

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**İŞLENMİŞ VE İŞLENMEMİŞ BAZI MISIR ÜRÜNLERİNDE GENETİK  
MODİFİKASYONUN TESPİTİ**

**Melike BARAN EKİNCİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANBİLİM DALI**

**ANKARA**

**2008**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### İŞLENMİŞ VE İŞLENMEMİŞ BAZI MISIR ÜRÜNLERİNDE GENETİK MODİFİKASYONUNUN TESPİTİ

Melike BARAN EKİNCİ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Bu çalışma ile Türkiye piyasasından toplanan ve mısır unu, mısır nişastası, mısır cipsi ve mısır gevreğini içeren 64 adet işlenmiş mısır ürünü ile 19 adet işlenmemiş yemlik dane mısırlarda genetik modifikasyon araştırılmıştır. Tüm numunelerde, birçok bitkide düzenleyici elementlerden olan 35S promotör ve NOS terminatör taranması önce konvensiyonel PCR ile yapılarak daha sonra real time PCR ile doğrulanmıştır. Sonuçlar eş yapma t testi metoduna göre istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Ürünlerde, Türkiye’ de kısıtlı veriye sahip olan Bt11 ve Bt176 mısırların varlığı konvensiyonel PCR ile aranmış, Bt11 ve Bt176 miktar tayini için real time PCR kullanılmıştır. Ayrıca, hakkında hiçbir veri bulunmayan Mon810, T25 ve CBH351 mısırlar konvensiyonel PCR’ da multipleks PCR yöntemi ile kalitatif, Mon810 ve T25 mısır varlığı kantitatif olarak real time PCR’ da aranmıştır. Sonuçlar, eş yapma t testi metoduna göre ve Kappa testine göre istatistiki olarak analiz edilmiştir.

Sonuçlar, analiz edilen işlenmiş ve işlenmemiş materyallerin bazılarında yabancı genetik elementlerin bulunduğunu göstermektedir. Konvensiyonel PCR ile 2 örnek, real-time PCR ile ise 14 örnek, 35S promotör ve/veya NOS terminatör açısından pozitif sonuç vermiştir. Bt176 relatif miktar tayinine göre, 3 örnekte % 0.05, 0.01 ve 0.04 oranlarında, absolute miktar tayininde ise, sadece bir örnekte % 0.14 oranında Bt176 mısır saptanmıştır. Absolute miktar tayinlerinde ise, aynı örneklerden birinde % 1.48 Bt11, % 2.83 Mon810 ve % 0.16 T25 mısır varlığı saptanmış olup, toplamda % 4.67 oranında GM mısır ürünü içermektedir. Diğer örneklerin içerdiği GM ürün miktarları ise Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifinde belirtilen etiketleme sınırı olan % 0.9’ un altındadır.

**Eylül 2008, 223 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** GM mısır, konvensiyonel PCR, real-time PCR

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### DETERMINATION OF GENETIC MODIFICATION ON PROCESSED AND UNPROCESSED JOME CORN PRODUCTS

Melike BARAN EKINCI

Ankara University  
Graduate School Natural and Applied Science  
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

In this study, raw and processed maize samples were analyzed for genetic modification using a DNA based detection method, the polymerase chain reaction. 19 raw maize and 64 processed maize food including maize flour, starch, corn flakes were collected from different markets located in Turkey. The samples were examined for the presence of genetic elements located in the majority of transgenic crops such as NOS terminator and CaMV 35S promoter using conventional PCR and then verified real time PCR, too. Additionally, Bt11 and Bt176 events, which have been enjoyed limited data in Turkey, examined in the products using conventional PCR. Then, quantification of Bt11 and Bt176 lines was performed via real time PCR. As well as, for confirming the presence of Mon810 and CBH-351 events, have not been possessed any data in Turkey, were examined with conventional PCR. And then, Quantification of T25 and Mon810 events were performed via real time PCR, too. The results were statistically analyzed using paired t test method and Kappa test method.

The results indicated that foreign genetic elements were found in analyzed raw and processed materials. 35S promotor and/or NOS terminator were determined in two samples by conventional PCR and in 14 samples by real-time PCR. According to relative and absolute quantification results, relatively, 0.05 %, 0.01 % and 0.04 % Bt176 were determined in three samples, 0.14 % Bt176 was only determined in one sample. It was also determined that 1.48 % Bt11, 2.83 % Mon810 and 0.16 % T25 and total 4.67 GM maize in the same sample. Quantity of GM maize of the others is below than 0.9 % which is limit of labeling, according to The GM Food and Feed Regulation (EC) No. 1829/2003.

**September 2008, 223 pages**

**Key Words:** GM maize (corn), conventional PCR, real-time PCR

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, piyasadan toplanan işlenmiş ve işlenmemiş mısır ürünlerinden DNA izolasyonu yapılarak genetik modifikasyon taranması, genetik modifikasyonun tanımlanması ve miktar analizleri yapılmıştır. İlgili optimizasyonlar ülkemizin ilk genetik modifiye gıda ve yem analizi yapan laboratuvarlarından biri olan Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü-Biyogenetik Birimi'nde ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü işbirliği ile gerçekleştirilmiştir. 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin saptanmasına yönelik çalışmalar Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü' nün katkısı, diğer çalışmalar ise TÜBİTAK Tarım, Orman, Veteriner Araştırma Grubu (TOVAG) tarafından 1070001 no'lu proje kapsamında sağlanan destek ile tamamlanmıştır.

Öncelikle, çalışmamın her aşamasında bana görüş ve önerileri ile büyük katkı sağlayan ve beni bilimsel anlamda sabırla destekleyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK' e (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği) teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, yapıcı eleştirileri ve katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri Prof. Dr. Zümrüt ÖGEL (ODTÜ Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı) ve Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ )Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği) hocalarıma, özellikle tez konusu seçiminde olmak üzere, tez sırasında yaptığı önerilerden dolayı Dr. Remziye YILMAZ'a,(ODTÜ Biyoloji Bölümü) tezin istatistik kısımlarının gerçekleştirilmesindeki büyük katkılarından dolayı sevgili arkadaşım Özgür KOŞKAN' a, bilgisayarla ilgili teknik yardımlarından dolayı Ercan KOCA'ya, birim şefim Berrin YERLİKAYA' ya (SDÜ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü) ve adlarını buraya sığdıramadığım ama her türlü maddi-manevi katkılarını benden esirgemeyen tüm arkadaş ve dostlarıma teşekkür ediyorum.

Ayrıca; bugüne kadar yaptığım çalışmalarda maddi manevi desteklerinin yanı sıra dualarını esirgemeyen, benimle birlikte sevinen ve üzülen canım annem ve babama, sabırla tezimin bitmesini bekleyen ve pek çok fedakarlığa katlanan eşime ve her koşulda beni destekleyen eşimin ailesine, kardeşlerime ve tabi ki iki yıl önce aramıza katılan yeğenim Mert Emre'ye, bu kadar sevimli olduğu, tez ile ilgili çalışmalarım sırasında tüm stresimi aldığı ve bana yaşama sevinci verdiği için teşekkür etmek istiyorum.

Melike BARAN EKİNCİ  
Ankara, Eylül 2008

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Dünya’ da GDO’ ların Sosyo-Ekonomik Açıdan Değerlendirilmesi.....	3
2.2 Transgenik Ürünlerin Global Değeri.....	5
2.3 GMO’ ların Kullanım Amaçları.....	6
2.4 Modern Biyoteknolojinin Riskleri.....	7
2.4.1 İnsan ve hayvan sağlığı üzerindeki riskler.....	8
2.4.2 GMO’ ların çevreye etkisi.....	8
2.4.3 Sosyo-ekonomik ve etik anlamda riskler.....	8
2.4.3.1 Türkiye’ de sosyo ekonomik açıdan riskler.....	10
2.5 Biyogüvenlik .....	13
2.5.1 Biyogüvenlik Protokolü (Cartagena Protocol on Biosafety).....	13
2.5.2 Biyogüvenlik Protokolü’ nün ana prensipleri.....	14
2.5.3 Avrupa Birliği Direktifleri.....	14
2.5.4 Türkiye’ de yasal düzenlemeler.....	15
2.5.4.1 Mevcut yasal durum.....	15
2.5.4.2 Ulusal Biyogüvenlik Çerçevesinin Geliştirilmesi” konulu UNEP/GEF projesi ve proje çalışmaları.....	16
2.5.4.3 Türkiye’ nin biyogüvenlik politikası.....	18
2.5.4.4 Türkiye’ de biyogüvenlikle ilgili ana problemler .....	18
2.5.5 GDO’ larda Monitoring (İzleme) .....	19
2.5.5.1 İzleme programı.....	19
2.5.5.2 Etiketleme.....	21
2.6 Gıdalarda GMO Analizi.....	24
2.6.1 DNA analizlerine dayalı yöntemler .....	24
2.6.2 Protein analizlerine dayalı yöntemler.....	28
2.6.3 NIR spektroskopisi.....	29
2.6.4 Fenotipik karakterizasyon.....	29
2.6.5 Yeni teknikler.....	30
2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi İçin Metot Validasyonu.....	30
2.8 Dünya’ da Üretimi Yapılan Genetik Modifiye Mısırlar.....	33
2.8.1 Bt 176 mısır (SYN-EV176-9).....	35
2.8.2 Bt11 mısır.....	38
2.8.3 Mon810 mısır.....	41
2.8.4 T25 mısır (ACS-ZMQQ3-2) .....	43
2.8.5 CBH351 mısır (ACS-ZMQQ4-3) .....	45
2.9 Halkın Katılımı ve Eğitimi.....	48

3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	50
3.1 Örnekleme.....	50
3.2 Sertifikalı Referans Materyaller (SRM' ler) .....	53
3.3 İşlenmiş ve İşlenmemiş Ürünlerden DNA Ekstraksiyonu.....	54
3.3.1 CTAB yöntemi.....	54
3.3.2 Roche-High Pure DNA Isolation Kit ile DNA izolasyonu.....	55
3.3.3 Sure Food – Prep Plant X DNA Isolation Kit ile DNA izolasyonu.....	56
3.4 DNA Konsantrasyonunun Saptanması.....	57
3.5 Agaroz Jel Elektroforezi.....	58
3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	58
3.6.1 Konvensiyonel PCR' da saptama ve tanımlama testleri.....	59
3.6.1.1 Konvensiyonel PCR' da saptama testleri.....	59
3.6.1.1.1 Bitki spesifik PCR.....	59
3.6.1.1.2 Genetik modifiye mısırın saptanması.....	61
3.6.1.2 Konvensiyonel PCR' da tanımlama testleri.....	64
3.6.1.2.1 CBH351 mısır tespiti.....	64
3.6.1.2.2 Mon810 mısır tespiti.....	65
3.6.1.2.3 Bt11 mısır tespiti.....	66
3.6.1.2.4 T25 mısır tespiti.....	68
3.6.1.2.5 Bt176 mısır tespiti.....	69
3.6.2 Real-Time PCR' da tarama ve miktar tayini.....	70
3.6.2.1 Real-Time PCR' da tarama.....	70
3.6.2.2 Real-Time PCR' da miktar tayini.....	72
3.6.2.2.1 Real-time PCR yöntemi ile Bt176 miktar tayini.....	72
3.6.2.2.1.1 Bt 176 Relatif miktar tayini.....	72
3.6.2.2.1.2 Bt 176 Absolute miktar tayini.....	74
3.6.2.2.2 Real-time PCR yöntemi ile Bt11 miktar tayini.....	76
3.6.2.2.3 Real-time PCR yöntemi ile Mon810 miktar tayini.....	78
3.6.2.2.4 Real-time PCR yöntemi ile T25 miktar tayini.....	81
3.7 İstatistiksel Değerlendirme.....	83
3.7.1 Eş yapma t testi .....	83
3.7.2 Kappa istatistiği .....	83
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	84
4.1 DNA İzolasyonu.....	84
4.2 DNA konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Teorik Saptama Limiti.....	84
4.3 Bitki Spesifik PCR.....	85
4.4 Konvansiyonel PCR Yöntemi ile 35S Promotör, NOS Terminatör Varlığının Araştırılması.....	93
4.4.1 Konvansiyonel PCR yöntemi ile 35S promotör varlığının araştırılması.....	93
4.4.2 Konvansiyonel PCR yöntemi ile NOS terminatör varlığının araştırılması..	101
4.5 Real-Time PCR Yöntemi ile 35 S Promotör, NOS Terminatör ve Bitki Geni Varlığının Araştırılması.....	108
4.6 Tanımlama Testleri.....	116
4.6.1 Bt176 mısır tespiti.....	116
4.6.2 Bt11 mısır tespiti.....	119
4.6.3 Mon810 mısır tespiti.....	122
4.6.4 T25 mısır tespiti.....	126
4.6.5 CBH351 mısır tespiti.....	128

4.7 Miktar Analizleri.....	132
4.7.1 Real-time PCR yöntemi ile Bt176 miktar tayini.....	132
4.7.1.1 Bt 176 Quantification Kit (Roche) ile relatif kuantifikasyon.....	133
4.7.1.2 Sure Food Bt 176 Quntification Kit (R-Biofarm) ile absolute kuantifikasyon.....	137
4.7.2 Real-time PCR yöntemi ile MON810 miktar tayini.....	141
4.7.3 Real-time PCR yöntemi ile Bt 11 miktar tayini.....	146
4.7.4 Real-time PCR yöntemi ile T25 miktar tayini.....	149
4.8 Genel Değerlendirmeler.....	152
4.9 İstatiksel Analiz Sonuçları.....	162
4.9.1 Eş yapma t testi.....	162
4.9.2 Kappa istatistiği.....	165
4.9.2.1 35S promotör-NOS terminatör bölgeleri için real-time PCR ve konvansiyonel PCR sonuçlarının karşılaştırılması.....	165
4.9.2.2 Bt 176, Bt11, Mon810 ve T25 genetik modifiye mısırların kalitatif ve kantitatif sonuçlarının karşılaştırılması.....	167
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	171
KAYNAKLAR.....	181
EKLER.....	188
EK-1 KİMYASALLAR VE KAYNAKLARI.....	189
EK-2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER.....	190
EK-3 ENZİMLER, MARKÖRLER VE AYRAÇLAR.....	192
EK-4 TÜRKİYE'NİN MISIR VE SOYA İTHALATI VE DEĞERİ.....	193
EK-5 TÜRKİYE ULUSAL BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK STRATEJİSİ EYLEM PLANI .....	194
EK-6 AMERİKADA YETİŞTİRİLEN GM MISIRLARIN YÜZDE ORANLARI.....	195
EK-7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ .....	197
EK-8 İŞLENMİŞ MISIR ÜRETİMİ AKIM ŞEMASI.....	203
EK-9 BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERİN 1996-2006 YILLARI ARASINDAKİ EKİM ALANLARI (MİLYON HEKTAR).....	205
EK-10 TKB GMO' LAR İLE İLGİLİ GENELGELER VE GENELGELERE AİT TAAHHÜTNAMELER.....	206
EK-11 BAZI ÖRNEKLERDE DNA MİKTAR SONUÇLARI.....	209
EK-12 BAZI ÖRNEKLERDE 35S VE NOS ANALİZ SONUÇLARI.....	210
EK-13 BAZI ÖRNEKLERDE BT176 MISIR (RELATİF) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI.....	212
EK-14 BAZI ÖRNEKLERDE BT 176 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI.....	215
EK-15 BAZI ÖRNEKLERDE BT11 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI.....	218
EK-16 BAZI ÖRNEKLERDE MON810 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI.....	219
EK-17 BAZI ÖRNEKLERDE T25 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI.....	220
EK-18 ÜLKEMİZDEKİ TRANSGENİK BİTKİLERİN ALAN DENEMELERİ.....	221
ÖZGEÇMİŞ.....	222

## SİMGELER DİZİNİ

bç	baz çifti
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
EDTA	Etilendiamine tetra acetic acid
µL	Mikrolitre
Rpm	Revolutions per minute
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
Uv	Ultra vialote
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
Cp	Crossing point
CRM	Sertifikalı referans materyal
Ct	Cycle treshold
DNA	Deoksi ribonükleik asit
EC	European Council
ECB	European Corn Borer
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPSPS	5-Enolpiruvilşikimat-3 fosfatsintaz
GM	Genetik Modifiye
GMO	Genetik Modifiye Organizma
GOX	Glifosat oksidaz
IRMM	Institute for Refence Materials and Mesurements
LOD	Limit of detection (saptama limiti)
LOQ	Limit of quantification (ölçüm limiti)
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
NOS	Nopalin Sintaz
nptII	neomisin fosfotransferaz
OD	Optik Dansite
PAT	fosfinotrisin asetiltransferaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TKB	Tarım ve Köyişleri Bakanlığı



TUBİTAK  
UBÇ

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu  
Ulusal Biyogüvenlik Çerçeve Programı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyoteknolojik ürünlerin 1996-2006 yılları arasındaki ürün bazında ekim alanlarındaki artış (milyon hektar) .....	3
Şekil 2.2 Biyoteknolojik ürünlerin 1996-2006 yılları arasındaki genetik modifikasyon çeşidine göre ekim alanlarındaki artış (milyon hektar).....	4
Şekil 2.3 Biyoteknolojik ürün üreten ülkeler ve üretim alanları .....	5
Şekil 2.4 Biyoteknolojik ürünlerin gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere göre dağılımı.....	5
Şekil 2.5 Etiketlemenin gerekmediği soya-mısır karışımı.....	23
Şekil 2.6 Etiketlemenin gerektiği soya-mısır karışımı.....	23
Şekil 2.7 GM ürünlerde kullanılan promotör bölgeler.....	24
Şekil 2.8 GM ürünlerde kullanılan terminatör bölgeler.....	25
Şekil 2.9 Transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- pCIB4431 yapısı (bir pUC-derivatı plazmid) US-Patent-N <sup>o</sup> :6,121,014.....	37
Şekil 2.10 Transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- (pZO1502) US-Patent-N <sup>o</sup> : 6,114,608 .....	40
Şekil 2.11 Transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- PV-ZMBK07 US-Patent- US-Patent-N <sup>o</sup> : 5,689,052.....	42
Şekil 2.12 T25 mısırdaki transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- P35S/Ac .....	44
Şekil 2.13 CBH-351 mısırın transformasyonu için kullanılan DNA yapısının linear haritası- pRVA9909 yapısı.....	47
Şekil 4.1 Zein geni spesifiklik çalışması.....	85
Şekil 4.2 Mısır unu örneklerinde zein geni saptanması.....	87
Şekil 4.3 Mısır nişastası örneklerinde zein geni saptanması.....	89
Şekil 4.4 Mısır cipsi örneklerinde zein geni saptanması.....	91
Şekil 4.5 Mısır gevreği örneklerinde zein geni saptanması.....	92
Şekil 4.6 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) 35S promotör bölgesinin saptanması.....	94
Şekil 4.7 Sertifikalı referans materyallerde (RR Soya) 35S promotör bölgesinin saptanması.....	95
Şekil 4.8 35S-3 ve 35S-6 primer çifti ile mısır yemlerinde PCR amplifikasyonu.....	96
Şekil 4.9 35S-3 ve 35S-6 primer çifti ile mısır unlarında PCR amplifikasyonu.....	97
Şekil 4.10 35S-3 ve 35S-6 primer çifti ile mısır nişastalarında PCR amplifikasyonu...98	
Şekil 4.11 35S-3 ve 35S-6 primer çifti ile mısır cipslerinde PCR amplifikasyonu.....	99
Şekil 4.12 35S-3 ve 35S-6 primer çifti ile mısır gevreklerinde PCR amplifikasyonu.....	100
Şekil 4.13 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) NOS terminatör bölgesinin saptanması.....	102
Şekil 4.14 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır yemlerinde PCR amplifikasyonu.....	103
Şekil 4.15 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır unlarında PCR amplifikasyonu.....	104
Şekil 4.16 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır cipslerinde PCR amplifikasyonu.....	105

Şekil 4.17 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır nişastalarında PCR amplifikasyonu.....	106
Şekil 4.18 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır gevreklerinde PCR amplifikasyonu.....	107
Şekil 4.19 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu.....	117
Şekil 4.20 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu.....	118
Şekil 4.21 GM pozitif mısır unlarında Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu.....	120
Şekil 4.22 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu.....	121
Şekil 4.23 GM pozitif mısır unlarında Mon810 multipleks PCR amplifikasyon.....	123
Şekil 4.24 GM pozitif mısır unlarında Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu.....	124
Şekil 4.25 GM pozitif mısır unlarında T25 multipleks PCR amplifikasyonu.....	127
Şekil 4.26 GM pozitif mısır ürünlerinde T25 multipleks PCR amplifikasyo.....	127
Şekil 4.27 GM pozitif mısır unlarında CBH-351 multipleks PCR amplifikasyonu.....	129
Şekil 4.28 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH-351 multipleks PCR amplifikasyon....	130
Şekil 4.29 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH-351 multipleks PCR amplifikasyonu...131	
Şekil 4.30 % 0.1 ve % 1' lik CRM' lere ait Bt176 sonuçları.....	133

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Avrupa Birliği tarafından 18 Nisan 2004' te kabul edilmiş yeni Etiketlem kuralı ile ilgili örnekler.....	22
Çizelge 2.2 Ticari bazı GM mısır çeşitleri.....	34
Çizelge 2.3 Bt 176' nın sekans özellikleri.....	37
Çizelge 2.4 Bt176 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti.....	37
Çizelge 2.5 Bt 11' in sekans özellikleri.....	40
Çizelge 2.6 Bt11 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti.....	41
Çizelge 2.7 Mon810' nun sekans özellikleri.....	42
Çizelge 2.8 Mon810 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti.....	43
Çizelge 2.9 T25' in sekans özellikleri .....	45
Çizelge 2.10 T25 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti.....	45
Çizelge 2.11 CBH-351 mısır sekans özellikleri .....	47
Çizelge 2.12 CBH-351 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti.....	48
Çizelge 3.1 İşlenmiş ve işlenmemiş mısır örnekleri.....	51
Çizelge 3.2 Bt176 mısır, Bt 11 mısır ve MON 810 mısır' ların SRM' leri.....	53
Çizelge 3.3 Zein Geni saptanmasında kullanılan PCR miksi .....	60
Çizelge 3.4 Zein geni saptanmasında kullanılan PCR programı.....	60
Çizelge 3.5 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin tespitinde kullanılan PCR miksi.....	62
Çizelge 3.6 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin saptanmasında Kullanılan PCR programı.....	62
Çizelge 3.7 Zein Geni, 35S promotör ve NOS terminatör bölgesi tespitlerinde kullanılan primerler.....	63
Çizelge 3.8 CBH-351 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi.....	64
Çizelge 3.9 CBH-351 mısır tespitinde kullanılan PCR programı.....	65
Çizelge 3.10 Mon 810 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi .....	66
Çizelge 3.11 Mon 810 mısır tespitinde kullanılan PCR programı.....	66
Çizelge 3.12 Bt11 mısırtespitinde kullanılan multipleks PCR miksi.....	67
Çizelge 3.13 Bt11 mısır tespitinde kullanılan PCR programı.....	67
Çizelge 3.14 T25 mısırtespitinde kullanılan multipleks PCR miksi.....	68
Çizelge 3.15 T25 mısır tespitinde kullanılan PCR programı.....	68
Çizelge 3.16 Bt176 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi.....	69
Çizelge 3.17 Bt176 mısır tespitinde kullanılan PCR programı.....	70
Çizelge 3.18 35S promotör, NOS terminatör ve bitki geni varlığının araştırılmasında real time PCR yönteminde kullanılan PCR programı... ..	71
Çizelge 3.19 Bt176 relatif miktar tayininde kullanılan PCR programı.. ..	73
Çizelge 3.20 Bt176 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri.....	74
Çizelge 3.21 Bt176 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı.....	75
Çizelge 3.22 Bt11 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri.....	77
Çizelge 3.23 Bt11 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı.....	78
Çizelge 3.24 Mon810 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri.....	79
Çizelge 3.25 Mon810 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı.....	80
Çizelge 3.26 T25 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri.....	81
Çizelge 3.27 T25 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı.....	82
Çizelge 3.28 Kappa skalası.....	83
Çizelge 4.1. Zein geni spesifiklik çalışması sonuçları.....	86

Çizelge 4.2 GM pozitif mısır ürünlerinde zein PCR amplifikasyonu.....	88
Çizelge 4.3 GM pozitif mısır nişastası örneklerinde zein PCR amplifikasyonu.....	90
Çizelge 4.4 GM pozitif mısır cipsi örneklerinde zein PCR amplifikasyonu).....	91
Çizelge 4.5 GM pozitif mısır cipsi örneklerinde zein PCR amplifikasyonu.....	92
Çizelge 4.6 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) 35S promotör bölgesinin saptanması.....	94
Çizelge 4.7 Sertifikalı referans materyallerde (RRSoya) 35S promotör bölgesinin saptanması.....	95
Çizelge 4.8 Mısır yemlerinde CaMV35S promotör saptanması.....	96
Çizelge 4.9 Mısır unlarında CaMV35S promotör saptanması.....	97
Çizelge 4.10 Mısır nişastalarında CaMV35S promotör saptanması.....	98
Çizelge 4.11 Mısır cipslerinde CaMV35S promotör saptanması.....	99
Çizelge 4.12 Mısır gevreklerinde CaMV35S promotör saptanması.....	100
Çizelge 4.13 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) NOS terminatör bölgesinin Saptanması.....	102
Çizelge 4.14 Mısır yemlerinde NOS terminatör saptanması.....	103
Çizelge 4.15 Mısır unlarında NOS terminatör saptanması.....	104
Çizelge 4.16 Mısır cipslerinde NOS terminatör saptanması .....	105
Çizelge 4.17 Mısır nişastalarında NOS terminatör saptanması .....	106
Çizelge 4.18 Mısır gevreklerinde NOS terminatör saptanması .....	107
Çizelge 4.19 35S/NOS açısından analiz edilen mısır unu numuneleri ve sonuçları.....	109
Çizelge 4.20 35S/NOS açısından analiz edilen mısır yemi numuneleri ve sonuçları. ....	111
Çizelge 4.21 35S/NOS açısından analiz edilen mısır nişastası numuneleri ve sonuçları.....	112
Çizelge 4.22 35S/NOS açısından analiz edilen mısır cipsi numuneleri ve sonuçları.....	114
Çizelge 4.23 35S/NOS açısından analiz edilen mısır gevreği numuneleri ve sonuçları.....	115
Çizelge 4.24 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu.....	117
Çizelge 4.25 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu.....	118
Çizelge 4.26 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu.....	120
Çizelge 4.27 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu.....	121
Çizelge 4.28 GM pozitif mısır ürünlerinde Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu.....	123
Çizelge 4.29 GM pozitif mısır ürünlerinde Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu.....	125

Çizelge 4.30 GM pozitif mısır ürünlerinde T25 multipleks PCR amplifikasyonu.....	127
Çizelge 4.31 GM pozitif mısır ürünlerinde T25 multipleks PCR amplifikasyonu.....	128
Çizelge 4.32 GM pozitif mısır unlarında CBH-351 multipleks PCR amplifikasyonu.....	130
Çizelge 4.33 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH-351 multipleks PCR amplifikasyonu.....	131
Çizelge 4.34 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH-351 multipleks PCR amplifikasyonu.....	131
Çizelge 4.35 Bt176 açısından relatif miktar tayini yapılan numuneler ve sonuçları.....	134
Çizelge 4.36 Bt176 açısından absolute miktar tayini yapılan numuneler ve sonuçları.....	138
Çizelge 4.37 Bt176 açısından absolute miktar tayini yapılan numuneler ve sonuçları.....	142
Çizelge 4.38 Bt11 açısından absolute miktar tayini yapılan numuneler ve sonuçları.....	147
Çizelge 4.39 T25 açısından absolute miktar tayini yapılan numuneler ve sonuçları.....	150
Çizelge 4.40 Mısır ürünlerinde Bt176 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi.....	157
Çizelge 4.41 Mısır ürünlerinde Bt11 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi.....	158
Çizelge 4.42 Mısır ürünlerinde Mon810 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi.....	159
Çizelge 4.43 Mısır ürünlerinde T25 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi.....	160
Çizelge 4.44 Mısır ürünlerinde CBH351 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi .....	161
Çizelge 4.45 Mısır örneklerinde Bt176 relatif ve absolute miktar tayini yönünden tanıtıcı istatistikler.....	162
Çizelge 4.46 Mısır örneklerinde Bt176 relatif ve absolute miktar tayinine ait eş yapma t testi değerleri.....	163
Çizelge 4.47 Mısır örneklerinde kappa istatistiğine göre real-time PCR ile konvensiyonel PCR’da 35S promotör ve NOS terminatör sonucu karşılaştırılması.....	165
Çizelge 4.48 Mısır unu ve yeminde real-time PCR ile konvensiyonel PCR’da 35S promotör-NOS terminatör için Kappa istatistik sonuçları.....	166
Çizelge 4.49 GM pozitif mısır örneklerinde Kappa istatistiğine göre Bt11, Bt176 ve Mon810 kalitatif-kantitatif karşılaştırmaları.....	168
Çizelge 4.50 GM pozitif mısır örneklerinde Bt11, Bt176 ve Mon810 kalitatif-kantitatif Kappa istatistik sonuçları.....	169
Çizelge 4.51 İstatistiksel açıdan değerlendirmelerin özeti.....	170

## 1.GİRİŞ

Genetik mühendisliği yöntemleriyle bünyelerine yabancı genler dahil edilerek “genetik yapıları” değişikliğe uğratılan, bu yabancı genleri genomlarına sabit olarak entegre eden ve bu özellikleri gösteren bitki, hayvan ve mikroorganizmalar, genetik yapısı değiştirilmiş organizma (GDO) olarak adlandırılmaktadır (Demir vd. 2006). Rekombinant organizmalar farklı şekillerde isimlendirilebilmektedir. Bunlar; GMO (Genetically modified organism, Genetik olarak modifiye organizma), GDO (Genetik olarak değiştirilmiş organizma), Transgenik/Biotek/Rekombinant Organizma, LMO (Living Modified Organism)’ dur (Gözükırmızı 2002, Tozzini *et al.* 2000, Lipp *et al.* 2005, Eser ve Kılınçarslan 2005a).

