



**İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLZA' NIN (*Brassica napus* L.)
TRANSGEN YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI**

Sultan FİDAN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Yard. Doç. Dr. Ercan ARICAN
Şubat, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma 01/03/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman
Yard. Doç. Dr. Ercan ARICAN
İ.Ü. Fen Fakültesi

Jüri
Prof. Dr. Güler TEMİZKAN
İ.Ü. Fen Fakültesi

Jüri
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İ.Ü. Fen Fakültesi

Jüri
Prof. Dr. ŞuleARI
İ.Ü. Fen Fakültesi

Jüri
Doç. Dr. Tijen OĞRAŞ
TÜBİTAK

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin T-2422 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

KOLZA' NIN (*Brassica napus* L.) TRANSGEN YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Ercan ARICAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Güler TEMİZKAN olmak üzere bölümümüzün diğer tüm saygın öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Bilge ÇELİK ve İpek EVEN'e,

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasına tanık olan, eğitim sürem boyunca beni destekleyen ve yüreklendiren can dostlarım Yasemin TURAN ve Esra MARAZ'a teşekkür ederim.

Eğitimimin başından itibaren bana olan inançlarını kaybetmeyen, ellerini omzumdan hiç çekmeyen canım AİLEME ve Barış PEDÜK'e en içten teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunar, yaptığım tez çalışmasını ithaf ederim.

Şubat, 2010

Sultan FİDAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. KOLZA (KANOLA).....	4
2.2. BİTKİLERE GEN AKTARIM TEKNİKLERİ	13
2.3. TRANSGEN ANALİZİNDE KULLANILAN TEKNİKLER.....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1. BİTKİ MATERYALİ	27
3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	27
3.2.1 Yüzey Sterilizasyonu	27
3.2.2. Steril Kanola Tohumlarının Doku Kültürüne Alınması.....	27
3.3 DOKU KÜLTÜRÜNE ALINAN KANOLA BİTKİCİKLERİNDEN VE SERTİFİKALI MISIR UNLARINDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU	28
3.3. İZOLE EDİLEN GENOMİK DNA'LARIN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ.....	29
3.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR).....	29
3.5.1. Kanola Varyetelerinde ve Sertifikalı Materyallerde 35 S ve pNOS Bölgelerinin Klasik PZR ile Çoğaltılması	30

3.5.2. Kanola Varyetelerinin Çoklu PZR (Multiplex PCR) Tekniği ile Transgen Analizleri.....	31
3.5. KLASİK PZR VE ÇOKLU PZR İLE ÇOĞALTILAN 35S, pNOS VE NAD DNA BÖLGELERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZLERİ.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. KANOLA BİTKİCİKLERİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLMESİ .	33
4.2. KANOLA BİTKİCİKLERİNDEN VE SERTİFİKALI MISIR MATERYALLERİNDEN DNA İZOLASYONU	34
4.3. KLASİK PZR VE ÇOKLU PZR TEKNİKLERİ KULLANILARAK TRANSGEN ANALİZLERİ.....	35
4.3.1. %0 ve %2' lik Sertifikalı Mısır Materyallerinde Klasik PZR Tekniği Kullanılarak 35S ve pNOS Gen Bölgelerinin Araştırılması.....	35
4.3.2. Kanola Varyetelerinde NAD “Housekeeping” Gen Bölgesinin Çoğaltılması ..	36
4.3.3. Kanola Californium, Elvis, Jura ve Orkan Varyetelerinin Klasik PZR ile Transgen Analizleri.....	37
4.3.4. Kanola Varyetelerinde Çoklu PZR tekniği ile 35S ve pNOS Gen Bölgeleri Bakımından Transgen Analizleri.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Brassica türleri arasındaki genetik ilişki5
Şekil 2.2	: Türkiye’de kanola ekim alanlarının ve üretiminin yıllara göre durumu13
Şekil 2.3	: Aktarılmak istenen gende olması gereken diziler14
Şekil 2.4	: <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla bitkilere gen aktarımının şematik gösterimi16
Şekil 2.5	: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi.....24
Şekil 4.1	: MS besiyerinde gelişen bitkicikler33
Şekil 4.2	: Kanola bitkisinin Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinden ve sertifikalı mısır materyallerinden izole edilen genomik DNA’ların agaroz jel elektroforez görüntüleri (1: %0 sertifikalı mısır materyali, 2: %2 sertifikalı mısır materyali, 3: Californium, 4: Jura, 5: Elvis, 6: Orkan)34
Şekil 4.3	: %0 ve % 2’ lik sertifikalı mısır materyallerinde 35S promotör bölgesine ait PZR çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: 100 bç’ lik standart DNA, 2: %0’ lik sertifikalı mısır materyali, 3:%2’ lik sertifikalı mısır materyali).....35
Şekil 4.4	: %0 ve % 2’ lik sertifikalı mısır materyallerinde pNOS promotör bölgesine ait PZR çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: 100 bç’ lik standart DNA, 2: %0’ lik sertifikalı mısır materyali, 3:%2’ lik sertifikalı mısır materyali)36
Şekil 4.5	: Kanola varyetelerinde NAD primerleri kullanılarak gerçekleştirilen klasik PZR çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1: 100 bç’ lik standart DNA, 2: Californium, 3: Jura, 4: Elvis, 5: Orkan)36
Şekil 4.6	: Kanola varyetelerinin 35S, pNOS ve NAD primerleri kullanılarak gerçekleştirilen klasik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: 100 bç’ lik standart DNA, 2, 6, 10: Californium, 3, 7: Jura, 4, 8: Elvis, 5, 9: Orkan).....37
Şekil 4.7	: Çoklu PZR sonucunda 35S ve pNOS bölgelerine ait çoğaltım ürünleri (1: 100 bç’ lik standart DNA, 2: Californium, 3: Jura, 4: Elvis, 5: Orkan).....38

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Brassica türlerinin kromozom sayıları ve genom yapıları.....	5
Tablo 2.2	: Kolza tohum içeriği.....	7
Tablo 2.3	: Dünyada yağlı tohum üretimi (ton).....	8
Tablo 2.4	: Dünyada kanola üretimi, ihracatı ve ithalatı (2009).....	10
Tablo 2.5	: Türkiye’de ekim alanları (da) ve üretim (ton) miktarlarının illere göre dağılımı	11
Tablo 2.6	: Türkiye’de kanola ekim alanları (da) ve üretimin (ton) yıllara göre durumu	12
Tablo 2.7	: Ticari olarak ekimine izin verilen transgenik varyeteler.....	17
Tablo 2.8	: Kanada’ da ekimi yapılan bazı transgenik kanola varyeteleri.....	19
Tablo 2.9	: Dünya’ da GDO’lu tarım ürünü üreten ülkeler ve tarım alanları	20
Tablo 2.10	: Transgen analizinde kullanılan bazı teknikler.....	23
Tablo 3.1	: MS besiyeri içeriği	28
Tablo 3.2	: 35S, pNOS ve NAD primer dizileri	30
Tablo 3.3	: Klasik PZR bileşenleri.....	30
Tablo 3.4	: Klasik PZR sıcaklık döngüleri	31
Tablo 3.5	: Çoklu PZR bileşenleri	31
Tablo 3.6	: Çoklu PZR sıcaklık döngüleri	31
Tablo 3.7	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların bileşenleri ve derişimleri	32
Tablo 4.1	: Kanola varyeteleri ve sertifikalı mısır materyallerinin genomik DNA miktarı	34

SEMBOL LİSTESİ

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
µl	: Mikrolitre
NOS	: Nopalin sentaz
CDPK	: Kalsiyum bağlı protein kinaz
PEPC	: Fosfoenolpirivat karboksilaz
nptII	: Neomisin fosfotransferaz
Ti	: Tümör indükleyen
Ri	: Kök indükleyen
T-DNA	: Aktarılan DNA
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar
GMO	: Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Organizmalar
GD	: Genetiği Değiştirilmiş Ürünler
GM	: Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Ürünler
EPSPS	: 5-Enol-piruvilşikimat-3-fosfat
GT73	: Glifosat herbisit tolerans
HCN92	: Glufosinat amonyum herbisit tolerans
Pat	: Fosfofinotrisin-N-asetiltransferaz
OXY235	: Bromoksinil herbisit tolerans
NIR	: Yakın kızıl ötesi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
dNTP	: Deoksiribonukleozid trifosfat
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
Tm	: Erime ısı
bç	: Baz çifti
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit

ÖZET

KOLZA' NIN (*Brassica napus* L.) TRANSGEN YÖNÜNDE ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak ekimi yapılan kanola bitkisinin (*Brassica napus* L.) Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinin klasik ve çoklu PZR teknikleri kullanılarak transgen analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, öncelikle kanola varyetelerinin doku kültürleri kuruldu ve doku kültüründe yetişen bitkiciklerden genomik DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Kanola varyetelerinin transgen analizleri için, klasik ve çoklu PZR teknikleri kullanılarak, Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinde 35S ve pNOS promotör bölgeleri tarandı. Buna ek olarak çalışmamızda PZR tekniğinin doğruluğunu test etmek için housekeeping gen olarak NAD gen bölgesinden yararlanıldı.

Çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda, Türkiye' de ekimi yapılan Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinin 35S ve pNOS promotör bölgeleri bakımından transgen oldukları saptandı. Bu bulguları ek olarak her dört varyete de 35S ve pNOS promotör bölgesi açısından çoklu giriş olduğu belirlendi.

SUMMARY

TRANSGENIC INVESTIGATION OF CANOLA (*Brassica napus L.*)

In this study, transgenic investigation of Californium, Jura, Elvis and Orkan varieties of canola which are cultivated widely in Turkey, using classic and multiplex PCR techniques has been aimed.

With this purpose, tissue cultures of canola varieties were established and total DNA isolation were performed with plants which were grown in tissue culture. For the canola varieties' transgene analyses, Californium, Jura, Elvis ve Orkan varieties' 35S and pNOS promoter region were scanned with using classic and multiplex PCR techniques. To test the accuracy of the PCR techniques, also NAD gene region which is the Housekeeping gene has been benefited.

According to the findings of the study, it has been detected that Californium, Jura, Elvis and Orkan varieties' which are cultivated in Turkey are transgen with regard to 35S and pNOS promoter region. In addition of these findings, it has been determined each four varieties have multiple insertion in terms of 35S and pNOS promoter regions.

1. GİRİŞ

Kolza ilk defa M.Ö. 2000 yılında, Hindistan'da kültüre alınan ve 13. yy.' da Belçika' da ekimine başlanan, tohum başına %45 civarında yağ içeren değerli bir yağ bitkisidir (Sobutay, 2004; www.tagem.gov.tr [Ziyaret Tarihi:15 Ağustos 2009]).

Kolza, lahana ve yağ şalgamının doğal olarak melezenmesi sonucu geliştirilmiş amfidiploid bir türdür. Yazlık ve kışlık türleri olan kolza, yüksek oranda erusik asit ve glukosinolat içermektedir. Erusik asit ve glikosinolatın insan ve hayvan sağlığına zararlı olması nedeniyle, klasik ıslah teknikleriyle, kolzanın düşük erusik asit ve glikosinolat içeriğine sahip yeni çeşitler geliştirilmiş ve "Canadian Oil Low Acid" (düşük asitli Kanada yağı) sözcüklerinden türeme, kanola (canola) adı verilmiştir (Odabaşı ve Taşkaya, 2004).

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan yağlar, insanların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmesi için gerekli olan ana besin maddelerinden biridir. Bir insan günlük olarak yaklaşık 93 gr. yağ gereksinim duymaktadır. Avrupa standartlarına göre yılda yaklaşık 24 kg yağ tüketildiği takdirde, sağlıklı beslenmeden söz edilebilmektedir. Ülkemizde tüketilen yağların büyük bir kısmı, bitkisel yağlardan karşılanmaktadır ve kişi başına yılda 17,5 kg yağ tüketildiği varsayılırsa Avrupa standartlarına göre ülkemizde 6,5 kg' lık bir açık bulunmaktadır (Odabaşı ve Taşkaya, 2004).

Bugün dünya yağ bitkileri tarımında kanola, soya fasulyesinden sonra ikinci sırayı almaktadır. Tohum başına %40-45 oranında yağ içeren kolza, yaygın olarak insan beslenmesinde kullanılmakta olup, biyodizel üretiminde de oldukça önemli bir yere sahiptir.

Kanola, Kanada'da yapılan çalışmalar sonrasında sifira indirgenen erusik asit ve glikosinolat içeriğiyle dünya tarımında kendine önemli bir yer edinmiştir. Bununla beraber kanola, yağ kalitesinin ve içeriğinin arttırılması, herbisitlere direnç gibi

özelliklerin kazandırılması sonucunda dünyada ekimi yapılan transgenik bitkiler arasında yerini almıştır.

Ülkemize 1960 yılında getirilmiş olan kanola, özellikle Trakya yöresinde yaygın olarak yetiştirilmeye başlanmış, ancak 1979 yılında kolza yağındaki insan sağlığına zararlı olan erusik asit ve küspesindeki hayvan sağlığına zararlı toksik etkili glukosinolat oranlarının yüksek olması nedeniyle yasaklanmıştır. Daha sonra erusik asit ve glikosinolat içeriği sıfıra indirgenmiş, kaliteli yağ içeren kanola çeşitleri ülkemize getirilmiş ise de ekim yaygınlaştırılmamıştır (Odabaşı ve Taşkaya, 2004).

Son yıllarda kanola’da yaygın olarak herbisitlere direnç ve yağ kalitesini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Özellikle glifosat (N-fosfometil-glisin) herbisit toleransı, glufosinat amonyum herbisit toleransı, bromoksinil herbisit toleransı üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Virüslere direnç, toprak tuzluluğuna, topraktaki ağır metallere ve düşük sıcaklıklara toleranslık konularında araştırmalar devam etmektedir.

Bir canlı türüne başka bir canlı türünden gen aktarılması ile doğal olarak edinilmesi mümkün olmayan yeni özellikler kazandırılmış organizmalara genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) denilmektedir. 1950’li yıllarda “Yeşil Devrim” ile aşırı sulama, mineral gübreleme, pestisit kullanımı ve bitki ıslahı ile verim ve üretimin artırılması çalışmaları ile toprakların kirlenmesi, su kaynaklarının azalması gibi sorunlar beraberinde GDO’ nun kurtarıcı olarak görülmesini getirmiştir.

Organizmalarda gen aktarım çalışmalarında; DNA’ya, RNA’ya, proteine ve metabolite dayalı teknikler kullanılmaktadır. Genetik olarak modifiye edilmiş organizmaların tanısında en çok kabul gören yöntem, DNA’ya dayalı yöntemlerdir. Çünkü bazı gıda üretimleri sürecinde olağanüstü koşullar altında DNA molekülü yüksek kararlılık gösterir. DNA’ ya dayalı tekniklerden yaygın olarak kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)’dur. Genetik olarak modifiye edilmiş organizmaların tanısında transgen ve endojen referans genin (housekeeping gen) paralel çoğaltımı PZR tekniği ile oldukça güvenilir sonuç vermektedir (Hübner ve diğ., 1999; Hernandez ve diğ., 2003; Jensen, 2007).

