.
- Evrensel, C., 2010, Arpa (*Hordeum vulgare* L.) doku kültürlerinde transpozon analizi, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- FAO, 2018. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2018*.
- Francis, D., Finer, J.J. ve Grotewold, E., 2017, Challenges and opportunities for improving food quality and nutrition through plant biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 124–129.
- Freese, W. ve Schubert, D., 2013, Safety Testing and Regulation of Genetically Engineered Foods Safety Testing and Regulation of Genetically Engineered Foods, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 21(1), 299-324.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., and Duan, J., 2007, Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria, *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*. Dordrecht: Springer Netherlands, 329–339.
- Guo, D., Zhang, H., ve Luo, Z., 2006, Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb related species revealed by IRAP and REMAP analysis, *Plant Science*, 170(3), 528-533.
- Hardegger, M., Brodmann, P., and Herrmann, A., 1999. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR, *European Food Research and Technology*, 209 (2), 83–87.
- Hoagland, D. R. ve Arnon, I., 1950, The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil, Circular., *California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).

- Holst-Jensen, A., Rønning, S.B., Løvseth, A., Berdal, K.G., 2003, PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375 (8), 985–993.
- Huang, J., Zhang, K., Shen, Y., Huang, Z., Li, M., Tang, D., 2009, Genomics Identification of a high frequency transposon induced by tissue culture, nDaiZ, a member of the hAT family in rice, *Genomics*, 93 (3), 274–281.
- Ibelgaufts, H., 1993. *Gentechnologie von A-Z. Studienausgabe.* VCH Verlag.
- Jaccard, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44, 223-270.
- James, C., 2017, ISAAA Briefs brief 53 Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years, (53).
- Kalendar, R., 2010, Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers, *Heredity*, 106 (4), 520–530.
- Kashkush, K., Feldman, M., ve Levy, A.A., 2003, Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat, *Nature Genetics*, 33(1), 102.
- Kaya, Y., Yilmaz, S., Gozukirmizi, N., ve Huyop, F, 2013, Evaluation of transgenic *Nicotiana tabacum* with *dehE* gene using transposon based IRAP markers, *American Journal of Plant Sciences*, 4(8A), 41-44.
- Korth, K.L., 2008, Transgenik Bitkilerle İlgili Genler ve Özellikler, Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik, Çeviri Editörleri: H.A Öktem, M. Yücel, 2012, *Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti.*, Bölüm 8:193-216.
- 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.
- Laten, H.M., Havecker, E.R., Farmer, L.M., ve Voytas, D.F., 2014, *SIRE1* an Endogenous Retrovirus Family from *Glycine max*, Is Highly Homogeneous and Evolutionarily Young, *Molecular biology and evolution*, 20(8), 1222-1230.
- Luis, J., Paz, L., Pla, M., Papazova, N., ve Vicient, C.M., 2010, Stability of the MON 810 transgene in maize, *Plant molecular biology*, 74(6), 563-571.
- Macar, T.K., Macar, O., Yalçın, E., ve Çavuşoğlu, K., 2017, Gen Teknolojisi ve Bitkilerde Genetik Transformasyon Yöntemleri, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17.
- Malik, H.S. ve Hutchinson, F., 2014, Origins and Evolution of Retrotransposons, In Mobile DNA II, *American Society of Microbiology* (pp. 1111-1144).

- Maniatis, T., vd. 1982, Molecular cloning–A laboratory manual. *Acta Biotechnologica*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 5.1: 104-104.
- Mansour, A., 2014, Epigenetic activation of genomic retrotransposons, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6(2), 99-107.
- Manuel, R., Machado, A., Serralheiro, R.P., 2017, Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth. Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization, *Horticulturae*, 3(2), 30.
- McClintock, B., 1950, The origin and behavior of mutable loci in maize, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(6), 344-355.
- Michelini, E., Simoni, P., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Roda, A., 2008, New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (3), 355–367.
- Naegeli, H., Birch, A.N., Casacuberta, J., Schrijver, A. De, Guerche, P., Jones, H., Manachini, B., Mess, A., Nielsen, E.E., Nogu, F., Robaglia, C., Rostoks, N., Sweet, J., Tebbe, C., Visioli, F., Wal, J., Devos, Y., Dumont, A.F., Lanzoni, A., Paoletti, C., Paraskevopoulos, K., ve Waigmann, E., 2017, Guidance for the risk assessment of the presence at low level of genetically modified plant material in imported food and feed under Regulation (EC) No 1829 / 2003, *EFSA Journal*, 15 (1829).
- Onat, F. B. Z., 2012, Erken ve geç ekilen ikinci ürün soyada çift sıralı ekim yönteminde farklı bitki yoğunluklarının verim ve verim unsurlarına etkisi, Doktora, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Öktem, H. A., 2016, Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik. Editör H. A. ÖKTEM ve M. YÜCEL. *NOBEL AKADEMİK YAYINCILIK*.
- Parida, A.K. ve Das, A.B., 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Elsevier*, 60, 324–349.
- Rao, A.Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A.A., Husnain, T., ve Riazuddin, S., 2009, The myth of plant transformation, *Biotechnology Advances*, 27 (6), 753–763.
- Ruan, C., Teixeira, J.A., Mopper, S., Qin, P., Lutts, S., Ruan, C., Teixeira, J.A., Mopper, S., Qin, P., ve Lutts, S., 2010, Halophyte improvement for a salinized world. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(6), 329-359.
- Saeed, T. ve Shahzad, A., 2016, Basic Principles Behind Genetic Transformation in Plants. In: *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*, Springer, 327–350.
- Schulman, A. H., Gupta, P. K., Varshney, R. K., 2004, Organization of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes, In *Cereal genomics* (pp. 83-118), Springer, Dordrecht.