İlk transgenik bitkiler insan ve hayvan beslenmesi amacı ile üretilmiş olup, agronomik özellikleri geliştirilmiş bitkilerdir. Birinci nesil olarak adlandırılan bu bitkiler (Haver *et al.* 2003), pestisitlere (Tuzun *et al.* 1996) ve/veya yabancı ot kontrolü için bazı herbisitlere dayanıklı olması için üretilmiştir (Stewart and Sorensen 1997, Haver *et al.* 2003). Ticari olarak yaygın bir biçimde üretilen birinci nesil bitkilerin aksine, bazı besinsel elementleri artırılmış veya değiştirilmiş ve ikincil/yeni nesil olarak adlandırılan bitkiler üzerinde, henüz yaygın olarak üretimleri yapılmamakla birlikte, yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Haver *et al.* 2003).

Genetik mühendisliğinde son yıllarda yaşanan gelişmeler, özellikle gıda güvenliği, ekolojik dengenin korunması, sosyo-ekonomik riskler ve etik konular ile ilgili pek çok soruyu da beraberinde getirmiştir. Çünkü bazı bilim çevreleri, tarımda geniş üretim ve kullanım alanı bulan genetik modifiye organizmalardan elde edilen kazanımların ve kullanımından kaynaklanacak muhtemel risklerinin iyi araştırılmadığı ve kontrol edilmediğini savunmaktadır. Bunun yanı sıra, modern biyoteknoloji tekniklerinin uygulamalarının ve modern biyoteknoloji ürünlerinin muhtemel olumsuz etkileri için alınan önlemler “biyogüvenlik” kavramı içinde değerlendirilmektedir. Biyogüvenliğin en önemli unsurlarından bir tanesi olan “izleme (monitoring)”, genetik modifiye organizmaların hareketini izlemek, onların taşıdığı transgenler ve beklenmeyen sonuçlara karşı hazır olmak için kullanılmaktadır. Ürünlerdeki izlemeyi sağlayabilmek

için ise GMO (Genetik Modifiye Organizma)' ların kalitatif ölçümünün yanında üründeki miktarını ölçmek gerekmektedir. Ayrıca, halkın ne yediğini bilmeye hakkı vardır. Bunu sağlamada etiketleme büyük önem arz eden konulardan biridir. Avrupa Birliği direktiflerine göre, bir ürünün etiketlenebilmesi için yine kantitatif ölçümlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bir ürünün GM (Genetik Modifiye) olup olmadığının saptanmasında kullanılan yöntemler proteine dayalı yöntemler ve DNA' ya dayalı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ancak; özellikle kantitatif belirlemelerde, DNA' ya dayalı yöntemlerin kullanımı daha hassas, hızlı ve güvenilir olduğundan, proteine dayalı yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir.

Türkiye'ye, 2003 yılı itibariyle, 1,8 milyon tonluk toplam mısır ithalatının % 81'i, en büyük GM mısır ve soya üretici ülkelerden olan ABD ve Arjantin'den yapılmıştır. Buna rağmen, dış ticaretle ilgili veriler arasında, ülkemize transgenik tarım ürünlerinin alındığı yönünde bir veri bulunmamaktadır (Haspolat 2004). Bu durum, Türkiye piyasasında satılan, özellikle ithal mısır ve soya ürünlerinde genetik modifikasyon bulunduğu şüphesini artırmaktadır. Çünkü, ürün bazında, TKB (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı)' nın KKGGM (Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü) bünyesinde yürüttüğü izleme programı için yayınlanan genelge dışında yasal bir düzenleme bulunmamaktadır.

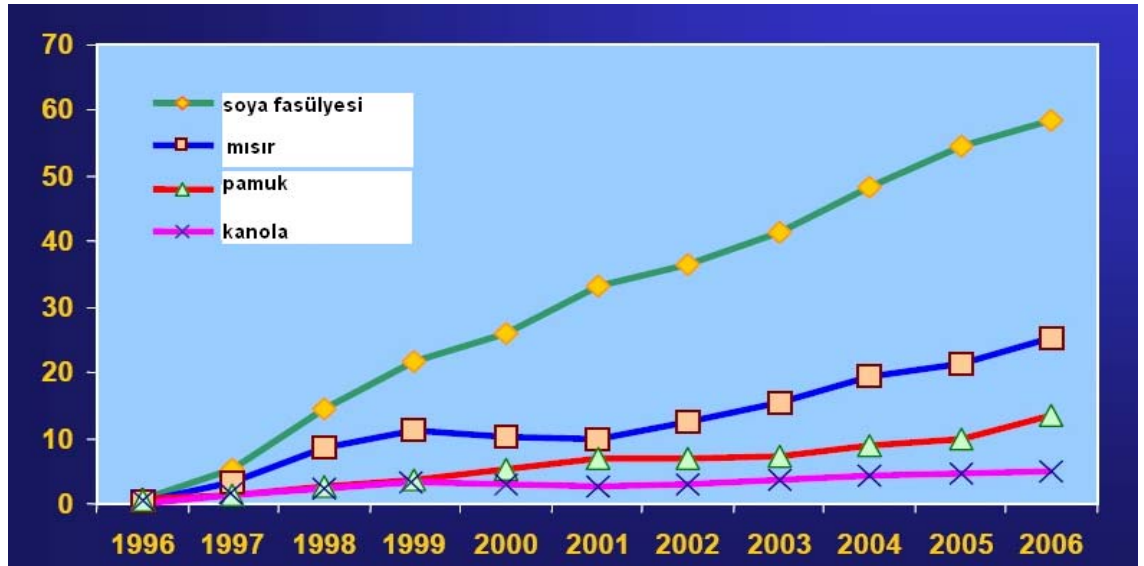
Türkiye piyasasında bulunan mısır ürünlerinde genetik modifikasyonun var olup olmadığının saptanmasını amaçlayan bu çalışmada, Nisan 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında, piyasadadan toplanan işlenmiş mısır ürünleri ile işlenmemiş yemlik tane mısır ürünleri olmak üzere toplam 83 mısır örneğinde genetik modifikasyon durumu araştırılarak, ülkede kontrolsüz bir genetik modifiye mısır girişinin olup olmadığı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Genetik modifikasyonu saptama işlemi DNA' ya dayalı yöntemler ile yapılmış, tüm örneklerde, 35S promotör ve NOS terminatör taranması önce konvensiyonel PCR (Polymerase Chain Reaction) ile yapılp, sonra real-time PCR ile doğrulanmıştır. Daha sonra ise, bazı genetik modifiye mısır çeşitlerinin aranmasına yönelik tanımlama ve miktar analizleri yapılmış; ayrıca yöntemler arasındaki benzerlikler istatistik açıdan analiz edilmiştir.



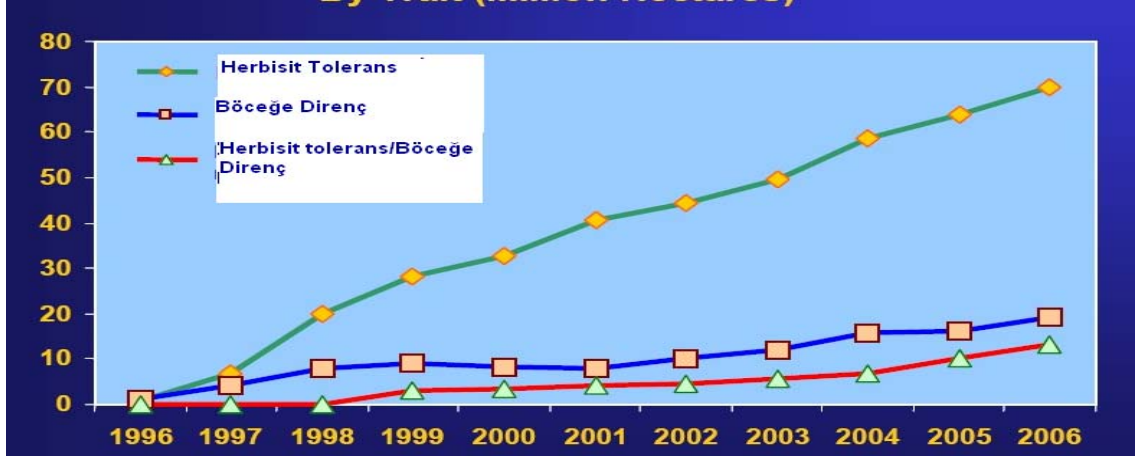
## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Dünya' da GMO ların Sosyo-Ekonomik Açından Değerlendirilmesi

Transgenik ürünlerin pazarlama imkanlarının ortaya çıkması ile bu konuda bir pazar ve buna bağlı olarak bir sektör oluşmaya başlamıştır. İlk transgenik bitkiler 1985 yılında tarla denemelerine alınmış olmasına rağmen (Haspolat 2004), üretimlerine, kayda değer olarak, 1996 yılında başlanmıştır (Martineau 1996, Haspolat 2004). EK 9'a göre, genetik modifiye ürünlerin ekim alanı 1996-2006 yılları arasında 60 kat artarak hiçbir yeni tarımsal ürün teknolojisinde görülmemiş bir değere ulaşmıştır. Yine 2005 ve 2006 yılları arasındaki artış 12 milyon hektarla % 13 olarak belirtilmiştir (James 2006). Genetik modifiye ürünlerin 1996-2006 yılları arasında, ekim alanlarındaki değişimler Şekil 2.1'de ürün bazında, Şekil 2.2'de ise genetik modifikasyon çeşidine göre verilmiştir.



Şekil 2.1 Biyoteknolojik ürünlerin 1996-2006 yılları arasındaki ürün bazında ekim alanlarındaki artış (milyon hektar) (James 2006)

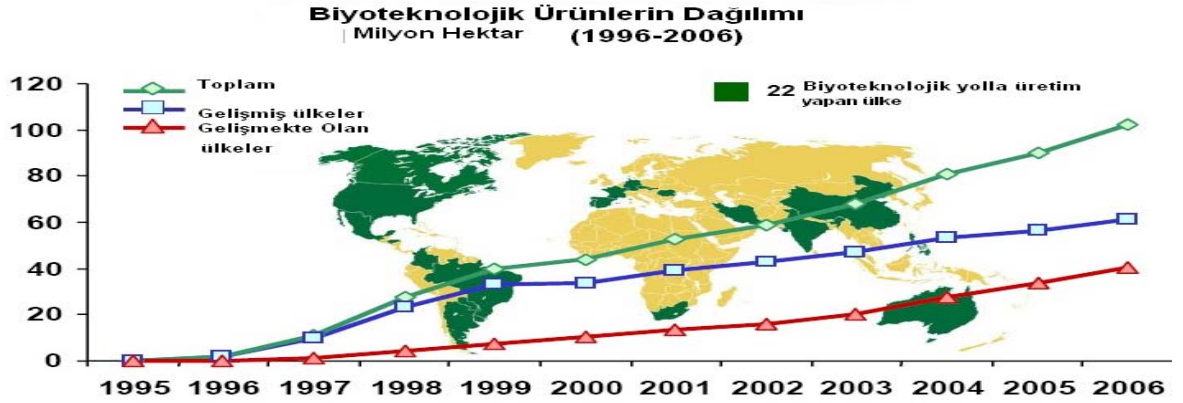


Şekil 2.2 Biyoteknolojik ürünlerin, 1996-2006 yılları arasında, genetik modifikasyon çeşidine göre ekim alanlarındaki artış (milyon hektar) (James 2006)

ISAAA tarafından 2006 yılında yayınlanan rapora (James 2006) göre; 22 ülke ticari olarak biyoteknolojik ürünleri yetiştirirken, ek olarak 29, toplamda 51 ülke 1996 yılından beri çevreye salım ile gıda ve yem olarak ithal etmek için düzenleyici kurullara başvurmuştur. Toplam 539 başvuru, 21 farklı ürüne ait 107 modifikasyon çeşidi ile ilgilidir (James 2006). Biyoteknolojik ürünler, bu tür bitkileri yetiştirmeyen ve en büyük gıda ithalatçılarından olan Japonya gibi ülkelerin de aralarında bulunduğu 29 ülkede çevreye salım, gıda ve yem üretiminde kullanılmak üzere kabul edilmiştir. Biyoteknolojik ürünler için onay veren ülkelerin başında ABD gelmektedir. Bu ülkeyi Japonya, Kanada, Güney Kore, Avustralya, Filipinler, Meksika, Yeni Zelanda, AB ülkeleri ve Çin izlemektedir. Şekil 2.3'de, biyoteknolojik ürün üreten ülkelerin ekim alanları hakkında bilgi verilmektedir. Genetik modifikasyon çeşidi açısından en çok onaylanan ürün 35 çeşit ile mısırdır. Mısırı 19 çeşit ile pamuk, 14 çeşit ile kanola ve 7 çeşit ile soya fasulyesi izlemektedir. Herbisite toleranslı G-S-40-3-2 soya fasulyesi ise, 21 kabulle, başvuru yaptığı ülkelerde en çok kabul gören üründür. Genetik modifiye soya fasulyesini, her biri 18 kabul olmak üzere, böcek dirençli olan Mon810 mısır ve herbisit toleranslı NK603 mısır izlemektedir (James 2006). Şekil 2.4'de, biyoteknolojik ürünlerin gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere göre dağılımı verilmiştir (James 2006).



Şekil 2.3 Biyoteknolojik ürün üreten ülkeler ve üretim alanları (James 2006)



Şekil 2.4 Biyoteknolojik ürünlerin gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere göre dağılımı (James 2006)

## 2.2 Transgenik Ürünlerin Global Değeri

2003 yılında transgenik ürünlerin toplam değerinin 4.5-4.75 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bu 31 milyar dolar olan toplam ürün piyasasının % 15'ini ve 30 milyar dolarlık tohumluk piyasasının % 13'ünü oluşturmaktadır. Transgenik ürünlerin toplam

piyasa değeri içine, tohumluk satış fiyatı ve uygulanan teknoloji ücreti dahildir. 2005 yılında transgenik ürünlerin toplam değerinin 5 milyar dolar olacağı tahmin edilmektedir (Haspolat 2004).

### **2.3 GMO' ların Kullanım Amaçları**

**GMO' ların tarım alanında kullanımları:** Ürünlerdeki alerjik proteinlerin azaltılması, aromanın artırılması, nişasta ve şeker içeriğinin değiştirilmesi, tohumuz meyve ve sebzelerin üretilmesi, kafeinsiz kahve çekirdeklerinin üretilmesi gibi amaçlarla da üretilen tarımsal amaçlı GMO' lar en çok hastalık ve zararlılara dayanıklılığın artırılması, yabancı ot ilacına karşı dayanıklılık amacıyla kullanılmaktadır (Özgen vd. 1997, Uzogora 2000, Anonim 2002, Anonymous 2003a, Özcan ve Sancak 2005). Domatesler ise, raf ömrünün uzatılması amacıyla piyasaya ilk olarak sürülmüş ürün olması açısından önemlidir (Martineau 1996).

**GMO' ların tıp alanında kullanımları:** Tıbbi yapıştırıcılar, büyüme hormonu, insan kullanımı için ilk lisanslı ilaç olan insülin üretimi ve kan proteinleri ile ilgili çalışmaların yanı sıra, tıp alanında en büyük ilgiyi yenilebilir aşı ve ilaç üretimi çekmektedir (Goldstein 1997, Watson et al. 1998).

**GMO' ların hayvancılık alanında kullanımları:** Hayvancılıkta modern biyoteknolojinin uygulama alanları genel olarak üç kısımda incelenebilir:

- 1 Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar
- 2 Hayvan sağlığı ürünleri (aşılar, ilaçlar vs.)
- 3 Hayvan besinleri (yem, yem katkı maddeleri vs.)

Embriyolara gen transferi yolu ile transgenik hayvanlar üretilmekte, böylece hayvanların değişik tür, nicelik ve nitelikteki birim başına verimini (et, süt, yumurta, yapağı, döl vs.) artırmak, bunlarda bazı değişiklikler (yağsız et, laktosuz süz veya kolestrolsüz süt ve yumurta vs.) yapmak, hayvanların yemden yararlanma kabiliyetini artırmak, çabuk büyüme ve gelişmelerini sağlamak, hastalıklara (bakteriyel, viral,

parazitler vs) karşı dirençli ırklar yetiştirmek, yeni genotipte hayvan oluşturmak vs. amaçlanmaktadır. Bazı biyoteknologlar, bunların yanı sıra insan ve hayvanlar için çok önemli olan bazı protein ve farmosatik maddelerin sentezlerini kodlayan genleri embriyolara transfer ederek, sütlerinde ve/veya kanlarında bu maddeleri salgılayan “Canlı Biyoreaktör Hayvanlar (GM hayvanlar)” elde etmeyi düşünmekte ve böylece hayvanların modelliğinden yararlanmayı amaçlamaktadırlar (Arda ve Yardımcı 2005).

## **2.4 Modern Biyoteknolojinin Riskleri**

Genetik mühendisliği sadece gıda güvenliğini, alerji, toksisite, karsinojenik etkiyi ve gıdaların değişen etkilerini değil, çevreye etkileri konusunu da kapsamaktadır (Uzogora 2000). Daha önce bahsedilen gen transfer tekniklerinin insanların diğer çalışmalarında yaptığı bazı yanlışlıkların, güvenli olmayan gen transfer tekniklerinde de yaşanabileceğinden endişe duyulmaktadır (Salyers 1997, Nielsen 1997, Nielsen *et al.* 1998). Eğer; yeni genetik materyal başarılı şekilde hedef hücreye transfer edilmezse, hedef organizmanın DNA’ sında yanlış bir noktaya transfer edilirse veya yeni gen yanlışlıkla yakınındaki başka bir geni aktive ederken bir diğerini inaktive ederse veya baskılarsa, beklenmeyen mutasyonlara sebep olarak, farklı bir genin fonksiyonunu değiştirebileceği düşünülmektedir. Böylece kullanılmayacak, verimsiz veya toksik bitki oluşumuna sebep olabileceği düşünülmektedir (Uzogora 2000).

Riskler hem GMO’ ların kullanımından hem de genetik aktarımdan kaynaklanabilmektedir (Myhr and Traavik 2002). Genetik yapısı değiştirilmiş organizma kullanımı ile meydana gelebilecek riskleri, insan ve hayvan sağlığı, çevre, sosyo-ekonomik yapı şeklinde 3 ana başlık altında toplamak mümkündür (Anonim 2002).

#### **2.4.1 İnsan ve hayvan sağlığı üzerindeki riskler**

GMO' lar, insan ve hayvan sağlığı üzerinde üç önemli risk taşımaktadır;

1. İnsan ve hayvanda alerjik ve toksik etkisi olan genlerin aktarılması,
2. Gıdanın kalitesi ve besin öğelerini azaltıcı maddelerin gıdaya geçiş tehlikesi,
3. GM gıdalarda potansiyel alerji riski (Uzogora 2000, Bardocz *et al.* 2005).

#### **2.4.2 GMO' ların çevreye etkisi**

Transgenik ürünlerin geniş bir şekilde yetiştirilmesinin bazı çevresel risklere yol açabileceği düşünülmektedir. Bu çevresel riskler şunlardır:

1. Bitki sosyolojisinde bozulmalar (Uzogara 2000. Kuvshinov *et al.* 2001)
2. Doğal türlerde genetik çeşitliliğin kaybı ve horizontal gen transferi (Nielsen and Townsend 2005, Bertolle and Simonet 1997, Heinemann 1997, Salyers 1997, Nielsen 1997, Nielsen *et al.* 1998)
3. Ekosistemde tür dağılımının ve dengenin bozularak genetik kaynakları oluşturan yabani türlerin doğal evrimlerinde sapmalar
4. Gen kaçışı ile yabani türlerin de aynı özelliğe sahip olması (Andow and Hilbeck 2004, Smalla and Vogel 2007)
5. Yabani ot ilaçlarına dayanıklı bitkiler bir sonraki yıl diğer bir ürün için yabani ot durumuna düşeceğinden, mücadelelerinin güç olma ihtimali (Kuiper *et al.* 2000. Uzogara 2000. Kuvshinov *et al.* 2001, Anonim 2002, Göçmen 2002, Gözükırmızı 2002).

#### **2.4.3 Sosyo-ekonomik ve etik anlamda riskler**

GMO' lar, sosyo-ekonomik anlamda da bazı riskler taşımaktadır. Bu riskleri şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Pahalı tohum
2. Küçük çiftçilerin bu durumdan zarar görmesi
3. Bu teknolojiyi üreten gelişmiş ülkelerin dünya gıda ticaretini ellerinde tutmaları nedeniyle, gelişmekte olan ülkelerdeki gıda güvencesini olumsuz etkilemeleri

4. Organik ve diğ er sürdürülebilir tarım yöntemlerine zarar vermesi (Uzogara 2000, Okusu 2003, Zarilli 2004).

Tarımsal modern biyoteknoloji uygulamalarının, ekonomik anlamda, başlıca iki amacı oldu ğ u ö ne sürülmektedir. Bunlardan birincisi; gelişmiş ülkeler için daha yüksek kalitede, daha sağlıklı ve besleyici değ eri daha yüksek gıda üreterek, özellikle hastalıkların tedavisinde kullanılacak gıdaların üretimi ile ilaç ve tedavi masraflarını azaltmaktır. İkinci amaç ise; gelişmekte olan ülkeler için, ABD gibi stratejik üretici ülkelerden desteklenmemiş dünya fiyatları üzerinden gıda ithal eden Asya ülkelerinin büyüyen nüfusu için satın alabilecekleri temel gıdaların üretimini artırmaktır (Haspolat 2004). Ancak, biyoteknolojik ürünlerin maliyetleri göz önünde bulundurulduğ unda, açlık sorununa çözüm olması konusunda şüpheler mevcuttur. Ayrıca; biyoteknolojide oluşan rantın ABD ve Kanada'daki üretici firmalarda kalması ve biyoteknoloji alanında yaşam bilimi şirketi şeklinde faaliyet gösteren çok sayıda firmanın az gelişmiş ülkeleri sömürmesi ekonomik gelişme sorununa da çözüm getirmeyecektir. Bu durumda, sermayenin gelişmekte olan ülkede kaldığı ve biriktiğini söylemek mümkün görülmemektedir. Özellikle tohum piyasasını kontrol eden az sayıda firma (10'dan daha az), yüksek tohum maliyetleri ve ürün yetiştirme standardı ile gelişmekte olan ülkelerdeki ekonomik gelişmeyi olumsuz etkileyebilecek bir durum ortaya çıkarabilecektir (Haspolat 2004).

Etik açıdan riskler 3 başlık altında toplanabilir:

- 1.Etiketlenmemelerinin etik olmaması
- 2.Gen transferinde etik olmayan yaklaşımlar
- 3.Gıda yardımı kapsamında GMO ürünlerinin kullanılmasının etik olmaması (Uzogora 2000).

### 2.4.3.1 Türkiye' de sosyo ekonomik açıdan riskler

Türkiye açısından bakıldığında, GMO organizmaların tarımda kullanılması halinde, sosyo-ekonomik anlamda, dört risk alanı özellikle önem arz etmektedir. Bunlar; maliyet artışı, zararların tazmini, yerel çeşitlerin ve geleneksel ürünlerin kaybı, gıda güvenliği ve tarımda tekeldir (Eser ve Kılınçarslan 2005b).

**Maliyet artışı:** GMO' lardan kaynaklanabilecek risklerin belirlenmesi ve kontrol altında tutulması için laboratuvar ve saha araştırmaları yapılması ve risklerin kontrol altında tutulabilmesi için çeşitli tedbirler alınması gerekmektedir. Bu araştırma ve tedbirlerin bedeli tüketiciye kadar yansiyacaktır (Eser ve Kılınçarslan 2005b).

**Zararların tazmini:** GMO' ların kullanımı sırasında insan ve hayvan sağlığı veya biyolojik çeşitlilik üzerinde her hangi bir zarar ortaya çıkması halinde sorumlu tutulacak tarafın belirlenmesi ve zararın tazmin ettirilmesi her zaman mümkün olmayacaktır (Eser ve Kılınçarslan 2005b).

**Yerel çeşitlerin ve geleneksel ürünlerin kaybı:** GMO' ların piyasaya sürülmesi ve kullanılması, geleneksel ürünler ve üretim modelleri üzerinde de etkiler yapacaktır. Etiketleme, ürünün GMO olup olmadığının ispatlanması, üretim alanlarında izolasyon mesafeleri bırakılması gibi gereklilikler ve geleneksel üretim yapılan alanlarda zararlı böcek ve ot populasyonlarının kaçınılmaz olarak artması geleneksel üretimi olumsuz olarak etkileyecektir (Eser ve Kılınçarslan 2005b).

**Gıda güvenliği ve tarımda tekel:** Modern biyoteknoloji alanında, başta ABD olmak üzere gelişmiş ülkeler ve çok uluslu şirketler tekel durumundadır. Geliştirdikleri GMO' lara bağlı haklarını patentle korumakta ve yeniden üretilemeyecek nitelikte GMO' lar geliştirmektedirler. Toprak ve suda meydana gelecek değişiklikler nedeniyle, GMO üretilen alanlarda yeniden geleneksel üretime dönmek her zaman mümkün olmayacaktır. Yerli çeşitlerin de korunamaması durumunda, tarımsal üretimde daha



fazla dışa bağımlılık ve ürün çeşitliliğinin kaybedilmesi riskleri artmaktadır (Eser ve Kılınçarslan 2005b).

Türkiye ABD'nden mısır, soya ve pamuk dışalımını yapmaktadır. EK 4'de verilen değerlere göre, 1999 yılında ABD'nden 74 milyon dolarlık mısır ve 55 milyon dolarlık soya dışalımını yapılmıştır. Türkiye, 2003 yılı itibarıyla 1.818.458 ton mısır ithal etmiş olup, bu miktarın 1.113.684 tonu ABD'den, 356.754 tonu ise Arjantin'den ithal edilmiştir. Başka bir ifadeyle, 1,8 milyon tonluk toplam mısır ithalatının % 81'i ABD ve Arjantin'den yapılmıştır. Soya ithalatında da durum farklı değildir. 2003 yılında toplam 831.453 ton soya ithal edilmiş olup, bu miktarın 399.328 tonu ABD'den, 336.991 tonu ise Arjantin'den gelmiştir. 2003 yılı soya ithalat miktarının % 88'i ABD ve Arjantin'den yapılmıştır. Dış ticaretle ilgili veriler arasında, ülkemize transgenik tarım ürünlerinin alındığı yönünde bir veri bulunmamaktadır (Haspolat 2004).