Bu alışmada, Türkiye’ de ekimi yapılan, kanolanın daha önce transgen analizleri yapılmamış California, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinin, transgen teknolojisinde yaygın olarak kullanılan 35S ve pNOS promotör bölgelerine özgü primer dizileri kullanarak transgen analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KOLZA (KANOLA)

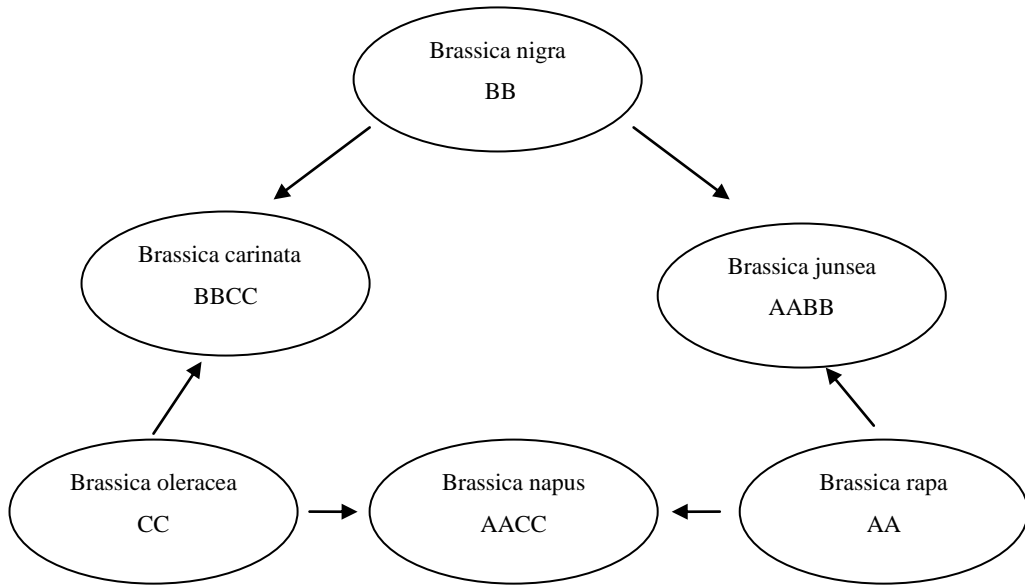
Kolza bitkisi; lahana ve yağ şalgamının doğal olarak melezlenmesi sonucu geliştirilmiş, tohumlarında bulunan % 40-50 arası yağ oranı ile Avrupa, Amerika, Asya, Avustralya kıtalarında bulunan, bir çok gelişmiş ülkede geniş alanlarda tarımı yapılan önemli bir yağ bitkisidir. (Sobutay, 2004; Süzer, 2008). Kolzanın bitkisel taksonomide bulunduğu yer ise aşağıdaki gibidir:

Alem	: Plantae
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takımı	: Rhodales
Familya	: Cruciferae
Cins	: Brassica
Tür	: <i>Brassica napus</i> (L.) <i>oleiferae</i>

Avrupa'da 19. yüzyılın başlarında yapılan yoğun sitolojik araştırmalar, *Brassica* türleri arasında önemli düzeyde genetik ilişkilerin olduğunu ortaya koymuştur. Tablo 2.1 ve Şekil 2.1'de görüldüğü gibi amfidiploid genetik yapıya sahip *Brassica napus*, *Brassica juncea* ve *Brassica carinata* türlerinin, *Brassica nigra*, *Brassica rapa* ve *Brassica oleracea* arasında kendiliğinden meydana gelen doğal melezlemeleri olduğu belirlenmiştir (Süzer, 2008)

Tablo 2.1: Brassica türlerinin kromozom sayıları ve genom yapıları

Gruplar	Kromozom Sayıları	Genom	Türler	Türü
I.	10	AA	<i>B.rapa</i>	Elementer tür I
II.	8	BB	<i>B.nigra</i>	Elementer tür II
III.	9	CC	<i>B.oleracea</i>	Elementer tür III
IV.	18	AABB	<i>B.juncea</i>	Amfidiploid I ve II
V.	19	AACC	<i>B.napus</i>	Amfidiploid II ve III
VI.	17	BBCC	<i>B.carinata</i>	Amfidiploid II ve IV



Şekil 2.1: Brassica türleri arasındaki genetik ilişki

Kolza ilk defa M.Ö. 2000 yılında Hindistan'da kültür bitkisi olarak kabul görmüş ve 13. yy.'da Belçika'da ekimine başlanmıştır ((Sobutay, 2004); <http://www.tagem.gov.tr/HABERLER/kolza/10.pdf> [Ziyaret Tarihi:15 Ağustos 2009]). 1942'de Kanada, kolza yağını gemicilikte kullanmak amacıyla üretimine başlamış ve daha sonra düşük erusik asit içeren yazlık çeşitlerini geliştirmiş ve 1956 – 1957 yılları arasında insan gıdası amacıyla ilk kez kolza yağını işlemiştir. Ülkemize, Balkanlardan göçmenler ile gelen kolza, 1960 yıllarında Trakya'da ekim alanı bulmuştur. Ancak kolza ürününün yağında insan sağlığına zararlı erusik asit, küspesinde de hayvan sağlığına zararlı olan glikosinolat bulunması nedeniyle ekimi yasaklanmıştır (Sobutay, 2004).

Kolza bitkisi kuvvetli, çok dallı ve derinlere giden kazık kök sistemine sahip bir bitkidir. Yaprakları mavi-yeşil görünümüne sahip bir bitki olup; boyu 2 m'ye kadar çıkabilmektedir. İlkbaharda bir aya yakın süreyle açan sarı renk çiçeklere sahiptir (Tan, 2007). Çiçeklenme sonrası oluşan harnupları (kapsülleri) yaklaşık 20-28 arasında sarı, kahverengi veya siyah renkte olabilen küçük tohumlara sahiptir. Tohumların bulunduğu harnup ortadan ince bir zarla ayrılmakta ve bu zarın her iki tarafına bağlı olarak tohumlar bulunmaktadır. Tohumlar 1-2 mm çapında, saçma şeklinde yuvarlaktır (Süzer, 2008). Kolza kendine döllen bir bitki olmasına rağmen %35 oranında da yabancı döllenme görülebilmektedir (Tan, 2007).

Kolza, uzun gün bitkisi olmasının yanı sıra, yazlık ve kışlık formları da bulunmaktadır. Yazlık kolza boy olarak kışlık formlara göre ufak ve tane verimi daha düşüktür. Kışlık kolza da ise bitkiler daha kuvvetli, boylu, yüksek verimli ve yetiştirilmesi yazlık formlara göre daha kolaydır. Avrupa'da birçok ülkede gerek sofralık ve gerekse biyodizel elde etmek amacıyla yağ bitkisi olarak kolzanın kışlık üretimi yapılmaktadır (Süzer, 2008).

Yağ miktarı % 40-45 arasında değişen kolza tohumunun içeriği Tablo 2.2' de verilmiştir (http://www.bysd.org.tr/bitkisel_yag.pdf. [Ziyaret Tarihi:29 Eylül 2009]). Kolza tohumu yağı % 40 kadar erusik asit içerebilmekte ve yüksek düzeylerde bulunan erusik asit, çeşitli hayvanlarda olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Hertrampf ve Pascual, 2000). Kolza yağındaki yüksek erusik asit, diğer yağların oksidasyonunu engelleyerek, canlıların yağ metabolizmasını bozmakta ve kalpte trigliseritlerin birikmesine yol açmaktadır (Odabaşı ve Taşkaya, 2004). Kolza, erusik aside ek olarak tohumlarında 3 mg/g'dan daha az miktarda glukosinolat içermektedir (Francis ve diğ., 2001). Kolza tohumunda bulunan en önemli glukosinolatlar; progoitrin, glukonapin ve glukobrassikanapin'dir. Bu bileşikler tek başlarına zararlı değildir ve kolza tohumunun parçalanması sırasında glukosinolatlar, su ve mirosinaz enzimi (bitkide bulunan veya hayvanın sindirim kanalında mikroflora tarafından üretilen) etkisiyle hidrolize olarak tiyosiyanat, izotyosiyanat, goitrin ve nitril gibi zararlı bileşikler haline dönüşmektedir. Bu zararlı bileşikler organizmanın iyot alımını düşürdükleri gibi tiroid bezinin yapısı ve fonksiyonunu bozarak ayrıca karaciğer hasarına yol açarak büyümenin gerilemesine neden olmaktadır. Toksik etkilerine ek olarak kanola, bir çok hayvanda yem alımını acı ve keskin tadı ile azaltmaktadır (Koca, 1982; Ergün ve diğ., 2004). Bu

nedenle yapılan ıslah çalışmaları sonucu erusik asit içeriği sıfır (%00) ve küspede glikosinolat içeriği 30 mikromol (μmol)' un altında yeni kolza çeşitleri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu çeşitlere "Canadian Oil Low Acid" (düşük asitli Kanada yağı) sözcüklerinden türeme, kanola (canola) adı verilmiştir (Odabaşı ve Taşkaya, 2004). Dr. Baldur Stefansson, 1974'de Kanada'da Manitoba Üniversitesinde ilk defa düşük yağ asitli kanola çeşidini geliştirmiştir (Scarth, 1988). Avrupa' da yapılan ıslah çalışmalarında, yağında düşük seviyede erusik asit içeren Alman çeşidi Liho ile küspesinde glukosinolat içeriği az olan Polonya kökenli yazlık Bronoswki çeşitleriyle yapılan melezleme sonucunda ilk kanola çeşidi elde edilmiştir. Erusik asit ve glukosinolat seviyeleri sıfıra yakın azaltılmış olan ilk *Brassica napus* çeşidi o yıllarda gıda ve yem sanayisinin ihtiyaçlarını tam olarak karşılayarak kanola ekim alanlarının her yıl biraz daha artmasına yardımcı olmuştur (Süzer, 2008).

Tablo 2.2: Kolza tohum içeriği

İçerik	Miktar (%)
Su	5.4 - 7.2
Yağ	40 – 45
Protein	19 – 20
Azotsuz ekstrakt	16.8 - 20.7
Ham lifler	4.4 - 5.9
Kül	3.5 - 4.5

Kanola tohumu sıfıra yakın erusik asit içeriği ve % 41 yağ içeriği ile ayçiçeği bitkisi tohumuna yakın bir tohumdur (Sobutay, 2004). Bununla beraber yüksek erusik asit içeren kolza tohumu yağı, Avrupa ve Kuzey Amerika'da endüstriyel kullanım için önemlidir. Erusik asit değerli ve yenilenebilir bir kaynak olup yağ-kimyasal

(oleochemical) endüstrisinde plastik, yağlama maddesi, biyodizel, sabun, kumaş, mürekkep üretiminde kullanılmaktadır (Sasongko ve Christian Möllers, 2005).

Dünyada yağlı tohumlar üretimine bakıldığında kanolanın, soya fasülyesinden sonra ikinci sırayı aldığı görülmektedir (Tablo 2.3) (www.tekirdagtsso.org.tr/urun/Ayieek%20ya%20GTIP%201512.doc). [Ziyaret Tarihi: 20 Ekim 2009].

Tablo 2.3: Dünyada yağlı tohum üretimi (ton)

	2008/09	2007/08	2006/07	2005/06	2004/05	2003/04
Soya Tohumu	250	220	240	220	215	185
Pamuk Tohumu	45	45,3	45	45	45	35
Ayçiçek Tohumu	30	30,2	30	30	25	27
Kolza Tohumu	55	50	50	50	45	40
Diğer Tohumlar	35	40	35	40	45	45
Toplam	415	385,5	400	385	375	332

Tohumlarında yüksek miktarda yağ içeren bitkiler biyodizel üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyodizel; kanola, ayçiçek, soya, aspir gibi yağlı tohum bitkilerinden elde edilen yağların bir katalizör eşliğinde kısa zincirli bir alkol ile (metanol veya etanol) reaksiyonu sonucu açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Bitkisel ürünlerden elde edilen yağların dizel motorlarda kullanımı yeni bir kavram değildir. Nitekim, Rudolf Diesel'in 1900 yılında dizel motoru keşfetmesi ve yerfıstığı yağını yakıt olarak kullandığı ilk dizel motorunu "Paris Fuarı" nda tanıtmasından itibaren bilinmesine rağmen, söz konusu yıllarda petrolün ihtiyacı fazlasıyla karşılaması, bitkisel yağlara göre daha ucuz olması ve bitkisel yağların yakıt olarak kullanılmasıyla ortaya çıkan motorda tortu oluşumu ve yakıt sistemindeki tıkanma gibi sıkıntılardan dolayı bitkisel yağların yaygın kullanımına geçilememiştir (Öztürk ve Bilen, 2009).

Kanola, verimli ve iyi drenajlı toprakları sever. Çok kumlu hafif toprak olmamak kaydı ile her tip toprakta yetişen, toprak tuzluluğundan pek etkilenmeyen kanola derin yapılı pH' ı 6-7 olan nötr ve hafif alkali toprakları sever. Kanola bitkisi 5,5 pH' a tolerans

göstermekte, bu değerin altında ise verim kayıpları olmaktadır. 300-2800 mm yıllık yağış alan yerlerde yetiştirilebilen kanola, ekimden sonra ağır yağışlara karşı duyarlıdır ve yetiştirme periyodunda 200-500 mm su ihtiyacı bulunmaktadır. Serin sezon bitkisi olan kanolanın büyümesi için minimum sıcaklık derecesi 5 °C, optimum sıcaklık derecesi ise 20 °C' dir. Çeşit özelliği yanında çevresel olarak birçok faktör verim üzerinde büyük rol oynamaktadır. Kanola da verim, aşağıda verilen verim, bileşenleri eşitliği ile hesaplanabilmektedir (Tan, 2007).

$$\text{VERİM} = \begin{array}{cccc} \text{Birim} & & \text{Bitkideki} & & \text{Harnuptaki} & & \text{Tek} \\ \text{Alandaki Bitki} & \times & \text{Harnup} & \times & \text{Tohum} & \times & \text{Tohum} \\ \text{Sayısı} & & \text{Sayısı} & & \text{Sayısı} & & \text{Ağırlığı} \end{array}$$

Dünyada kanola üretimi 57.8 milyon ton kadardır. Kanolanın yoğun olarak ekiminin yapıldığı ülkeler, Çin (13.2 milyon ton), Hindistan (7.1 milyon ton), Kanada (10,500 milyon ton) 'dır. Avrupa Birliği üyesi ülkelere baktığımızda toplam kanola üretimi 20.6 milyon ton kadardır. Tablo 2.4'de dünyada önemli oranda kanola üretimi yapan ülkelerin ihracat ve ithalat miktarları verilmiştir (www.fas.usda.gov [Ziyaret Tarihi:20 Ekim 2009]).

Tablo 2.4: Dünyada kanola üretimi, ihracatı ve ithalatı (milyon ton) (2009)

	Yemeklik, Kanola			Yağ, Kanola			Yağlık Tohum, Kanola		
	2007/08	2008/09	2009/10	2007/08	2008/09	2009/10	2007/08	2008/09	2009/10
ÜRETİM									
Çin	6,856	8,281	8,550	3,870	4,675	4,828	10,573	12,100	13,200
Hindistan	3,120	3,560	3,770	1,968	2,245	2,378	5,450	7,000	7,100
Kanada	2,440	2,520	2,885	1,675	1,730	1,980	9,528	12,600	10,500
Japonya	1,275	1,249	1,238	902	884	876	1	1	1
AB-27	10,500	11,675	12,282	7,575	8,422	8,854	18,358	18,896	20,600
Diğer	3,417	3,752	4,156	2,302	2,533	2,773	4,384	7,294	6,409
TOPLAM	27,608	31,037	32,881	18,292	20,489	21,689	48,294	57,891	57,810
İTHALAT									
Çin	302	250	250	277	420	250	805	2,870	750
Hindistan	0	0	0	0	0	0	25	20	20
Kanada	5	6	5	36	111	60	179	115	230
Japonya	29	110	80	17	20	40	2,257	2,150	2,200
AB -27	109	161	150	296	434	400	687	3,342	1,900
Diğer	3,111	3,026	3,318	1,403	1,345	1,503	3,609	3,618	4,265
TOPLAM	3,556	3,553	3,803	2,029	2,330	2,253	7,562	12,115	9,365
İHRACAT									
Çin	89	220	90	8	10	10	0	0	0
Hindistan	1,093	900	820	1	1	1	4	4	5
Kanada	1,857	1,861	2,190	1,307	1,527	1,680	5,775	7,486	6,100
Japonya	19	5	0	0	0	0	0	0	0
AB -27	182	162	200	137	141	150	396	98	350
Diğer	355	447	638	478	679	767	2,020	4,319	3,468
TOPLAM	3,595	3,595	3,938	1,931	2,358	2,608	8,195	11,907	9,923

Ülkemizde kanola, buğdayın yetiştirilebildiği tarım alanlarında kışlık ve yazlık olarak ön adaptasyon denemeleri yapılmak koşuluyla yetiştirilebilmektedir. Trakya, Marmara'nın güneyi, Anadolu'da kış dönemi sıcaklığının $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altına düşmediği geçit iklimine sahip bölgeleriyle, Karadeniz, Ege ve Akdeniz sahil kuşaklarında doğal yağış şartları altında kışlık kanola zamanında ekilmek koşuluyla yetiştirilebilir. İç Anadolu Bölgesi'nin Yozgat, Çankırı, Sivas gibi yüksek ve dağlık kesimleri, Doğu Anadolu Platosu'nun orta ve kuzeydoğu kesimleri, Van Gölü Havzası, Göller Bölgesi'nin erken tava gelen derin yapılı topraklarında yazlık kanola çeşitleri arpa gibi yazlık olarak yetiştirilebilir (Süzer, 2008).