- Schulman, J.R.A.H. ve Manninen, O., 2000, Application of *BARE-1* retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley, *Molecular and General Genetics MGG*, 264(3), 325-334.
- Shrivastava, P. ve Kumar, R., 2015, Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (2), 123–131.
- 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.
- Starlinger, P. ve Döring, P., 1984, Barbara McClintock's Controlling Elements: Now at the DNA Level, *Cell*, 39, 253–259.
- Taşçı, R. ve Uçum, İ., 2018. Tarım Ürünleri Piyasaları, *TEPGE*, (17), 2016–2019.
- Testbiotech, 2015, Stress test for genetically engineered plants shows major gaps in risk assessment, 1–15.
- Todorovska, E., 2007, Retrotransposons and their Role in Plant—Genome Evolution, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21 (3), 294–305.
- Trtikova, M., Wikmark, O.G., Zemp, N., Widmer, A., ve Hilbeck, A., 2015, Transgene Expression and Bt Protein Content in Transgenic Bt Maize (MON810) under Optimal and Stressful Environmental Conditions, *PLOS ONE*, 10 (4), e0123011.
- TÜİK. 2014, Kaynak: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=104&locale=tr> (Erişim Tarihi: 22.12.2018).
- Uçarlı, C., 2016, Tuz stresi etkisindeki arpa bitkilerinin gen anlatım profilleri, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- USDA, 2018, United States of Department Agriculture <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=zema>, [Ziyaret Tarihi: 25.12.2018].
- Wicker, T., vd., 2007, A unified classification system for eukaryotic transposable elements, *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973.
- Willmitzer, L., 1980, The Interaction of *Agrobacterium* Ti-Plasmid DNA and Plant Cells [ and Discussion ], *The Royal Society*, 210, ss. 351–365.
- Wu, Y., Gong, W., Wang, Y., Yong, T., Yang, F., ve Liu, W., 2018. Leaf area and photosynthesis of newly emerged trifoliate leaves are regulated by mature leaves in soybean, *Journal of Plant Research*, 1-10.

- Yüzbaşıoğlu, G., Maraklı, S., ve Gözükırmızı, N., 2017, Screening of *Oryza sativa* L. for *Hpt* Gene and Evaluation of *Hpt* Positive Samples Using *Houba* Retransposon-Based IRAP Markers, *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 59–59.
- Zhang, Y., Lv, Y., Jahan, N., Chen, G., Ren, D., ve Guo, L., 2018, Sensing of Abiotic Stress and Ionic Stress Responses in Plants, *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3298.



## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Olcay ŞAHİN
Doğum Yeri	Seyhan/ADANA
Doğum Tarihi	19.07.1992
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0545 587 96 93
E-Posta Adresi	sah.olcay@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	27.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Programı

Makale ve Bildiriler
<p>1. Olcay Şahin, Nagihan Tombul, Ayyub Ebrahimi, Deniz Gürle, Şule Arı. (2015). Histon 3 Lizin 9 Metilasyon inhibisyonunun <i>Nicotiana tabacum</i>'da Kallus oluşumu ve Gen Anlatım Profiline Etkisi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Bildiriler Kitabı. S. 199. 18-19 Aralık, 2015, Konya.</p> <p>2. Özbilgiç, R., Meriç, S., Şahin, O., Tombul, N., Arı, Ş., 2016, Investigation of horizontal gene transfer (HGT) from genetically modified plants to bacteria, The FEBS Journal 283, S1: 333-334. P-02.08.5-037 DOI: 10.1111/febs.13808.</p> <p>3. Arı, Ş, Tombul, N., Şahin, O., Ebrahimi, A., 2016, Effects of histone H3 lysine 9 inhibition on gene expression profile in tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.), The FEBS Journal 283, S1: 337-338. P-02.08.5-051 DOI: 10.1111/febs.13808.</p> <p>4. Şahin, O., Meriç, S., Yalçın, D.G., Arı, Ş., 2017. Genomic Analysis of Feeder Soybean Seeds Under Salinity Stress. International Green Biotechnology Congress, Abstract Book. P:93. September 11-13, 2017, Dedeman Bostancı-İstanbul Hotel and Convention Center.</p>