Ülkemizin tarımsal dış ticareti açısından olaya bakıldığında, en büyük ihrac pazarı olan AB'nin transgenik ürünler konusunda en sıkı düzenlemelere sahip olduğu, Avrupalı tüketicilerin bu tür ürünleri tercih etmediği, dolayısıyla modern biyoteknolojinin tarım alanında kullanılmasının kısa ve orta vadede tarım ürünleri ihracatı üzerinde olumlu bir etkisi olmayacağı gibi, geleneksel ve organik ürünlerimize bulaşma olasılığı nedeniyle, bu tür ürünlerimizin ihracatını da sıkıntıya sokabilecek, hatta durmasına yol açabileceği görülmektedir. Bu durum, özellikle tarımsal ürün ihracatı içinde giderek önem kazanmaya başlayan organik tarım ürünleri ihracatı üzerinde daha büyük bir tehdit oluşturabilecektir (Haspolat 2004).

Tarımsal üretimde kullanılan herhangi bir çeşidin ülkemiz ekonomisine katkı sağlaması için, o çeşidin öncelikle ülkemiz ihtiyaçları göz önüne alınarak geliştirilmiş olması gerekir. Yine, başka bir yerde yetiştirilen çeşidin ülkemize uyum sağlayıp sağlamayacağı araştırmalar yapılarak bilimsel verilerle ortaya konulmalıdır. Ülkemiz için emsal teşkil etmemekle birlikte, İspanya' da yapılan bir çalışmayı örnek olarak vermek mümkündür. Böcek zararının çok yoğun olarak görüldüğü alanlarda böcek zararına dayanıklı mısır yetiştirildiğinde tohumu % 18 fazla ödeme, % 42 daha az

kimyasal ilaç kullanımı ve eşit verim düzeyinde % 23' lük bir gelir artışı olmuştur. Bu oran, parasal olarak da 14.65 Euro' luk bir değere tekabül etmektedir. Aynı ürün böcek zararı düşük ya da hiç olmayan alanlarda üretildiğinde ise, herhangi bir verim ve gelir artışının olmadığı görülmüştür (Haspolat 2004). Ayrıca; GM çeşitlerin üretimi durumunda genel tarımsal üretim içindeki payı, tüketici tarafından kabulü, piyasanın talep durumu gibi bir çok faktör ekonomik katkıya etki edecektir. İlâveten; bu ürünlerin ihracat içindeki payları, ihracat yapılan ülkelerin bu ürünleri kabulü, çeşitlere ait tohumlukların fiyatları, patent korunması, söz konusu çeşitlerin tamamı ithalat yolu ile temin edileceğinden maliyet artışı gibi hususlar da mutlaka göz önünde bulundurulmak zorundadır. Kısaca, verimdeki bir miktar artışın veya masraflardaki bir miktar azalmanın tek başına ekonomik katkı olarak değerlendirilmesi mümkün değildir (Haspolat 2004).

Sonuç olarak; transgenik ürünlerin ithalatına izin verilmeyen ülkemizde, üretimi yapılan herhangi bir transgenik ürün de bulunmamaktadır. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından pamuk, mısır ve patates için alan denemelerinin Tarımsal Araştırma Enstitüleri tarafından yapılmasına izin verilmiştir. EK18'de, ülkemizde yürütülen transgenik bitkilerin alan denemeleri verilmiştir (Eser ve Kılınçarslan 2005a). Bu durumda, Türkiye'ye baktığımızda hem ekonomik açıdan değerlendirmede bazı eksiklikler hem de yasal açıdan boşluklar bulunduğu bir gerçektir. Bu boşlukların doldurulmasında alan denemelerinin sonuçları ve özellikle geleneksel ve transgenik ürünler arasında karşılaştırmalı ekonomik analizlerin yapılması gerekmektedir. Bu sayede, mikro (üretici) ve makro (sektör ve ülke) düzeylerde transgenik ürün yetiştirmeye izin verilmesinin fayda ve maliyetlerinin ölçümünün sağlanması ve transgenik ürünlerle ilgili politika alternatiflerinin rasyonel esaslara uygun olarak geliştirilmesi söz konusu olacaktır (Haspolat 2004).

## **2.5 Biyogüvenlik**

Biyogüvenlik kavramı, modern biyoteknoloji tekniklerinin uygulamalarının ve modern biyoteknoloji ürünlerinin insan ve hayvan sağlığı ile çevre üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin belirlenmesi ve belirlenen risklerin oluşma olasılığının ortadan kaldırılması ya da meydana gelme durumunda oluşacak zararların kontrol altında tutulması için alınan önlemleri kapsar (Gözükırmızı 2002).

### **2.5.1 Biyogüvenlik Protokolü (Cartagena Protocol on Biosafety)**

Genetik mühendisliği ve genetik modifiye organizmalarla ilgili ilk ve tek uluslararası yasadır. 29 Ocak 2000'de Montreal' de kabul edilmiş, 11 Eylül 2003'de yürürlüğe girmiştir. Ağustos 2005'den itibaren bünyesinde 125 grup vardır. Tarafların çoğu Afrika ve küçük ada devletlerinden oluşan, gelişmekte olan ülkelerdir. "Çevre ve Gelişimde Rio Deklarasyonu' nun" 15. maddesinde bulunan tedbir uygulamalarıyla ilişkili olarak, bu protokolün amacı; modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilmiş olan, özellikle sınırlar arası harekete odaklanarak insan sağlığı açısından önemli riskleri içine alan, biyolojik çeşitliliğin korunması ve devamı üzerinde ters etkide bulunabilecek GMO' ların güvenli kullanımı, taşınması ve transferinde yeterli düzeyde korunmaya katkı sağlamaktır. Bu protokol uluslararası yasadaki önemli prensipleri içerir. Eksiklikleri olan bir metindir ve protokol gelişmelerini belirlemek için devam edilmesi önemlidir. Bu protokolü imzalayan grupların protokolün uygulanmasında bazı hakları ve zorunlulukları vardır. Protokol asgari standartları içerdiği için biyogüvenlik konusundaki ulusal yorum ve uygulamalar daha ayrıntılı ve daha gelişmiş standartlara sahip olmalıdır (Lin 2005).

## 2.5.2 Biyogüvenlik protokolünün ana prensipleri

Biyogüvenlik Protokolü' nün temel özellikleri şunlardır:

**Tedbir kuralları:** Tedbir kuralları ile ilgili birçok yorum vardır ve net bir tanımı olmaması uygulamada çeşitli zorluklara yol açmaktadır. Bilimsel belirsizlik ve çevreye muhtemel etkilerini, spesifik GM bitkilerin davranışını, etkilerin saptanması ve izlenmesi gibi konuları içerir (Myhr and Traavik 2002).

**İzin kuralları:** GM bitkilerin üretim, nakliye, kapalı kullanımları, gıdalarda kullanımları gibi tüm konulara ilişkin izinler hakkındaki kurallarını içerir (Ching 2005).

**Hayır deme hakkı:** Protokole göre, insanların ne yediğini bilme ve seçme hakkı vardır. GM gıdaları tüketip tüketmeme tercihinin sağlanması amaçlanmaktadır (Ching 2005).

**Karar verme mekanizmasında ulusal bağımsızlık:** Protokol sadece biyogüvenlik ile ilgili ana kuralları içerir. Ülkeler kendi önceliklerine göre davranabilir ve kendi yasal sistemlerine daha sıkı kurallar koyabilir (Ching 2005).

**İhracat yapanlar ve üreticiler üzerindeki zorunluluk ve sorumluluklar:** İhracat ve üretimle ilgili bazı yasal zorunluluklar, bununla ilgili cezalar belirtilir (Ching 2005).

## 2.5.3 Avrupa Birliği Direktifleri

**2001/18/EC Kodlu Direktifi:** GMO' ların çevreye salımı ( Eski 90/220/EEC)

**98/81 EC Kodlu Direktifi:** Çevre ve insan sağlığının GMO' ların kapalı kullanımından kaynaklanabilecek risklere karşı korunması ( Eski: 90/290/EEC)

**1829/2003 EC Kodlu Direktifi:** GD gıda ve yem hakkında düzenleme (Eski: 97/258/EEC-27 Ocak 1997 Yeni gıda ve içerikleri)

**1830/2003 Kodlu Direktifi:** GMO' ların iz-sürülebilirliği ve etiketlenmesi ve GMO' lardan elde edilen gıda ve yem ürünlerinin iz sürülebilirliği hakkında düzenleme (Eski: **1139/98/EC AB -29 Mayıs 1998- Konsey düzenlemesi:** Genetik olarak modifiye edilmiş ürünlerin etkilenmesi)

**2003/556/EC Kodlu Direktifi:** Geleneksel ürünlerde GMO varlığı hakkında rehber (Baran 2003, Ergül 2005).

## **2.5.4 Türkiye' de yasal düzenlemeler**

### **2.5.4.1 Mevcut yasal durum**

Türkiye'de biyoçeşitliliğin devamını sağlamak amacıyla, 1997' de, Ulusal Çevresel Eylem Planı ve Ulusal Biyoçeşitlilik Strateji ve Eylem Plan Taslağı (EK 5) hazırlanmıştır (Anonim 2001). 5 Haziran 1992' de ise, Biyoçeşitlilik Sözleşmesi (CBD- Convention on Biological Diversity) imzalanarak, 14 mayıs 1998'de yürürlüğe girmiştir.

Modern biyoteknoloji ile üretilen ürünlerin, 1996' da, tarımda geniş ölçüde kullanılmaya başlanması bazı önemli riskleri de beraberinde getirmiştir. Bu risklerin değerlendirilmesi, yönetimi ve elde edilen bilginin ilgili mercilere iletimi konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Türkiye 1998' de, bu amaçla Biyoçeşitlilik Sözleşmesinin ek protokolü olan, Cartagena Biyogüvenlik Protokolünün hazırlık çalışmalarına katılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, 5 Mayıs 1998' de, biyogüvenlikle ilgili Türkiye' deki tek yasal düzenleme olan "Transgenik Bitkilerin Alan Deneme Talimatı" düzenlenmiştir. 24 Mayıs 2000' de ise, 5. COP'ta Biyogüvenlik protokolü imzalanmış, 17 Temmuz 2003' te TBMM' de kabul edilmiştir. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı (TKB), Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) "Cartagena Biyogüvenlik Protokolü" hakkında çalışmalar için sorumlu kurulmuştur.

Biyogüvenlik konusunda yasal, yönetsel, enstitü bazında ve teknik açıdan eksiklikler bulunmaktadır ve Türkiye' ye GMO ürün girişinin olduğundan şüphelenilmektedir. Bu

durum, Dünya' nın en büyük biyolojik çeşitliliğe sahip alanlarından biri olan Türkiye' de, acil olarak biyogüvenlik mekanizmasının oluşturulması ve uygulanması gerektiğini göstermektedir. Bu amaçla, Eylül 2002 - Eylül 2005 tarihleri arasında "Ulusal Biyogüvenlik Çerçevesinin Geliştirilmesi" konulu UNEP/GEF projesi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda bir "Ulusal Biyogüvenlik Yasa Taslağı" hazırlanmış ve meclise sunulmak üzere Bakanlığın yetkili birimine gönderilmiştir.

Biyogüvenlik yasa taslağı "Biyogüvenlik Protokolü" nün minimum gereksinimlerini içermektedir. Bunun yanı sıra, yasa taslağının hazırlanmasında ülkenin coğrafi ve sosyo-ekonomik durumu ile etik değerleri göz önüne alınmıştır.

Ayrıca, Türkiye' de, ithal edilen bitkiler ve tohumların "Süs Bitkileri Çoğaltım Materyali İthalat Uygulama Genelgesi" (Anonim 2005b), "Tohumluk İthalat Uygulama Genelgesi" (Anonim 1998) ve "Meyve ve Asma Fidanları ile Sebze ve Çilek Fidesi İthalat Uygulama Genelgesi" (Anonim 2005c)' inde transgenik unsurlar içermediğine dair taahhütname istenmektedir ve bu genelgelerin ilgili bölümleri EK 10' da verilmektedir.

Son zamanlarda ise, ülkede kazara veya çevreye kasıtlı salımı yapılmış olabileceği düşünülen GMO' ların varlığının araştırılmasına yönelik, geniş kapsamlı ulusal bir proje hazırlığına başlanmıştır.

#### **2.5.4.2 "Ulusal Biyogüvenlik Çerçevesinin Geliştirilmesi" konulu UNEP/GEF projesi ve proje çalışmaları**

Proje uygulamalarının birinci evresinde modern biyoteknolojinin kullanımı, biyoteknoloji ve biyogüvenlikle ilgili mevcut yasa ve yasal unsurlar, biyoteknolojinin güvenli kullanımı ile ilgili kapasite geliştirmek için aktif veya planlanmış ulusal projeler, risk değerlendirme/yönetiminin uyumu için mekanizmalar ve ülke içindeki ilgili uzmanlar araştırılmıştır. Ulusal Biyogüvenlik Çerçevesinin geliştirilmesinde UNEP/GEF Projesi ve Biyogüvenlikte Cartagena Protokolü (Biyogüvenlik Protokolü),

çalıştayda, proje koordinatörü tarafından sivil toplum örgütleri ve özel sektörü de içeren ilgili enstitülerdeki üyelere uluslararası uzmanlara sunulmuştur. UNEP/GEF projesi ve ulusal proje, aynı zamanda risk analizi ve GMO' ların analizi üzerinde TKB' nin laboratuvarları ve araştırma enstitülerinde teknik eleman eğitimi için olanak vermektedir.

Projenin 2. ve 3. evresi boyunca, NBF' in unsurları olarak yasal ve düzenleme sistemi, yönetim sistemi, enstitüsel mekanizma ve risk değerlendirme ve yönetmeyi içeren bir karar verme mekanizması, GMO ların tanımlanması, saptanması ve izlemeyi (monitoring) içeren bir denetim sistemi, halk katılımı ve bilgilendirilmesi için mekanizmaların yanı sıra, bu ana unsurların gelişmesi ve bu unsurlarla ilgili boşluk ve ihtiyaçları da belirlemek için hükümet ve hükümetten olmayan enstitüler (özel enstitüler), üniversiteler ve özel sektöre ait 51 enstitüden 82 uzman/temsilcinin katılımı ile 4 çalıştay düzenlenmiştir. Mevcut yasal ve enstitüsel sistem Protokolün uygulanmasında uygun bulunmadığı için, katılımcılar biyogüvenlikle ilgili özel bir yasaya ihtiyaç duyulduğu konusunda hemfikir olmuşlardır. Biyogüvenlik ve ilgili enstitüsel sistem hakkında bir yasa taslağı hazırlamak için bir komisyon kurulmuştur.

Komisyon, Mart- Kasım 2004 tarihleri arasında 35 toplantı düzenlemiş ve Türkiye' nin yapısı, protokolün maddeleri, çalıştaylardan çıkan sonuçların yanı sıra diğer ülkelerin ve AB'nin ilgili direktifleri de dikkate alınarak, bir "Biyogüvenlik Yasası" taslak haline getirilmiştir. Yasa taslağı görüşülmek üzere ilgili birimlere gönderilmiştir. Yasa taslağı ve UBÇ' nin unsurları Türkiye'nin çeşitli bölgelerine sunulmuş ve tartışılmıştır. Projenin son evresinde modern biyoteknoloji, GMO' lar ve biyogüvenlikle ilgili yayınlar hazırlanmış ve halka ve örgütlere dağıtılmıştır.

#### **2.5.4.3 Türkiye' nin biyogüvenlik politikası**

Türkiye' nin genel politikası; ulusal ihtiyaçlar doğrultusunda modern biyoteknolojinin mevcut ve gelecekteki avantajlarından güvenli bir şekilde yararlanırken, modern biyoteknolojinin kullanımıyla geliştirilmiş ürünlerin muhtemel zararlı etkilerine karşı insan ve hayvan sağlığının korunması ve biyoçeşitliliğinin devamının sağlanabilmesidir. Biyogüvenliğin temel prensipleri; tedbir kuralları, GMO' ların ayrı ayrı ele alınarak değerlendirilmesi, stratejik uzun vadeli etkilerinin değerlendirilmesi ve sosyo-ekonomik yapıdaki etkilerini incelemektir. Bu sistem yasal, yönetsel ve teknik düzenlemeler ve organizasyonlar ile avantajların belirlenmesi, muhtemel zararlı etkilerin kontrolü, yok edilmesi veya azaltılması için şarttır. TKB bunu sağlayabilmek amacıyla biyogüvenlik konusundaki bilgi ve verilerin toplanması, hayata geçirilmesi ve yayılması konusunda sorumlu kuruluştur (Baran and Yılmaz 2008).

#### **2.5.4.4 Türkiye' de biyogüvenlikle ilgili ana problemler**

**Biyogüvenlikle ilgili yasanın olmaması:** Ülkemizde biyogüvenlik sorunları ile ilgili ulusal bir kurum yoktur. Bu durum biyogüvenlik unsurlarının gerçekleştirilmesinde en önemli engel olarak görülmektedir (Haspolat 2004).

**Ar-ge imkanları ve ödeneklerin kısıtlı olması:** Ülkemizde bazı üniversitelerde, TÜBİTAK-MAM ve benzeri araştırma kurumlarında genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalar, araştırma ve ar-ge amaçlı olarak kısıtlı düzeyde kullanılmaktadır (Haspolat 2004).

**Yeterli bir denetimin olmaması:** İthal edilen tüketim amaçlı mısırların GMO içerdikleri konusunda ciddi kuşkular vardır (Haspolat 2004).



### 2.5.5 GMO' larda monitoring (İzleme)

Gıda güvenliği tüm ülkelerin ilgilendiği en önemli kavramlardan biridir. Gıda güvenliği için vatandaşların sağlığı veya gıda zincirine direk etkisi olan organizmaları izlemek ve güvenli gıda üretiminin sürekliliğini sağlamak gerekmektedir (Heinemann et al. 2004). Bazı ülkelerde transgenik ürünlerin çevreye serbest salımına izin verilirken, çoğu ülke risk değerlendirme sistemini oluşturmaya çalışmaktadır (Heinemann and Traavik 2004).

Biyoteknolojide izleme, çeşitli koşul ve durumlara bağlı olarak farklı yorum ve anlamlara sahiptir. İzlemenin anlamlarından bir tanesi yeni bitki çeşitlerinin relatif ölçümünün ve karşılaştırılmasının yapılmasıdır. Ancak; modern biyoteknolojinin ortaya çıkışı ile çevreye salınan GMO (genetik modifiye organizma)' lardaki potansiyel zararlar hakkındaki spekülasyonlar nedeniyle, monitoring kavramı bu organizmaların hareketini izlemek ve onların taşıdığı transgenler ve beklenmeyen sonuçlara karşı hazır olmak için kullanılmaya başlanmıştır (Anonymous 2007a).

İzleme yapılma sebepleri, başlıca 4 unsurda toplanabilir:

- 1-Kısa süreli deneyler ve transgenik bitkilerin genel özellikleri çevresel etkilerin hepsini ortaya koymayabilir.
- 2-Ürünlerin piyasaya sürülmeden önce yapılan testlerin, riskleri yeterli bir şekilde değerlendirip değerlendiremediğinin kontrol edilmesi gerekmektedir.
- 3-Tahmin edilen etkilerin kaydedilmesi ve tahmin edilemeyen etkilerin saptanması için uzun vadeli izlemeye ihtiyaç duyulmaktadır.
- 4-Pazarlama sonrası yapılan değerlendirmeler veya validasyonun yapılması kalite kontrolünün bir parçasıdır (Bardocz *et al.* 2005).

#### 2.5.5.1 İzleme programı

Genetik modifiye organizmaların alan deneme çalışmaları ile ilgili izleme programları risk yönetim planlarının veya yasal düzenlemelerin bir parçası olarak değerlendirilmektedir. Örneğin; GMO' ların salınımı hakkındaki Avrupa Birliği

Direktifi EC/2001/18 Annex VII, bir monitoring planı geliştirilirken izlenmesi gereken hedef ve genel prensipleri tanımlamaktadır (Anonymous 2007a).

İzleme programları üç kategoriden oluşmaktadır; deney, iz sürülebilirlik ve denetim. Kategoriler, sırasıyla, alan denemelerini aşamalı olarak artırma ve ürün gelişiminin son pazarlama aşamasını kapsamaktadır (Anonymous 2007a). Deneysel bölüm; temel bilimsel verilerin toplanması, ön-salınım tahminlerinin test edilmesi ve deneme deseninin geliştirilmesinden oluşmaktadır. İz sürülebilirlik kavramı, ürün gelişimi ve pazarlama, yasal düzenlemelere uyma ve aşamalı olarak yayma/dağıtma konularını kapsamaktadır. Monitoring sisteminin son kısmında ise olaylar tanımlanmakta ve beklenmeyen etkiler denetlenmektedir (Anonim 2007a). İzleme (monitoring) çevresel etkiler ile insan ve hayvan sağlığına olan etkileri inceler. Çevresel etkiler toprak, su, hava, vertikal ve horizontal gen transferleri, dirençlilik gelişimi, tri-trofik interaksyonlar ve populasyon değişimleri ile incelenir (Bardocz et al. 2004).

Çevredeki GMO'ların ve genlerinin hareketini izlemede kullanılacak pek çok çeşitli moleküler genetik araçları vardır (Kapusinski 2005). Bu araçların tamamına yakını geleneksel yetiştiriciliğin bölgesel biyoçeşitlilik üzerindeki etkilerini izlemek için kullanılmaktadır (Heinemann ve Traavik 2004). Örneğin; alan denemelerindeki kontrollerde, genellikle ürünlerden çevresindeki topraktaki mikroorganizmalara olabilecek horizontal gen transferi (HGT) izlenir (Heinemann and Traavik 2004, Ho et al. 2004). Ancak, şimdiye kadar, bitkiler gibi ökaryotlardan bakterilere HGT' nin olduğu sadece birkaç olay bilinmektedir (Salyers 1997, Heinemann 1997, Nielsen 1997, Bertolle and Simonet 1997, Nielsen et al. 1998). Yine, gıdalardaki veya çevredeki GMO'ları modifiye olmamış akrabalarından ayırt etmek için yapılarındaki DNA'lar veya protein molekülleri kullanılmaktadır (Kapusinski 2005).

Hayvan sağlığına olan etkileri izlenirken gelişim ve yaşam süreleri, hastalıklara duyarlılık –bağışıklık durumu, patojenite bulaşıcılık vs. ve üretim fonksiyonlarına (en az dört jenerasyon) olan etkilerine bakılmalıdır (Bardocz et al. 2005). İnsan sağlığına olan etkileri ise bağışıklık durumu, düzenli kan örneklerinin alımı, hormon deneyleri,

bakteriyel flora, gastrik biopsiler, tümör histolojisi, patoloji incelemeleri, epidemiyolojik çalışmalar ve gönüllü insan çalışmaları yoluyla kontrol edilebilir (Bardocz et al. 2005).

İzleme sistemleri, yasalar veya sözleşmelerdeki standartlara uyulması ve bunun kontrollerinin sağlanması için geliştirilmelidir. Düzenleme yapan birimler izleme bilgilerine erişebilmeli ve bu bilgiler bağımsız bir bilimsel komite tarafından toplanmış olmalıdır. Herhangi bir ticari GMO' nun yeni hibritlerden bile ayırt edilebilmesi ve tanımlanabilmesi için üreticilerden yeterli bir DNA dizi analiz bilgisi sağlanmalıdır (Heinemann et al. 2004). Ürünlerdeki izleme sadece GMO' ların varlığını değil, bir ürünlerdeki miktarını ölçmeyi de içerir. Aslında bu anlamda etiketleme, izlemenin bir unsuru olarak kabul edilebilir (Heinemann et al. 2004). Ulusal Biyogüvenlik Yasa Taslağı' nda Madde 13'de, GMO' ların izlenmesi ve ürün analizi ile ilgili genel bilgiler yer almaktadır (Anonim 2005a).

#### **2.5.5.2 Etiketleme**

Halkın ne yediğini bilmeye hakkı vardır. Bunu sağlamada etiketleme büyük önem arz eden konulardan biridir. Dünya' da etiketleme ile ilgili üç ayrı görüş vardır; GM ürün ile GM olmayan ürünün eşdeğerliği aynı ise tüketicilerde gereksiz kafa karışıklığına yol açmamak ve haksız rekabet sağlamamak için bazı çevreler etiketlemeye tamamen karşı iken başka bir taraf olası bulaşmalar göz önüne alındığında, belli düzeyin üstünde GM içeren ürünlerin etiketlenmesini istemektedir (Nielsen and Andersan 2005). Ancak, üçüncü bir görüş ise bu tolerans düzeyinin belirlenmesinin çok zor veya yetersiz olduğunu savunmaktadır (Heinemann et al. 2004).

Avrupa Birliği' nde, EC (258/97) sayılı direktif (Mitten et al. 1999) değiştirilerek, 18 Nisan 2004' te, son üründe herhangi bir GM materyalinin bulunması durumunda, tüm GM gıda ve hayvan yemlerini kapsayan etiketleme ile ilgili GM Gıda ve Yem (EC) 1829/2003 sayılı direktifi kabul edilmiştir. Bu, bir GM kaynağından üretilen un, yağ ve glikoz şurubu gibi ürünlerin etiketlenmesi gerektiği anlamına gelmektedir. GM

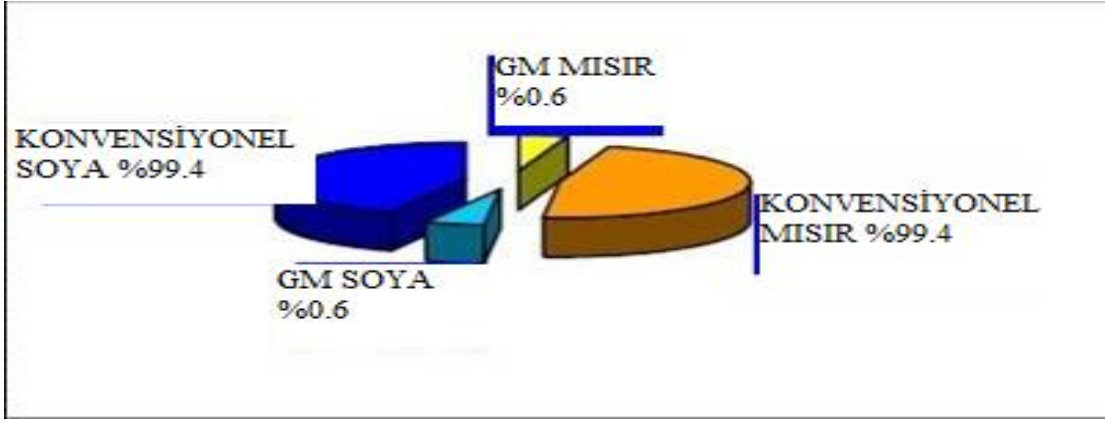
teknolojisi ile üretilmiş ürünler (örneğin GM enzimler ile üretilmiş ürünler) etiketlenmek zorunda değildir. Yine aynı şekilde, GM yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen ürünlerin de etiketlenmesine gerek yoktur. Çizelge 2.2’ de, etiketleme kuralları ile ilgili örnekler verilmiştir (Anonymous 2005a).