Ülkemizde en fazla kanola ekim alanına sahip il 17800 ha ile Adana ilidir. Bu ilde dekar başına verim yaklaşık 236 kg' dır. Adana ilinin 2006 yıllık toplam kanola üretimi ise 4197 ton olarak gerçekleşmiştir. Adana'dan sonra üretimin en fazla olduğu il 7581 da'lık üretim alanı ile Tekirdağ ilidir. Tekirdağ ilini de ekim alanı fazlalığı yönünden (5500 da) Balıkesir ili takip etmektedir (Tablo 2.5) (Tıraş, 2009).

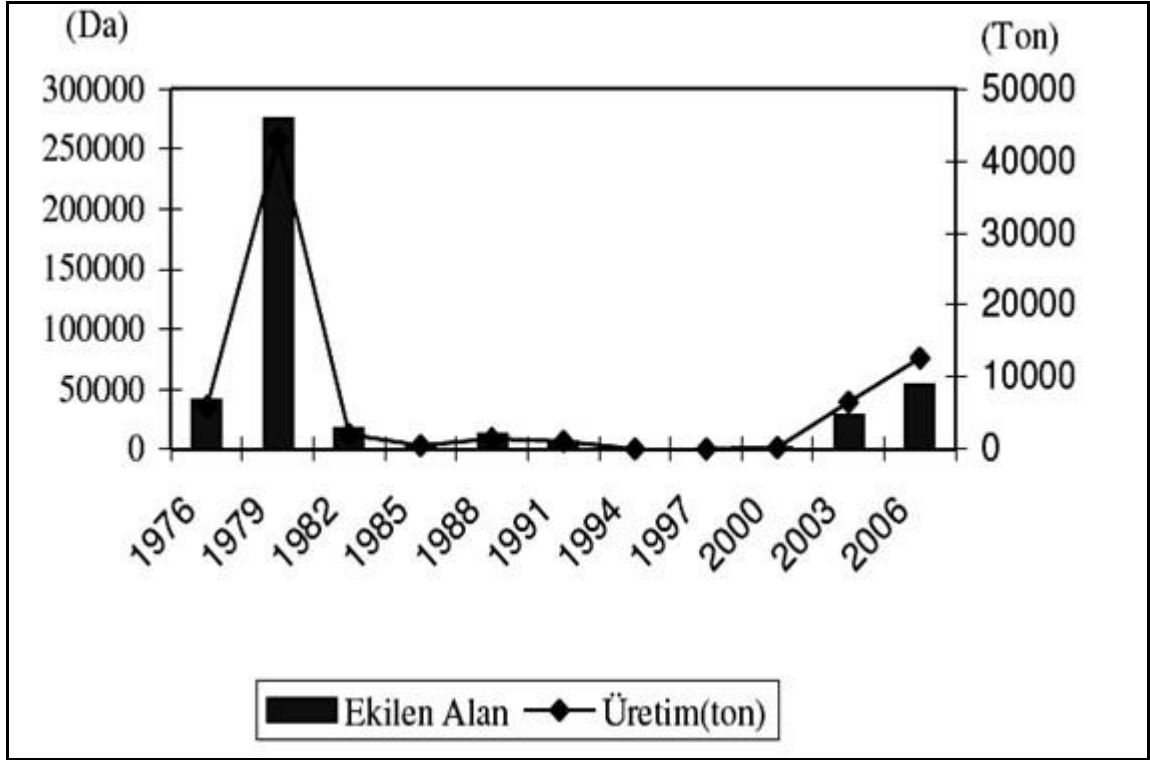
Tablo 2.5: Türkiye'de kanola ekim alanları (da) ve üretim (ton) miktarlarının illere göre dağılımı (2006)

İller	Ekim	%	Üretim	%
Adana	17800	33	4197	33.2
Afyonkarahisar	105	0.2	14	0.1
Amasya	60	0.1	11	0.08
Ankara	58	0.1	12	0.09
Aydın	280	0.5	67	0.5
Balıkesir	5500	10.2	1065	8.4
Burdur	128	0.23	2	0.01
Bursa	800	1.5	210	1.6
Çanakkale	150	0.3	35	0.2
Çorum	25	0.06	5	0.03
Denizli	293	0.5	88	0.6
Diyarbakır	1735	3.2	101	0.8
Eskişehir	2117	4	47	0.4
Hatay	650	1.2	120	0.9
Mersin	3000	5.5	1050	8.3
Kars	1495	2.7	273	2.1
Kayseri	150	0.3	30	0.2
Kırklareli	550	1	181	1.4
Kocaeli	20	0.03	2	0.01
Konya	10	0.01	2	0.01
Malatya	486	0.9	0	0
K.Maraş	50	0.09	15	0.1
Muğla	2030	3.7	209	1.6
Samsun	1700	3.1	473	3.7
Sivas	440	0.8	132	1.0
Tekirdağ	7581	14	2516	19.9
Tokat	1230	2.3	396	3.1
Şanlıurfa	1726	3.2	434	3.4
Yozgat	140	0.25	31	0.2
Karaman	100	0.18	30	0.1
Batman	200	0.37	40	0.3
Kilis	39	0.07	10	0.07
Osmaniye	3250	6.2	797	6.3
TOPLAM	53898	100	12641	100

Ülkemizde kanola ekim alanlarında yıldan yıla önemli artışlar ve azalışlar olmaktadır. Örneğin 2005 yılında toplam 7000 da.'lık arazide ekilmiş olan kanolanın 2004 yılında 17000 da.'lık arazide ekimi yapılmıştır. Ekim alanı 2003 de 28000 da. iken 2002 yılında belirgin bir şekilde azalarak 5500 da' a gerilemiştir (Tablo 2.6, Şekil 2.2). Ekim alanlarının artışı ve azalışında uygulanan fiyat politikalarının rolü olmaktadır. Üretim artışları da ekim alanlarıyla paralellik göstermektedir.1976'da kanola üretimi 5900 ton iken 1979 yılında ise 43 000 tona çıkmıştır. Ekim alanlarındaki azalışa bağlı olarak bazı yıllar (1996) üretim 5 tona kadar inmiştir. 2006 yılında ise kanola üretimi 12641 ton olarak gerçekleşmiştir (Tıraş, 2009).

Tablo 2.6: Türkiye'de kanola ekim alanları (da) ve üretimin (ton) yıllara göre durumu.

Yıllar	Ekilen Alan	Üretim	Yıllar	Ekilen Alan	Üretim
1976	41000	5900	1992	5000	1000
1977	93500	13800	1993	50	9
1978	90000	12500	1994	60	10
1979	275000	43000	1995	70	9
1980	100000	11500	1996	20	5
1981	62500	6000	1997	100	10
1982	17000	2000	1998	1150	300
1983	2530	400	1999	1870	330
1984	2900	450	2000	820	187
1985	1350	450	2001	2900	650
1986	1010	121	2002	5500	1500
1987	2500	340	2003	28000	6500
1988	12300	1400	2004	17000	4500
1989	32000	3000	2005	7000	1200
1990	20170	2100	2006	53898	12641
1991	5210	1046			



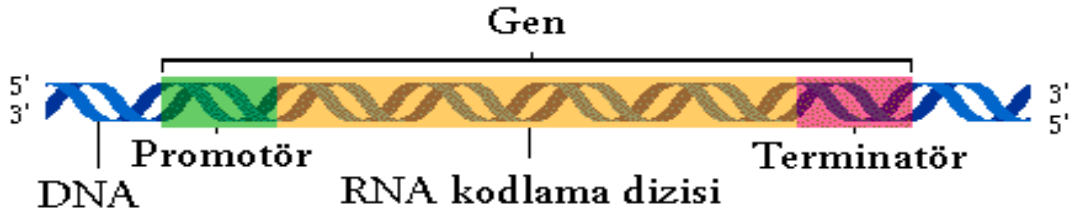
Şekil 2.2: Türkiye’ de kanola ekim alanlarının ve üretiminin yıllara göre dağılımı

2.2. BİTKİLERE GEN AKTARIM TEKNİKLERİ

Biyoteknolojinin temelleri M.Ö. 1750 yılına kadar dayanmaktadır ve Sümer’liler bira ve ekmek yapımında maya kullanmışlardır. Biyoteknoloji günümüzde sadece genlerle uğraşan ve gen transferi gerçekleştiren bir bilim dalı olarak bilinse de "özel bir kullanıma yönelik olarak ürün ya da işlemleri dönüştürmek ya da oluşturmak için biyolojik sistem ve canlı organizmaları ile bunların türevlerini kullanan teknolojik uygulamalar" olarak tanımlanmaktadır (Özgen ve Türet, 1995). Biyoteknoloji terimi ilk kez 1919 yılında Macar bir ziraat mühendisi tarafından kullanılmıştır (Turhan, 2003). Biyoteknoloji, 1950’lerden sonra bitkilerde ıslah alanında kullanılmaya başlanmıştır (Doyle and Persley, 1996). Biyoteknoloji ilk kullanılmaya başlandığında doku kültürü, laboratuvar koşullarında seleksiyon, meristem kültürü, hücre kültürü gibi canlı organizmaların gen yapısına doğrudan müdahale etmeyen teknikler içermektedir. Biyoteknoloji günümüzde ise gen teknolojisi ve gen transferi gibi, türlere kendi potansiyelleri dışında bazı özellikler kazandırabilen teknikleri içermektedir. Klasik biyoteknoloji, yabancı türlerin ıslah edilmesi ile günümüzdeki birçok türün yetiştirilmesine olanak sağlamıştır. Günümüz biyoteknolojisi ise GDO yetiştirilmesine olanak sağlamıştır (Vines, 2002).

Herhangi bir gen aktarım sisteminin esasını, tam bir bitki oluşturulabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi ve o hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesi oluşturmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996).

Başarılı bir gen aktarımının yapılabilmesi için, kullanılacak DNA parçası aktarılmak istenen genle beraber uygun promotör (transkripsiyonu başlatmak için gerekli olan başlatıcı nükleotid dizisi) , terminatör (transkripsiyonu doğru pozisyonda durdurmayı sağlamak için gerekli olan nükleotid dizisi), haberci (reporter) gen ve seçici işaretleyici (markır) gen bölgesi içermelidir (Şekil 2.3). Bitkilere gen aktarımında, tütün mozaik virüsünden alınan 35S promotörü, NOS (napolin sentaz) promotör, CDPK (kalsiyum bağlı protein kinaz), PEPC (fosfoenolpürivat karboksilaz), 35S terminatör, NOS terminatör ve seçici gen olarak da kanamisin direnç geni (nptII) gen aktarım çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ahmed, 2002; Querci ve diğ., 2004).



Şekil 2.3: Aktarılmak istenen gende olması gereken diziler

Gen aktarım teknikleri iki ana başlık altında toplanmaktadır:

1. Dolaylı Gen Aktarım Teknikleri

- *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı
- *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığıyla Gen Aktarımı

2. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri

- Makro-enjeksiyon
- Kimyasal yöntemlerle protoplastlara gen aktarımı
- Lipozomlarla Protoplastlara Gen Aktarımı
- Elektroporasyon ile Protoplastlara Gen Aktarımı
- Biyolistik (Partikül Bombardımanı)
- Mikro-enjeksiyon
- Elektroforez ve Mikrolazer
- Polen Transformasyonu

-Polen Tüpü yoluyla DNA Aktarımı

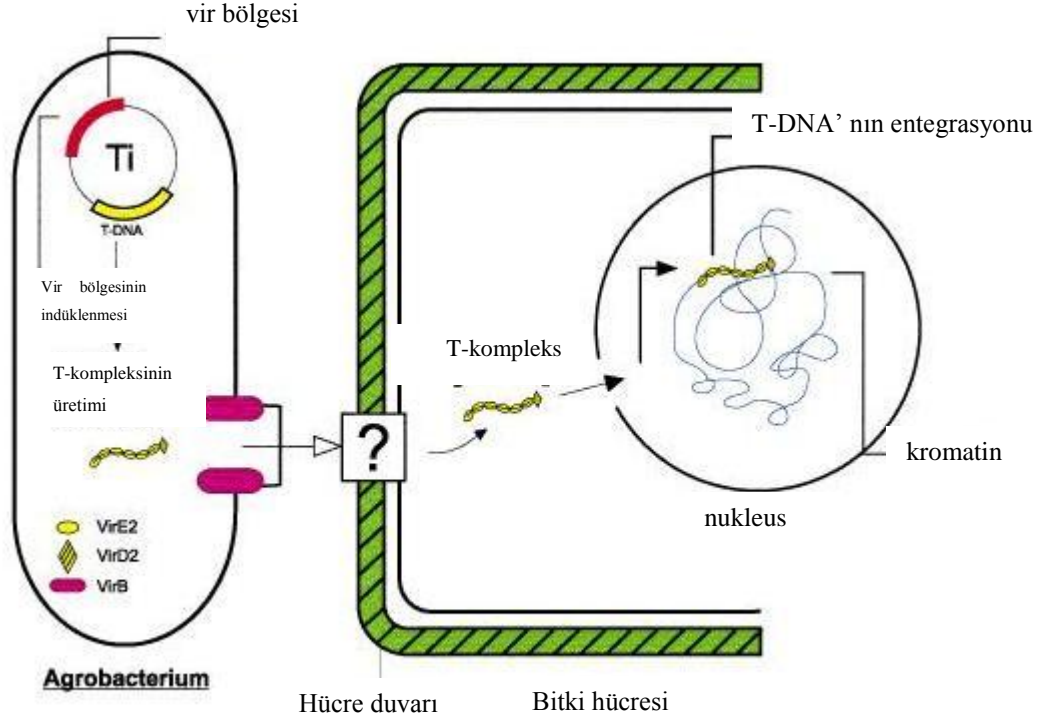
-Zigotik Embriyoya DNA Emdirilmesi

-Fiberler Aracılığı ile DNA Aktarımı

-Sonikasyon

-Desikasyon (Pena ve diğ., 1987; Arı, 2004; http://www.biotechnology4u.com/biotechnology_agriculture_methods_transfer_genes_plants.html [Ziyaret Tarihi: 13 Ekim 2009])

Bitkilere gen aktarım teknikleri içerisinde yaygın olarak, doğal genetik mühendisi olan *A. tumefaciens* bakterisi kullanılmaktadır. Bu bakteri aracılığıyla tarımsal öneme sahip birçok gen, dikotiledon bitkilere kolaylıkla aktarılabilmektedir (Birch, 1997). *A. tumefaciens* bitkide taç tümörüne (crown gall), *A. rhizogenes* ise saçak kök (hairy-root) oluşumuna neden olmaktadır. Bu oluşum *A. tumefaciens* içerisindeki Ti (tümör indükleyen) plazmidi, *A. rhizogenes* içerisinde bulunan Ri (kök indükleyen) plazmidi aracılığıyla olmaktadır. Ti ve Ri plazmitleri bitkinin zarar görmüş dokusundan bitkiyi enfekte etmekte, enfeksiyon sonucu plazmitler üzerinde bulunan T-DNA (aktarılan DNA) bölgesi bitki hücrelerine aktarılmakta ve bitki DNA' sına girmektedir (Şekil 2.4). Bu süreçten sonra aktarılan gen bitki DNA' sında değişmeden kalmakta ve nesilden nesile aktarılmaktadır (Paszkowski ve diğ., 1984; De La Riva ve diğ.,1998; http://www.accessexcellence.org/RC/AB/BA/Transforming_Plants.php [Ziyaret Tarihi: 13 Ekim 2009]).



Şekil 2.4: *A. tumefaciens* aracılığıyla bitkilere gen aktarımının şematik gösterimi

Agrobacterium ile gen aktarım çalışmalarında; eksplantın (çeşitli bitki kısımları) yaşı, eksplanta yapılan işlemler, *Agrobacterium* hattı ve vektör kombinasyonu, ko-kültivasyon süresi, kültür ortamının hormonal kompozisyonu, seleksiyon ortamının özellikleri ile konsantrasyonu transformasyon başarısını etkilemektedir (Moyne ve diğ., 1989; Schrammeijer ve diğ., 1990; Escandon ve Hahne, 1991; Bidney ve diğ., 1992; Pugliesi ve diğ., 1993; Knittel ve diğ., 1994; Grayburn ve Vick, 1995; Laparra ve diğ., 1995).

İlk transgenik bitki olan tütün bitkisi 1984 yılında elde edilmiş olup ticari olarak ilk transgenik bitki tarımı ise 1990'lı yılların başında Çin Halk Cumhuriyeti'nde tütün bitkilerinin yetiştirilmesi ile başlamıştır (Birch, 1997; James, 1997). 1997 yılına kadar 35 familya içerisinde, 120'nin üzerindeki türde transformasyon başarılı ve bunlardan bazılarının ticari olarak ekimine izin verilmiştir (Tablo 2.7) (Birch, 1997).