Çizelge 2.1 Avrupa Birliği tarafından 18 Nisan 2004’ te kabul edilmiş yeni etiketleme kuralı ile ilgili örnekler (Anonim 2005c)

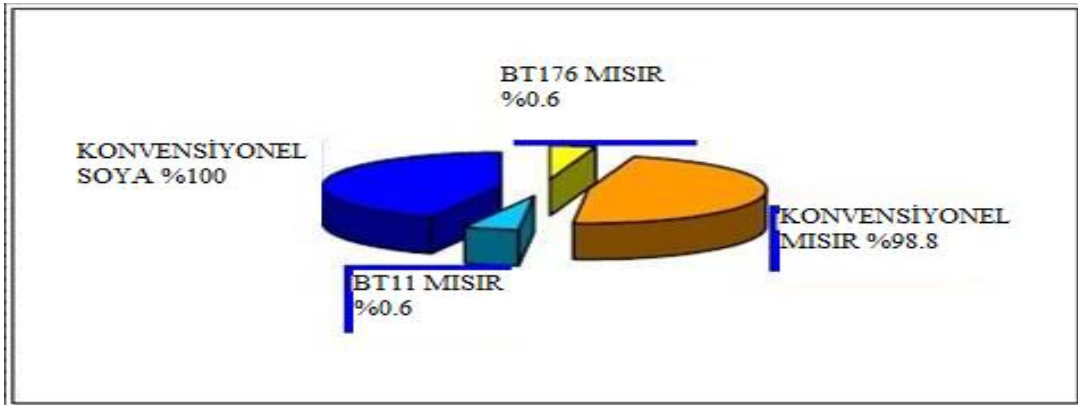
GMO-Tipi	Örnek	18 nisan 2004’ den İtibaren Etiketleme
GM Bitki GM tohum GM gıda	Hindiba, mısır tohumu, mısır, soya fasulyesi, domates	+
GMO lardan üretilmiş gıda	Mısır unu, yüksek rafinasyonlu soya yağı,	+
Bir GM enzim yardımıyla üretilmiş gıda ürünü	Amilaz kullanılmış peynir ve fırın ürünleri	-
Bir GMO’ dan üretilmiş yem katkısı	Riboflavin	-
GM yemlerle beslenmiş hayvanlardan elde edilmiş gıda	Et,süt,yumurta	-
GMO lardan üretilmiş gıda katkısı/aroma maddesi	Çikolatada kullanılan GM soya fasülyesinden yüksek filtre lesitin ekstraktı	+
Yemek kuruluşlarında satılan GM katkıları içeren gıda		+(Komisyon ve birlik arasında anlaşmazlık var)
GM katkı maddeleri içeren alkollü içecekler		+
Gıda katkısı olarak kullanılan genetik modifiye materyaller	Maya ekstraktı	+

Kasıtlı kullanılmış GM katkılarının her seviyesi mutlaka etiketlenmelidir. Ancak, kazara bulunan küçük miktarlardaki (onay verilmiş GM varyeteleri için %0.9, onaylanmamışlar için %0.5) GM katkılarının etiketlenmesine gerek yoktur (Anonymous 2004a, Anonymous 2005a). Tüm içeriği sadece bir üründen elde edilen (soya, mısır vs.) katkı maddelerinin (yağ, un vs) tümü tek bir ürün olarak (örneğin mısır) olarak kabul

edilir. Etiketlemede eşik değeri hesaplanırken, aynı türden elde edilmiş GM katkıların toplamı göz önüne alınır (Somma 2003). Şekil 2.5 ve Şekil 2.6’ da, karışım örneklerinin etiketlenmesi ile ilgili örnekler verilmiştir.



Şekil 2.5 Etiketlemenin gerekmediği soya-mısır karışımı (Somma 2003)



Şekil 2.6 Etiketlemenin gerektiği soya-mısır karışımı (Somma 2003)

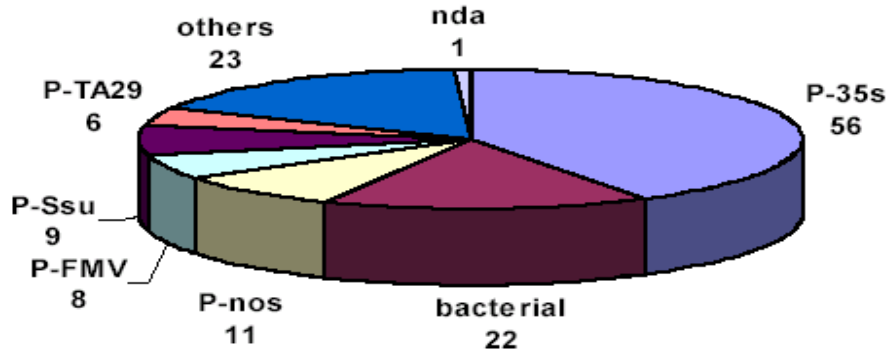
Türkiye’ de etiketleme ile ilgili kuralların Avrupa Birliği yasalarıyla uyum içerisinde olması beklenmektedir. Buna göre, Ulusal Biyogüvenlik Yasa Taslağı Madde 16’ da GMO’ ların etiketlenmesi ile ilgili genel bilgiler yer almaktadır (Anonim 2005a).

## 2.6 Gıdalarda GMO Analizi

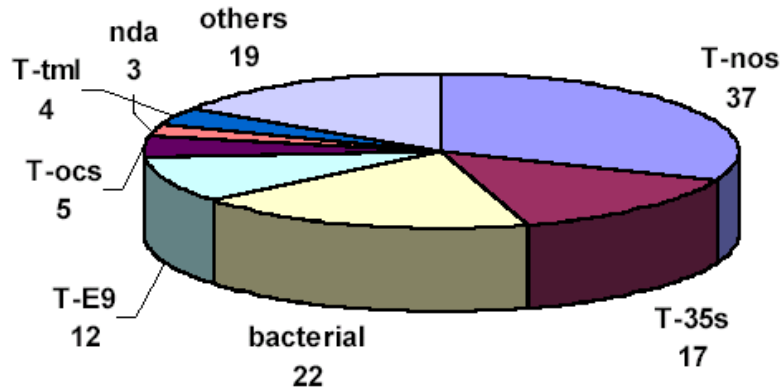
GM bitkilerden elde edilen ham materyal (ör: tahıllar) ve işlenmiş ürünler (ör: gıdalar) eklenmiş DNA' nın veya genetik materyal tarafından kodlanan eksprese edilmiş yeni proteinlerin saptanması ile tanımlanabilir. GMO saptanması kalitatif (var/yok analizleri) ve kantitatif (miktar analizleri) şeklinde yapılabilmektedir (Farid 2002). Ancak; gelecekte GM gıdaların pazarda sayılarının ve çeşitlerinin artmasıyla, daha avantajlı çoklu-saptama yapabilen sistemlere ihtiyaç duyulacaktır (Schreiber 1999).

### 2.6.1 DNA analizlerine dayalı yöntemler

GM gıdaların DNA saptanma metotları, diziyeye spesifik hibridize olabilen çift iplikli DNA' nın komplementlerine bağlıdır. DNA, onun fonksiyonlarını yöneten bazı elementleri içerir. Bu elementler bir promotör bölgesi, yapısal gen ve bir terminatör bölgesidir. GM ürünlerde bulunan promotör bölgeleri Şekil 2.7'de, terminatör bölgeleri ise Şekil 2.8' de verilmiştir.



Şekil 2.7 GM ürünlerde kullanılan promotör bölgeler (Anonymous 2003c)



Şekil 2.8 GM ürünlerde kullanılan terminatör bölgeler (Anonymous 2003c)

GM ürünlerin tespitinde kullanılan birçok metot bulunsa da, en çok kullanılanları Southern Blot ve özellikle PCR analizleridir. Tespit edilen gen ekspresyonu (ifadesi) tespiti için ise Mikroarray teknolojisi geliştirilmektedir (Farid 2002).

**Southern Blot:** Bu teknikte izole edilen örnek DNA' sını çift iplikçikli (ds) –işaretlenmiş GMO' ya spesifik nükleik asit problemleri içeren nitroseluloz veya naylon membran üzerine fikse edilir (Nicholl 2002). Hibridizasyon radyografikle, florometrik yolla veya “chemiluminesans” yöntemi ile saptanır. Bu metot PCR' a dayalı metottan daha az hassastır. Son zamanlarda, Southern Blot teknolojisine alternatif olarak, yakın infrared (NIR-near infrared) floresan boyalar da kullanılmaktadır (Farid 2002).

**PCR Yöntemi:** PCR yöntemleri genetik modifiye ürünlerin rutin olarak saptanmasında, genellikle, en güvenilir hassas yöntem olarak kabul edilmektedir (Holts-Jensen 2003, Yuan et al. 2006)

**Kalitatif PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) teknikleri hedef DNA dizilerinin (50-3000 baz), in vitro koşullarda, hızlı ve güvenli şekilde milyonlarca kez çoğaltılmasına dayanır. Tipik bir kalitatif PCR için örnek

DNA' sını, PCR Buffer, dNTP' ler, MgCl<sub>2</sub>, primer veya primerler, Taq DNA polimeraz enzimi ve su gereklidir. Tipik bir kalitatif PCR 3 ana basamaktan oluşur:

1. DNA zincirinin açılması (Denaturation): Kalıp DNA dizilerinin 94-98 °C'de açılmasıdır.
2. Primerlerin açılan DNA zincirine yapışması (Annealing): Sıcaklık 37-65 °C düşürülerek primerlerin DNA dizilerinin hedef bölgelere yapışması sağlanır.
3. Primer uzaması (Primer extension): DNA dizilerine bağlanan primerler, Taq DNA polimeraz enzimi (5' → 3' yönünde) ile uzatılır (Watson et al. 1998).

AB' deki mevcut GMO ların çoğu 3 genetik elementten birini içerir; karnıbahar mozaik virüsü (CaMV-cauliflower mosaic virus), 35S promotör, NOS (nopalın synthase) terminör veya kanamisin –dirençlilik marker geni (nptII) (Anonymous 2003b, Farid 2002). Bu elementler bazı bitkiler ve toprak mikroorganizmalarında da doğal olarak bulunmaktadır ve PCR kullanılarak saptama yapılırken yanlış pozitif sonuç verebilir. PCR sonuçları çeşitli metotlar ile doğrulanabilir. Bu metotlara nested PCR (Farid 2002) ve multipleks PCR' ları örnek olarak verilebilir.

**Kantitatif Uç Nokta PCR'ı (QC-PCR):** AB' deki etiketleme ile ilgili standartlara göre, gıdalardaki GMO' ların belli bir sınırı aşmaması gerektiği için gıdalardaki GMO' ların analizinde önemli en önemli noktalardan biri miktar analizidir. Bu yüzden, daha çok kantitatif PCR uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

QC PCR 4 adımdan oluşur;

1. Bir reaksiyon tüpünde standart ve hedef DNA' larının birlikte amplifikasyonu,
  2. Etidium bromid ile jele bağlayarak ve agaroz jel elektroforezi gibi uygun bir metot kullanarak ürünlerin ayrımı,
  3. Dansitometrik olarak jelin analizi,
  4. Geri alma analizi ile standart ve hedef DNA' nın oransal olarak tahmin edilmesi.
- QC-PCR ticari olarak sağlanabilecek (Fluka, Buchs, İsviçre) bir sertifikalı standart materyal ile kontrol edilebilir (Farid 2002).



**Real-time PCR:** Gıdalarda GMO analizinde, konvansiyonel kantitatif uç-nokta PCR'ında yaşanan bazı problemler nedeniyle, real-time-Q-PCR' lar kullanılmaya başlanmıştır (Farid 2002). Bu yöntem analizlere özgün işaretlenmiş problemleri içeren reaksiyon karışımlarının florometrik ölçümüne dayanır. Real-time PCR düşük miktardaki DNA' ların saptanmasına da olanak vermektedir (Lübeck 2002, Lipp et al. 2005). PCR ürünlerinin miktarının tahmin edilmesinde aşağıdaki yöntemler kullanılır:

1. DNA bağlayıcı boya SYBR Green I kullanımı (Andersen et al. 2006, Giglo et al. 2003, Farid 2002)
2. Hibridizasyon problemleri veya floresan rezonans enerji (FRET) problemleri (Farid 2002) ve IFRET problemleri kullanımı (Giglo et al. 2003),
3. Hidroliz problemleri kullanımı (Taq Man teknolojisi) (Farid 2002, Lipp et al. 2005, Bustin 2005)
4. Skorpionlar (Giglo et al. 2003) ve
4. Moleküler işaretlerdir (Giglo et al. 2003, Farid 2002, Lipp et al. 2005, Bustin 2005).

**Geniş Limitli Dilüsyon PCR Metodu:** Bu metot PCR' ın optimizasyonu olup; PCR' ın son evresinden türetilmiş, tamamen veya hiçbir biçimde yer almayacak kontrol genin çoğaltılmasıdır. Pozitif sonuç verebilecek reaksiyon karışımındaki bir veya daha fazla hedefi içerir (Farid 2002, Lübeck 2002). Kesin kuantifikasyon bir dizi dilüsyonu yapılan materyalin analiz edilmesi ile yapılır. Kimi yerde pozitif kimi yerde negatif olan dilüsyon sınırında hedef sayısı negatif uç-noktaların oranından Poisson istatistiği kullanılarak hesaplanabilir. Bu metodun avantajı, eklenen raportör DNA' nın birlikte çoğaltılmasına ihtiyaç duyulmamasıdır (Farid 2002).

**Microarray Metodu:** Son yıllarda geliştirilmiş olan ve çeşitli PCR teknikleri ile kombine kullanılabilen bir DNA saptama sistemidir. Aynı anda pek çok genetik modifiye bölgesini saptamak mümkündür (Aarts et al. 2008, Anonymous 2008c). Esası, klasik DNA hibridizasyon metoduna dayanır. PCR ürünleri katı cam yüzeylerde veya naylon bir membran üzerinde depolanır. Mikro-elektronik arraylar ince bir agaroz ile kaplanmış elektrotlar içermektedir. Çok hassas ve gelişmekte olan bir yöntemdir (Lübeck 2002).

### 2.6.2 Protein analizlerine dayalı yöntemler

İmmünolojik uygulamalar, GMO' lardaki proteinlerin belirlenmesinde kullanılan antijen-antikor ilişkisine dayanan analitik testlerdir. Antijenler, test edilecek materyal ile immünize olan hayvan serumundan izole edilen özgün proteinlerdir. Antijen hayvana enjekte edildiğinde hayvan immunosistemi bu maddeleri yabancı madde olarak tanımlar ve buna karşı antikor üretimi ile cevap verir. Antijen serumundan izole edilerek indikatör moleküller ile konjuge edilir, kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılır (İpekçi 2002a, Lübeck 2002).

İhtiyaç duyulan miktara ve saptama spesfikliğine bağlı olarak, mono klonal ve poliklonal antikorlar kullanılabilir. Western Blot ve ELISA teknikleri Monsanto' nun transgenik RR soya ürünlerindeki proteinin analizi için kullanılabilirler. RR soya glifosat herbisidine dirençlidir ve Agrobacterium spp. CP4 suşu'ndaki genin kodladığı 5-enolpiruvilşikimat-3 fosfatsintaz (EPSPS) türevi ihtiva etmektedir (Farid 2002).

**Western Blot Kullanımı:** Bir örneğin içerdiği hedef proteinin önceden belirlenen treshold seviyesinden yüksek mi düşük mü olduğunu belirlemede kullanılan çok hassas kalitatif bir metottur. Özellikle çözünmeyen proteinlerin analizi için oldukça kullanışlıdır. Western Blotların saptama limiti % 0.25- % 1 arasında değişmektedir (Farid 2002).

**ELISA (Ezyme Linked Immuno Sorbent Assay) Tekniği:** ELISA tekniği, enzim ile işaretlenmiş immunoreaktan ve immunosorbentin katı bir desteğe bağlanması temeline dayanır. ELISA' nın farklı uygulama tipleri bulunmaktadır. Antijen ile kaplanmış ELISA plakları veya tüpler kullanılabilir (İpekçi 2002, Yücel 2002, Lübeck 2002). CP4 EPSPS soya fasulyesi proteini için saptama limiti, tohumlar için % 0.25 ve işlem görmüş materyal için ise % 1.4' tür (Farid 2002).

**Çubuklar (Lateral Flow Strip):** Lateral flow strip çalışma mekanizması ELISA yöntemine dayanmaktadır. Antijen belirlenmesi “çift antikor sandviç” yöntemi ile gerçekleştirilir. Bu yöntemde, özgün bir antikor ve renkli ajan ile işaretli belirleyici ikinci bir özgün antikor nitroseluloz membrana bağlanır. Belirlenmesi istenilen proteini içeren çözeltiye stripler daldırıldığında, renkli konjugat ile işaretli antikor membran boyunca ilerler ve spesifik antikor ile bağlandığında renk açığa çıkar. Tek bandın oluşumu negatif örneği (kontrol bölgeyi), iki bandın oluşumu ise pozitif örneği gösterir (İpekçi 2002b, Farid 2002, Lübeck 2002).

**Diğer Immunoassay Teknikleri:** ELISA ve çubukların kullanıldığı immunoassay tekniklerinden başka destekleyici katı yüzey olarak magnetik partiküllerin kullanıldığı teknikler de vardır. Magnetik parçacıklar antikor ile kaplanabilmektedir ve reaksiyon test tüpünde gerçekleşmektedir. Bu yöntem enstrumetal tekniklerle kombine olarak kullanılabilir. Örnek olarak, immunoassay- mass spektrometresi verilebilir (Farid 2002).

### **2.6.3 NIR Spektroskopisi**

NIR transmitans spektroskopisi, normalde, tüm tahıllardaki nem, protein, yağ ve nişastanın tahmini için tahıl yetiştiricileri tarafından kullanılmaktadır. Son yıllarda ise, konvensiyonel soyadan RR soyayı ayırt etmek için kullanılmaktadır (Farid 2002).

### **2.6.4 Fenotipik karakterizasyon (Herbisit bioassay)**

Spesifik bir uygulamanın varlığı-yokluğu hakkında bilgi verir. Şimdiye kadar sadece herbisit toleranslılık-dirençliliğin tespiti için kullanıldığı için “herbisit bioassay” olarak da adlandırılmıştır. Herbisit içeren bir ortamda, tohumların geliştirilmesi ile uygulanan bir doğrulama yöntemidir (Lübeck 2002).

## 2.6.5 Yeni Teknikler

**MPLA (Microarray Padlock Ligation Analysis):** PCR amplifikasyonu ile microarray tekniğinin tanımlama sisteminin bir arada kullanıldığı bir metottur. DNA dizisini bir padlock probu yardımıyla saptama esasına dayanmaktadır. Dijk ve arkadaşları (Dijk et al. 2008) tarafından uygulanmıştır ve saptama limitinin % 0.1' in altında olduğu rapor edilmiştir.

**DNA Insert Fingerprint Method:** Restriksiyon enzimlerinin parçalama ve bağlama özelliğinin adaptörlere ve işaretlenmiş primerleri ihtiva eden bir nested PCR sistemine uygulanması ile, özellikle karışım GM ürünler için geliştirilmiş bir metottur. Bazı mısır çeşitlerinde, saptama limitleri % 0.1-%1 aralığında olmak üzere uygulanmıştır (Raymond et al. 2008).

## 2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi için Validasyon Metotları

Validasyon, belirli bir amaç için bir metodun ayırıcı özelliğini ve güvenilirliğini kanıtlayan bir prosestir (Anonymous 2005d) ve 3 önemli bölümden oluşmaktadır; metod, test materyali ve katılımcıların performansı (Holts- Jensen et al. 2003). Avrupa Birliği Direktifi EC 882/2004' e göre gıda ve yem kontrolü için kullanılan analitik metotlar kontrol laboratuvarları tarafından kullanılmadan önce valide edilmelidir. Ayrıca, Avrupa Birliği Direktifleri 1829/2003 ve 641/2004' e göre; GMO analizlerinin analitik metotlarının validasyonu, bir GM gıda veya yem ruhsatı alınması için zorunlu kılınmıştır (Anonymous 2005b). Metotların validasyonu için en az sekiz laboratuvar tarafından kollabratif çalışılması gerekmektedir (Anklam 1998). Ancak, bir yöntemin valide edilmesindeki en büyük sorunlardan biri yeterli sayıda CRM (Certified reference materials-Sertifikalı referans materyal) bulunmamasıdır. Çünkü; validasyon işlemi sırasında LOD (Limit of detection-tanımlama limiti) ve LOQ (Limit of quantification-ölçüm limiti) hesaplamaları için CRM' lere ihtiyaç duyulmaktadır (Holts- Jensen et al. 2003). Kalitatif GM analizlerinin validasyon çalışmalarında, doğruluk (accuracy), uygulanabilirlik (applicability), LOD (limit of determination- saptama limiti), seçicilik

(selectivity), hassaslık (sensitivity) parametreleri kullanılırken, kesinlik (precision), geri kazanım (recovery), LOQ (limit of quantification-ölçüm limiti) ve linearite (linearity) gibi genel validasyon hesaplamalarında kullanılan değerler hesaplanmamaktadır. Kantitatif GM analizlerinde hesaplanan validasyon parametreleri ise doğruluk, LOD, LOQ, kesinlik, hassaslık, güvenilirlik (robustness, ruggedness), spesifiklik ve linearitedir (Lipp et al. 2005). Aşağıda, GM ürünlerin validasyonunda kullanılan bazı parametreler hakkında bilgi verilmiştir.

**Doğruluk:** Bir ölçüm cihazının veya metodun ölçüm sonucunun gerçek değere yakınlığı şeklinde tanımlanmaktadır. Metot talimatının seçilen matrikse uygulanabilirliğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Validasyon, metotta tanımlanmış olan ürün/ürünler için geçerlidir (Lipp and Anklam 2002). Doğruluk değerlendirmesi için, Sertifikalı Referans Materyal (CRM) analiz edilmeli, ilgili yeterlilik test programlarına katılım sağlanmalı veya sistematik sapması daha düşük olduğu bilinen bir analiz metodu ile karşılaştırılmasıdır. Çalışılan materyal için uygun SRM mevcut değil ise; bu durumda numuneye standart ilavesi yapılarak çalışma gerçekleştirilir (Lipp et al. 2005).

**Çalışma Aralığı, Linearite:** Kör örneğe (solvent/numune körü) artan miktarda referans madde eklenerek en az 5 farklı konsantrasyonda ölçüm yapılır. Eğer linearite sağlanıyorsa; daha düşük konsantrasyonlara inerek lineer olarak ölçülebilecek en düşük miktar belirlenir. Çalışılması gereken en düşük konsantrasyon, en azından LOD veya LOQ düzeyinde olmalıdır. Kalibrasyon eğrisi, amacına uygun olarak standart madde çözeltileri ile veya standart ilave edilmiş numuneler ile hazırlanmalıdır (Lipp and Anklam 2002). Kalibrasyon güvenilirliği;

- Sertifikalı referans maddeler/sertifikalı standart maddeler kullanılması,
- Tüm çalışma aralığında kesinlik değerinin birbirine yakın olması,
- Lineer veya kuadratiklik fonksiyonunun tüm metoda uygulanabilir olması,
- Hataların normal dağılım göstermesi ile sağlanır.
- Lineer aralık, değişik konsantrasyonlardaki belli sayıda numunenin analiz sonuç regresyonlarının hesaplanması ile elde edilir (Anonymous 2002).

**Tanımlama (Saptama) Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ):** LOD ve LOQ, sırasıyla, örneğin saptandığı ve miktarının belirlenebildiği en düşük konsantrasyondur (Holts-Jensen et. al. 2003). LOD ve LOQ hesaplamasında farklı uygulamalar yapılabilmektedir (Anonymous 2002). Pratik olarak LOD ve LOQ hesaplanması mutlaka DNA kopya sayısı üzeinden hesaplanmalıdır. Ancak, sonuçlar relatif yüzde oranlarına çevrilebilir veya yüzde oranı şeklinde ifade edilebilir (Holts- Jensen et al. 2003). 30 kopya herbsit toleranslı soya fasülyesi ve 9 kopya böceğe dirençli mısır haploid genomo için tahmini teorik LOD %0.005 (GMO/Konvensiyonel ürün [w/w])' dir. Üründeki GMO miktarı azaldıkça hata oranı artacaktır (Lipp and Anklam 2002).

**Hassasiyet (Sensitivity, Resolution):** Ölçüm cihazının birim konsantrasyon için verdiği sinyal büyüklüğüdür. Hassasiyet, kalibrasyon eğrisi veya standart ilave edilmiş numuneler ile tespit edilebilir (Anonymous 1992).

Hassasiyet = Ölçüm sinyali / konsantrasyon

**Kesinlik (Precision):** Metodun kesinliği, aynı analitik koşullar altında çok sayıdaki ölçüm sonuçları arasındaki benzerlik derecesidir. Kesinlik iki bileşene ayrılmaktadır; tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik.

**A.Tekrarlanabilirlik (Repeatability):** Tekrarlanabilirlik, tüm şartların (ölçüm metodu, kişi, cihaz, laboratuvar, çalışma koşulları, gün) aynı olduğu koşullarda yapılan ölçüm sonuçlarının standart sapmasının hesaplanmasıdır (Anonymous 2005d).

**B.Tekrar Üretilirlik (Reproducibility):** Uygulanan koşullardan (metodun esası, ölçüm metodu, kişi, cihaz, laboratuvar, çalışma koşulları, gün) bir veya birkaçının değiştirilmesi ile elde edilen ölçüm sonuçlarının standart sapmasının hesaplanmasıdır. Tekrar üretilebilirlik kapsamında laboratuvarlar arası karşılaştırmalı çalışma yapılmalıdır (Anonymous 1992).

**Sağlamlık (Robustness):** Metot uygulanırken, koşullardaki değişimin analiz sonucuna etkisinin test edilmesi için:

Analiz sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerin değerlendirilmesi,

Rutin uygulamalar için bu parametrelerin tolerans değerlerinin belirlenmesi,

Uygun analiz planının yaratılması,

Metodun uygulanması ve etken parametrelerin değerlendirilmesi,

Metodun optimize edilmesi için parametrelerin yeniden düzenlenmesi (parametrelerin etkisinin azaltılması veya parametre aralığının yeniden ayarlanması) amaçlı düzeltici faaliyetler gerekmektedir (Lipp et al. 2005).

**Seçicilik (Selectivity):** Bir metodun seçiciliği, kompleks bir materyal içinde, incelenen analit/analitler dışındaki bileşenlerinden etkilenmeden, bir veya birden fazla analitin tespit edilebilmesidir. Bir veya birden fazla madde için seçici olan bir metot spesifik olarak tanımlanmaktadır (Lipp and Anklam 2002).

**Spesifiklik (Specificity):** Spesifiklik analiz metodunda belirlenmiş olmalıdır. Spesifik bir metot uygulanması durumunda, metotta bunun belirtilmesi yeterlidir. Diğer durumlarda, belirtilen metot ile yeterli sayıda örnek analizi yapılması metodun spesifikliğini garanti altına alacaktır. Primerlerin spesifikliğini göstermek için en az 100 farklı negatif kontrol kullanılmalıdır (Lipp and Anklam 2002). Metodun yeterli spesifikliğe sahip olmaması durumunda, sonucun pozitif çıkması halinde başka bir metot ile doğrulanması/kontrol edilmesi gerekmektedir (Anonymous 2003d)

## 2.8 Dünya’ da Üretimi Yapılan Genetik Modifiye Mısırlar

Genetik modifikasyon çeşidi açısından en çok onaylanan ürün, 35 çeşit ile mısırdır. Mon810 mısır ve herbisit toleranslı NK603 mısır ise, başvurusu yapıldığı 21 ülkede kabul gören herbisite toleranslı soya fasulyesi (G-S-40-3-2)’ nin ardından, 18’ er kabul ile, 2. sırada kabul gören transgenik ürünlerdir (James 2006). ABD’ de, 17 GM mısır çeşidi gıda ve yem amaçlı üretilmektedir. Ancak, sadece 4 GM mısır hattı AB tarafından kabul edilmiştir. Bununla beraber Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Afrika,

Çin, Japonya, Arjantin, Kanada, İsveç gibi bazı ülkelerde bazı mısır hatları kabul edilmiştir ve ticari olarak bulunmaktadır.

Transgenik mısır üretiminde Cry genleri çok kullanılmaktadır ve bunların içinde en yaygınlarından biri Cry1Ab proteinini kodlayan Cry1Ab genidir. Ayrıca; *CryIAC* (DBT418), *Cry9c* (CBH351) ve *Cry3Bb1* (Mon863) genleri de genetik modifiye mısır oluşumunda kullanılan Cry genlerindedir. Dünya’ da bulunan genetik modifiye mısırlar en çok herbisite toleranslı, böcek dirençli veye erkek kısırlığına sahip mısırlardır (Aydın 2004). Çizelge 2.3’ de, bir kısmı bu tez kapsamında araştırılan ticari genetik modifiye GM mısır çeşitleri özetlenmiştir. EK 7’de ise diğer ticari genetik modifiye mısır çeşitleri verilmiştir.

Çizelge 2.2 Ticari bazı GM mısır çeşitleri (Anonymous 2007b)

Modifikasyon İsmi	Üretici Firma	Tanımlama
<b>BT176</b>	Syngenta Seeds Inc.	Böcek dirençli mısır; tarımda mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB ( <i>Ostrinia nubilalis</i> ) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir. <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. kurstaki’den elde edilen <b>CryIAb</b> geni içermektedir.
<b>T14,T25</b>	Bayer Crop Science (Aventis Crop Science (AgrEvo))	Aerobik bir aktinomiset olan <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ’ ten fosfotrisin N-asetiltransferaz ( <b>PAT</b> ) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
<b>BT11 (X4334CBR,X4734CBR)</b>	Syngenta Seeds Inc.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. kurstaki’den elde edilen <b>CryIAb</b> geni aktararak böcek dirençlilik kazandırılması için, <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ’ ten fosfotrisin asetiltransferaz ( <b>PAT</b> ) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
<b>CBH351</b>	Aventis Crop Science	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. tolworthi’den elde edilen <b>Cry9</b> geni aktararak böcek dirençlilik kazandırılması ve <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ’ ten fosfotrisin asetiltransferaz ( <b>PAT</b> ) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
<b>MON810</b>	Monsanto Şirketi	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. kurstaki’ nin HD1 suşundan türetilen ve bir insektisidal proteinin kesik (truncated) versiyonu olan <b>CryIAb</b> ’ yi üretmektedir. Mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB ( <i>Ostrinia nubilalis</i> ) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir.



### 2.8.1 Bt 176 mısır (SYN-EV176-9)

Ticari ismi NaturGard™ ve KnockOut™ olan Bt176 mısır, tarımda mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB (*Ostrinia nubilalis*) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir. Bu yeni bitkiler *Bacillus thuringiensis* subs. kurstaki' nin HD1 suşundan türetilen ve bir insektisidal proteinin kesik versiyonu olan Cry1Ab' yi üretmektedir. Bt 176 PAT (fosfotrisin-N-asetiltransferaz) enzimini kodlayan ve bir toprak bakterisi olan *Streptomyces hygroscopicus*' dan klonlanan bar genini eksprese etmesi için de genetik modifiye edilmiştir (Moens 2003).

PAT enzimi transforme edilmiş bitki hücrelerinin tanımlanmasında seçici marker olarak yararlı olduğu kadar, bir herbisid olan fosfotrisine dirençlilik göstermesi açısından da önemlidir. Fosfotrisin, glufosinat amonyum olarak da bilinmektedir ve Basta, Rely, Finale ve Liberty herbisitlerindeki aktif ingrediyenttir. PAT enzimi fosfotrisinin asetilasyonunu katalizleyerek, herbisidal aktivitesini elimine eder ve böylece onu toksik olmayan duruma getirir.

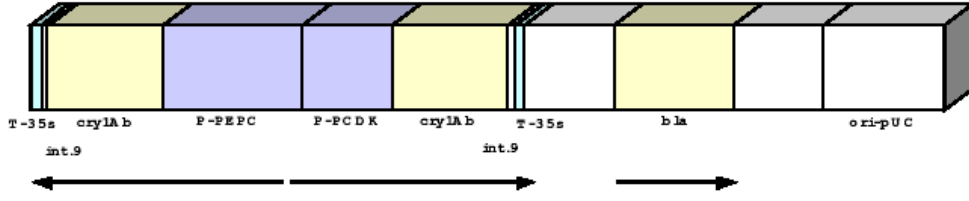
Event 176' dan ifade edilen Cry1Ab proteini gibi delta-endotoksinler seçici olarak hassas böcek türlerinin kuyruk sınırı orta bağırsak epitelyumlarındaki özel bölgelere bağlanarak aktivite gösterirler. Bağlanmanın ardından, katyon spesifik formlar şekil değiştirerek orta bağırsak iyon akışını tahrip eder ve böylece felç ve ölüme neden olur. Cry1Ab sadece lepidopteran böceklere etkilidir ve etkisi direkt olarak hedef böceklerdeki özgül bağlanma bölgelerinin bulunuşu ile ilgilidir. Memeli intestinal hücrelerinin yüzeyinde *Bacillus thuringiensis*' in delta endotoksinleri için bir bağlanma bölgesi yoktur ve bu yüzden çiftlik hayvanları ve insanlar bu proteine duyarlı değildir (Anonymous 2006a).

**Kullanım amacı:** Bt176 mısır insan tüketimi (kuru veya yaş öğütme veya tohum yağı olarak), yemek veya çiftlik hayvanları için slaj materyali olarak kullanılmak üzere üretilmektedir. Ancak; Bt 176 mısırın, geleneksel mısırın yetiştirildiği alanlarda üretilmesine izin verilmemektedir (Anonymous 2006a).

**Modifikasyon metodu:** Event176 iki plazmid ile yakın hat olan CG00526' nın mikropartikül bombardımanı (biolistik transformasyonu) ile üretilmiştir (Anonymous 2003c, 2007b). Plazmidlerden bir tanesi, her biri farklı promotör dizileri ile düzenlenmiş 3' kesik Cry1Ab geninin 2 kopyasını içermektedir (Moen 2003a). Doğal Cry1Ab proteininin N-terminal 648 amino asidini kodlayan diziliminden sorumlu olan Cry1Ab, bitki hücresindeki optimum ekspresyonu için modifiye edilmiştir.

Cry1Ab geninin bir kopyası, yeşil dokuda ekspresyonu için, fosfoenolpiruvat karboksilaz promotörü tarafından düzenlenirken diğer Cry1Ab geninin ifadesi mısırdan izole edilen bir polen spesifik promotör tarafından kontrol edilmektedir. Her iki gen karnabahar mozaik virüsünün 35S transkriptindeki 3' poliadenilasyon dizilerini kullanmaktadır. Bu plazmid, ayrıca bakteriyel bir promotörün kontrolü altındaki "bla" geninin kodladığı beta-laktamazın bir kopyasını da içermektedir. "Bla" geni bitki dokularında ifade edilmemektedir, ancak plazmid vektörlerin mevcudiyetini saptamak için izlenen bakteriyel kolonilerini seçmede kullanılmaktadır (Anonymous 2006a).

İkinci plazmid fosfinotrisin N-asetil transferaz (PAT) enzimini kodlayan ve bir toprak bakterisi olan *Streptomyces hygroscopicus*' tan elde edilen "bar" geninin bir kopyasını içermektedir. Bu enzim seçici marker olarak kullanılmaktadır ve glufosinat amonyum herbisidine karşı dirençlilik göstermesi için kullanılmaktadır. "Bar" geninin yapısal ifadesi CaMV 35S promotörün kontrolü altındadır. Bitki genomuna Cry1Ab ve PAT kodlayan dizilerden farklı olarak, başka bir bitkiye aktarılabılır DNA dizisi eklenmemiştir (Moen 2003a, Anonymous 2006a). Transformasyon için kullanılan yapılar (pCIB4431 ve pCIB3064) ve Bt176 ' nın sekans özellikleri, Şekil 2.9 ve Çizelge 2.4' de verilmiştir (Anonymous 2003c). Çizelge 2.5' de ise, Bt176 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti verilmiştir (Anonymous 2006a).



Şekil 2.9 Transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- pCIB4431 yapısı (bir pUC-derivatı plazmid) US-Patent-N<sup>0</sup> :6,121,014 (Anonymous 2003c)

Çizelge 2.3 Bt 176' nın sekans özellikleri

Kodu	Element-İsmi	Büyükük [KB]
T-35s	T-35s	0.16
int.9	intron 9	0.11
	Cry1Ab delta-endotoxin	1.94
P-PEPC	P-PEPC	2.31
P-PCDK	P-PCDK	1.49
	Cry1Ab delta-endotoxin	1.94
int.9	intron 9	0.11
T-35s	T-35s	0.16
Space	Space	-
bla	beta-lactamase	-

Çizelge 2.4 Bt176 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti

Kodu	İsmi	Tipi	Promotör, diğer	Terminatör	Kopya sayısı	Form
Cry1Ab	Cry1Ab delta-endotoksin <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. kurstaki HD1	IR	İlk kopya promotör, mısır fosfoenolpirüvat karboksilaz geni ve CaMV 35S terminatördendir. Ve ikinci kopya CaMV 35S terminatör ve bir mısır kalsiyum bağlı protein kinaz geninden türetilen bir promotörün düzenlenmesi altındaki ikinci kopyadır.	CaMV 35S poly(A) sinyal	2	Doğal
bar	Fosfotrisin-N-asetiltransferaz ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> )	SM	CaMV 35S	CaMV 35S poly(A) sinyal		
bla	Beta-lactamaz	SM	Bakteriyal promotör			Bitki dokularına transfer edilemedi

### 2.8.2 Bt11 mısır

Bt11 mısır, tarımda mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB (*Ostrinia nubilalis*) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir. Bu yeni bitkiler *Bacillus thuringiensis* subs. kurstaki' nin HD1 suşundan türetilen ve bir insektisidal proteinin kesik (truncated) versiyonu olan Cry1Ab' yi üretmektedir (Anonymous 2004b).

Bt11, PAT (fosfotrisin-N-asetiltransferaz) enzimini kodlayan ve bir toprak bakterisi olan *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 suşundan klonlanan bar genini eksprese etmesi için de genetik modifiye edilmiştir. PAT enzimi transforme edilmiş bitki hücrelerinin tanımlanmasında seçici marker olarak yararlı olduğu kadar, bir herbisid olan fosfotrisine dirençlilik göstermesi açısından da önemlidir (Anonymous 2008b). Fosfotrisin, gulufozinat amonyum olarak da bilinmektedir ve Basta, Rely, Finale ve Liberty herbisitlerindeki aktif ingrediyenttir. PAT enzimi fosfotrisinin asetilasyonunu katalizleyerek herbisidal aktivitesini elimine eder ve böylece onu toksik olmayan duruma getirir (Anonymous 2005b).

Bt11' den ifade edilen Cry1Ab proteini gibi delta-endotoksinler seçici olarak hassas böcek türlerinin kuyruk (brush) sınırı orta bağırsak epitelyumlarındaki özel bölgelere bağlanarak aktivite gösterirler. Bağlanmanın ardından, katyon spesifik formlar şekil değiştirerek orta bağırsak iyon akışını tahrip eder ve böylece felç ve ölüme neden olur. Cry1Ab sadece lepidopteran böceklere etkilidir ve onun etkisi direkt olarak hedef böceklerdeki özgül bağlanma bölgelerinin bulunuşuna bağlanabilir. Memeli intestinal hücrelerinin yüzeyinde *Bacillus thuringiensis*' in delta endotoksinleri için bir bağlanma bölgesi yoktur ve bu yüzden çiftlik hayvanları ve insanlar bu proteine duyarlı değildir (Anonymous 2005b).

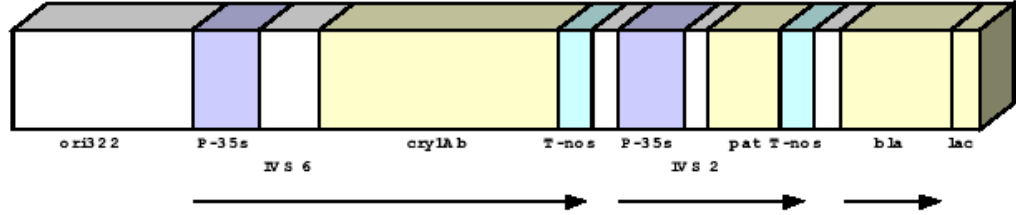
**Kullanım amacı:** Bt11 mısır, insan tüketimi (kuru veya yaş öğütme veya tohum yağı olarak), yemek veya çiftlik hayvanları için slaj materyali olarak kullanılmak üzere

üretilmektedir. Ancak; Bt 11 mısırın, geleneksel mısırın yetiştirildiği alanlarda üretilmesine izin verilmemektedir (Anonymous 2005b).

**Modifikasyon metodu:** Bt11 mısır, yakın akraba H8540 hattındaki bitki protoplastlarının direkt transformasyon işlemine tabi tutulması ve seçici bir ortamda tekrar üretilmeleri ile oluşturulmaktadır. Transformasyonda, Cry1Ab endotoksinini kodlayan, kesik ve sentetik tek bir Cry1Ab geni ve sentetik pat geni içerecek şekilde dizayn edilmiş pZO1502 tekli plazmiti kullanılmıştır. Pat geni glufosinat amonyumda transformantların seçimine izin vermektedir. Transformasyonda önce, Cry1Ab ve pat genlerini içeren DNA fragmentlerindeki bla genini uzaklaştırmak için plazmit vektör, restriksiyon endonükleaz *NotI* ile muamele edilir. Cry1Ab geni, bir 35S promotör ve NOS (nopalın sintaz)' un 3' poliadenilasyon sinyali tarafından kontrol edilmektedir. 35S promotör, mısır alkol dehidrojenaz 1S geninden elde edilen IVS6 intronu ile modüllendirilmiş bir CaMV' den türetilmiş olup, NOS' un 3' poliadenilasyon sinyali ise *A. tumefaciens*' den elde edilmiştir. Ayrıca N-asetil transferaz (PAT) enzimini kodlayan "pat" geni seçici marker olarak ve glufosinat amonyum herbisidine karşı dirençlilik göstermesi için kullanılmaktadır. Pat geninin yapısal ifadesi CaMV 35S promotörün, IVS2 intronu ve NOS 3' terminatörün kontrolü altındadır (Anonymous 2008b).

PZO1502 plazmiti, transformasyona uğramış bakteri hücrelerinin izlenebilmesi için seçici markır olarak kullanılan beta laktamaz (bla) genini de ihtiva etmektedir. Bla geni, aralarında orta düzey spektruma sahip penisilin ve ampisilin antibiyotiklerinin bulunduğu bazı beta-laktam antibiyotiklerine dirençlilik sağlayan beta-laktamaz enzimini kodlamaktadır. PZO1502 plazmiti içeren bakteriler ampisiline dirençlilik göstermelerine göre seçilmektedir. Bla geni mısır dokularına transformasyondan önce plazmit vektörden çıkarılmaktadır. Diğer genetik elementler beta-galaktosidazın bir kısmını kodlayan ve fonksiyonel olmayan lacZ geni ve ayrıca pBR322 plazmitinden türetilen replikasyonun PUC orjini ile ilgilidir. Transformasyonu takiben bitkiler yeniden yetiştirilmiş ve Bt 11 transformasyonundan türetilen mısır bitkilerinin (*Zea mays* L.) polenleri, yakın akraba mısır hatlarının dışı bitkileri ile tozlaşmasında kullanılmıştır. İlk çaprazlamaya ait soylar Bt11 taşıyan farklı mısır hatları oluşturmak

için başarılı bir şekilde geri çaprazlanmıştır. Bt11 mısırdan çeşitli hibrit mısır varyeteleri türetilmektedir. Transformasyon için kullanılan yapı (*pZO1502*) Şekil 2.10’ da gösterilmektedir. Bt11’ in sekans özellikleri Çizelge 2.6’ de, Bt11 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti ise Çizelge 2.7’ de verilmiştir (Anonymous 2005b, 2008b).



Şekil 2.10 Transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- (*pZO1502*)  
US-Patent-Nº: 6,114,608 (Anonymous 2003c)

Çizelge 2.5 Bt 11’ in sekans özellikleri

	Element-İsmi	Büyükük [KB]
ori322	ori322	-
P-35s	P-35s	0.514
IVS 6	intervening sequence 6	0.472
	Cry1Ab delta-endotoxin	1.84
T-nos	T-nos	0.27
Space	Space	-
P-35s	P-35s	0.42
IVS 2	intervening sequence 2	0.178
	phosphinothricin acetyltransferase (PAT) 0.558	
T-nos	T-nos	0.22
Space	Space	-
bla	beta-lactamase	-
lac	beta-galactosidase	-

Çizelge 2.6 Bt11 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti

Kodu	İsmi	Tipi	Promotör, diğer	Terminatör	Kopya sayısı	Form
PAT	Fosfinotrisin-N-asetiltransferaz ( <i>Streptomyces viridochromogenes</i> )	SM	CaMV 35S Mısır alkol dehidrojenaz genindeki IVS2 intronu	A. <i>tumafaciens</i> nopalın sintaz (nos) 3' poliadenilasyon sinyali	1	Zenginleştirilmiş ekspresyon için modifiye edilmiştir.
Cry1 Ab	Cry1Ab delta-endotoksin <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. kurstaki HD1	IR	CaMV 35S Mısır alkol dehidrojenaz genindeki IVS2 intronu.	A. <i>tumafaciens</i> nopalın sintaz (nos) 3' poliadenilasyon sinyali	1	Kesik, modifiye

### 2.8.3 MON810 mısır

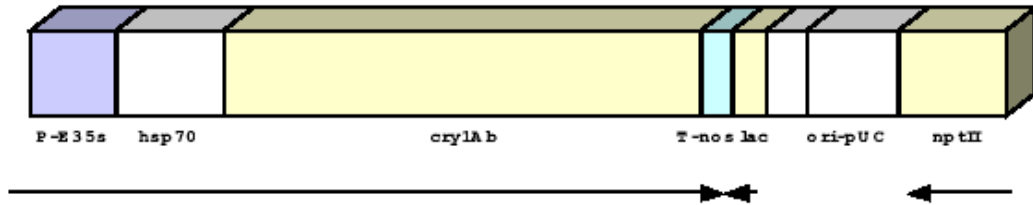
Ticari ismi YieldGard™ olan Mon810 mısır, tarımda mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB (*Ostrinia nubilalis*) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir. Bu yeni bitkiler *Bacillus thuringiensis* subs. kurstaki'nin HD1 suşundan türetilen ve bir insektisidal proteinin kesik (truncated) versiyonu olan *Cry1Ab*'yi üretmektedir (Moen 2003b).

Mon810' dan ifade edilen *Cry1Ab* proteini gibi delta-endotoksinler seçici olarak hassas böcek türlerinin kuyruk sınırı orta bağırsak epitelyumlarındaki özel bölgelere bağlanarak aktivite gösterirler. Bağlanmanın ardından, katyon spesifik formlar şekil değiştirerek orta bağırsak iyon akışını tahrip eder ve böylece felç ve ölüme neden olur. *Cry1Ab* sadece lepidopteran böceklere etkilidir ve onun etkisi direkt olarak hedef böceklerdeki özgül bağlanma bölgelerinin bulunmasına bağlanabilir. Memeli intestinal hücrelerinin yüzeyinde *Bacillus thuringiensis*' in delta endotoksinleri için bir bağlanma bölgesi yoktur ve bu yüzden çiftlik hayvanları ve insanlar bu proteine duyarlı değildir (Moen 2003b, Anonymous 2005c).

**Kullanım amacı:** Mon810 mısır, insan tüketimi (kuru veya yaş öğütme veya tohum yağı olarak), yemek veya çiftlik hayvanları için slaj materyali olarak kullanılmak üzere

üretilmektedir. Ancak; Mon810 mısırın, konvansiyonel mısırın yetiştirildiği alanlarda üretilmesine izin verilmemektedir (Anonymous 2005b, Anonymous 2007c).

**Modifikasyon metodu:** Mon810 mısır PV-ZMBK07 ve PV-ZMGT10 plasmid DNA'larının bir karışımı ile Hi-II genotipine sahip mısırın mikropartikül bombardımanı (biolistik transformasyonu) ile üretilmiştir (Anonymous 2003c, Anonymous 2007b). PV-ZMBK07 *CryIAb* geni içerirken, PV-ZMGT10 plasmidi, CP4 EPSPS ve *gox* genleri içermektedir. Her iki plazmit de, bakterilerdeki plazmitlerin replikasyonu için gerekli bir PUC (ori-PUC) plazmitinin içerdiği replikasyon orijini ve bakteriler ile plazmitlerinin seçimi için gerekli ve bir bakteriyel bir promotörün kontrolü altındaki *nptII* geni içermektedir (Anonymous 2005c). Şekil 2.11' de, Mon810 mısırın transformasyonu için kullanılan DNA yapısının linear haritası- PV-ZMBK07 yapısı gösterilmektedir. Çizelge 2.8' de Mon810 mısır sekans özellikleri, Çizelge 2.9' da ise Mon810 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti verilmiştir (Anonymous 2003c).



Şekil 2.11 Transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- PV-ZMBK07 US-Patent- US-Patent-N°: 5,689,052 (Anonymous 2003c).

Çizelge 2.7 Mon810' nun sekans özellikleri

Kısaltma	Element-İsmi	Büyükük[KB]
P-E35s	P-E35s	0.61
hsp70	heat-shock protein 70	0.8
	CryIAb delta-endotoxin	3.46
T-nos	T-nos	0.26
lac	beta-galactosidase	0.24
Space	Space	-
ori-pUC	ori-pUC	0.65
nptII	neomycin phosphotransferase	0.79



Çizelge 2.8 Mon810 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti

Kodu	İsmi	Tipi	Promotör, diğer	Terminatör	Kopya sayısı	Form
Cry1Ab	Cry1Ab delta-endotoksin <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. kurstaki HD1	IR	Zenginleştirilmiş CaMV 35S mısır HSP70 intron	Yok İntegrasyon sırasında 3' ucuna doğru kayboluyor	1	Kesik form

#### 2.8.4 T25 mısır (ACS-ZMQQ3-2)

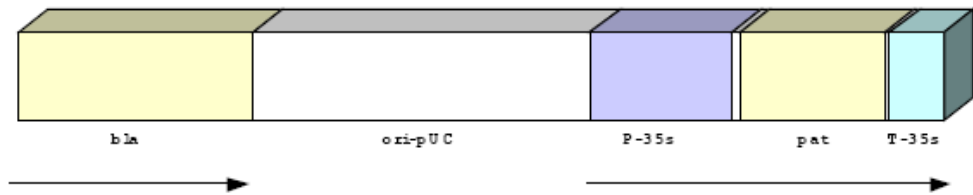
T25 mısır glufosinat amonyuma tolerans göstermesi amacıyla üretilmiştir. T25 mısırdaki glufosinat toleranslılığı, yaygın bir toprak aktinomiseti olan *Streptomyces viridochromogenes*' ten elde edilen ve fosfotrisin-N asetil transferaz (pat) enzimini kodlayan bir genin aktarılmasıyla sağlanır. Ayrıca, glufosinat da aynı organizmadan izole edilmiştir. Pat enziminin her hangi bir toksik özelliğinin varlığı bilinmemektedir (Bunning 1995).

Glufosinat amonyum Basta, Rely, Finale ve Liberty gibi bazı firmalar tarafından üretilen fosfotrisin herbisitlerinin aktif ingrediyevidir. Aslında, glufosinat kimyasal olarak glutamat amino asidine benzemektedir ve onun gibi davranır. Glutamat molekülü, normalde glutamin oluşturulması amacıyla glutamin sintaz enzimi tarafından kullanılır. Ancak; glukofosinat varlığında, glutamin sintaz enzimi, glutamat yerine glukofosinat molekülünü kullandığı için glutamin oluşturamaz ve genel aktivitesi önlenmiş olur. Glutamin sintaz amonyum detoksifikasyonuna da katılmaktadır. Glukofosinatın etkisiyle glutamin seviyesi azalacağından, buna bağlı olarak önce bitki dokularındaki amonyak konsantrasyonunda artış olur ve bu yüzden hücre membranı parçalanarak bitki solması ve ölümüne neden olan fotosentez durması gerçekleşir (Anonymous 2006b).

**Kullanım amacı:** Tane ve silaj için sarı diş tipi mısır üretiminde kullanılmaktadır. Ancak; T25 mısırın, geleneksel mısırın yetiştirildiği alanlarda üretilmesine izin verilmemektedir (Anonymous 2006b).

**Modifikasyon metodu:** T25 mısır, kimyasal yöntem ile direkt transformasyon işleme tabi tutulan sarı diř mısırdan elde edilen ve PAT geni içeren protoplastların kùltüre alınmasıyla üretilmiştir. Transformasyona uğratılan hücre kolonileri glufosinat amonyum içeren bir ortama aktararak, transformasyona uğratılan hücreler seçilmiştir. Daha sonra birincil transformantlar sarı diř mısır tipinin patentli ve ticari yakın akraba hatları ile geri çaprazlanmıştır. T25 transformantlara eklenen pat geni, pat enziminin amino asit dizisini değiştirmeden, ekspresyonu optimize edilmesi amacıyla modifiye edilmiştir (Anonymous 2006b).

T25, ayrıca seçici markır olarak beta laktamaz (bla) geni ihtiva eder. Bla geni orta spektrumlu penisilin ve amfisilin gibi bazı beta-laktam antibiyotiklere dirençlilik sağlayan bir beta-laktamaz enzimini kodlamaktadır (Bunning 1995). Bla geninin promotörü sadece bakterilerde aktif olduğu için modifiye mısır hatlarında aktif değildir (Anonymous 2006b). şekil 2.12' de T25 mısırın transformasyonu için kullanılan DNA yapısının linear haritası- P35S/Ac yapısı gösterilmektedir (Anonymous 2003c). T25 mısır sekans özellikleri Çizelge 2.10' de, Mon810 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti ise Çizelge 2.11' de verilmiştir.



şekil 2.12 T25 mısırdaki transformasyon için kullanılan DNA yapısının linear haritası- P35S/Ac (Anonymous 2003c)

Çizelge 2.9 T25' in sekans özellikleri

Kısaltma	Element-İsmi	Büyükük[KB]
bla	Beta-laktamaz	0.86
ori-pUC	ori-pUC	2.63
P-E35s	P-E35s	0.52
Space	Space	0.029
pat	fosfinotrisinasetiltransfer az	0.53
Space	Space	0.019
T-35s	T-35s	0.2

Çizelge 2.10 T25 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti

Kodu	İsmi	Tipi	Promotör, diğer	Terminatör	Kopya a sayısı	Form
pat	Cry1Ab delta- endotok sin <i>Bacillus thuringi ensis</i> subs. kurstaki HD1	IR	İlk kopya promotör, mısır fosfoenolpirüvat karboksilaz geni ve CaMV 35S terminatördendir. Ve ikinci kopya CaMV 35S terminatör ve bir mısır kalsiyum bağlı protein kinaz geninden türetilen bir promotörün düzenlenmesi altındaki ikinci kopyadır.	CaMV 35S poly(A) sinyal	1	Modifiye veya zenginleştirilmi ş ekspresyon; PEG ortamında bitki protoplastlarının içine alınıyor.
bla	Beta- lactama z	SM	Bakteriyal promotör			Kesik beta laktamaz geni- 5' ucuna doğru genin %25' i kayıp ve eksprese edilmiyor.

### 2.8.5 CBH351 mısır (ACS-ZMQQ4-3)

Ticari ismi Starlink™ olan CBH351 mısır, *Bacillus thuringiensis* subs. *tolworthi*'nin BTS02618 suşundan elde edilen Cry9 geni aktarılarak, tarımda mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB (*Ostrinia nubilalis*) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması ve *Streptomyces viridochromogenes*' ten ise fosfinotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir (Bucchini and Goldman 2002).