Tablo 2.7: Ticari olarak ekimine izin verilen transgenik varyeteler

Geliştirilen Özellik	Varyete	Geliştiren Şirket	Tarih
Kalite (raf ömrü)	Flavr Savr (Domates)	Calgene	1994
Yağ özelliği	Laurical (Kanola)	Zeneca	1994
Virüse dayanıklılık	Freedom (Kabak)	Asgrow	1995
Böceğe dayanıklılık	Ballgard (Pamuk)	Monsanto	1996-97
	New Leaf (Patates)		
	YieldGuard (Mısır)		
Böceğe dayanıklılık	Maximizer (Mısır)	Ciba Seeds	1996
Herbisite dayanıklılık	Roundup Ready (Soya)	Monsanto	1995-96
Herbisite dayanıklılık	Roundup Ready (Kanola) Roundup Ready (Soya)	Pioneer	1996-97

Gen aktarım teknikleriyle organizmaya bir seferde birden fazla gen aktarmak mümkündür ve bu teknik daha verimli, alternatif bir yoldur. Partikül bombardımanı, son zamanlarda birden fazla gen transferi için tercih edilen bir yöntem olarak öne çıkmıştır. Partikül bombardımanı aracılığıyla üç gen barındıran tek bir plazmit ile ve ya 9-14 ayrı plazmidin kullanılmasıyla tek seferde çoklu gen aktarımı yapılabilmektedir. *Agrobacterium* ile çoklu gen transferi, bir *Agrobacterium* içinde bulunan iki vektör aracılığıyla, farklı *Agrobacterium* suşlarıyla ya da bu iki yöntemin her ikisi aynı anda kullanılarak yapılabilmektedir (Radchuk ve diğ., 2005).

Farklı gen aktarım teknikleri ile gen veya genlerin bir organizmadan diğer bir organizmaya aktarılmasına gen aktarımı ve bu organizmalara da genetiği değiştirilmiş

organizmalar (GDO) denilmektedir (Anonim, 2000). Genetik mühendisliği teknolojisi kullanılarak üretilen organizmalar literatürde; genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), genetiği değiştirilmiş ürünler (GD), genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar (GMO), genetik olarak modifiye edilmiş ürünler (GM), gen aktarımlı organizmalar, transgenik organizmalar, bio-mühendislik organizmaları vb. adlarla tanımlanmaktadır. Bu organizmalara aktarılan genler ise transgen olarak ifade edilmektedir (Uzogara, 2000; Cellini ve diğ., 2004).

Dünya nüfusunun hızla artması, az gelişmiş ülkelerdeki insanların yetersiz beslenmeleri ya da hiç beslenememeleri, bitkisel ve hayvansal üretimde verimliliğinin arttırılmak istenmesi ve gıdaların besin değerinin düzenlenmesi (A vitamince zenginleştirilmiş “altın çeltik”), transgenik çeşit geliştirilmesine yol açmıştır (Vines, 2002).

Tarım bitkilerinde üzerinde en çok çalışılan özellikler, hastalıklara ve zararlılara karşı, yabancı ot ilaçlarına karşı dayanıklılık, besin değeri yüksek lezzetli gıdalar, meyve olgunlaşma sürecinin değiştirilmesi, raf ve depolama ömrünün uzatılması ve aromanın arttırılması, birim alandan da daha fazla verim alınması olarak sıralanabilir. Dünyada bu teknolojinin uygulandığı, yem bitkilerinde bulunan antinutrisyonel (büyümeyi engelleyici) faktörlerin elimine edilmesine yönelik olarak bu teknolojinin en başarılı olduğu transgenik bitkiler; mısır, soya fasulyesi, kanola, pamuk, tütün, patates ve domates bitkileridir (Çabuk ve diğ., 2005). Ticari GDO ürün üretimi; ABD (%59), Arjantin (%20), Kanada (%7), Brezilya (%6) ve Çin (%4) olmak üzere sadece 5 ülkede yapılmaktadır. Dünya GDO ticareti; soya, mısır, kanola ve pamuk olmak üzere sadece 4 ürünün üzerinde yoğunlaşmıştır (Kıyak, 2004). Son yıllarda birçok ülkede, kanola varyetesiyle birlikte 100’den fazla genetiği değiştirilmiş bitkinin ticarileştirilmesi onaylanmıştır (Tablo 2.8). Kanada, ABD ve Avustralya her yıl milyonlarca ton transgenik kanola tohumu ve bu tohumdan elde edilen yağı ihraç etmektedir. GDO ürünlerinin ticarileştirilmesi ve ihracatı, piyasaya sürülen bu ürünlerin etiketlenmesi şeklinde tüketici haklarını korumaya yönelik girişimlere yol açmıştır ve etiketleme mevzuatı ülkelere göre değişiklik göstermektedir: ürünlerde transgenik miktarı, Avrupa Birliği üyesi ülkelerde ve Rusya’da %0.9, Güney Kore’de %3 ve Japonya’da %5 olarak izin verilmektedir (Wu ve diğ., 2008). GDO ürünlerine aktarılan özellikler 3 grup altında toplandığı zaman genel olarak en fazla aktarılan özelliğin herbisite (böcek zararlısı) toleranslılık (%59) olduğu görülmektedir. %28 oranında böcek ve virüse

dayanıklılık özelliği kazandırılan ürünler olduğu halde kaliteye yönelik özelliklerin aktarılması %13 gibi düşük bir seviyede kalmaktadır (Turhan, 2008).

Tablo 2.8: Kanada’da ekimi yapılan bazı transgenik kanola varyeteleri

Varyete	GDO durum	Kaynak
Conquest	GT73 ^a	Agricore, MB
LG3235(A)	GT73	Fairlight, SK
LG3235(B)	GT73	Weyburn, SK
LG3345(A)	GT73	NWT Unity, SK
LG3345(B)	GT73	Starbuck, MB
Quest(A)	GT73	Edgerton, AB
Quest(B)	GT73	Vermilion, AB
SW Arrow(A)	GT73	Brandon North, MB
SW Arrow(B)	GT73	Foam Lake, SK
SW Rider(A)	GT73	Tribune, SK
SW Rider(B)	GT73	Fairlight, SK
Exceed	HCN92; HCN28	Booth Siding, SK
Independence	HCN92 ^b	Deloraine, MB
Innovator	HCN92	Perdue, SK
SW Flare LL	HCN92; HCN28	Amazon, SK
2273	Ms1/Rf2	Nokomig, SK
Armor BX	OXY235 ^c	Carnduff, SK
Cartier BX	OXY235	Alexander, MB
A, b ve c üst simgesi alanlar Roundup Ready (glifosata dirençli), Liberty Link (glifosinat amonyuma dirençli) ve BX (Bromoksinile dirençli) içermektedirler. SK, Saskatchewan; MB, Manitoba; AB, Alberta		

ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri- Biotechnology Applications) verilerine göre; transgenik ürünler ilk olarak 1996 yılında üretilmeye başlanmış ve 1996 yılından 2008 yılının sonuna kadar geçen 13 yıllık süre içerisinde bu ürünlerin toplam ekim alanı 74 kat artarak 125 milyon hektara ulaşmıştır. Bugün dünya genelinde 15 tanesi gelişmekte ve 10 tanesi gelişmiş ülkeler arasında olan toplam 25 ülkede GDO’lu ürünlerin üretilmesine onay verilmiştir (Tablo 2.9). Bu ülkelerin haricinde 30 ülkede ise bu ürünlerin gıda ve yem amaçlı kullanımına yönelik ithalatı onaylanmış olup, böylelikle bu ürünleri kullanan ülke sayısı toplam 55’e ulaşmıştır (http://www.ekopolitik.org/images/cust_files/091008162957.pdf [Ziyaret Tarihi: 25 Ekim 2009])

Tablo 2.9: Dünya’ da GDO’lu tarım ürünü üreten ülkeler ve tarım alanları

No	Ülke	Tarım Alanı (Milyon Hektar)	Ürün Türü
1	ABD	62.5	Soya fasülyesi, mısır, pamuk, kanola, şekerpancarı, papaya, alfaalfa, kabak
2	Arjantin	21	Soya fasülyesi, mısır, pamuk
3	Brezilya	15.8	Soya fasülyesi, mısır, pamuk
4	Hindistan	7.6	Pamuk
5	Kanada	7.6	Soya fasülyesi, mısır, şekerpancarı, kanola
6	Çin	3.8	Pamuk, domates, kavak, petunya, papatya, tatlı biber
7	Paraguay	2.7	Soya fasülyesi
8	Güney Afrika	1.8	Soya fasülyesi, mısır, pamuk
9	Uruguay	0.7	Soya fasülyesi, mısır
10	Bolivya	0.6	Soya fasülyesi
11	Filipinler	0.4	Mısır
12	Avusturalya	0.2	Kanola, pamuk
13	Meksika	0.1	Soya fasülyesi, mısır
14	İspanya	0.1	Mısır
15	Şili	<0.1	Soya fasülyesi, mısır, kanola
16	Kolombiya	<0.1	Mısır, karanfil
17	Honduras	<0.1	Mısır
18	Burkina Faso	<0.1	Mısır
19	Çek Cumhuriyeti	<0.1	Mısır
20	Romanya	<0.1	Mısır
21	Portekiz	<0.1	Mısır
22	Almanya	<0.1	Mısır
23	Polonya	<0.1	Mısır
24	Slovakya	<0.1	Mısır
25	Mısır	0.1	Mısır

Kanola’ da yapılan araştırmalar glifosat (N-fosfometil-glisin) herbisit toleransı, glufosinat amonyum herbisit toleransı, bromoksinil herbisit toleransı, erkek fertilitite/sterilitite restorasyon ve yağ kalitesini artırma üzerine yoğunlaşmıştır (Demeke ve diğ., 2002).

Glifosat herbisit toleransına sahip transgenik kanola (GT73), transgenik ürünlerde en yaygın olarak kullanılan *5-Enol-piruvilşikimat-3-fosfat (EPSPS)* geni ve *glifosat oksidaz* geninin (*GOX*) aktarımıyla elde edilmiştir. Glifosat, kloroplastta şikimik asit yolağında görev alan EPSP sentaz enzimini inhibe etmekte, EPSP moleküllerinin sentezini durdurarak hücrelerin ölümüne yol açmaktadır. Genetik mühendisliği teknikleriyle aktarılan *EPSPS* geni ise alternatif EPSP proteinlerinin üretimini sağlayarak şikimik asit yolağının işlevini sürdürmesini sağlamakta ve böylece hücreleri glifosinatın olumsuz etkilerine karşı dirençli hale getirmektedir (Demeke ve diğ., 2002).

Glufosinat amonyum herbisit toleransına sahip transgenik kanola (HCN92) ise *Pat (Fosfofinotrisin-N-asetiltransferaz)* geninin aktarımı sonucu elde edilmiştir. Glufosinat amonyum, hücrede glutamin sentetaz enziminin aktivitesini inhibe ederek glutamin sentezini engellemektedir. *Pat* geni ise, sentezinden sorumlu olduğu Fosfofinotrisin-asetiltransferaz enzimi ile glufosinat amonyumun asetillenerek inhibisyonuna yol açmaktadır. Böylece hücreler glufosinat amonyumun olumsuz etkilerine karşı direnç kazanmaktadırlar (Demeke ve diğ., 2002).

Bitkilerde toksik etki oluşturan diğer bir herbisit ailesi bromoksinil herbisitleri ise, dikotil bitkiler üzerinde fotosentezin ışık reaksiyonları evresinde elektron akışını bloke ederek etkilerini göstermektedirler. Bitkilere aktarılan nitralaz (OXY235) geni, bakteriyal nitralaz enzimini kodlayarak bromoksinil herbisitlerini nonfitotoksik bileşiklere hidroliz etmekte ve direnç sağlamaktadır (Demeke ve diğ., 2002).

Avrupa Birliği üyesi ülkelerde bulunan transgenik ürünlerde kullanılan plazmitlerde yaygın olarak *bar* geni (*Streptomyces hygroscopicus*' e dirençli BASTA), *Streptomyces viridochromogens*'dan alınan fosfofinotrisin asetiltransferaz enzimini kodlayan gen bulunmaktadır. Bununla beraber Bt-XtraTM mısırının, Bt11 mısırının, MaximizerTM Bt176 mısırının, MON 810/809/802 mısırının, Roundup ReadyTM soya fasulyesinin yaygın olarak ekimi yapılmaktadır (Ahmed, 2002).

2.3. TRANSGEN ANALİZİNDE KULLANILAN TEKNİKLER

Bitkilere hangi özelliklerin kazandırıldığıнын tespit edilebilmesi amacıyla farklı teknikler geliştirilmiştir (Tablo 2.10). Bu teknikler dört ana başlık altında toplanmaktadır:

1.DNA'ya Dayalı Teknikler

- Southern blot
- Kalitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
- Kantitatif-kompetitif PZR
- Real-Time PZR

2.RNA'ya Dayalı Teknikler

- Northern blot

3.Proteine Dayalı Teknikler

- ELİSA
- Western Blot
- Lateral Flow Strip
- Manyetik parçalar

4.Metabolite Dayalı Teknikler

- NIR (Yakın kızıl ötesi) Spektroskopi
- NMR (Nükleer manyetik rezonans) Spektroskopi
- Yüzey Plasmon Rezonans
- HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) (Ahmed, 2002; Jensen, 2007)

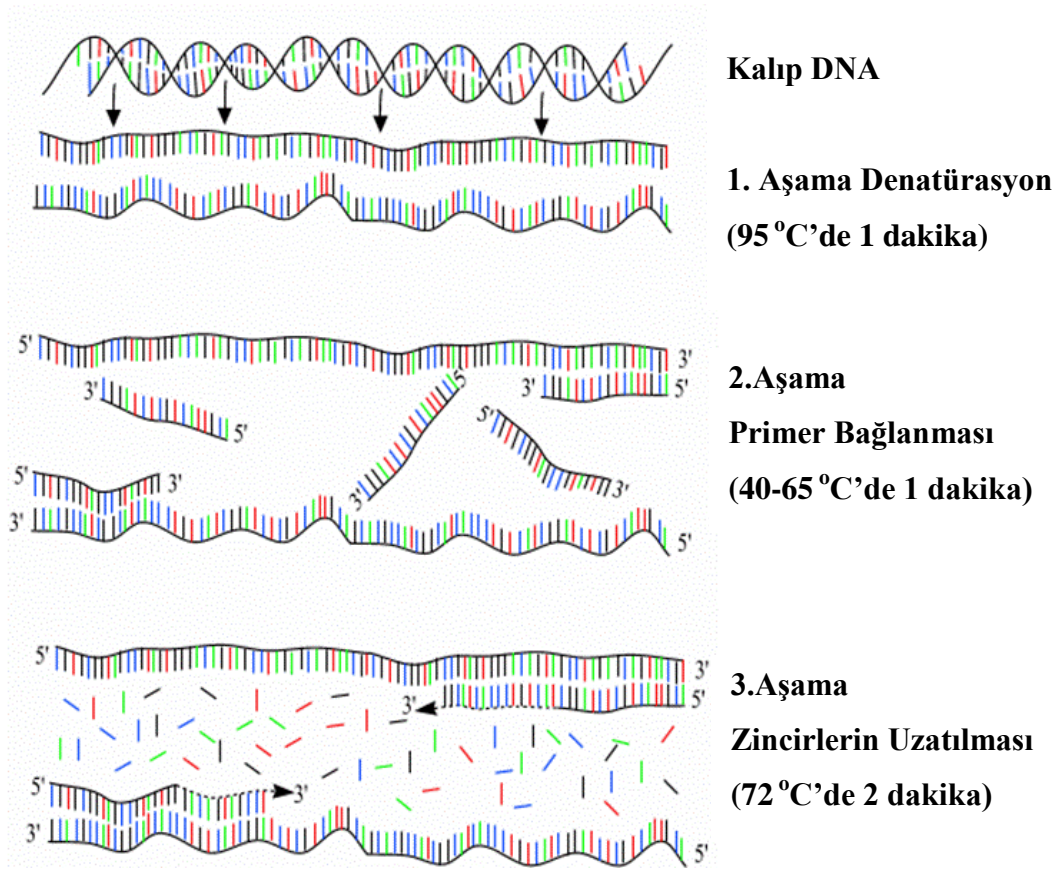
Tablo 2.10: Transgen analizinde kullanılan bazı teknikler

Parametre	Proteine dayalı			DNA'ya dayalı			
	Western Blot	ELISA	Lateral flow strip	Southern blot	Kalitatif PZR	Kantitatif-kompetatif PZR	RT-PZR
Kullanım kolaylığı	Zor	orta	kolay	zor	zor	zor	Zor
Özel ekipman ihtiyacı	Var	var	yok	var	var	var	Var
Duyarlılık	yüksek	yüksek	yüksek	orta	Çok yüksek	yüksek	Yüksek
Süreç	2 gün	30-90 dakika	10 dakika	6 saat	1.5 gün	2 gün	1 gün
Maliyet/örnek (\$)	150	5	2	150	250	350	450
Kantitatif sonuç verme	Yok	var	yok	yok	yok	var	Var
Saha testlerine uygunluk	Yok	var	var	yok	yok	yok	Yok
Başlıca kullanıldığı yerler	Akademik lab.	Araştırma lab.	Saha testi	Akademik lab.	Araştırma lab.	Araştırma lab.	Araştırma lab.