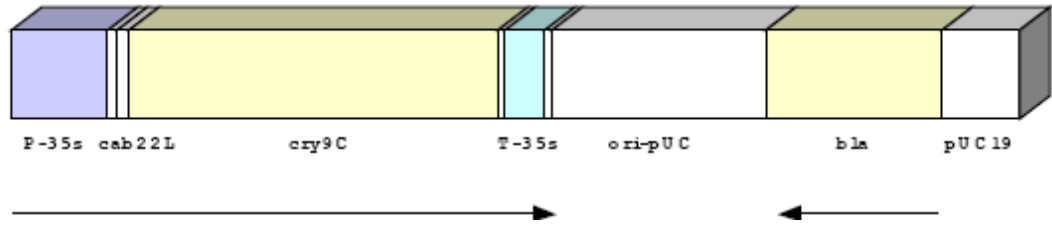
CBH351' den ifade edilen Cry9 proteini gibi delta-endotoksinler seçici olarak mısırın yemlik değerini etkileyen lepidopteran böcek türü olan ECB larvalarının kuyruk (brush) sınırı orta bağırsak epitelyumlarındaki özel bölgelere bağlanarak aktivite gösterirler. Bağlanmanın ardından, katyon spesifik formlar şekil değiştirerek orta bağırsak iyon akışını tahrip eder ve böylece felç ve ölüme neden olurlar. Cry1Ab sadece lepidopteran böceklere etkilidir ve onun etkisi direkt olarak hedef böceklerdeki özgül bağlanma bölgelerinin bulunmasına bağlanabilir. Memeli intestinal hücrelerinin yüzeyinde *Bacillus thuringiensis*' in delta endotoksinleri için bir bağlanma bölgesi yoktur ve bu yüzden çiftlik hayvanları ve insanlar bu proteine duyarlı değildir (Anonymous 2001).

PAT enzimi ise transformasyona uğramış bitki hücrelerinin tanımlanmasında seçici marker olarak yararlı olduğu kadar bir herbisid olan fosfonotrisine dirençlilik göstermesi açısından da önemlidir. Fosfonotrisin, glufozinat amonyum olarak da bilinmektedir ve Basta, Rely, Finale ve Liberty herbisitlerindeki aktif ingrediyenttir. PAT enzimi fosfonotrisinin asetilasyonunu katalizleyerek herbisidal aktivitesini elimine eder ve böylece onu toksik olmayan duruma getirir (Anonymous 2001).

**Kullanım amacı:** CBH351 mısır, çiftlik hayvanları için yemek veya slaj materyali olarak kullanılmak üzere üretilmektedir. Ancak; CBH351 mısırın, geleneksel mısırın yetiştirildiği alanlarda üretilmesine izin verilmemektedir (Anonymous 2001, Anonymous 2008c).

**Modifikasyon metodu:** CBH351 mısır, PUC19 temelli plazmitlerden olan PV-ZMBK07 ve PV-ZMGT10 plazmid DNA' larının bir karışımı ile (PA91xH99)xH99 hibrit mısırın mikropartikül bombardımanı (biolistik transformasyonu) ile üretilmiştir (Anonymous 2001, Anonymous 2003c). Her iki plazmit de modifiye Cry9C ve bar genlerini içermektedir. Cry9C ve bar genleri, bitkilerin çoğunda onları devamlı olarak ve yüksek seviyelerde eksprese edebilen, kodlanmamış (noncoding) düzenleme dizilerine eklenir. Özellikle modifiye Cry9C geni petunyadaki cab22L geninin lider dizisi ile CaMV' nin 35S transkripsiyonuna ait promotör ve terminatör dizileri ile düzenlenmektedir. Ayrıca, bar geninin ekspresyonu terminasyon transkripsiyonu ve

poliadenilasyon içeren *A. tumefaciens*' in NOS geninin sahip olduğu 3' tranlasyon bölgesi ile birlikte 35S CaMV promotör tarafından yönetilmektedir. Bu regulatör bölgelerin bir çoğu bitki patojenlerinden türetilmesine rağmen düzenleyici diziler, düzenleme için dizayn edilen genler ile veya kendi başlarına bitki hastalıklarına sebep olmazlar. Ayrıca; transformasyona katılan plazmitteki genetik elementler ampisilin dirençlilik geni, beta-laktamaz (bla) ve enterik bir bakteri olan *E. coli*' deki her iki replikasyon başlangıcını (ori) içermektedir. Her ikisi de, CBH351 mısıra aktarılmasına rağmen, bitkilerde fonksiyonel değildir. Bla geni, transforme olmuş *E. coli* konukçu bakterilerin saptanabilmesi için seçici markır olarak yalnızca plazmitlerde bulunmaktadır (Anonymous 2001). Şekil 2.13' de, CBH351 mısırın transformasyonu için kullanılan DNA yapısının linear haritası- pRVA9909 yapısı gösterilmektedir. CBH351 mısır sekans özellikleri Çizelge 2.12' de, CBH351 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti ise Çizelge 2.13' de verilmiştir.



Şekil 2.13 CBH351 mısırın transformasyonu için kullanılan DNA yapısının linear haritası- pRVA9909 yapısı (Anonymous 2003c)

Çizelge 2.11 CBH351 mısır sekans özellikleri

Kodu	Element-İsmi	Büüklük[KB]
P-E35s	P-E35s	0.52
Cab22L	Cab22L	0.059
Cry9C	Cry9C delta-endotoxin	1.9
T-35s	T-35s	0.2
ori-pUC	ori-pUC	1.1
bla	Beta-laktamaz	0.9
PUC19	PUC19	0.4

Çizelge 2.12 CBH351 mısıra eklenen genetik elementlerin özeti (Anonymous 2001)

Kodu	İsmi	Tipi	Promotör, diğer	Terminatör	Kopya sayısı	Form
Cry9C	Cry9C delta-endotoksin <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>tolworthi</i>	IR	CaMV 35S; Petunya hibritlerinin lider dizisi	CaMV 35S poly(A) sinyali	≥4	Kesik N-, C-terminal
bar	Fosfinotrisin-N-asetiltransferaz ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> )	HT	CaMV 35S	A. <i>tumafaciencie</i> nopalin sintaz (nos) 3' poliadenilasyon sinyali	≥1	
	Beta-lactamaz	SM	Bakteriyal promotör			Bitki dokularına transfer edilemedi

## 2.9 Halkın Katılımı ve Eğitimi

Genetik Mühendisliği'nin çevre ve insan sağlığına sebep olduğu muhtemel zararlar son derece ciddi boyuttadır ve halka, özellikle de halk tanımlamasının bir parçası kabul edilen bilim insanlarına, bu bilgiyi açıklamak şarttır (Lin 2005). Çünkü; mevcut sorunlara çözüm üretmek ve olası sorunları önleyebilmek için bilim adamları şüphesiz kilit rol oynayacaktır.

Biyogüvenlik protokolü sadece yasal düzenlemeleri kapsamamakta, aynı zamanda yasal düzenlemelerin anlaşılabilirliği ve sağlıklı platformlarda tartışılabilirliği için gerekleri düzenlemelerin hayata geçirilmesini de garanti altına almayı amaçlamaktadır. Bunu sağlamada en etkili yol halkın katılımı ve eğitimini içeren ve halkın bu konudaki farkındalığını artıracak bir mekanizma oluşturulmasıdır (Ling and Lin 2005).

Biyogüvenlik Protokolününün 23. maddesinin uygulanmasında taraflar, kendi yasalarının dizaynı ve uygulama evrelerinde halk katılımını sağlamak için Genetik Mühendisliğinin teknolojik değerlendirmelerinin iletimini sağlayacak ulusal bir sistem geliştirmek zorundadır (Ling ve Lin 2005). Biyogüvenlik; etik, sosyo-ekonomik, sürdürülebilirlik ve politik alanları da kapsayan karmaşık bir konudur ve bu konuların her biri halkın bilgisine sunulmalıdır. Ayrıca, halkın ne yediğini bilmeye hakkı vardır ve bunu

sağlamada etiketleme büyük önem arz eden konulardan biridir (Baran ve Özçelik 2007). Bu yüzden, genetik modifiye ürünler mutlaka etiketlenmelidir.

Türkiye’ de halkın eğitimi ve katılımı ile ilgili etkin bir mekanizma oluşturulmasında tüketiciler, gönüllü kuruluşlar (bilimsel dernekler), meslek odaları/birlikleri (sendikalar), özel sektör, çiftçiler, sanayiciler, üniversiteler, medya ve yerel yönetimlerin yanı sıra, özellikle kamu kuruluşlarına büyük görev düşmektedir. En kısa zamanda öngörülen çalışmalar tamamlanıp, ilgili yasa ile bu sistemin devamlılığı sağlanmalıdır. Özellikle, en etkili grup olan tüketicilerin konu hakkında bilinçlenmesi, tüketici talepleri doğrultusunda, ülkenin yasal düzenlemelerinin gelişmesinde de büyük rol oynayacaktır. Çapraz bulaşma, genetiği değiştirilmiş bitkilerin endemizme etkisi gibi bazı konularda çeşitli bilimsel çevrelerin görüşlerine ihtiyaç duyulacağı gibi, yasadışı tohum ithalinin önlenmesinde üreticiye de büyük görev düşecektir. Çünkü; salt tazminatlar, gen kaçışı ile doğada meydana gelebilecek herhangi bir tahribatı geri getiremeyecektir (Baran ve Özçelik 2008).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Örnekleme

Materyal olarak işlenmemiş yemlik tane mısır, yarı işlenmiş ve çok işlenmiş mısır numuneleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Yemlik tane mısırlar Yem Sanayicileri Birliği tarafından ithal edilen ve Türkiye' nin çeşitli bölgelerinde yetişen yerli çeşitlerden seçilmiştir. Yarı işlenmiş ve çok işlenmiş mısır örnekleri ise yerel süper marketlerden satın alınan yerli ve ithal mısır örneklerinden oluşmaktadır. Örnekler, Nisan 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında bir yıl boyunca (3' er aylık dönemlerde 4 kez) toplanmış olup, aynı dönemde alınan örneklerin farklı markalardan seçilmesine özen gösterilmiştir.

Örneklemede Kay ve Paoletti (2001)' in önerdiği yöntemler kullanılmıştır. İşlenmiş örneklerin tamamı önce öğütülmüş daha sonra homojenize edilmiştir. Binomial tarzda homojenize edilen örneklerde % 1' den düşük GM konsantrasyonuna sahip ürünlerin % 95 güvenilirlikte saptanabilmesi için 299 mısır tanesi gerekmektedir (Lipp and Anklam 2002). Bu yüzden, işlenmemiş örneklerde, 1 kg yemlik tane mısırı temsilen en az 300 mısır tanesi rastgele seçilerek blender' da un haline gelene kadar homojenize edilmiştir. Öğütme işleminin etkinliği arttıkça ekstraksiyon ajanlarının etki etme alanı da arttığı için (Guerra 2005), büyük parçalar mümkün olduğunca toz haline getirilmiştir. Homojenize edilen mısır taneleri iyice karıştırılmıştır. Homojenizasyon işlemi mısır gevreği ve mısır cipsi örneklerine de uygulanmıştır.

Parçalama esnasında, 121 °C' de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş ekipmanlar kullanılmıştır. Homojenizasyon işleminden sonra örnekler steril cam şişelerde paketlenerek etiketlenmiş ve daha sonra kullanmak amacıyla +4 °C' de saklanmıştır. Analiz edilen örnekler Çizelge 3.1' de verilmektedir. Örneklerin proses dereceleri ile DNA izolasyonu/PCR amplifikasyonları arasında ilişki olabileceği için, ürünlerin proses aşamaları dikkate alınmıştır.



Çizelge 3.1 İşlenmiş ve işlenmemiş mısır örnekleri

Örnek Sayısı	Örnek Kodu	Örnek Cinsi	Orijini	Alındığı Yer	Alındığı Dönem
1	MY1	Yemlik Tane Mısır	İthal Mısır(T.E*)	Ankara	1. Dönem
2	MY2	Yemlik Tane Mısır	İthal Mısır(T.E*)	Ankara	1. Dönem
3	MY3	Yemlik Tane Mısır	İthal Mısır(T.E*)	Ankara	1. Dönem
4	MY4	Yemlik Tane Mısır	İthal Mısır(T.E*)	Ankara	1. Dönem
5	MU1	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
6	MU2	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
7	MU3	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
8	MU4	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
9	MNiŞ1	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
10	MNiŞ2	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
11	MNiŞ3	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
12	MNiŞ4	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
13	MC1	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
14	MC2	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
15	MC3	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
16	MC4	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
17	MG1	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
18	MG2	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
19	MG3	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
20	MG4	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	1. Dönem
21	MY5	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Gaziantep	2. Dönem
22	MY6	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Samsun	2. Dönem
23	MY7	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Adana	2. Dönem
24	MY8	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Adapazarı	2. Dönem
25	MU5	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
26	MU6	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
27	MU7	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
28	MU8	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
29	MNiŞ5	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
30	MNiŞ6	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
31	MNiŞ7	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
32	MNiŞ8	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
33	MC5	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
34	MC6	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
35	MC7	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
36	MC8	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
37	MG5	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
38	MG6	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
39	MG7	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	2. Dönem

Çizelge 3.1 İşlenmiş ve işlenmemiş mısır örnekleri (devam)

Örnek Sayısı	Örnek Adı	Örnek Cinsi	Orijini	Alındığı Yer	Alındığı Dönem
40	MG8	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	2. Dönem
41	MY9	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Kayseri	3. Dönem
42	MY10	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Edirne	3. Dönem
43	MY11	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	İzmir	3. Dönem
44	MY12	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Adana	3. Dönem
45	MU9	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
46	MU10	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
47	MU11	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
48	MU12	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
49	MNİŞ9	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
50	MNİŞ10	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
51	MNİŞ11	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
52	MNİŞ12	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
53	MC9	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
54	MC10	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
55	MC11	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
56	MC12	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
57	MG9	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
58	MG10	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
59	MG11	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
60	MG12	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	3. Dönem
61	MY13	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Çorum	4. Dönem
62	MY14	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Gaziantep	4. Dönem
63	MY15	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Kayseri	4. Dönem
64	MY16	Yemlik Tane Mısır	Türkiye (Yerli çeşit)	Adana	4. Dönem
65	MY17	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Manisa	4. Dönem
66	MY18	Yemlik Tane Mısır	Ukrayna	Ankara	4. Dönem
67	MY19	Yemlik Tane Mısır	Türkiye	Adana	4. Dönem
68	MU13	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
69	MU14	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
70	MU15	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
71	MU16	Mısır Unu	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
72	MNİŞ13	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
73	MNİŞ14	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
74	MNİŞ15	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
75	MNİŞ16	Mısır Nişastası	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
76	MC13	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
77	MC14	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
78	MC15	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
79	MC16	Mısır Cipsi	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
80	MG13	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
81	MG14	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
82	MG15	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	4. Dönem
83	MG16	Mısır Gevreği	(T.E*)	Ankara	4. Dönem

\*TE: Tespit Edilemedi

Ham madde olarak kullanılan mısır (ların) türü ve yetiştirildiği ülke bilinmediği için, işlenmiş mısır ürünlerinin orijini Çizelge 3.1’ de “tespit edilemedi” şeklinde belirtilmiştir.

### 3.2 Sertifikalı Referans Materyaller (CRM’ ler)

Sertifikalı referans materyaller (Certified Reference materials-CRM) Avrupa Birliği (AB) Institute for Reference Materials and Measurements ve European Reference Materials (IRMM, ERM) tarafından üretilmiştir. Bt 176 mısır, Bt 11 mısır ve MON 810 mısır olmak üzere üç farklı CRM kullanılmıştır.

Bu ürünler, farklı oranlarda GM ürün içeren soğukta kurutulmuş homojenize unlardır. Argon gazı atmosferi altında yaklaşık 1 g halinde cam şişelerde paketlenmektedir. CRM’ ler kuru, karanlık ve serin (+4C) ortamlarda muhafaza edilmektedir. Çizelge 3.2’ de kullanılan CRM’ ler ve oranları verilmektedir.

Çizelge 3.2 Bt176 mısır, Bt 11 mısır ve MON 810 mısır’ların CRM’ leri

Sertifikalı Referans Materyaller	Ürün Kodu
% 0 Bt176 mısır (w/w)	ERM®-BF411a
% 0.1 Bt176 mısır (w/w)	ERM® BF411b
%0.5 Bt176 mısır (w/w)	ERM® BF411c
%1 Bt176 mısır (w/w)	ERM® BF411d
%2 Bt176 mısır (w/w)	ERM® BF411e
% 5 Bt176 mısır (w/w)	ERM® BF411f
% 0 Bt 11 mısır (w/w)	ERM®-BF412a
% 0.1 Bt 11 mısır (w/w)	ERM® BF412b
%0.5 Bt 11 mısır (w/w)	ERM® BF412c
%1 Bt 11 mısır (w/w)	ERM® BF412d
%2 Bt 11 mısır (w/w)	ERM® BF412e
% 5 Bt 11 mısır (w/w)	ERM® BF412f
% 0 MON 810 mısır (w/w)	ERM®-BF413a
% 0.1 MON 810 mısır (w/w)	ERM® BF413b
%0.5 MON 810 mısır (w/w)	ERM® BF413c
%1 MON 810 mısır (w/w)	ERM® BF413d
%2 MON 810 mısır (w/w)	ERM® BF413e
% 5 MON 810 mısır (w/w)	ERM® BF413f

### 3.3 İşlenmiş ve İşlenmemiş Ürünlerden DNA ekstraksiyonu

Bu amaçla 3 farklı DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır; CTAB yöntemi, Roche-High Pure DNA Isolation Kit, Sure Food – Prep Plant X DNA Isolation Kit.

#### 3.3.1 CTAB yöntemi

Bazı işlenmiş ve işlenmemiş mısır örneklerinin DNA izolasyonunda Rogers ve Bendich (1985)'in yöntemi kullanılmıştır. 100 mg'lık un haline getirilerek homojenize edilmiş örnek 1.5 mL'lik steril bir reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 300 µL steril deiyonize su eklenerek vortex ile karıştırılmıştır. Sonra üzerine 500 µL CTAB-Buffer ekleniş ve vortex ile tekrar karıştırılmıştır. Daha sonra 20 µL Proteinaz K (20 mg/ml) eklendikten sonra karıştırılmış ve 65 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. İlk inkübasyondan sonra 20 µL RNase A (10 mg/ml) eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 5 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından tüpler 13000 rpm'de, 10 dakika Hettich (Micro 22R)'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı 500 µL kloroform/isoamilalkol (24/1) içeren bir tüpe eklemiştir ve 30 sn karıştırılmıştır. Tüpler 13000 rpm'de, 10 dakika santrifüjlenerek faz ayrımı sağlanmış ve üst tabaka yeni bir reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. 2 hacim (çektığımız üst tabaka çözeltinin 2 katı) CTAB Precipitation çözeltisi eklenip, pipet ile iyice karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından tüpler 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Pelet oluşumunu sağlamak için 13000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Pelet 350 µL NaCl (1.2 M)'de çözündürülmüş, çözündürülen pelet üzerine 350 µL kloroform:isoamilalkol (24:1) karışımı eklenerek 30 sn karıştırılmıştır. Sonra tüpler faz ayrılana kadar (yaklaşık 10 dakika) 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Nükleik asidin çöktürülmesi amacıyla (precipitation) üst tabaka yeni bir reaksiyon tüpüne aktarılıp, 0.6 hacim izopropanol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tüpler 13000 rpm'de, 10 dakika yeniden santrifüjlenerek, süpernatant atılmıştır. Pelet kısmına % 70'lik etanol çözeltisinden 500 µL eklenip, dikkatlice karıştırılmıştır. Tüpler 13000 rpm'de, 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant tekrar atılmıştır. Pelet içindeki etanolün tamamen uçurulmasını sağlamak amacıyla, oda sıcaklığında bırakılarak kurutulmuştur. Toplanan

pelet 100 µL steril deiyonize suda tekrar çözüldürülmüştür (Somma 2003). Sonuçta saflaştırılmış template DNA elde edilmiştir.

Elde edilen DNA, daha sonra kullanmak amacıyla -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

### **3.3.2 Roche-High Pure DNA Isolation Kit ile DNA izolasyonu**

Un haline getirilmiş 200 mg' lık homojenize örnek 2 mL' lik steril bir reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 1000 µL Extraction Buffer eklenerek vortex ile 30 sn karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti 80 °C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler 12000 g'de, 10 dakika Hettich (Micro 22R)' de santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı 400 µL Binding buffer içeren bir tüpe eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sonra 80 µL Proteinaz K (20 mg/mL) eklenmiş ve karıştırılıp, 5 dakika, 72 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından 200 µL isopropanol alkol eklenerek iyice karıştırılmıştır. Bu karışımdan 650 µL alınarak Collection tüp içine yerleştirilen High Pure Filter tüpe yüklenmiştir. High Pure Filter Tüp 5000 g' de, 1 dk santrifüj edilmiştir. Collection tüpe geçen miktar atıldıktan sonra 450 µL Wash Buffer eklenmiştir 1 dakika süre ile 5000 g' de santrifüjlenerek alttaki kısım atılmıştır. Bu işlem tekrarlanmak suretiyle 2. kez yıkama yapılmıştır. Bundan sonra tüpler 10 saniye süre ile 13000 g'de santrifüjlenerek Wash Buffer' ın tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra collection tüp atılıp, filter tüp yeni bir reaksiyon tüpünün içine yerleştirilmiştir. Üzerine 70 °C'de dengeye getirilen 30-100 µL elution buffer ekleniş ve 1 dakika süre ile 5000 g' de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonuçta, saflaştırılmış template DNA elde edilmiştir.

Elde edilen DNA, daha sonra kullanmak amacıyla -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

### 3.3.3 Sure Food–Prep Plant X DNA Isolation Kit ile DNA izolasyonu

Çok işlenmiş ürünlerden bazıları, üretici firma tarafından hazırlanmış protokole göre izole edilmiştir. Un haline getirilmiş 200 mg'lık homojenize örnek 2 mL'lik steril bir alıcı tüp (yeşil) içine aktarılmıştır. Üzerine 580 µL Lysis Buffer (kit kodu L) ve 20 µL Proteinaz K (kit kodu K) eklenip kısa süre karıştırılmıştır. Sonra 65 °C' de 30 dk inkübe edilmiş ve homojen örneğe 40 µL (10mg/ml) RNAse ilave edilmiştir. Çözelti 12000 rpm'de (küçük santrifüjde), 2 dk santrifüj edilmiştir. Yeni bir 2 mL'lik alıcı tüp (yeşil) alınarak içine filtre yerleştirilmiştir. Filtreye 400 µL sıvı süpernatant ilave edilmiştir. Alıcı tüp 12000 rpm'de, 2 dk filtre ile santrifüj edilmiştir. Filtrata 200 µL Binding Buffer (kit kodu B) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Yeni 2 mL'lik bir alıcı tüpe (yeşil) filtre yerleştirilmiştir. Yeni filtre içine hazırlanan çözelti eklenmiştir. Çözelti 12000 rpm'de (küçük santrifüjde), 2 dk santrifüj edilmiştir. Filtrat atılmış ve alıcı tüpe filtre tekrar yerleştirilmiştir. Filtreye 550 µL Pre-Wash Buffer eklenmiş ve 12000 rpm'de (küçük santrifüjde), 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtrat atılmış ve filtre aynı alıcı tüpe yerleştirilmiştir. Filtreye daha sonra 550 µL Wash Buffer I eklenmiş ve 12000 rpm'de (küçük santrifüjde), 1 dk santrifüj edilmek suretiyle ikinci kez yıkama yapılmıştır. Filtrat atılıp, alıcı tüpe filtre tekrar yerleştirildikten sonra 2 dk, 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu suretle Wash-buffer tamamen giderilmiştir. Yeni 2 mL'lik bir alıcı tüp (yeşil) içine filtre yerleştirilip önceden ısıtılmış (65°C) Elution Buffer X'ten (kit kodu X) 200 µL eklenmiştir. Çözelti 65 °C'de, 3 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüp 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip filtre atılmıştır. Aşağı geçen filtrata 200 µL Lysis Buffer (kit kodu L) ve 200 µL Binding Buffer (kit kodu B) konmuş ve iyice karıştırılmıştır. 2 mL'lik bir alıcı tüpe (yeşil) yeni bir filtre yerleştirilmiştir. Yeni filtre içine bir önceki adımda hazırlanan çözelti eklenmiştir. Çözelti 12000 rpm'de (küçük santrifüjde), 2 dk santrifüj edilmiştir. Filtrat atılmış ve alıcı tüpe filtre tekrar yerleştirilmiştir. Filtreye 550 µL Pre-Wash Buffer (kit kodu P) eklenip, 12000 rpm'de (küçük santrifüjde), 1 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda filtrat atılmış ve alıcı tüp içine filtre tekrar yerleştirilmiştir. Filtreye 550 µL Wash Buffer I (kit kodu W) eklenip, 12000 rpm'de (küçük santrifüjde) 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtrat atılıp, alıcı tüpe filtre tekrar yerleştirildikten sonra 2 dk, 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu suretle Wash-buffer tamamen giderilmiştir. Filtre yeni bir alıcı

tüpe (1,5 mL) yerleştirilmiş ve üzerine daha önceden 65°C’ de dengeye getirilmiş Elution Buffer’ dan (kit kodu E) 50 µL eklenmiştir. Çözelti, son olarak, 65 °C’de, 3 dk inkübe edildikten sonra 10000 rpm’de, 2 dk santrifüj edilmiştir. Filtre atılmış, sonuçta saflaştırılmış template DNA elde edilmiştir.

Elde edilen DNA, daha sonra kullanmak amacıyla -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

### 3.4 DNA Konsantrasyonunun Saptanması

Örneklerdeki DNA saflığının kontrolü ve miktar tayini spektral yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla Perkin-Elmer Lambda EZ-201 spektrofotometre kullanılmıştır. Her çalışmanın başlangıcında spektrofotometrenin kalibrasyonu yapılarak ideal çizgideki standart sapma grafik halinde gösterilmiştir. Spektrofotometrenin kalibrasyonu ve standart sapmanın hesaplanmasından sonra deiyonize steril su içeren “kör” e karşı sıfırlama yapılmıştır. Örnek DNA’ sı streil deiyonize su ile 1/10 oranında sulandırılarak bir küvete yerleştirilmiştir. 260 nm ve 280 nm’ de ölçümler yapılmıştır.  $A_{260}/A_{280}$  oranı hesaplanarak örnek saflığı hesaplanmıştır. İdeal oran 1.8’ dir. Oran 2.0’ dan büyük ise RNA kontaminasyonunu gösterirken, 1.6’ dan küçük ise protein kontaminasyonu varlığına işaret etmektedir. DNA konsantrasyonu ng/µL olarak hesaplanmıştır.

DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

$$\text{DNA}_{\text{Konsantrasyon}} = \text{OD}_{260} \times \text{Katsayı (50)} \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

OD260. A260’ daki optik yoğunluğu temsil eder. 1 optik dansite (O.D) çift iplikli DNA için 50 µL/mL olduğundan, katsayı olarak 50 kullanılmıştır (Somma 2003).

### **3.5 Agaroz Jel Elektrofrez**

Elektrofrez, Thermo EC marka yatay jel elektrofrez sisteminde gerçekleştirilmiştir. % 0.8' lik agaroz 0.5X TBE (EKC) içeren erlenmayere aktarılmıştır. Erlenmayer agarose çözülünceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Karışım 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 10 mg/mL ethidium bromide stok solusyonundan son konsantrasyon 0.3-5 µg/mL olacak şekilde ilave edilip, iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım jel tepsisine dökülmüş ve katılaşıncaya kadar beklenmiştir. Jel iyice katılaştıktan sonra jel tepsi dikkatlice elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Elektrofrez tankına jelin yüzeyini 2-5 mm kalınlığında kaplayacak şekilde 0.5XTBE tampon çözeltisi eklenmiştir. Elektrofrez 125 mA ve 80 voltta 60 dakika çalıştırılmıştır. Daha sonra jel, jel dokümantasyon analiz sistemine (GeneGenius, Syngene) alınarak Gene Snap Software programında 260 nm' de incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### **3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)' nda Light Cycler (Roche) ve T Personel (Biometra) makineleri kullanılmıştır. Her diziye özel bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımları 10xPCR Buffer (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), dNTP' ler (Fermentas, Genmark), Taq DNA polimeraz (Fermentas) veya Hot taq DNA Polimeraz (Fermentas, Applied Biosystem) içermektedir. Bir örnek için reaksiyon miksi ve kullanılan hedef DNA miktarları saptanmak istenen bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Kullanılan maddelerden meydana gelebilecek herhangi bir bulaşmayı saptamak üzere bir tüpe hedef DNA yerine steril deiyonize su eklenmiştir. Primer seçimi Genetik Modifiye (GM), ürünlere transfer edilen yabancı genlere göre yapılmıştır.