GDO tanısında en çok kabul gören teknik DNA'ya dayalı tekniktir. Bazı gıdaların üretimleri sürecinde olağanüstü koşullar altında DNA molekülü yüksek kararlılık gösterir. GDO organizmaların tanısında transgen ve endojen referans genin paralel çoğaltımı, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği ile oldukça güvenilir sonuç vermektedir (Hübner ve diğ., 1999; Hernandez ve diğ., 2003; Jensen, 2007). PZR tekniği örnekteki hedef DNA'nın çoğaltılabilirliği ve inhibisyonu ile ilgili kontrol sağlamaktadır ve nicel analiz için referans genin çoğaltımı toplam hedef DNA'nın tahmini miktarı noktasında bilgi sağlamaktadır (Hernandez ve diğ., 2003).

PZR, genomda nukleotid dizisi bilinen bir bölgenin çok sayıda kopyasının çıkarıldığı *in vitro* DNA çoğaltım yöntemidir. Temelini organizmanın DNA moleküllerini çoğalttığı replikasyon mekanizmasından alan PZR'da DNA molekülü kalıp olarak kullanılır. Ortama çoğaltılacak bölgeye özgün olarak sentezlenen bir çift primer molekülü, dört serbest deoksiribonukleozidtrifosfat (dNTP) (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), DNA polimeraz enzimi ve enzimin kofaktörü olan Mg^{+2} iyonu eklenir. Bir

tampon içerisinde karıştırılan bu birleşenler sıcaklık döngüleri aracılığıyla replikasyonu taklit ederek ilgili bölgenin çoğaltılmasını sağlar. Bu amaçla üç farklı sıcaklık derecesi, 30-35 döngü olacak şekilde, ardışık olarak kullanılır. Standart PZR’ da 95 °C, DNA molekülünde ipliklerin denatürasyonunun sağlanması için, 40-65 °C Tm (erime ısısı)’ ye bağlı olarak tek iplikli primer çiftinin genomda tamamlayıcı olduğu bölgelere bağlanması için ve 72 °C bağlanan her iki primerin serbest 3’-OH uçlarına kalıba göre serbest dNTP’lerin eklenmesi için kullanılır (Şekil 2.5) (Mullis ve diğ., 1986).



Şekil 2.5: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi

PZR tekniği, transgenik organizmaların tanısı dışında, allelik varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini) gibi tıbbın diğer kollarında, tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evolüsyon çalışmaları gibi birçok alanda (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi) kullanılmaktadır (Arı, 2004).

Günümüzde kullanılan 9 çeşit PZR tekniği bulunmaktadır.

1. Yuvalanmış ('Nested') PZR: Yuvalanmış ('nested') PZR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükte bir PZR yöntemidir. Bu yöntemde ardarda iki PZR yapılır. İlk PZR özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. İkinci PZR ise ilk PZR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren 'nested' primerler ile yapılır. İlk PZR ürünleri ikinci PZR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilir. Böylece 'nested' PZR doğru ürünlerin çoğaltılması için kullanılır (Arı, 2004).

2. Demirlenmiş ('Anchore') PZR: Demirlenmiş ('anchored') PZR çoğaltılacak olan DNA'nın sadece bir bölgesinin (yani bir primer bölgesinin) bilindiği durumda uygulanır. Amaç bilinen bölgeden yararlanılarak ilgilenilen DNA parçasının çoğaltılmasıdır (Arı, 2004).

3. Geri ('Revers') Trankripsiyon PZR'si (RT-PCR): RNA PZR olarak da adlandırılan RT-PZR iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın standart PZR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar (Arı, 2004).

4. Asimetrik PZR: Bu PZR çeşidinde kullanılan iki çeşit primerden biri miktarca diğerinden çok daha fazla kullanılır. Bu nedenle asimetrik PZR sonucu ipliklerden biri diğerinden çok daha fazla miktarda çoğaltılır (Arı, 2004).

5. Ters ('Inverse') PZR (IPCR): Ters ('inverse') PZR bilinen bir DNA dizisinden yararlanılarak bu DNA'nın her iki ucundaki bilinmeyen bölgelerin çoğaltılması için kullanılır (Arı, 2004).

6. *In situ* PZR: Lam üzerindeki hücre, doku ya da doku parçaları içindeki kalıp DNA'nın PZR ile çoğaltılması işlemine *in situ* PZR adı verilir. Bu yöntem viral DNA'nın tek kopyalı genlerin saptanmasında veya RT-PZR ile birlikte viral RNA ve traskriptlerin belirlenmesinde kullanılır (Arı, 2004).

7. Çoklu (multipleks) PZR: İki ya da daha fazla hedef dizinin eş zamanlı olarak aynı reaksiyonda çoğaltım ilkesine dayalı, PZR çeşitlerinden biridir. İlk olarak bu yöntem 1988 'de uygulanmıştır. DNA 'nın test edilmesi ile ilgili delesyon, mutasyon,

polimorfizm ve nicel analizler gibi birçok alanda uygulanmaktadır (Henegariu,1997). Tek bir PZR'da çoklu bölgelerin eş zamanlı çoğaltımı, genetik olarak modifiye edilmiş organizmaların tespit analizlerinde de kullanılmakta, zaman ve çaba noktasında tasarruf sağlamaktadır (Hernandez ve diğ., 2003).

8. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD): RAPD nükleotid dizilimi rasgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar.

9. İmmuno PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ile bir antijen saptama sistemi olan immuno PZR, özgül olarak antijen-antikor kompleksine bağlanmış bir işaret DNA parçasının çoğaltılması için kullanılır.

PZR'nun kalitesini kontrol etmek için, bir tür veya organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde anlatım yapan 'housekeeping genler' kullanılmaktadır. Housekeeping genler PZR tekniği kullanılarak yapılan, transgen analizlerinde, filogenetik araştırmalarda sürekli ve aynı kopya sayısını verdiği için referans gen olarak kullanılmaktadır (Vandesompele ve diğ., 2002; Savlı ve Hatırnaz, 2004; Kullberg ve diğ., 2006). β -tubulin, siklofilin, aktin, elongasyon (uzama) faktörü 1-a (ef1a), 18S rRNA, adenin fosforibozil transferaz (aprt), sitoplazmik ribozomal protein L2 ve NAD bitki housekeeping genlerine örnek olarak verilebilir (Nicot ve diğ., 2005). Kanola bitkisine özgü olan NAD geni, PZR tekniğinde reaksiyonun kalitesini kontrol etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Mannerlöf ve Tenning, 1997).

Bu çalışmada, Türkiye' de ekimi yapılan kanola bitkisinin (*Brassica napus* L.) daha önce transgen analizleri yapılmamış Californium, Orkan, Jura ve Elvis varyetelerinin PZR teknikeri aracılığı ile 35S ve pNOS promotör bölgeleri bakımından transgen analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada, Türkiye’de ekimi yapılan kanola (*Brassica napus* L.) bitkisinin Jura, Orkan, Californium ve Elvis varyeteleri, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü/ Samsun’dan sağlandı. Sertifikalı referans materyalleri (Bt11 %0, MON810 %2) IRRM’ den (Institute for Reference Materials and Measurements) sağlandı (http://www.ermcrm.org/html/ERM_products/search/reports/BF412a.pdf [Ziyaret tarihi: 20 Ocak 2010]).

3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

3.2.1 Yüzey Sterilizasyonu

Kanola tohumlarının doku kültürüne alınabilmeleri için ilk aşamada yüzey sterilizasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla, tohumlar; %70’lik (v/v) etil alkolde 5 dakika tutulduktan sonra, %20’lik (v/v) sodyum hipoklorid solüsyonunda 20 dakika bekletildi. Süre sonunda tohumlar 15 dakika süreyle 3’er kez steril distile sudan geçirilerek yüzey sterilizasyonları tamamlandı.

3.2.2. Steril Kanola Tohumlarının Doku Kültürüne Alınması

Yüzey sterilizasyonları yapılan kanola tohumları, Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) (Tablo 3.1) besiyerine alındı. Besiyerleri 25°C’deki kontrollü bitki büyüme kabininde, 400 W ışık şiddeti, %70 nem, 16 saat gündüz/8 saat gece koşullarında tutularak, doku kültürleri kuruldu.

Tablo 3.1: MS besiyeri içeriği

Makro Elementler	Konsantrasyon (mg/l)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
Mikro elementler	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	15.6
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
KI	0.83
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
Na_5EDTA	37.3
Organik Maddeler	
Tiamin HCl	0.1
Pridoksin HCl	0.5
Nikotik asit	0.5
Myo-inositol	100
Sakkaroz	30000
Agar	8000
pH	5.8

3.3 DOKU KÜLTÜRÜNE ALINAN KANOLA BİTKİCİKLERİNDEN VE SERTİFİKALI MISIR UNLARINDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU

Kanola bitkiciklerinin ve sertifikalı mısır materyallerinin genomik DNA izolasyonları ‘peqGold Plant DNA Mini Kit’ (katalog no:12-3486-01) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için kanola bitkiciklerinin yapraklarından 200 mg ile %0 ve %2 oranında transgenik içeren sertifikalı mısır materyallerinden, 50’şer mg kullanıldı. Kanola bitkicikleri steril havanlar içinde sıvı azot ile ezildikten sonra mısır materyalleri ile birlikte 2 ml’ lik santrifüj tüplerine ayrı ayrı alınıp üzerlerine 600 µl P1 tamponu ve 10 µl β-merkaptotanol ilave edildi. 2 ml’ lik santrifüj tüpüne alınan %0 ve %2’ lik mısır tozlarının üzerine ise 800 µl P1 tamponu ve 10 µl β-merkaptotanol ilave edilerek karıştırıldı. Tüpler, daha sonra 10 dakika süreyle 65 °C’ deki su banyosunda tutuldu. Süre sonunda tüplerin içine 140 µl P2 tamponu eklendi ve 10 dakika

10000 devir/dakikada oda sıcaklığında santrifüj edildi. İşlem sonunda üst sıvılar izolasyona devam etmek için yeni santrifüj tüplerine alındı. Solüsyonların üzerine 0,7 hacim (v/v) izopropanol ilave edilerek karışımlar 2 dakika 10000 devir/dakika' da oda sıcaklığında santrifüjlendikten sonra üst sıvılar uzaklaştırıldı. Çökeltiler 1 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha önceden 65 °C' ye ısıtılmış olan steril distile sudan, tüplerin içine 300' er µl ilave edildi. Daha sonra karışımların üzerine 4 µl RNaz ilavesi yapılarak tüpler 2 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Karışımların üzerine, 37 °C' deki 150 µl P3 tamponu ve 300 µl saf alkol (%99.5; v/v) ilave edilerek karıştırıldı. 750 µl' lik karışımlar, kolonlu toplama tüplerine alındıktan sonra 10000 devir/dakika' da oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Kolonların altında kalan sıvı atıldı ve tüplerin içine 750 µl DNA yıkama tamponu ilave edilerek 1 dakika 10000 devir/dakika' da oda sıcaklığında tüpler santrifüjlendi, kolonların altındaki sıvı uzaklaştırıldı ve işlem tekrar edildi. Toplama tüpleri, kurutma amaçlı 2 dakika 12000 devir/dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve kolonlar yeni toplama tüplerine alındı. Tüplerin içine 100 µl elüsyon (çözücü) tamponu eklenerek 1 dakika 10000 devir/dakika' da oda sıcaklığında santrifüjlendi. Bu işlem tekrar edildi ve izole edilen DNA' lar 200 µl elüsyon tamponu içinde -20 °C' de saklandı.

3.3. İZOLE EDİLEN GENOMİK DNA' LARIN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ

Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinden izole edilen genomik DNA' ların ve sertifikalı referens materyallerinin spektral analizleri yapılarak miktarları ve saflıkları ölçüldü. Genomik DNA' ların 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ile aşağıdaki formül kullanılarak DNA miktarları hesaplandı.

$$\text{“DNA}(\mu\text{g/ml)} = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 50\text{”}$$

3.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Türkiye' de ekimi yapılan kanola bitkisinin, Elvis, Californium, Orkan ve Jura varyetelerinin ve bunlara ek olarak %0 ve %2' lik sertifikalı mısır materyallerinin transgen analizleri için klasik PZR ve çoklu PZR teknikleri kullanıldı. PZR 50 µl total hacimde 'G-storm Gradient PZR' cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.1. Kanola Varyetelerinde ve Sertifikalı Materyallerde 35 S ve pNOS Bölgelerinin Klasik PZR ile Çoğaltılması

Bu çalışmada kanola varyetelerinde ve sertifikalı mısır materyallerinde transgen analizleri amacıyla 35S (227 bç) ve pNOS (167 bç) promotör dizilerine özgü primerler kullanıldı (Tablo 3.2). Sertifikalı mısır materyallerinden %0' lık Bt11 mısırının 35S promotör, tNOS, zSSIIb genini, % 2' lik MON 810 mısırının ise 35S, tNOS ve zein genini içerdiği ürün katoloğunda verilmiştir (http://www.ermcrm.org/html/ERM_products/search/reports/BF412a.pdf [Ziyaret tarihi: 20 Ocak 2010]). Bu promotör bölgelerine ek olarak standart gen anlatımının (housekeeping) belirlenebilmesi için NAD (813 bç) gen bölgesine ait primer kullanıldı (Demeke ve diğ., 2002). Transgen analizi için kullanılan iki promotör gen bölgesi ve NAD geninin çoğaltımı için 'Fermentas PZR Master Mix (2X)' kullanıldı. PZR bileşenleri Tablo 3.3' de ve klasik PZR sıcaklık döngüleri ise Tablo 3.4' de verilmiştir.

Tablo 3.2: 35S, pNOS ve NAD primer dizileri

Primer	Nukleotit dizisi (5'-3')	Çoğaltılan ürün (bç)	Tm (C°)
AM35S F	AAGGGTCTTGCGAAGGATAG	227	60
AM35S R	AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT		60
pNOS F	GGAAGTACAGAACCGCAACG	167	66
pNOS R	TGGAACGTCAGTGGAGCATTT		62
NAD5 F	TAGCCCGACCGTAGTGATGTTAA	813	68
NAD5 R	ATCACCGAACCTGCACTCAGGAA		70

Tablo 3.3: Klasik PZR bileşenleri

Bileşenler	Miktar(µl)
Temel karışım	25
Primer çifti	1(1'er µl)
Genomik DNA	2
Distile H ₂ O	21

Tablo 3.4: Klasik PZR sıcaklık döngüleri

	SÜRE (dakika)	Sıcaklık (°C)
Başlangıç Denatürasyonu	5	95
Denatürasyon	0.5	95
Bağlanma	0.5	60
Uzama	1	72
Son uzama aşaması	3	72
Toplam döngü sayısı	35	

3.5.2. Kanola Varyetelerinin Çoklu PZR (Multiplex PCR) Tekniği ile Transgen Analizleri

Klasik PZR’ de her bir reaksiyon tüpü içine bir primer çifti eklenirken, çoklu PZR’ de ise her bir reaksiyon tüpüne 35S, pNOS, NAD olmak üzere 3 primer çifti birlikte eklendi. Reaksiyon için ‘Qiagen Multiplex PCR’ kiti (katalog no: 206143) kullanıldı, reaksiyon bileşenleri Tablo 3.5’ de, PZR sıcaklık döngüleri ise Tablo 3.6’ de verilmiştir.

Tablo 3.5: Çoklu PZR bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
Distile H ₂ O	14
Q solüsyonu	5
Primer karışımı (pNOS, AM35S, NAD5)	5
Kalıp DNA	1
Temel Karışım	25

Tablo 3.6: Çoklu PZR sıcaklık döngüleri

	SÜRE (dakika)	Sıcaklık (°C)
Başlangıç Denatürasyonu	15	95
Denatürasyon	0.5	94
Bağlanma	1.5	57
Uzama	1.5	72
Son uzama aşaması	10	72
Toplam döngü sayısı	30	

3.5. KLASİK PZR VE ÇOKLU PZR İLE ÇOĞALTILAN 35S, pNOS VE NAD DNA BÖLGELERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZLERİ

Klasik PZR ve çoklu PZR ile yapılan 35S, pNOS ve NAD bölgelerinin analizleri, agaroz jel elektroforezi sisteminde gerçekleştirildi. Özgün primer dizileri kullanılarak çoğaltılan DNA' ların klasik PZR ve çoklu PZR ürünlerinin analizleri için %2 (w/v)' lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, agaroz jel için, 0.8 gram agaroz tartıldı ve 40 ml 1x TAE tamponunda (Tablo 3.7) çözünmesi için mikrodalga fırında ısıtıldı. Çözünen agaroz jel, 60°C' ye kadar soğutulduktan sonra çoğaltılan DNA' ların UV ışık altında gözlenebilmesi için jele 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi ve jel kasetine döküldü. Jel polimerize olduktan sonra, her iki PZR ürünlerinden 10'ar µl agaroz jel kuyucuklarına yüklendi. Ürünlerin jel üzerinde göçlerinin izlenebilmesi ve PZR ile çoğaltılan DNA bölgelerinin TAE tamponun içinde kuyucuklarda çökmesi amacıyla her bir 10 µl PZR ürünü için 2 µl bromofenol mavisi (6x) PZR ürünlerine eklenerek agaroz jel kuyucuklarına yüklendi (Tablo 3.7). Yüklenen çoğaltım ürünlerinin ağırlıklarının bç bakımından belirlenmesi amacıyla 100 bç' lik standart DNA örnekleri de jele yüklendi. Agaroz jele yüklenen DNA' lar, 80 V sabit güç altında 1 saat boyunca yürütüldü. Elektroforez sonrası çoğaltım ürünleri jel görüntüleme cihazı (Avegene, X-lite 200) kullanılarak gözlemlendi ve fotoğraflandı.

Tablo 3.7: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların bileşenleri ve derişimleri

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetat (TAE) Tamponu	Tris bazı	2 M
	Glisiyal asetik asit	%0,0571
	EDTA (pH 8.0)	0,05 M
Elektroforez yükleme tamponu (6X)	Tris-HCl (pH 7.6)	10mM
	Bromofenol mavisi	%0.03
	Ksilen siyanol FF	%0.03
	Gliserol	%60
	EDTA	60 mM

4. BULGULAR

4.1. KANOLA BİTKİCİKLERİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLMESİ

Kanola bitkisinin Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerine ait tohumlar MS besiyerinde in vitro koşullarda bitki büyütme kabininde yetiştirildi. Doku kültürüne alınan tüm tohumlardan, yedi gün sonunda DNA izolasyonu yapılacak boyutlarda (5-7 cm) bitkicikler elde edildi (Şekil 4.1).



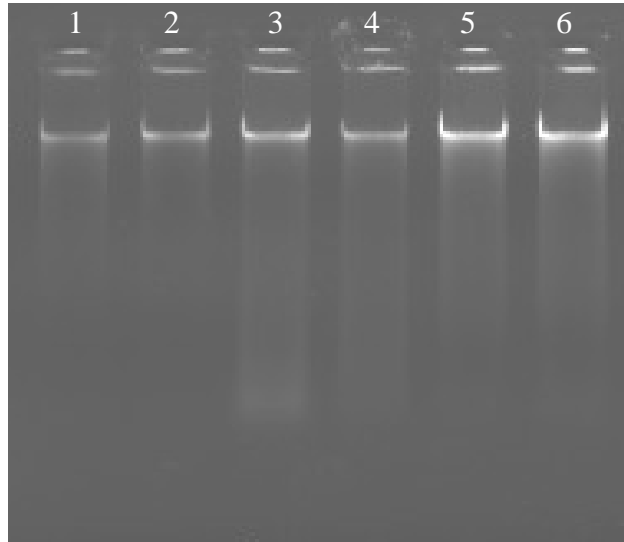
Şekil 4.1: MS besiyerinde gelişen bitkicikler (7 gün)

4.2. KANOLA BİTKİCİKLERİNDEN VE SERTİFİKALI MISIR MATERYALLERİNDEN DNA İZOLASYONU

Doku kültüründe yetiştirilen bitkiciklerden ve kontrol amacıyla kullanılacak olan sertifikalı mısır materyallerinden klasik ve çoklu PZR için gerekli olan genomik DNA izolasyonları peqGold Plant DNA Mini Kit (katalog no:12-3486-01) kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapılarak DNA miktarları tayin edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.2).

Tablo 4.1: Kanola varyeteleri ve sertifikalı mısır materyallerinin genomik DNA miktarları

Varyete	Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$)
Sertifikalı referans materyal (Bt11 mısır %0)	0,0569
Sertifikalı referans materyal (MON 810 mısır %2)	0,0589
Californium	0,0669
Jura	0,0696
Elvis	0,0614
Orkan	0,0637



Şekil 4.2: Kanola bitkisinin Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinden ve sertifikalı mısır materyallerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroferez görüntüleri(%2 w/v)(1: %0 sertifikalı mısır materyali, 2: %2 sertifikalı mısır materyali, 3: Californium, 4: Jura, 5: Elvis, 6: Orkan)

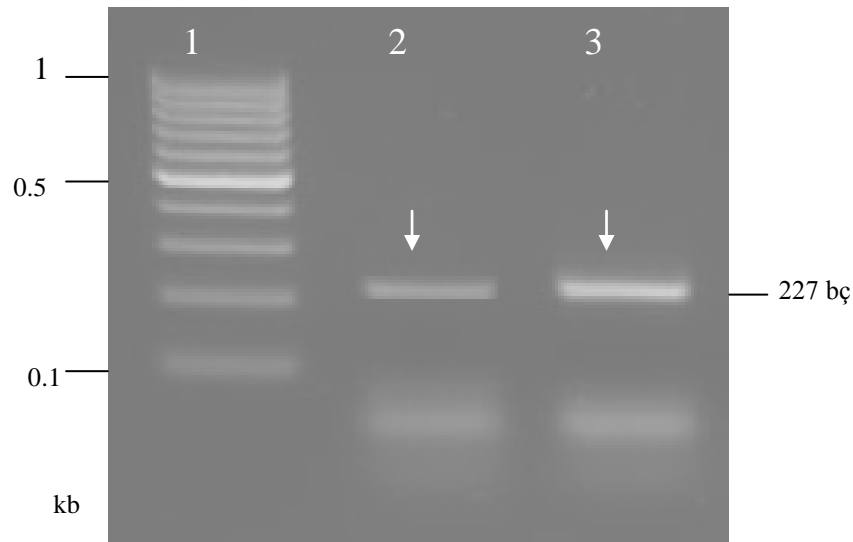
4.3. KLASİK PZR VE ÇOKLU PZR TEKNİKLERİ KULLANILARAK TRANSGEN ANALİZLERİ

Türkiye’de ekimi yapılan kanola bitkisinin Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyeteleri ile %0 ve %2’ lik sertifikalı mısır materyallerinin 35S ve pNOS promotör bölgeleri bakımından transgen analizlerinin yapılması amacıyla klasik ve çoklu PZR teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

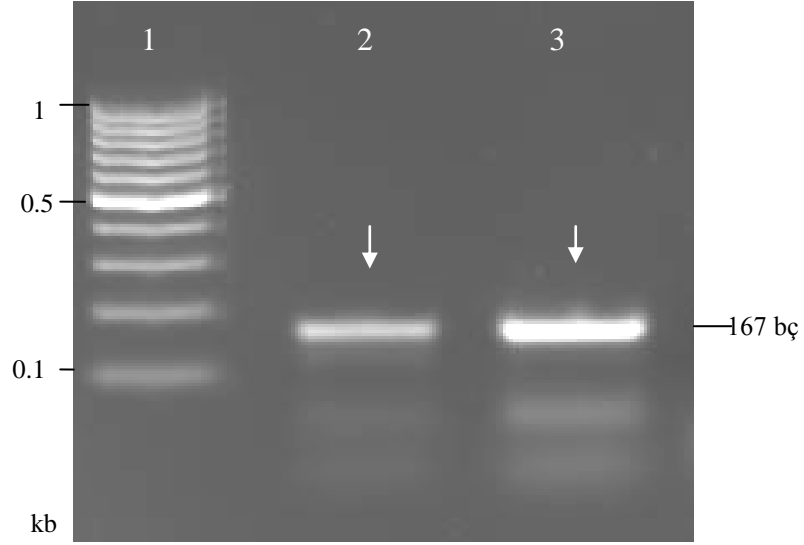
4.3.1. %0 ve %2’ lik Sertifikalı Mısır Materyallerinde Klasik PZR Tekniği Kullanılarak 35S ve pNOS Gen Bölgelerinin Araştırılması

Çalışmada, transgen analizleri amacıyla GDO’ larda yaygın olarak kullanılan 35S (227 bç) ve pNOS (167 bç) promotör bölgelerine ait özel primerler kullanıldı. PZR sürecinin doğruluğu ve çoğaltım ürünlerinin kalitesinin belirlenebilmesi amacıyla bu iki primere ek olarak NAD (813 bç) bölgesine ait primerde çalışmada kullanıldı.

%0 ve %2’ lik sertifikalı mısır materyallerinde 35S ve pNOS promotör bölgeleri klasik PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Klasik PZR sonucunda, hem %0’ lık hem de %2’ lik mısır materyalinde 35S ve pNOS promotör bölgelerinde çoğaltım ürünleri saptandı (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



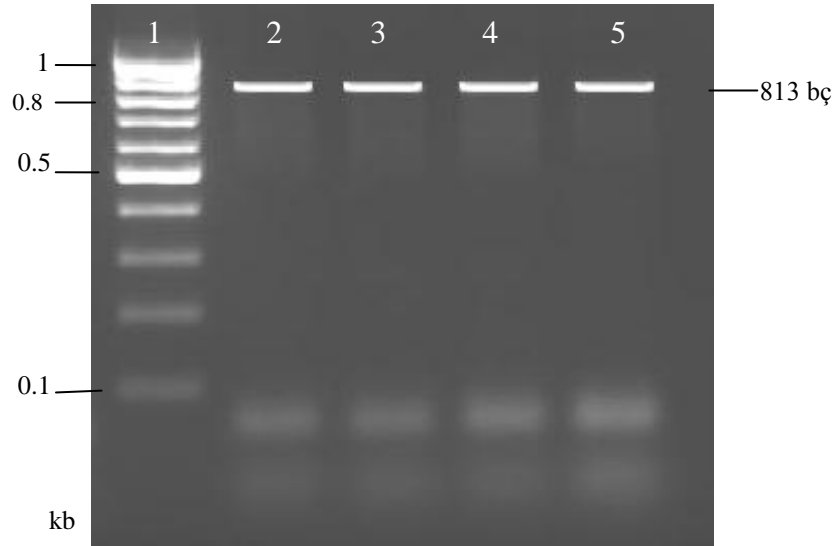
Şekil 4.3: %0 ve % 2’ lik sertifikalı mısır materyallerinde 35S promotör bölgesine ait PZR çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri(%2 w/v) (1: 100 bç’ lik standart DNA, 2: %0’ lık sertifikalı mısır materyali, 3:%2’ lik sertifikalı mısır materyali)



Şekil 4.4: %0 ve % 2' lik sertifikalı mısır materyallerinde pNOS promotör bölgesine ait PZR çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, 2: %0' lik sertifikalı mısır materyali, 3:%2' lik sertifikalı mısır materyali)

4.3.2. Kanola Varyetelerinde NAD “Housekeeping” Gen Bölgesinin Çoğaltılması

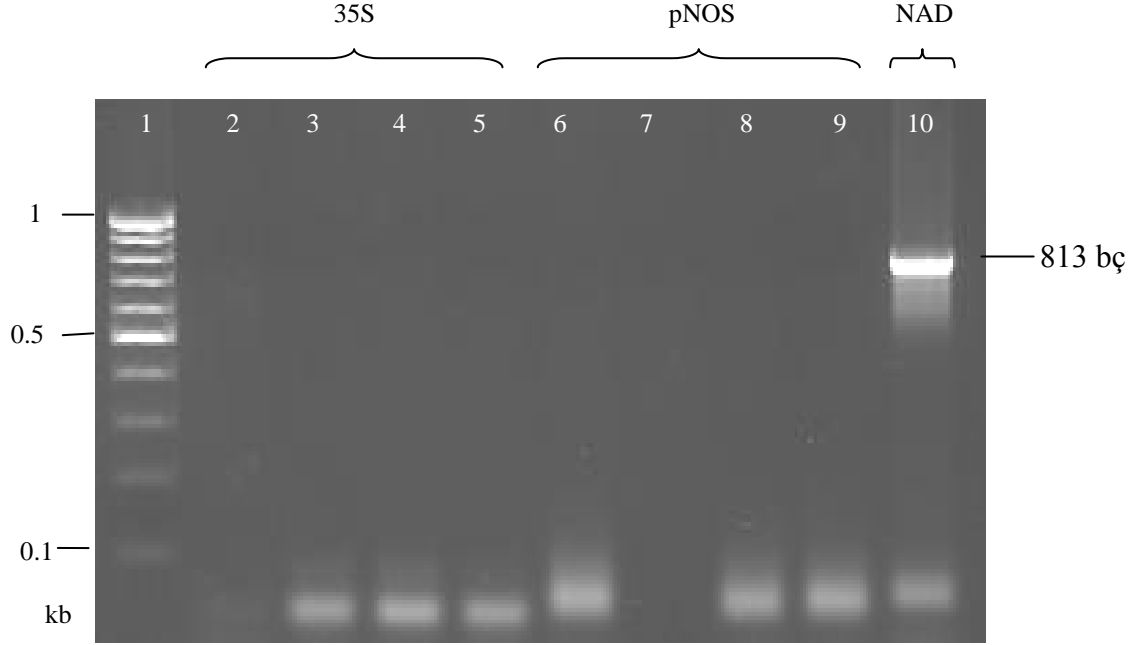
PZR reaksiyonunun doğruluğunu ve ürünlerin kalitesini belirlemek amacıyla kullanılan NAD bölgesine ait PZR çoğaltım ürünleri her 4 varyetede belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Kanola varyetelerinde NAD primerleri kullanılarak gerçekleştirilen klasik PZR çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1: 100 bç' lik standart DNA, 2: Californium, 3: Jura, 4: Elvis, 5: Orkan)

4.3.3. Kanola Californium, Elvis, Jura ve Orkan Varyetelerinin Klasik PZR ile Transgen Analizleri

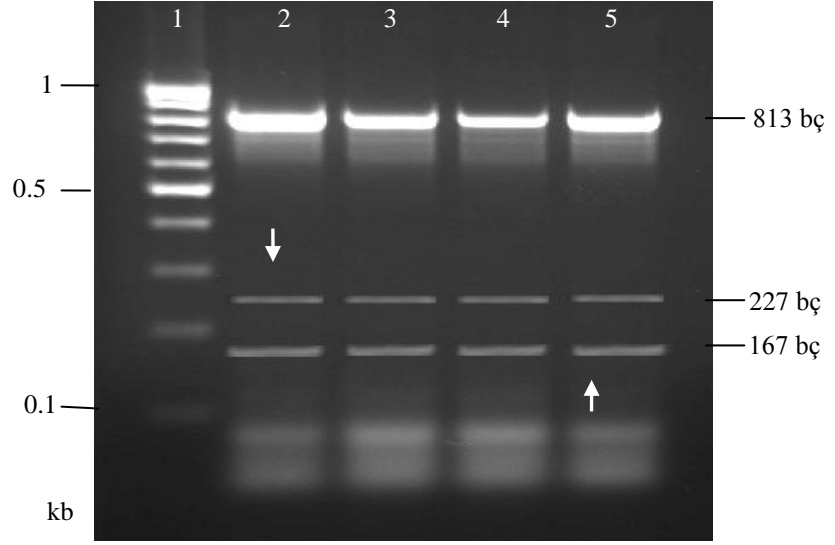
Kanola bitkisinin Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinin klasik PZR ile transgen analizleri amacıyla, 35S ve pNOS promotör bölgeleri tarandı. PZR sonucunda bu dört varyetede herhangi bir çoğaltım ürününe rastlanmadı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Kanola varyetelerinin 35S, pNOS ve NAD primerleri kullanılarak gerçekleştirilen klasik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: 100 bç' lik standart DNA, 2, 6, 10: Californium, 3, 7: Jura, 4, 8: Elvis, 5, 9: Orkan)