### **3.6.1 Konvensiyonel PCR' da saptama ve tanımlama testleri**

Konvensiyonel PCR' da mısır varlığını araştırmak için Zein geni, genetik modifikasyonun varlığını araştırmak üzere ise 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin saptanmasına ve genetik modifiye ürün olarak tespit edilen ürünlerde Bt176, Bt11, Mon810, T25 ve CBH351 varlığını araştırmak üzere tanımlama testleri yapılmıştır.

#### **3.6.1.1 Konvensiyonel PCR' da saptama testleri**

##### **3.6.1.1.1 Bitki spesifik PCR**

Mısır zein geni, ham materyal veya işlenmiş mısır örneklerinden izole edilen DNA' nın varlığını ve kalitesini belirlemek amacıyla saptanmıştır. Bu amaçla, mısır zein genine (ze1, 10kb protein kodlar) spesifik Zein3 ve Zein4 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.7). İşlem sonunda amaçlanan (beklenen) DNA fragment büyüklüğü 277 bp' dir (Querci et al. 2002).

50 µL' lik PCR miksinin son konsantrasyonu, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP seti, 0.2mM zein primerleri ve 0.025 U/µL Taq DNA polimeraz içermektedir. Amplifikasyon için reaksiyonda 2 µL hedef DNA kullanılmıştır. Son hacim sterilize deiyonize su ile 50 µL' ye tamamlanmıştır. Çizelge 3.3' de zein geni saptanmasında kullanılan PCR programı, Çizelge 3.4' de ise zein geni saptanmasında kullanılan PCR miksi verilmiştir.

Çizelge 3.3 Zein geni saptanmasında kullanılan PCR miksi (1 örnek için)

Madde Adı	Miktarı (µL)
Steril de iyonize su	32.75
10x PCR Buffer	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5
4 mM dNTP's	2.5
20 mM oligonükleotid Zein 3	1.20
20 mM olidotükleotid Zein 4	1.20
Taq DNA Polimeraz	0.25

Çizelge 3.4 Zein geni saptanmasında kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	95	3	1
Denaturasyon	96	1	40
Anneling	60	1	
Son uzama	72	3	1
Soğutma	4	-	

Denemelerde, pozitif kontrol olarak Bt 176 standart referans materyaller ile negatif kontrol olarak % 0 RR soya standart referans materyal, miks' teki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise steril deiyonize su kullanılmıştır. 0.5-0.2 mL' lik ependorf tüplere hazırlanan mikslere ve DNA T Personel (Biometra) konvensiyonel PCR' da çalışılmıştır. PCR ürünleri, % 1 agaroz jel kullanılarak, Thermo EC yatay elektroforez sisteminde analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Gene Genius (Syngene) marka jel dokümantasyon sistemi, Genesnap programında incelenmiştir.

### 3.6.1.1.2 Genetik modifiye mısırın saptanması

Genetik modifiye mısır, 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile saptanması yöntemiyle tespit edilmiştir. Karnabahar Mozaik Virüsü'nden elde edilen 35S promotör (CaMV35S) bölgesinin saptanmasında 35S3 ve 35S6 primerleri (Bergen 2001), *Agrobacterium tumefaciens*'ten elde edilen Nopalin Sintaz (NOS) terminatör bölgesinin tespitinde ise HA-nos-118-F ve HA-nos-118-R primerleri (Lipp et al. 2001) kullanılmış olup, bu primerler hakkındaki bilgiler Çizelge 3.7' de verilmiştir. Ayrıca 35S promotör ve NOS terminatör bölgeleri real-time PCR' de analiz edilerek konvensiyonel PCR' in verifikasyonu sağlanmıştır.

20 µL' lik PCR miksinin son konsantrasyonu, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP seti, 0.2' şer mM primerler ve 0.025U/µL Taq polimeraz içermektedir. Amplifikasyon için reaksiyonda 5µL hedef DNA kullanılmıştır. Son hacim sterilize deiyonize su ile 20µL' ye tamamlanmıştır. 35S promotör ve NOS terminatör saptanmasında kullanılan PCR miksi Çizelge 3.5' de, PCR programı ise Çizelge 3.6' da verilmiştir.

Denemelerde, pozitif kontrol olarak % 5 ve % 0.5 Bt 176 standart referans materyaller ile negatif kontrol olarak %0 Bt 176 standart referans materyal, miks' teki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise steril deiyonize su kullanılmıştır. 0.5-0.2 mL' lik ependorf tüplere hazırlanan mikslere ve DNA T Personel (Biometra) konvensiyonel PCR' da çalışılmıştır. PCR ürünleri, % 1 agaroz jel kullanılarak, Thermo EC yatay elektroforez sisteminde analiz edilmiştir. Analiz sonuçları GeneGenius (Syngene) marka jel dokümantasyon sistemi, Genesnap programında incelenmiştir.

Çizelge 3.5 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin tespitinde kullanılan PCR miksi

Madde Adı	Miktarı
Steril de iyonize su	11.8 µL
10x PCR Buffer	2.5 µL
25mM MgCl <sub>2</sub>	2 µL
2.5 mM dNTP's	1 µL
20 mM oligonükleotid*	1 µL
20 mM oligotükleotid *	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0.2µL

Çizelge 3.6 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin saptanmasında kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	95	10 dk	1
Denaturasyon	95	15 sn	
Anneling	60	15 sn	50
	72	15 sn	
Son uzama	72	7 sn	1
Soğutma	4	-	

Çizelge 3.7 Zein geni, 35S promotör ve NOS terminatör bölgesi tespitlerinde kullanılan primerler

Primerler	Hedef Dizi	Dizinin Orjini	Primer İsmi	Primer Uzunluğu bp	Baz dizilimi	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Erime Noktası (G/C)	Beklenen uzunluğu bp	Referanslar	
Kontrol Primerleri	Zein	Zea mays	Ze-03 (reverse)	19	AGTGCGAC CCATATTCC AG	5772.3	55.2	277	Querci et al. 2002	
			Ze-04 (forward)	21	GACATTGTG GCATCATCA TTT	6410.9	51.7			
Saptama Primerleri	CaMV Promotör	35S	<i>A. tumafaciencie</i>	35S-3	20	GACAGTGG TCCCAAAG ATGG	6191.1	55.6	147	Bergen 2001
				35S-6	20	GTCTTGCGA AGGATAGT GGG	6253.1	55.3		
	NOS Terminatör	<i>A. tumafaciencie</i>	HA-nos-118-F	24	GCATGACG TTATTTATG AGATGGG	7462.8	56.2	118	Lipp et al. 2001	
		HA-nos-118-R	24	GACACCGC GCGCGATA ATTTATCC	7296.9	61.2				

### 3.6.1.2 Konvensiyonel PCR' da tanımlama testleri

Tanımlama amacıyla, tarama testleri sonucu GM pozitif çıkan ürünlerde Bt176, CBH351, Bt11, T25 ve Mon810 varlığı kalitatif olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, GMO Selection Module (Tepnel Biosystems) kitleri ile multipleks PCR yöntemi kullanılmıştır.

#### 3.6.1.2.1 CBH351 mısır tespiti

CBH351 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Aventis Crop Science tarafından üretilen CBH351 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz)' da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif CBH351 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir. Çizelge 3.8' de CBH351 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi, Çizelge 3.9' da ise CBH351 mısır tespitinde kullanılan PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.8 CBH351 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi

Madde Adı	Miktarı
SI master miks	19.9 µL
Taq DNA Polimeraz	0.1 µL

Çizelge 3.9 CBH351 mısır tespitinde kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	94	10 dk	1
Denaturasyon	94	15 sn	
Anneling	58	15 sn	50
Son uzama	72	3 sn	1
Soğutma	4	-	

### PCR Sonrası Analizler:

0.5X TBE( Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromür çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü CBH351 mısır için 250 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

### 3.6.1.2.2 Mon810 mısır tespiti

Mon810 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Monsanto tarafından üretilen Mon810 (YieldGard™) mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz) da saptamaktadır. Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif Mon810 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir. Çizelge 3.10' da Mon 810 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi, Çizelge 3.11' de ise Mon 810 mısır tespitinde kullanılan PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.10 Mon 810 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi

Madde Adı	Miktar
SI master miksi	19.9 µL
Taq DNA Polimeraz	0.1 µL

Çizelge 3.11 Mon 810 mısır tespitinde kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	94	10 dk	1
Denaturasyon	94	15 sn	
Anneling	58	15 sn	50
Son uzama	72	3 sn	1
Soğutma	4	-	

#### PCR Sonrası Analizler:

0.5X TBE( Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromür çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü Mon810 mısır için 203 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

#### 3.6.1.2.3 Bt11 mısır tespiti

Bt11 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Syngenta Seeds Inc tarafından üretilen Bt11 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz)' da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif Bt11 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA



izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR’ da kullanılan örnek DNA’ sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla paralellerden birisine spike DNA’ sı ilave edilmiştir. Çizelge 3.12’ de Bt11 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi, Çizelge 3.13’ de ise Bt11 mısır tespitinde kullanılan PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.12 Bt11 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi

Madde Adı	Miktarı
SI master miks	19.9 µL
Taq DNA Polimeraz	0.1 µL

Çizelge 3.13 Bt11 mısır tespitinde kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	94	10 dk	1
Denaturasyon	94	15 sn	
Anneling	58	15 sn	50
Son uzama	72	3 sn	1
Soğutma	4	-	

#### PCR Sonrası Analizler:

0.5X TBE (Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3’ lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromür çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod’dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü Bt11 mısır için 186 bp, invertaz için ise 121 bp’ dir.

#### 3.6.1.2.4 T25 mısır tespiti

T25 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Aventis Crop Science tarafından üretilen T25 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz) da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif T25 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla, paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir. Çizelge 3.14' de T25 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi, Çizelge 3.15' de ise T25 mısır tespitinde kullanılan PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.14 T25 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi

Madde Adı	Miktarı
SI master miks	19.9 µL
Taq DNA Polimeraz	0.1 µL

Çizelge 3.15 T25 mısır tespitinde kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	94	10 dk	1
Denaturasyon	94	15 sn	
Anneling	58	15 sn	50
Son uzama	72	3 sn	1
Soğutma	4	-	

### PCR Sonrası Analizler:

0.5X TBE( Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromür çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü T25 mısır için 243 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

#### 3.6.1.2.5 Bt176 mısır tespiti

Bt176 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Syngenta Seeds Inc. tarafından üretilen Bt176 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz) da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif Bt176 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla, paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir. Çizelge 3.16' da Bt176 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi, Çizelge 3.17' de ise Bt176 mısır tespitinde kullanılan PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.16 Bt176 mısır tespitinde kullanılan multipleks PCR miksi

Madde Adı	Miktarı
SI master miks	19.9 µL
Taq DNA Polimeraz	0.1 µL

Çizelge 3.17 Bt176 mısır tespitinde kullanılan PCR programı

Program	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç sıcaklığı	94	10 dk	1
Denaturasyon	94	72 sn	
Anneling	66	72 sn	50
Son uzama	72	3 sn	1
Soğutma	4	-	

### PCR Sonrası Analizler

0.5X TBE (Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL Etidium Bromür çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele direkt yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü Bt176 mısır için 211 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

### 3.6.2 Real-Time PCR' da tarama ve miktar tayini

#### 3.6.2.1 Real-Time PCR' da tarama

Mısır ürünlerinde genetik modifikasyonun saptanması amacıyla, Real-Time PCR (Light-Cycler, Roche) ile 35S promotör ve NOS terminatör varlığı aranmıştır. Bu amaçla, Light Cycler GMO Screening Kit (Roche) ile sağlanan 35S promotör-NOS terminatör bölgelerine has primerleri içeren karışım, bitki DNA' sına özgü primer karışımı, GM pozitif bitki DNA' sı, gerekli enzim ve steril deiyonize su kullanılmıştır. GMO taramada kullanılacak çözeltiler düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlenerak kuru soğutucu bloğa yerleştirilmiştir. 35S/NOS bölgelerinin tespiti için aynı tüpe PCR miksi hazırlanırken, bitki spesifik bölgenin tespiti için farklı tüpe PCR miksi hazırlanmıştır. 35S/NOS tespiti için 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 11 µL dd H<sub>2</sub>O, 2 µL 35S/NOS saptama miksi (10X) ve 2 µL Light Cycler GMO

Screening enzim konmuştur. Bitki geni tespiti için ayrı bir 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 11 µL dd H<sub>2</sub>O, 2 µL bitki geni saptama miksi (10X) ve 2 µL Light Cycler GMO Screening enzim konmuştur.

Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler pipetle karıştırılıp düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlendikten sonra 15 µL olacak şekilde 20 µL kapasiteli LightCycler kapiler tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra PCR mikslerini içeren kapiler tüplerin üzerine 5 µL ürün DNA' sı eklenmiştir. Pozitif kontrol için 5 µL kit ile sağlanan LightCycler pozitif kontrol bitki DNA' sı, negatif kontrol için ise yine kit ile sağlanan 5 µL steril deiyonize su kullanılmıştır. Kapiler tüplerin ağzı kapatılarak, içine yerleştirildikleri özel adaptörleri vasıtasıyla düşük devirde (3000 rpm), kısa süreli (10 sn) santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra tüpler LightCycler cihazına ait bir karosel yardımıyla cihaza yerleştirilerek, Çizelge 3.18' de verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.18 35S promotör, NOS terminatör ve bitki geni varlığının araştırılmasında Real-time PCR yönteminde kullanılan PCR Programı

<b>Program : Ön inkübasyon</b>					Cycle : 1		Analysis
Mode: None							
Segment	Target (°C)	Temperature	Incubation Time (sn)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition mode		
1		95	900	20	None		
<b>Program : Amplifikasyon</b>					Cycle : 45		Analysis
Mode: Quantification							
Segment	Target (°C)	Temperature	Incubation Time (sn)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition mode		
1		95	0	20	None		
2		60	25	20	Single		
3		72	15	20	None		
<b>Program : Cooling</b>					Cycle : 1		Analysis
Mode: None							
Segment	Target (°C)	Temperature	Incubation Time (sn)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition mode		
1		40	30	20	None		

### **3.6.2.2 Real-Time PCR' da miktar tayini**

Konvensiyonel PCR ve real-time PCR' da 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinden bir tanesi ya da her ikisi pozitif sonuç veren örneklerde Bt176, Bt11, Mon810 ve T25 mısır miktar tayinleri yapılmıştır. Bu amaçla, analizlerin hepsinde real-time PCR (LightCycler,Roche) yöntemi kullanılmıştır.

#### **3.6.2.2.1 Real-time PCR yöntemi ile Bt176 miktar tayini**

Mısır ürünlerinde miktar tayini relatif ve absolute kuantifikasyon olmak üzere başlıca iki yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla, Bt 176 Quntification Kit (Roche) ve Sure Food Bt176 kit (R-Biofarm) kullanılmaktadır. Bu kitlerden ilki relatif kuantifikasyon amacıyla, diğeri absolute kuantifikasyon amacıyla kullanılmıştır.

##### **3.6.2.2.1.1 Bt 176 relatif miktar tayini**

Mısır ürünlerinde Bt176 miktar tayini amacıyla, real-time PCR (Light-Cycler, Roche) ile Bt176 ve zein geni varlığı aranmıştır. Bu amaçla, Bt 176 Quntification Kit (Roche) ile sağlanan Bt176 mısıra özgü primerleri içeren karışım, mısır DNA (zein geni)' sına özgü primer karışımı, Bt176 pozitif mısır DNA' sı, gerekli enzim ve steril deiyonize su kullanılmıştır. Bt176 miktar tayininde kullanılacak çözeltiler düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlenerek kuru soğutucu bloğa yerleştirilmiştir. Bt176 bölgesinin tespiti ve bitki spesifik bölgenin tespiti için farklı tüplere PCR miksi hazırlanmıştır. Bt176 tespiti için 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 11 µL dd H<sub>2</sub>O, 2 µL Bt176 saptama miksi (10X) ve 2 µL Light Cycler GMO Screening enzim konmuştur. Mısır bitki geni tespiti için ayrı bir 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 11 µL dd H<sub>2</sub>O, 2 µL mısır bitki geni saptama miksi (10X) ve 2 µL Bt 176 Quntification enzimi konmuştur.

Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler pipetle karıştırılıp, düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlendikten sonra 15 µL olacak şekilde 20 µL

kapiteli LightCycler kapiler tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra PCR mikslarını içeren kapiler tüplerin üzerine 5 µL ürün DNA' sı eklenmiştir. Pozitif kontrol için 5 µL kit ile sağlanan Bt 176 Quntification Kit pozitif kontrol mısır bitki DNA' sı, negatif kontrol için ise yine kit ile sağlanan 5 µL steril deiyonize su kullanılmıştır. Kapiler tüplerin ağzı kapatılarak, içine yerleştirildikleri özel adaptörleri vasıtasıyla düşük devirde (3000 rpm), kısa süreli (10 sn) santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra tüpler LightCycler cihazına ait bir karosel yardımıyla cihaza yerleştirilerek, Çizelge 3.19' da verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.19 Bt176 relatif miktar tayininde kullanılan PCR Programı

<b>Program : Ön inkübasyon</b>							Cycle : 1		Analysis		
Mode: None											
Segment	Target (°C)	Temperature	Incubation (sn)	Time	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition mode					
1		95		900		20	None				
<b>Program : Amplifikasyon</b>							Cycle : 45		Analysis		
Mode: Quantification											
Segment	Target (°C)	Temperature	Incubation (sn)	Time	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition mode					
1		95		0		20	None				
2		60		25		20	Single				
3		72		15		20	None				
<b>Program : Cooling</b>							Cycle : 1		Analysis		
Mode: None											
Segment	Target (°C)	Temperature	Incubation (sn)	Time	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition mode					
1		40		30		20	None				

Bu kit ile bir gıda örneğindeki Bt 176 mısır miktarı, Bt 176 mısır DNA' sının örnekteki toplam mısır miktarına oranı olarak hesaplanır. Bir örneğin relatif GMO içeriğinin saptanması, örneğin crossing point değerine ve PCR' ın etkinliğine bağlıdır. Crossing point (CP) değeri PCR amplifikasyonunun eksponansiyel faza başladığı döngü sayısıdır. PCR' ın verimliliği (efficiency) ise reaksiyon sırasındaki kinetikleri belirtir. Tüm reaksiyonun etkinliği ise kalibrasyon kurvesinin eğimi (slope) olarak ifade edilir. Kullanılan hibridizasyon problemleri ve primerler, hem Bt176 hem de referans gene

spesifik PCR verimliliklerine sahip olduklarından, kalibrasyon eğrileri ayrı olarak verilmelidir. Gıda işleme sırasındaki DNA degradasyonu GMO miktar analizini etkileyebilmektedir.

### 3.6.2.2.1.2 Bt 176 absolute miktar tayini

Bt176 absolute miktar tayini için real-time PCR (Light-Cycler, Roche) ile Bt176 ve zein geni varlığı aranmıştır. Bu amaçla, Bt 176 Kit (Surefood) ile sağlanan Bt176 mısıra (Bt176 geni) özgü primerleri içeren karışım, mısır DNA (zein geni)' sine özgü primer karışımı, % 2' lik Bt176 pozitif mısır DNA' sı, Taq DNA polimeraz ve FDE kullanılmıştır. Bt176 miktar tayininde kullanılacak çözeltiler düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlenerek, kuru soğutucu bloğa yerleştirilmiştir. Bt176 bölgesinin tespiti ve bitki spesifik bölgenin tespiti için farklı tüplere PCR miksi hazırlanmıştır. Bt176 tespiti için 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL Bt176-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Mısır bitki geni tespiti için ayrı bir 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL zein-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Ancak, örnekler için hazırlanacak reaksiyon mikslarına pipetlemeden kaynaklanacak kayıpları telafi etmek amacıyla, solüsyonlar hesaplanan miktardan % 10 daha fazla eklenmiştir. Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek amacıyla, kit ile sağlanan zein ve Bt176 geni içeren standartlar 1/10 oranında seyreltilmiştir. Hem zein hem de Bt176 genleri başlangıçta  $10^6$  kopya içermektedir ve seyreltilen genlerin kopya sayıları Çizelge 3.20' de verilmiştir.

Çizelge 3.20 Bt176 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri

Seyreltme seviyesi	1	2	3	4	5
<b>Zein</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
<b>Cry</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$



Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler pipetle karıştırılıp, düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1dk) santrifüjlendikten sonra 18 µL olacak şekilde 20 µL kapasiteli LightCycler kapiler tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra PCR mikserini içeren kapiler tüplerin üzerine 2 µL ürün DNA' sı eklenmiştir. Pozitif kontrol için 2 µL kit ile sağlanan Bt 176 Quntification Kit pozitif kontrol mısır bitki DNA' sı, negatif kontrol için ise 2 µL steril deiyonize su kullanılmıştır. Kapiler tüplerin ağzı kapatılarak, içine yerleştirildikleri özel adaptörleri vasıtasıyla düşük devirde (3000 rpm), kısa süreli (10 sn) santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra tüpler LightCycler cihazına ait bir karosel yardımıyla cihaza yerleştirilerek, aşağıda verilen PCR programı (Çizelge 3.21) uygulanmıştır.

Çizelge 3.21 Bt176 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı

<b>Program : Ön inkübasyon</b>						Cycle : 1
Analysis Mode: None						
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode	
1	95	60	20		None	
<b>Program : Amplifikasyon</b>						Cycle : 45
Analysis Mode: Quantification						
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode	
1	95	5	20		None	
2	62	10	20		None	
3	65	10	20		Single	
<b>Program : Cooling</b>						Cycle : 1
Analysis Mode: None						
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode	
1	40	10	20		None	

PCR işlemi sırasında % 2' lik pozitif kontrol, paralel olarak çalışılmıştır. Cry geninin mısır DNA' sına oranlanması sonucu çıkan pozitif kontrol değeri % 2' yi doğrulamalıdır. Aksi takdirde, örnek GM miktarının hesaplanmasında bir düzeltme

faktörü (K) kullanılması gerekmektedir. Düzeltme faktörünün hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$K = \text{Pozitif kontrol DNA'nın \%GM miktarı} / \text{hesaplanan miktar}$$

### 3.6.2.2.2 Real-time PCR yöntemi ile Bt11 miktar tayini

Bt11 absolute miktar tayini için real-time PCR (Light-Cycler, Roche) ile ıvs ve zein geni varlığı aranmıştır. Bu amaçla, Bt 11 Kit (Surefood) ile sağlanan Bt11 mısır (ıvs geni) özgü primerleri içeren karışım, mısır DNA (zein geni)' sine özgü primer karışımı, % 2' lik Bt11 pozitif mısır DNA' sı, Taq DNA polimeraz ve FDE kullanılmıştır. Bt11 miktar tayininde kullanılacak çözeltiler düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlenerek kuru soğutucu bloğa yerleştirilmiştir. Bt11 bölgesinin tespiti ve bitki spesifik bölgenin tespiti için farklı tüplere PCR miksi hazırlanmıştır. Bt11 tespiti için 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL ıvs-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Mısır bitki geni tespiti için ayrı bir 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL zein-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Ancak, örnekler için hazırlanacak reaksiyon mikslarına pipetlemeden kaynaklanacak kayıpları telafi etmek amacıyla, solüsyonlar hesaplanan miktardan %10 daha fazla eklenmiştir.

Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek amacıyla, kit ile sağlanan zein ve ıvs geni içeren standartlar 1/10 oranında seyreltilmiştir. Hem zein hem de ıvs genleri başlangıçta 106 kopya içermektedir ve seyreltilen genlerin kopya sayıları Çizelge 3.22' de verilmiştir.

Çizelge 3.22 Bt11 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri

Seyreltme seviyesi	1	2	3	4	5
<b>Zein</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
<b>Ivs</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$

Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler pipetle karıştırılıp, düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlendikten sonra 18 µL olacak şekilde 20 µL kapasiteli Light Cycler kapiler tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra PCR mikslarını içeren kapiler tüplerin üzerine 2 µL ürün DNA' sı eklenmiştir. Pozitif kontrol için 2 µL kit ile sağlanan Bt 11 Quntification Kit pozitif kontrol mısır bitki DNA' sı, negatif kontrol için ise 2 µL steril deiyonize su kullanılmıştır. Kapiler tüplerin ağzı kapatılarak, içine yerleştirildikleri özel adaptörleri vasıtasıyla düşük devirde (3000 rpm), kısa süreli (10 sn) santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra tüpler Light Cycler cihazına ait bir karosel yardımıyla cihaza yerleştirilerek, Çizelge 3.23' de verilen PCR programı uygulanmıştır.

PCR işlemi sırasında % 2' lik pozitif kontrol, paralel olarak çalışılmıştır. Ivs geninin mısır DNA' sına oranlanması sonucu çıkan pozitif kontrol değeri % 2' yi doğrulamalıdır. Aksi takdirde, örnek GM miktarının hesaplanmasında bir düzeltme faktörü (K) kullanılması gerekmektedir. Düzeltme faktörünün hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir:

$$K = \text{Pozitif kontrol DNA' nın \% GM miktarı} / \text{hesaplanan miktar}$$

Çizelge 3.23 Bt11 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı

<b>Program : Ön inkübasyon</b> Cycle : 1					
Analysis Mode: None					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	95	60	20		None
<b>Program : Amplifikasyon</b> Cycle : 45					
Analysis Mode: Quantification					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	95	5	20		None
2	62	10	20		None
3	65	10	20		Single
<b>Program : Cooling</b> Cycle : 1					
Analysis Mode: None					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	40	10	20		None

### 3.6.2.2.3 Real-time PCR yöntemi ile Mon810 miktar tayini

Mon810 absolute miktar tayini için real-time PCR (Light-Cycler, Roche) ile ıvs ve zein geni varlığı aranmıştır. Bu amaçla, Mon810 Kit (Surefood) ile sağlanan Mon810 mısıra (ıvs geni) özgü primerleri içeren karışım, mısır DNA (zein geni)' sına özgü primer karışımı, % 2' lik Mon810 pozitif mısır DNA' sı, Taq DNA polimeraz ve FDE kullanılmıştır. Mon810 miktar tayininde kullanılacak çözeltiler düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlenerek kuru soğutucu bloğa yerleştirilmiştir. Mon810 bölgesinin tespiti ve bitki spesifik bölgenin tespiti için farklı tüplere PCR miksi hazırlanmıştır. Mon810 tespiti için 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL ıvs-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Mısır bitki geni tespiti için ayrı bir 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL zein-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Ancak, örnekler için hazırlanacak reaksiyon mikslere pipetlemeden kaynaklanacak

kayıpları telafi etmek amacıyla, solüsyonlar hesaplanan miktardan %10 daha fazla eklenmiştir.

Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek amacıyla, kit ile sağlanan zein ve ıvs geni içeren standartlar 1/10 oranında seyreltilmiştir. Hem zein hem de ıvs genleri başlangıçta 106 kopya içermektedir ve seyreltilen genlerin kopya sayıları Çizelge 3.24' de verilmiştir.