4.3.4. Kanola Varyetelerinde Çoklu PZR tekniği ile 35S ve pNOS Gen Bölgeleri Bakımından Transgen Analizleri

Kanola varyeteleri ile %0 ve %2' lik sertifikalı mısır materyallerinde transgen analizi için klasik PZR' na ek olarak çoklu PZR tekniği kullanıldı. Çoklu PZR çoğaltım sonucunda kanola varyetelerinde hem 35S hem de pNOS bölgelerine ait çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezinde belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Çoklu PZR sonucunda 35S ve pNOS bölgelerine ait çoğaltım ürünleri (1: 100 bç' lik standart DNA, 2: Californium, 3: Jura, 4: Elvis, 5: Orkan)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye’ de ekimi yapılan kanola (*Brassica napus* L.) varyetelerinden Californium, Jura, Elvis ve Orkan’ ın PZR teknikleri aracılığıyla transgen analizlerinin yapılması amaçlandı. Bu amaçla, ilk aşamada kanola varyetelerinin doku kültürleri kuruldu. MS besiyerinde büyüyen bitkiciklerden ve sertifikalı mısır materyallerinden genomik DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra, Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinde transgen analizleri transgen teknolojisinde yaygın olarak kullanılan 35S ve pNOS promotör bölgeleri bakımından klasik ve çoklu PZR teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Yapılan çalışmada, transgen analizlerinde kontrol amacıyla kullanılan, sertifikalı mısır materyallerinden hem %0 hem de %2’ lik mısır materyallerinde 35S ve pNOS promotör bölgeleri klasik PZR tekniği kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Elde edilen bulgular doğrultusunda yapılan literatür taramasında, %0’ lık mısır materyalinin kontrol amacıyla kullanıldığı transgen çalışmalarında bulgularımızı destekleyecek herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Turhan’ ın (2008) soya ve mısır bitkilerinde, PZR tekniği aracılığıyla yaptığı transgen analizi çalışmasında, pozitif ve negatif kontrol olarak, IRMM’ den temin edilen; ‘Roundup Ready’ %0, %0.1, %0.5, MON810 %0, %0.1, %0.5, Bt11 %0, %0.1, %0.5, Bt176 %0, %0.1, %0.5 standart materyallerini kullanılmıştır. Turhan (2008), %0’ lık Bt11 materyalinin transgen analizinde, çalışmamızda da olduğu gibi 35S primerini kullanmış ve herhangi bir PZR çoğaltım ürününe rastlanmamıştır. Nikolic ve diğ., (2009) etiketlenmiş ve etiketlenmemiş gıda örneklerinde genetiği değiştirilmiş soya fasulyesi ile yaptıkları çalışmada, referans materyal olarak IRMM’ den temin ettikleri Roundup Ready soya fasulyesi, Bt11 mısırı ve H7-1 şeker pancarını kullanmışlardır. Yapmış oldukları çalışmada negatif kontrol olarak %0’ lık soya fasulyesi materyalini kullanmışlardır. Bu çalışmada örneklerin transgen analizleri için promotör bölgesi olarak 35S ve terminatör bölgesi olarak da NOS bölgesi taranmış fakat herhangi bir PZR ürünü tespit edilmemiştir.

Park ve diğ. (2010) Kore Cumhuriyeti'nde gerçekleştirmiş oldukları çalışmada hayvan yemi olarak kullanılan ürünlerin ve başlıca tohum ithalatının yapıldığı limanların, ambarların, yem üretim tesisleri çevresindeki mısırların transgen tespitinde PZR tekniğinden yararlanmışlardır. Pozitif kontrol olarak IRMM' den temin ettikleri %5' lik Bt11 mısırı kullanmışlar ve bu örneğe ait PZR çoğaltım ürününü agaroz jel elektroforezinde göstermişlerdir. IRMM' nin sertifikalı materyallere ait ürün kataloglarında %0' lık mısır materyalinin 0.12 g/kg' dan az olmak koşuluyla transgen içerebileceği belirtilmektedir (http://www.ermcrm.org/html/ERM_products/search/reports/BF412a.pdf [Ziyaret tarihi: 20 Ocak 2010]). Firmanın belirttiği bu bilgi doğrultusunda, çalışmamızda elde edilen %0'lık sertifikalı üründe 35S ve pNOS promotör bölgelerine ait PZR çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde saptanması IRMM' nin verdiği bilgi ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda %0' lık ve %2' lik sertifikalı mısır materyallerinde 35S ve pNOS promotör bölgelerinin çoğaltılması gen aktarımında çoklu gen girişini yani bitki genomuna birden fazla genin entegre olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Çoklu gen aktarımında partikül bombardımanı ve *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen ve diğ., 1998; Khan ve diğ., 2003). Wu ve diğ., 2004 yılında yaptıkları çalışmada *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk bitkisine gen aktarımı yapmışlar ve dizayn ettikleri vektörde iki böcek direnç geni (API-B ve Bt29K) kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada çoklu gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini PZR tekniği ve 'southern blot hibridizasyon' yöntemiyle göstermişlerdir. Elde edilen bulgular ve literatür araştırmaları bitkilerde transgen çalışmalarında çoklu gen aktarımlarının yaygın olarak yapıldığını ve başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Araştırmamızda, PZR tekniğinin doğruluğunun test edilmesi ve çoğaltım ürünlerinin miktar tayini amacıyla "housekeeping gen" olarak NAD gen bölgesinden yararlanılmış ve çalışmada kullanılan her dört kanola varyetesinde de çoğaltım ürünleri tespit edilmiştir (Şekil 4.5). PZR için uygun koşullar oluşturulduğunda, NAD primeri PZR tüpleri içindeki kalıp DNA' ya bağlanmakta ve o gen bölgesini çoğaltmaktadır. Bu özelliğiyle NAD bölgesinden PZR' nunda kontrol olarak yararlanılmaktadır. Demeke ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada, transgen analizinde kullanılan PZR tekniğinin doğru işlediğinin kontrolünü yapmak ve PZR ürünlerinin miktar tayini amacıyla "housekeeping gen" olarak çalışmamızda da kullanılan, NAD gen bölgesinden

yararlanmışlar ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Wu ve diğ., (2009) pirinç bitkisiyle yapmış oldukları çalışmada böcek zararlılarına karşı direnç sağlayan TT51-1 genini PZR tekniğini kullanarak araştırmışlardır. “Housekeeping gen” olarak ise PLD gen bölgesini kullanmışlar ve çalışmadan olumlu sonuç elde etmişlerdir. Demeke ve Ratnayaka (2007) Kanada’ da ekimi yapılan kanola varyeteleri ile çalışmışlar, klasik PZR, çoklu PZR ve RT-PZR tekniklerini kullanarak kanola varyetelerinde GT73 genini taramışlardır. Çalışmalarında “housekeeping gen” olarak çoklu PZR’ nda Fat-A (76 bç) ve RT-PZR’ nda hmg (99 bç) gen bölgesini kullanarak PZR çalışmalarının doğruluğunu göstermişlerdir. Nikolic ve diğ., (2009) yapmış oldukları bir çalışmada ise soya fasulyesi gıda örneklerinde transgen miktarını tayin etmek için RT-PZR tekniğini, “housekeeping gen” olarak da lektin genini kullanmışlardır. PZR sonucunda agaroz jel elektroforezinde lektin genine ait PZR çoğaltım ürününü saptamışlardır.

Çalışmamızda, Türkiye’ de ekimi yapılan Californium, Jura, Elvis, Orkan kanola varyetelerinin PZR yöntemiyle transgen analizleri yapıldı ve kanola varyetelerinde 35S ve pNOS promotör bölgeleri tarandı. Klasik PZR aracılığıyla yapılan transgen analizinde bahsedilen her 4 varyetede de 35S ve pNOS promotör bölgeleri çoğaltılamadı (Şekil 4.6). Çalışmamızda elde edilen klasik PZR sonuçlarının aksine Lee ve diğ., (2009) klasik PZR tekniği ile 35S ve NOS primer dizilerini kullanarak MS8 ve RF3 kanola varyetelerinin transgen analizlerini yapmışlar ve 35S ve NOS bölgelerini çoğaltmışlardır. Aydın (2004) ise yapmış olduğu çalışmada klasik PZR tekniğini kullanarak işlenmiş ve işlenmemiş mısır örneklerinin transgen analizlerini yapmıştır. Türkiye’nin farklı bölgelerinde bulunan marketlerden toplanan GDO mısırlarının analizinde, 10 işlenmemiş mısır ve 18 işlenmiş mısır ürününü transgen açısından incelemiştir. Örnekler 35S promotör, NOS terminatör, ve kanamisin direnç geni bakımından PZR tekniği kullanılarak incelenmiştir. Aydın (2004) analiz edilen işlenmemiş materyallerin hepsinde yabancı genetik elementlerin bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, 10 işlenmemiş mısır materyalinden 6’sının, Bt11 mısırdığı rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda GDO analizlerinin, mısır materyali ve mısır nişastası için mümkün olduğu, mısır gevreği, mısır cipsi ve patlamış mısır gibi işlenmiş gıdalarda ise mümkün olmadığı rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmada, transgen analizi için klasik PZR tekniğinin yanı sıra çoklu PZR tekniği de kullanıldı. Bu amaçla, Californium, Jura, Elvis, Orkan varyetelerinden izole

edilen genomik DNA' lar ile birlikte 35S, pNOS promotör bölgelerine ait primerler ve NAD primeri tek bir reaksiyon tüpünde birleştirildi ve çoklu PZR gerçekleştirildi. Klasik PZR sonuçlarının aksine çoklu PZR analizlerinde her 4 varyetede de 35S ve pNOS promotör bölgelerine ait DNA bantları saptandı (Şekil 4.7). Çalışmalarında çoklu PZR tekniğini kullanan Forte ve diğ. (2005) Monsanto ve Novartis firmalarından temin ettikleri mısır ve soya fasulyesi tohumlarının transgen analizleri için zein, lektin, 35S ve tNOS primerlerini kullanmışlar ve çalışmalarının sonucunda çoklu PZR tekniğinin GDO tespitinde uygun sonuçlar verdiğini ve bu tekniğin, çok daha hızlı, daha pahalı olan klasik PZR ve kantitatif PZR' ndan daha avantajlı olduğunu ifade etmişlerdir. Zhou ve diğ. (2008), çoklu PZR' nun hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu, genetik olarak modifiye edilmiş soya fasulyesi, mısır, kanola ve pirinç bitkilerinde yaptıkları çalışmalarda rapor etmişlerdir.

Araştırmamıza öncülük eden Demeke ve diğ.' nin (2002) kanola bitkisiyle yaptıkları çalışmada klasik ve çoklu PZR teknikleri kullanılmıştır. Çalışmalarında kullandıkları bitki tohumlarını, Grain araştırma laboratuvarından (Grain Research Laboratory's (GRL)) sağlamışlar ve herbiside direnç sağlayan GT73, HCN92, OXY235 gen bölgeleri üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada 35S, pNOS, CAN2, 4EPSPS, BXN gen bölgelerinin yanı sıra "housekeeping" gen olarak NAD gen bölgesini kullanmışlardır. Klasik PZR ve çoklu PZR sonucunda kanola tohumlarından izole edilen DNA ile yapılan çalışmada tohumların transgenik olduğunu her iki teknik aracılığıyla göstermişlerdir. Çoklu PZR sonuçları Türkiye' de ekimi yapılan kanola varyetelerinin 35S ve pNOS promotör bölgeleri açısından transgenik olduğu ve her 4 varyetede de 35S ve pNOS promotör bölgeleri bakımından çalışmamızda daha önce tespit ettiğimiz gibi sertifikalı mısır materyallerinde olduğu gibi çoklu girişin varlığı sonucunu ortaya koymuştur. Demeke ve diğ. (2002) Kanada' da ekimi yapılan Exceed, Independence ve Innavator varyetelerinde HCN92 (glufosinat amonyum herbisidine tolerans) gen bölgesini PZR tekniği ile taradıklarında çalışmamızda tespit edilen 35S ve pNOS bölgesine ait bantları gözlemlemişler ve bu varyetelerde çoklu giriş olduğu kanısına varmışlardır.

Türkiye' de ekimi yapılan varyetelerin klasik PZR sonucuna göre transgen olduğuna dair veri elde edilememesine rağmen çoklu PZR sonucunda Californium, Elvis, Orkan ve Jura varyetelerinde 35S ve pNOS bölgelerine dair bantlara rastlanması, çalışmamızda

kullanılan klasik PZR tekniğinin transgen analizinde verimli olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Klasik PZR’ de, transgen analizi yapılan varyetelere ait bulgulara rastlanılmaması varyetelerin transgen oranlarının düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Analitik metodlarla yapılan çalışmalar, gıda ve yemlerde transgen varlığını ve miktarını belirlemek ve gıda güvenliğini değerlendirmek amaçlanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan PZR tekniği, hedef DNA’ yı tespit etmede, duyarlı, hızlı, olduğundan dolayı tercih edilmektedir. Fakat primerlerin yanlış bölgelere bağlanmasından dolayı yanlış pozitif sonuçlar elde edilebildiği rapor edilmiştir (Liu ve diğ., 2007).

İnsan, hayvan sağlığına ve ekolojik çevreye karşı olası zararlarına rağmen, GDO’ ya ticari olarak talep giderek artmaktadır. Bugün dünyada ekimi yaygın olarak yapılan GDO bitkilerin ve ürünlerin tüketiciye sunumu öncesi etiketlenmesi için bazı ülkelerde etiketleme zorunluluğu bulunmaktadır (Liu ve diğ., 2007; Zhou ve diğ.,2008).

GDO’ lu ürünlerin üretim ve ticaretinin, doğal çevreye ve sosyo-ekonomik yapıya verebileceği zararlar, bu organizmaların üretimi, doğaya salınımı ve kullanımının biyogüvenlik düzenlemeleri ile kontrol edilmesini gerekli kılmaktadır. Biyogüvenlik, “modern biyoteknoloji tekniklerinin uygulanmalarının ve modern biyoteknoloji ürünlerinin insan sağlığı ve biyolojik çeşitlilik üzerine oluşturabileceği olumsuz etkilerin belirlenmesi (risk değerlendirme) ve belirlenen risklerin meydana gelme ihtimalinin ortadan kaldırılması ya da meydana gelme durumunda oluşacak zararların kontrol altında tutulması için (risk yönetimi) alınması öngörülen tedbirler” şeklinde tanımlanmaktadır. Biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir kullanımının sağlanması için biyoteknoloji uygulamalarından kaynaklanabilecek olumsuzlukların önlenmesine yönelik olarak hazırlanan ve 2003 yılından bu yana yürürlükte olan “Birleşmiş Milletler Biyogüvenlik (Cartagena) Protokolü”, genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO’lar) araştırılması aşamasından, çevreye salım ve transit geçiş aşamasına kadar çevre ve insan sağlığına gelebilecek risklerin önlenmesine kadar geniş bir kapsama sahip etkili bir hukukî belgedir. Protokolün kapsamı; insan sağlığı üzerindeki riskler de göz önünde bulundurularak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir kullanımı üzerinde olumsuz etkilerde bulunabilecek tüm değiştirilmiş

canlı organizmaların sınır ötesi hareketi, transit geçişi, muamelesi ve kullanılması için geçerlidir (http://www.ekopolitik.org/images/cust_files/091008162957.pdf [Ziyaret Tarihi: 25 Ekim 2009]).

Ülkemizde genetiği değiştirilmiş organizmalarla ilgili 26.10.2009 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren “Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik’ in dayandığı yasalar esas alınarak yasaklanmıştır. 20.11.2009 tarihinde yasada değişiklikler yapılmıştır. Kazanılmış haklar çerçevesinde, bakanlık aleyhine hukuki süreçlere muhatap olmamak açısından, 26 Ekim'den önce kontrol belgesi alınan ürünlere, AB kriterlerini sağlamaları, AB mevzuatında belirtilen belgeleri sunmaları, yönetmelikteki etiketleme, kontrol ve denetimle ilgili hükümlere uymaları şartıyla 1 Mart 2010’ a kadar ithalat imkanı getirilmiştir. Son olarak bu yönetmeliğin yayınlanmasından itibaren basında, sivil toplum örgütlerinde ve bilim çevrelerinde tartışmalar yaşanmış, yönetmeliğin bazı maddelerinin net olarak anlaşamadığı görülmüş, bunun üzerine 21.01.2010 tarihinde yönetmeliğin bazı maddelerinde değişiklikler yapılmıştır. Yine, AB ölçütlerine uygun olmayan hiçbir ürünün ithalatına izin verilmeyecektir. Ürünlerin ithalinde bakanlık tarafından gerekli kontrol ve denetimlerin yapılmasına devam edilmekte olup, etiketlemeye ilişkin hususlar da dahil yönetmeliğin diğer kuralları aynen uygulanmaktadır ve uygulanacaktır (http://www.tarim.gov.tr/Duyurular_haber_Detayli_Gosterim.html?NewsID=724[Ziyaret tarihi: 5 şubat 2010]). Ancak yürürlüğe giren söz konusu yasa öncesinde de her yıl iki milyon tona yakın GDO’ lu mısır, soya, pamuk ve kanola tohumunun kaçak olarak Türkiye’ye girdiği belirtilmektedir. İsteğe bağlı veya zorunlu etiketleme tarzında düzenlemeler ülkemizde yeni gündeme geldiği için, bu gıdalar, tüketici tarafından bilmeden tüketilebilmektedir (Ergin ve diğ., 2008).

Bu çalışmada, Türkiye’ de ekimi yapılan kanola bitkisinin daha önce transgen analizi yapılmamış Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyetelerinde klasik ve çoklu PZR teknikleri kullanılarak 35S ve pNOS promotörleri baz alınarak gerçekleştirilen transgen analizlerinden elde edilen bulgular doğrultusunda bu 4 varyetenin 35S ve pNOS promotör bölgeleri bakımından transgenik olduğu sonucuna varıldı. Yapılan transgen analiz çalışması, kanola bitkisinin Californium, Jura, Elvis ve Orkan varyeteleriyle yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamızda kullanılan teknikler ve elde edilen veriler

doğrultusunda çalışmamız, Türkiye’ de ekimi yapılan, ekonomik anlamda değerli tarım bitkilerinin transgen tespit çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

AHMED, F. E., 2002, Detection of genetically modified organisms in foods, *Trends in Biotechnology*, 20(5), 215-223.

ANONİM, 2000, DPT VIII, Beş yıllık kalkınma planı, biyoteknoloji ve biyogüvenlik özel ihtisas komisyonu raporu: ulusal moleküler biyoloji, modern biyoteknoloji ve biyogüvenlik atılım projesi önerisi, Ankara.

ANONİM, 2009, (online), www.fas.usda.gov [Ziyaret Tarihi:20 Ekim 2009]).

ANONİM, 2009, Methods to transfer genes in plants (online), http://www.biotechnology4u.com/biotechnology_agriculture_methodstransfergenes_plants.html [Ziyaret Tarihi: 13 Ekim 2009]).

ANONİM, 2009, Kolza Tarımı (online), Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun, <http://www.tagem.gov.tr/HABERLER/kolza/10.pdf> [Ziyaret Tarihi:15 Ağustos 2009]).

ANONİM, 2009, Bitkisel Yağlar (online), Ankara, http://www.bysd.org.tr/bitkisel_yag.pdf. [Ziyaret Tarihi:29 Eylül 2009].

ARI, Ş., 2004, *Doğrudan Gen Aktarım Yöntemleri*, Bitki Biyoteknolojisi-2, S. Ü. Basımevi, Konya, 160-189.

ARI, Ş., 2004, *DNA' nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması*, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 101-117.

AYDIN, G., 2004, *Detection of genetically modified maize via polymerase chain reaction*, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi.

BIDNEY, D., SCHELONGE, C., MARTICH, J., BURRUS, M., SIMS, L., HUFFMAN, G., 1992, Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313.

BIRCH R. G., 1997, Plant transformation: Problems and strategies for practical application, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 297-326.

CELLINI, F., CHESSON, A., COLQUHOUN, I., CONSTABLE, A., DAVIES, H. V., ENGEL, K. H., GATEHOUSE, A. M. R., KARENLAMPI, S., KOK, E. J., LEGUAY, J. J., LEHESRANTA, S., NOTEBORN, H. P. J. M., PEDERSEN, J., SMITH, M., 2004, Unintended effects and their detection in genetically modified crops, *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1089-1125.

CHEN, L., MARMEY, P., TAYLOR, J. N., BRIZARD, J. P., ESPINOZA, C., D'CRUZ, P., HUET, H., ZHANG, S., KOCHKO, A., BEACHY, R. N., FAUQUET, C. M., 1997, Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants, *Nature Biotechnology*, 16, 1060-1064.

ÇABUK, M., ALÇİÇEK, A., BOZKURT, M., 2005, Hayvan Beslemede Genetik Olarak Değiştirilmiş Bitkilerin (GMO) Kullanımı II. Kanatlıların Beslenmesinde GMO Kullanımı ve Etkileri, *III. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi*, Adana, 369-373.

DE LA RIVA, G. A., GONZALEZ-CABRERA, J., VAZQUEZ-PADRON, R., AYRA-PARDO, C., 1998, *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 118-133.

DEMEKE, T., GIROUX, R. W., REITMEIER, S., SIMON, S. L., 2002, Development of a Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Three Canola Transgenes, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(10), 1015-1019.

DEMEKE, T., RATNAYAKA, I., 2007, Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event, *Food Control*, 1-5.

DOYLE, J.J., PERSLEY, G.J., 1996, New biotechnologies, an international perspective In: Investment strategies for Agricultural and Natural Resources Research. CAB Int., Wallingford, UK.

ERGİN, I., GÜRSOY, T. Ş., ÖCEK, Z. A., ÇİÇEKLİOĞLU, M., 2008, Sağlık meslek yüksekokulu öğrencilerinin genetiği değiştirilmiş organizmalara dair bilgi tutum ve davranışları, *TAF Prev Med Bull*, 7(6), 503-508.

ERGÜN, A., ÇOLPAN, İ., YILDIZ, G., KÜÇÜKERSAN, S., TUNCER, Ş.D., YALÇIN, S., KÜÇÜKERSAN, M.K., ŞEHU, A., 2004, Yemler Yem hijyeni ve teknolojisi, *Pozitif Matbaacılık*, Ankara.

ESCANDON, A. S., HAHNE, G., 1991, Genotype and composition of culture medium are factors important for transformed sunflower (*Helianthus annuus* L) callus, *Physiol. Plant.*, 81, 367-376.

FORTE, V. T., DI PINTO, A., MARTINO, C., TANTILLO, G. M., GRASSO, G., SCHENA, F. P., 2005, A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize, *Food Control*, 16, 535-539.

FRANCIS, G., MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., 2001, Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish, *Aquaculture*, 199, 197–227.

GRAYBURN, W. S., VICK, B. A., 1995, Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads, *Plant Cell Rep.*, 14, 285-289.

HENEGARIU, O., HEEREMA, N. A., DLOUHY, S. R., VANCE, G. H., VOGT, P. H., 1997, Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol, *BioTechniques*, 23(3), 504-511.

HERNANDEZ, M., LAZARO, D.R., ESTEVE, T., PRAT, S., PLA, M., 2003, Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection, *Analytical Biochemistry*, 323, 164-170.

HERTRAMPF, J. W., PASCUAL F. P., 2000, Handbook on ingredients for aquaculture feeds, *Kluwer Academic Publish*, Boston, Londra, ISBN 0-412-627604.

HUBNER, P., STUDER, E., LUTHY, J., 1999, Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food, *Food Control*, 10, 353-358.

JAMES, C., 1997, Global status of transgenic crops in 1997. *ISAAA Briefs* , 5, ISAAA: Ithaca, NY

JENSEN, A. H., 2007, Sampling, detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs), *Food Toxicants Analysis*, 231-268.

KHAN, M. R., RASHID, H., ANSAR, M., CHAUDRY, Z., 2003, High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 223–231.

KIYAK, S., 2004, Genetik Olarak Değiştirilmiş Gıdalar, Cartagena Biyogüvenlik Protokolü ve Türkiye’ de Durum (3), *Çevreye Genç Bakış*, 6(9), 1-13.

KNITTEL, N., GRUGER, V., HAHNE, G., LENE, P., 1994, Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol, *Plant Cell Rep.*, 14, 81-86.

KOCA, S., 1982, Hayvan beslemede kolza tohumu küspesi, *Tarım ve Mühendislik dergisi*, 2, 6-15.

KULLBERG, M., NILSSON, M. A., ARNASON, U., HARLEY, E. H., JANKE, A., 2006, Housekeeping Genes for Phylogenetic Analysis of Eutherian Relationships, *Mol. Biol. Evol.*, 23(8), 1493–1503.

LAPARRA, H., BURRUS, M., HUONOLD, R., DAMM, V., BRAVO- ANGEL, A. M., BRONNER, R., HAHNE, G., 1995, Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus*) L.) evaluation of three gene transfer methods, *Euphytica*, 85,63-74.

- LEE, D., MURA, M. L., ALLNUTT, T. R., POWELL, W., 2009, Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) Using Isothermal Amplification of Target DNA Sequences, *BMC Biotechnology*, 9:7.
- LIU, G. M., CAI, H. N., CAO, M. J., SU, W. J., 2007, Fluorophore double stranded probe-multiplex quantitative PCR method for detecting transgenic component of promoter derived from Cauliflower Mosaic Virus and nos terminator derived from *Agrobacterium tumefaciens* simultaneously, *Food Control*, 18, 615–622.
- MANNERLÖF, M., TENNING, P., 1997, Screening of transgenic plants by multiplex PCR, *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 38-45.
- MOYNE, A.L., TAGU, D., THOR, V., BERGOUNIOUX, C., FREYSSINET, G., GADAL, P., 1989, Transformation cali obtained by direct gene transfer into sunflower protoplast, *Plant Cell Rep.*, 8, 97-100.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ELICH, H., 1986 Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.*, 1, 263-273.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15(3), 473-497.
- NIKOLIC, Z., TASKI-AJDUKOVIC, K., JEVTIC, A., MARINKOVIC, D., 2009, Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment of three pairs of PCR primers, *Food Research International*, 42, 349–352.
- NICOT, N., HAUSMAN J.F., HOFFMANN, L., EVERS, D., 2005, Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2907-2914.
- ODABAŞI, S., TAŞKAYA, B., 2004, Kolza (Kanola), *Tarımsal Ekonomi Araştırmalar Enstitüsü, (TEAE)*, 1303-8346, 7(11), 1-4.
- ÖZCAN, S., ÖZGEN, M., 1996, Bitki genetik mühendisliği, *Kükem Dergisi*, 1996(1), 69-95.
- ÖZGEN, M., TÜRET, M., 1995, Bitki ıslahı ve gen aktarma teknolojisi, *Biyoteknoloji ve Bitki Islahı*, 17-19 Nisan 1995 Gebze/Kocaeli, Can Ofset, 227-236.
- ÖZTÜRK M. G., BİLEN K., 2009, Kanola Yağı Metil Esteri ve Karışımlarının Dizel Motoru Performansına Etkisinin Deneysel İncelenmesi, *Int.J.Eng.Research & Development*, 1(1), 35-41.
- QUERCI, M., MAZZARA, M., 2004, *Characteristics of Roundup Ready® Soybean, MON810 Maize and Bt-176 Maize*, training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms, Special Publication No.1.03.114 European Commission Joint Research Centre, session 7, 1-16.

PARK, K. W., LEE, B., KIM, C., KIM, D. Y., PARK, J., KO, E., JEONG, S., CHOI, K., YOON, W. K., KIM, H. M., 2010, Monitoring the occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic of Korea, *Food Control*, 21 (2010), 456–461.

PASZKOWSKI, J., SHILLITO, R.D., SAUL, M., MANDAK, V., HOHN, T., HOHN, B., POTRYKUS, I., 1984, Direct gene transfer to plants, *The EMBO Journal*, 3(12), 2717-2722.

PENA, A., LORZ, H., SCHELL, J., 1987, Transgenic plants obtained, by injecting DNA into young floral tillers, *Nature*, 325, 274-276.

PETERS, P., 1993, *Transforming Plants - Basic Genetic Engineering Techniques*[online], IA: Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, http://www.access.excellence.org/RC/AB/BA/Transforming_Plants.php [Ziyaret Tarihi: 13 Ekim 2009]

PUGLIESI, C., MEGALE, P., CECCONI, F., BARONCELLI, S., 1993, Organogenesis and embryogenesis in *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* x *Helianthus tuberosus*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33, 187-193.

RADCHUK, V. V., VAN, D. T., KLOCKE, E., 2005, Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous in planta transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains, *Plant Science*, 168 (2005), 1515–1523.

SASONGKO, N. D., MOLLERS, C., 2005, Toward Increasing Erucic Acid Content in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Through the Combination with Genes for High Oleic Acid, *JAOCs*, 82(6), 445-449.

SAVLI, H., HATIRNAZ, Ö., 2004, Sayımsal gerçek zamanlı-polimer zincir reaksiyonu ve hematolojik gen anlatım analizleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 24, 653-660.

SCARTH, R., MCVETTY, P. B. E., RIMMER, S. R., STEFANSSON, B. R., 1988, Stellar low linolenic-high linoleic acid summer rape, *Canadian Journal of Plant Science*, 68, 509-510.

SCHRAMMEIJER, B., SIJMONS, P. C., VAN DEN ELZEN, P. J. M., HOEKEMA, A., 1990, Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium*, *Plant Cell rep.*, 9, 55-60.

SOBUTAY, T., 2004, Kanola sektör araştırması, İTO, İstanbul.

SÜZER, S., 2008, *Kanola (kolza) tarımı*, Hasad, İstanbul, 978-975-8377-61-9.

TAN, Ş., 2007, Kanola (kolza) tarımı, *Çiftçi Broşürü*, 134.

TIRAŞ, M., 2009, Türkiye’de kanola tarımı, *Doğu coğrafya dergisi*, 21, 159-172.

TRAPMANN, S., CATALANI, P., CONNEELY, P., CONTRERAS, M., CORBISIER, P., GANCBERG, D., GIORIA, S., LE GUERN, L., LINSINGER, T., SCHIMMEL, H., The Certification of Reference Materials of Dry-Mixed Maize Powder with different Mass Fractions of Bt-11 Maize (online), Belçika, http://www.erm-crm.org/html/ERM_products/search/reports/BF412a.pdf [Ziyaret tarihi: 20 Ocak 2010]

TURHAN, A., 2008, *Soya ve mısırdaki genetiği değiştirilmiş ürünlerin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.

TURHAN, H., 2003, Biyoteknoloji ve tarım, *Ekin Dergisi*, 7(23), 56-61.

UZOGARA, S.G., 2000, The impact of genetic modification of human foods in the 21st century, *Biotechnology Advances*, 18, 179-206.

ÜNAL, A., 2009, Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik yasa tasarısı, [online], İstanbul, http://www.ekopolitik.org/images/cust_files/091008162957.pdf [Ziyaret Tarihi: 25 Ekim 2009]).

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, 3(7).

VINES, R., 2002, Biotechnology and plants, Virginia Cooperative Extension, Biotechnology Information, Virginia State Univ., 443-002.

WU, J., ZHANG, X., NIE, Y., LUE, X., 2004, High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants, *Plant Breeding*, 124, 142-146.

WU, G., WU, Y., XIAU, L., LU, C., 2008, Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2, *Food Chemistry*, 112, 232-238.

WU, G., WU, Y., NIE, S., ZHANG, L., XIAU, L., CAO, Y., LU, C., 2009, Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1, *Food Chemistry*, 119 (2010), 417-422.

YILMAZ, N., 2009, GTIP 1512: Ayçiçeği Yağı [online], İstanbul, www.tekirdagtsso.org.tr/urun/Ayiek%20ya%20GTIP%201512.doc. [Ziyaret Tarihi: 20 Ekim 2009]).

ZHOU, P. P., ZHANG, J. Z., YOU, Y. H., WU, Y. N., 2008, Detection of genetically modified crops by combination of multiplex PCR and low-density DNA microarray, *Biomedical and Environmental Sciences*, 21, 53-62.



ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Afyon’ da doğdum. İlk öğrenimimi Bandırma Atatürk İlköğretim Okulunda, lise öğrenimimi Bandırma Şehit Mehmet Gönenç Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’ nde tamamladım. 2001 yılında kaydımı yaptırdığım İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden 2006 yılında mezun oldum. Aynı yılın güz döneminde İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programında eğitimime başladım.