Çizelge 3.24 Mon810 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri

Seyreltme seviyesi	1	2	3	4	5
<b>Zein</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
<b>Hsp</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$

Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler pipetle karıştırılıp, düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlendikten sonra 18  $\mu$ L olacak şekilde 20  $\mu$ L kapasiteli Light Cycler kapiler tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra PCR mikslarını içeren kapiler tüplerin üzerine 2  $\mu$ L ürün DNA' sı eklenmiştir. Pozitif kontrol için 2  $\mu$ L kit ile sağlanan Mon810 Quntification Kit pozitif kontrol mısır bitki DNA' sı, negatif kontrol için ise 2  $\mu$ L steril deiyonize su kullanılmıştır. Kapiler tüplerin ağzı kapatılarak, içine yerleştirildikleri özel adaptörleri vasıtasıyla düşük devirde (3000 rpm), kısa süreli (10 sn) santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra tüpler LightCycler cihazına ait bir karosel yardımıyla cihaza yerleştirilerek, Çizelge 3.25' de verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.25 Mon810 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı

<b>Program : Ön inkübasyon</b> Cycle : 1					
Analysis Mode: None					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	95	60	20		None
<b>Program : Amplifikasyon</b> Cycle : 45					
Analysis Mode: Quantification					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	95	5	20		None
2	62	10	20		None
3	65	10	20		Single
<b>Program : Cooling</b> Cycle : 1					
Analysis Mode: None					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	40	10	20		None

PCR işlemi sırasında % 2' lik pozitif kontrol paralel olarak çalışılmıştır. Hsp geninin mısır DNA' sına oranlanması sonucu çıkan pozitif kontrol değeri % 2' yi doğrulamalıdır. Aksi takdirde, örnek GM miktarının hesaplanmasında bir düzeltme faktörü (K) kullanılması gerekmektedir. Düzeltme faktörünün hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$K = \text{Pozitif kontrol DNA' nın \% GM miktarı} / \text{hesaplanan miktar}$$

#### 3.6.2.2.4 Real-time PCR yöntemi ile T25 miktar tayini

T25 absolute miktar tayini için real-time PCR (Light-Cycler, Roche) ile ivs ve zein geni varlığı aranmıştır. Bu amaçla, T25 Kit (Surefood) ile sağlanan T25 mısıra (glu geni) özgü primerleri içeren karışım, mısır DNA (zein geni)' sına özgü primer karışımı, %2' lik T25 pozitif mısır DNA' sı, Taq DNA polimeraz ve FDE kullanılmıştır. T25 miktar tayininde kullanılacak çözeltiler düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlenerek kuru soğutucu bloğa yerleştirilmiştir. T25 bölgesinin tespiti ve bitki spesifik bölgenin tespiti için farklı tüplere PCR miksi hazırlanmıştır. T25 tespiti için 1.5 mL' lik PCR tüpüne, sırasıyla, 17 µL ivs-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Mısır bitki geni tespiti için ayrı bir 1.5 mL' lik PCR tüpüne sırasıyla 17 µL zein-reaksiyon miksi, 1 µL FDE ve 0.1 µL Taq DNA polimeraz enzimi konmuştur. Ancak, örnekler için hazırlanacak reaksiyon mikslarına pipetlemeden kaynaklanacak kayıpları telafi etmek amacıyla, solüsyonlar hesaplanan miktardan %10 daha fazla eklenmiştir.

Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek amacıyla, kit ile sağlanan zein ve glu geni içeren standartlar 1/10 oranında seyreltilmiştir. Hem zein hem de ivs genleri başlangıçta  $10^6$  kopya içermektedir ve seyreltilen genlerin kopya sayıları Çizelge 3.26' de verilmiştir.

Çizelge 3.26 T25 saptamada kullanılan standartların seyreltme seviyeleri

Seyreltme seviyesi	1	2	3	4	5
<b>Zein</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
<b>Glu</b>	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$

Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler pipetle karıştırılıp, düşük devirde (1500-2000 rpm), kısa süreli (30 sn-1 dk) santrifüjlendikten sonra 18 µL olacak şekilde 20 µL kapasiteli Light Cyler kapiler tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra PCR mikslarını içeren kapiler tüplerin üzerine 2 µL ürün DNA' sı eklenmiştir. Pozitif kontrol için 2 µL kit ile sağlanan T25 Quntification Kit pozitif kontrol mısır bitki DNA' sı, negatif kontrol için ise 2 µL steril deiyonize su kullanılmıştır. Kapiler tüplerin ağzı kapatılarak, içine yerleştirildikleri özel adaptörleri vasıtasıyla düşük devirde (3000 rpm), kısa süreli (10

sn) santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işleminden sonra tüpler Light Cycler cihazına ait bir karosel yardımıyla cihaza yerleştirilerek, Çizelge 3.27’de verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.27 T25 absolute miktar tayininde kullanılan PCR programı

<b>Program : Ön inkübasyon</b> Cycle : 1					
Analysis Mode: None					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	95	60	20		None
<b>Program : Amplifikasyon</b> Cycle : 45					
Analysis Mode: Quantification					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	95	5	20		None
2	62	10	20		None
3	65	10	20		Single
<b>Program : Cooling</b> Cycle : 1					
Analysis Mode: None					
Segment	Target Temperature (°C)	Incubation Time (sn)	Temperature Transition (°C/s)	Rate	Acquisition mode
1	40	10	20		None

PCR işlemi sırasında % 2’ lik pozitif kontrol paralel olarak çalışılmıştır. Glu geninin mısır DNA’ sına oranlanması sonucu çıkan pozitif kontrol değeri % 2’ yi doğrulamalıdır. Aksi takdirde, örnek GM miktarının hesaplanmasında bir düzeltme faktörü (K) kullanılması gerekmektedir. Düzeltme faktörünün hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$K = \frac{\text{Pozitif kontrol DNA' nın \%GM miktarı}}{\text{hesaplanan miktar}}$$



### 3.7 İstatistiksel Değerlendirme

#### 3.7.1 Eş yapma t testi

Denemede üzerinde durulan materyaller (mısır yemi, mısır unu, mısır nişastası, mısır cipsi, mısır gevreği) bakımından elde edilen % değerler, her bir materyalde paralellerin ortalamaları alınarak, elde edilmiştir. Elde edilen bu ortalamalara eş yapma t testi uygulanarak (Sheskin 2000), relatif miktar tayin ortalaması ile absolute miktar tayin ortalamaları arasındaki farklılıklar irdelenmiştir. Tanıtıcı istatistikler çizelgeler halinde verilmiştir.

#### 3.7.2 Kappa istatistiği

Denemede, materyallerde 35S promotör bölgesi ile NOS terminatör bölgesinin varlığı konvensiyonel ve real-time PCR ile çalışılmıştır. Var-yok şeklinde elde edilen verilere Kappa istatistiği uygulanarak, her iki yöntemin benzerliği irdelenmiştir. Ayrıca, kantitatif olarak veri elde edildi ise var, edilemedi ise yok şeklinde yorumlanarak kalitatif ve kantitatif yöntemlerin benzerliğini irdellemek için de Kappa istatistiği kullanılmıştır. Sonuçlar, Çizelge 3.28'de verilen Kappa skalasına göre değerlendirilmiştir (Sim and Wright 2005).

Çizelge 3.28 Kappa skalası

Kappa Değeri	Benzerlik
<0.10	Hiç yok
0.11-0.40	Zayıf
0.41-0.60	Belirgin
0.61-0.80	Güçlü
0.81	Mükemmele yakın

## **4. BULGULAR ve TARTIŞMA**

### **4.1 DNA İzolasyonu**

Ürünlerden DNA ekstraksiyonu bir CTAB ve iki ticari kit olmak üzere 3 farklı yöntemle yapılmıştır. Ticari kitlerle yapılan DNA ekstraksiyonlarının birbirleri arasında DNA miktar ve kalite yönünden önemli bir farklılık olmamasına karşı, zaman ve DNA miktar ve kalitesi yönünden CTAB yönteminden üstün oldukları gözlenmiştir. İşlenmemiş tane mısırlardan yüksek molekül ağırlığına sahip DNA ekstraktları elde edilmiştir. İşlenmiş ürünlerin büyük bir kısmından da analiz için yeterli kalite ve miktarda DNA izolasyonu yapılmıştır. Ancak, çok işlenmiş bazı ürünlerde, özellikle miktar tayini için her zaman gerekli hedef bölgelerin çoğaltılmasına yetecek miktar ve kalitede DNA elde edilemediği görülmüştür. Gıdalar işlenme sırasında sıcaklık, düşük pH ve enzimatik reaksiyonlarla hidrolize mağruz kalmaktadırlar. Böylelikle, işlenmiş gıdalardan her zaman yüksek molekül ağırlığa sahip DNA elde edilememektedir (Gachet et al. 1999, Aydın 2004). Sadece konsantre edilmiş, kesilmiş, ısıtılmış, parçalanmış veya patlatılmış gıdalar yarı işlenmiş gıdalar olarak adlandırılmaktadır. Ancak; çöktürülmüş, kızartılmış veya fermente edilmiş gıdalar ise çok işlenmiş gıdalar olarak isimlendirilmektedir (Pauli et al. 2000, Aydın 2004).

Bu tanımlamalara göre, toplanan örneklerden mısır unu ve mısır nişastası yarı işlenmiş, mısır cipsi ve mısır gevreği ise çok işlenmiş ürün olarak katagorize edilmiştir. Analiz edilen örneklerde işleme derecesi yemlik tane mısır, mısır unu, mısır nişastası, mısır cipsi ve mısır gevreği olarak sıralanmaktadır. İşlenmiş gıdalardan en yüksek miktarda ve en saf DNA mısır unundan elde edilmiştir.

### **4.2 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Teorik Saptama Limiti**

Ürünlerin spektrofotometrik ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre, DNA konsantrasyonları hesaplanmıştır. Ham ve bazı yarı işlenmiş materyallerden elde edilen DNA konsantrasyonları çok işlenmiş materyallerden elde edilen DNA konsantrasyonlarından daha yüksek düzeyde çıkmıştır (EK11). Ancak; özellikle çok

işlenmiş ürünlerde, aynı ürüne ait DNA konsantrasyon değerleri aynı konsantrasyon ve kalite düzeyinde olmayıp, paralel ekstraksiyonlar arasında dahi çoğu zaman birbirinden bağımsız değerler elde edilmiştir. DNA konsantrasyonunun ölçümünden sonra teorik saptama limiti (LOD-Limit of Detection) hesaplanmıştır. Bir organizmanın replike edilmemiş haploid nükleer genomu C değeri ile ifade edilmektedir. 1C değeri temel alındığında, 100 ng mısır  $3.8 \times 10^4$  kopya mısır genomu içermektedir (Bonfini et al. 2001, Aydın 2004) Bu orana göre, ürünlerin teorik saptama limitleri ve kopya numaraları hesaplanmıştır. Ek 11’de örneklerin izolasyonundan elde edilen DNA miktarlarının bazıları verilmiştir.

### 4.3 Bitki Spesifik PCR

Zein geni tespiti için Zein3 ve Zein4 primerleri (Çizelge 3.7) kullanılmıştır. Beklenen bant büyüklüğü 277 bp’ dir. Zein geni sadece mısır DNA’ sında bulunan bir genidir. PCR sisteminin, zein genini bulmada kullanılan “spesifik” bir yöntem olduğunu ispat etmek için, içerisinde mısır olduğu bilinen örnekler ile mısır kökenli olmayan ve/veya mısır içermeyen örnekler bir arada çalışılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Zein geni spesifiklik çalışması

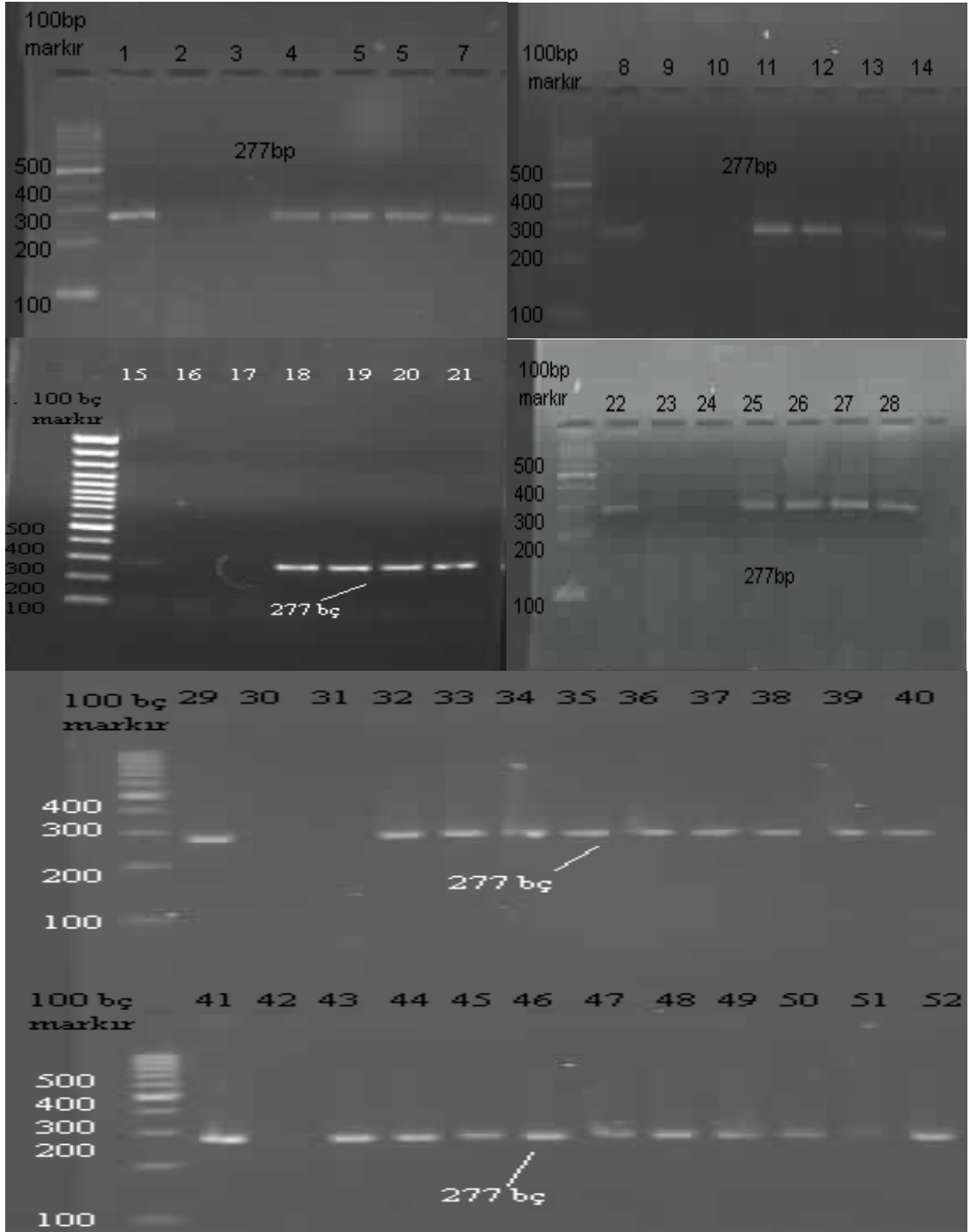
Çizelge 4.1 Zein geni spesifiklik çalışması sonuçları

Sıra No	Örnek Adı	Zein 277 bp
1	PK (Bt176 mısır)	+
2	NK (%0 RR Soya)	-
3	Kör	-
4	buğday kepeği	-
5	soya unu	-
6	pirinç	-
7	MC1 (mısır cipsi)	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Zein geni spesifiklik çalışmasında pozitif kontrol olarak Bt176 mısır, negatif kontrol olarak ise içerisinde zein geni bulunmayan % 0 RR soya CRM' i kullanılmıştır. Kör, PCR miksindeki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla DNA yerine su kullanılarak hazırlanan örnektir. Diğer örnekler; mısır cipsi, buğday kepeği ve pirinçtir. Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1' e göre; PK ve mısır cipsi örnekleri pozitif, diğer örnekler negatif sonuç vermiştir. Böylelikle; kullanılan yöntemin zein geni saptanması için spesifik bir yöntem olduğu ispatlanmıştır.

Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2' de mısır unu ve mısır yemi örneklerinde, Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2' de mısır unu örneklerinde, Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3' de mısır nişastası örneklerinde, Şekil 4.4 ve Çizelge 4.4' de mısır cipsi örneklerinde, Şekil 4.5 ve Çizelge 4.5' de mısır gevreği örneklerinde, zein geni saptanması ile ilgili çalışma sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.2 Mısır unu ve mısır yemi örneklerinde zein geni saptanması

Çizelge 4.2 Mısır unu ve mısır yemlerinde zein geni saptanması

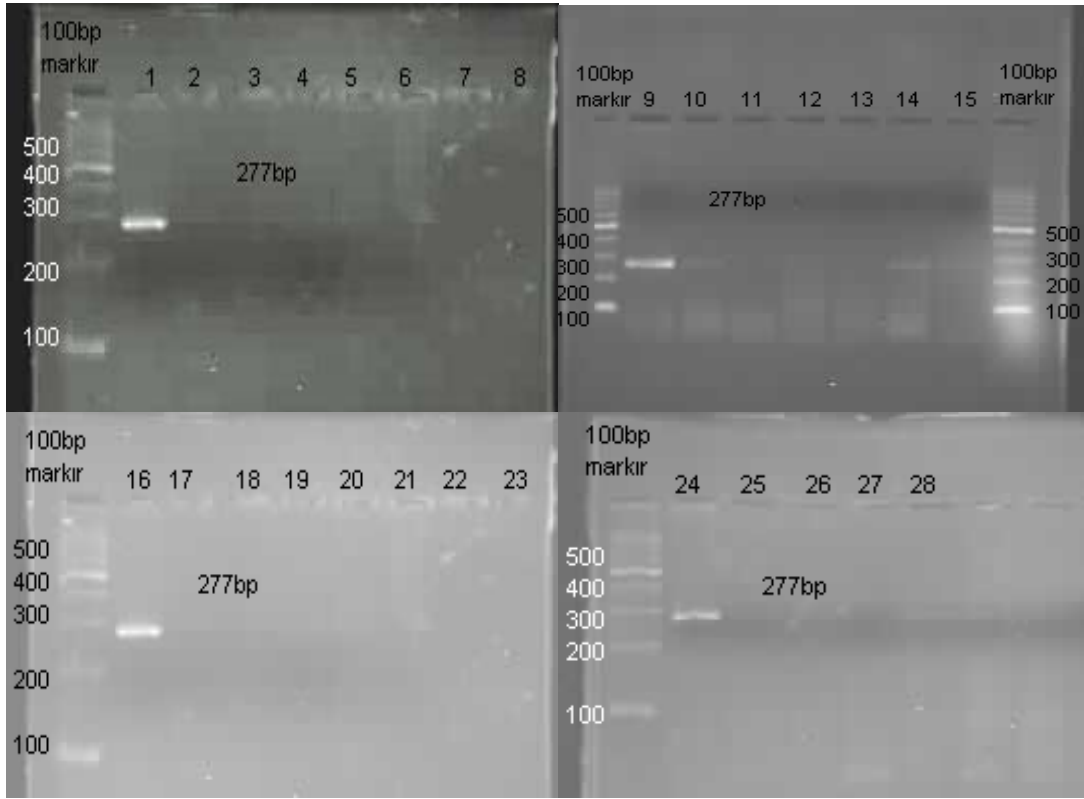
Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	27	MU15	+
2	<sup>2</sup> NK %0	-	28	MU16	+
3	RRSoya				
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	29	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
4	MU1	+	30	<sup>2</sup> NK %0	-
				RRSoya	
5	MU2	+	31	<sup>3</sup> K (Su)	-
6	MU3	+	32	MY1	+
7	MU4	+	33	MY2	+
8	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	34	MY3	+
9	<sup>2</sup> NK %0	-	35	MY4	+
	RRSoya				
10	<sup>3</sup> K (Su)	-	36	MY5	+
11	MU5	+	37	MY6	+
12	MU6	+	38	MY7	+
13	MU7	+	39	MY8	+
14	MU8	+	40	MY9	+
15	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	41	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
16	<sup>2</sup> NK %0	-	42	<sup>2</sup> NK %0	-
	RRSoya			RRSoya	
17	<sup>3</sup> K (Su)	-	43	MY10	+
18	MU10	+	44	MY11	+
19	MU11	+	45	MY12	+
20	MU12	+	46	MY13	+
21	MU13	+	47	MY14	+
22	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	48	MY15	+
23	<sup>2</sup> NK %0	-	49	MY16	+
	RRSoya				
24	<sup>3</sup> K (Su)	-	50	MY17	+
25	MU13	+	51	MY18	+
26	MU14	+	52	MY19	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2' ye göre tüm mısır unu ve mısır yemi örneklerinde yapılan PCR işlemi sonucu 277 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiş, yani zein geni saptanmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan % 1 Bt11 sertifikalı referans

materyalinden pozitif sonuç alınırken, negatif kontrol olarak çalışılan % 0 RR soya CRM' inden ve kör örneğinden negatif sonuç alınmıştır.

Şekil 4.3' e göre, sadece 2 mısır nişastası örneğinde (MNİŞ8 ve MNİŞ9) zein genine ait zayıf bantlar elde edilmiştir. Sistemde pozitif kontrol olarak çalışılan %1 Bt11 CRM' inden güçlü zein genine ait bant elde edilmesi, sistemin düzgün çalıştığını göstermektedir. Bu durumda, mısır nişastalarından ya zayıf bant elde edilmesi ya da hiç bant elde edilememesinin sebebinin, zein geninde nişasta üretimi esnasında meydana gelen, muhtemel zararlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.3 Mısır nişastası örneklerinde zein geni saptanması

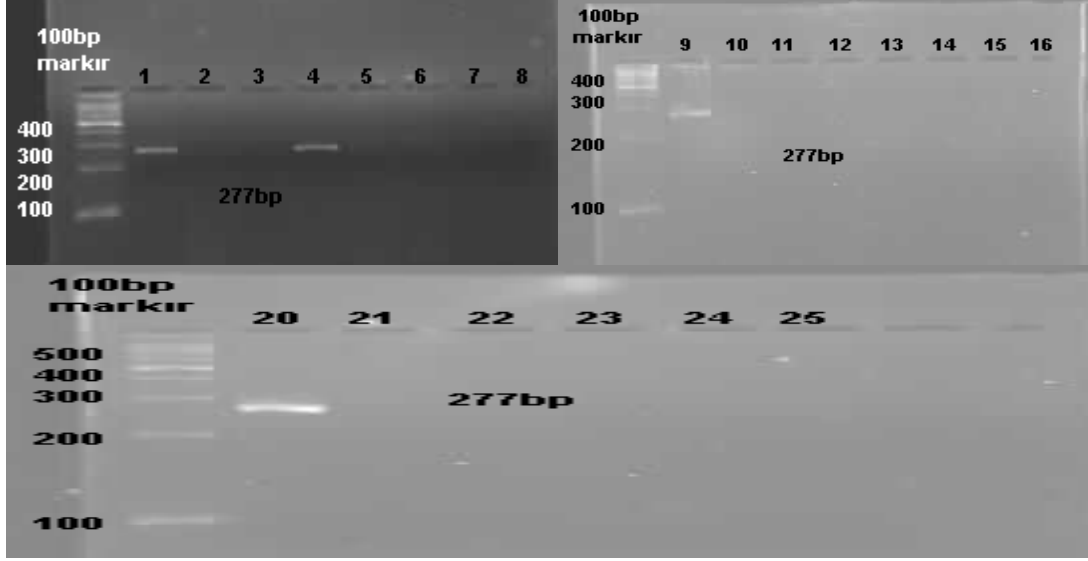
Çizelge 4.3 Mısır nişastası örneklerinde zein PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	15	MNİŞ9	+
2	<sup>2</sup> NK %0 RRSoya	-	16	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	17	<sup>2</sup> NK %0 RRSoya	-
4	MNİŞ1	+	18	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MNİŞ2	-	19	MNİŞ10	-
6	MNİŞ3	-	20	MNİŞ11	-
7	MNİŞ4	-	21	MNİŞ12	-
8	MNİŞ5	-	22	MNİŞ13	-
9	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	23	MNİŞ14	-
10	<sup>2</sup> NK %0 RRSoya	-	24	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	-
11	<sup>3</sup> K (Su)	-	25	<sup>2</sup> NK %0 RRSoya	-
12	MNİŞ6	-	26	<sup>3</sup> K (Su)	-
13	MNİŞ7	-	27	MNİŞ15	-
14	MNİŞ8	+	28	MNİŞ16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.4 ve Çizelge 4.4' e göre, bir mısır cipsi örneğinde (MC1) zein geni saptamıştır. Diğer mısır cipslerinde zein geni saptanmaması ürün işleme sırasında DNA' da meydana gelen zararlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, adı geçen mısır cipsi örneği, daha sonra tekrar çalışılmış, aynı örnek yine kuvvetli zein geni bantı vermiştir. Bu durum, mısır cipsi örneklerindeki DNA' ların işlem sırasında farklı derecelerde zarar gördüğünün de bir göstergesidir.





Şekil 4.4 Mısır cipsi örneklerinde zein geni saptanması

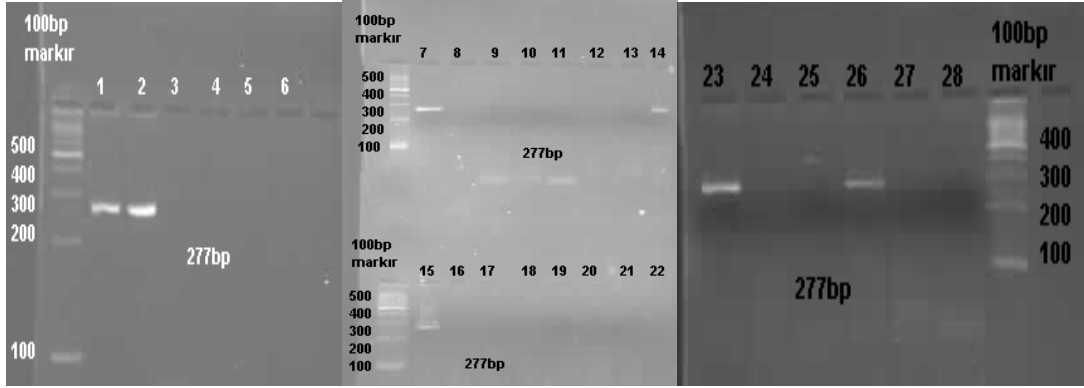
Çizelge 4.4 Mısır cipsi örneklerinde zein PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	14	MC8	+
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	15	MC9	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	16	MC10	-
4	MC1	+	17	MC11	-
5	MC2	-	18	MC12	-
6	MC3	-	19	MC13	-
7	MC4	-	20	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
8	MC5	-	21	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
9	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	22	<sup>3</sup> K (Su)	-
10	<sup>2</sup> NK %0 RRSoya	-	23	MC14	-
11	<sup>3</sup> K (Su)	-	24	MC15	-
12	MC6	-	25	MC16	-
13	MC7	-			

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.5 ve Çizelge 4.5' e göre, bir mısır gevreği örneğinde (MG9) zein geni saptamıştır. Diğer mısır gevreklerinde zein geni saptanmaması ürün işleme sırasında DNA' da meydana gelen zararlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, adı geçen mısır gevreği örneği, daha sonra tekrar çalışılmış, aynı örnek yine kuvvetli zein geni

bantı vermiştir. Bu durum, mısır gevreği örneklerindeki DNA' ların işlem sırasında farklı derecelerde zarar gördüğünün de bir göstergesidir.



Şekil 4.5 Mısır gevreği örneklerinde zein geni saptanması

Çizelge 4.5 Mısır gevreği örneklerinde zein PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	1PK (%1 Bt11)	+	15	1PK (%1 Bt11)	+
2	1PK (%1 Bt11)	+	16	2NK %0 RRSoya	-
3	MG1	-	17	3K (Su)	-
4	MG2	-	18	MG10	-
5	MG3	-	19	MG11	-
6	MG4	-	20	MG12	-
7	1PK (%1 Bt11)	+	21	MG13	-
8	2NK %0 RRSoya	-	22	MG14	-
9	3K (Su)	-	23	1PK (%1 Bt11)	+
10	MG5	-	24	2NK %0 RRSoya	-
11	MG6	-	25	3K (Su)	-
12	MG7	-	26	MG9	+
13	MG8	-	27	MG15	-
14	MG9	+	28	MU16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Sonuç olarak, işlem görmemiş mısır yemi örnekleri ile az işlem görmüş mısır unu örneklerinin hepsinde zein geni saptanırken, az işlem görmüş örneklerden 2 mısır nişastasında (MNİŞ8 ve MNİŞ9), çok işlem görmüş örneklerden ise bir mısır cipsi (MC1) ve ve mısır gevreği örneğinde (MG9) zein geni saptanmıştır.

#### **4.4 Konvansiyonel PCR Yöntemi ile 35S Promotör, NOS Terminatör Varlığının Araştırılması**

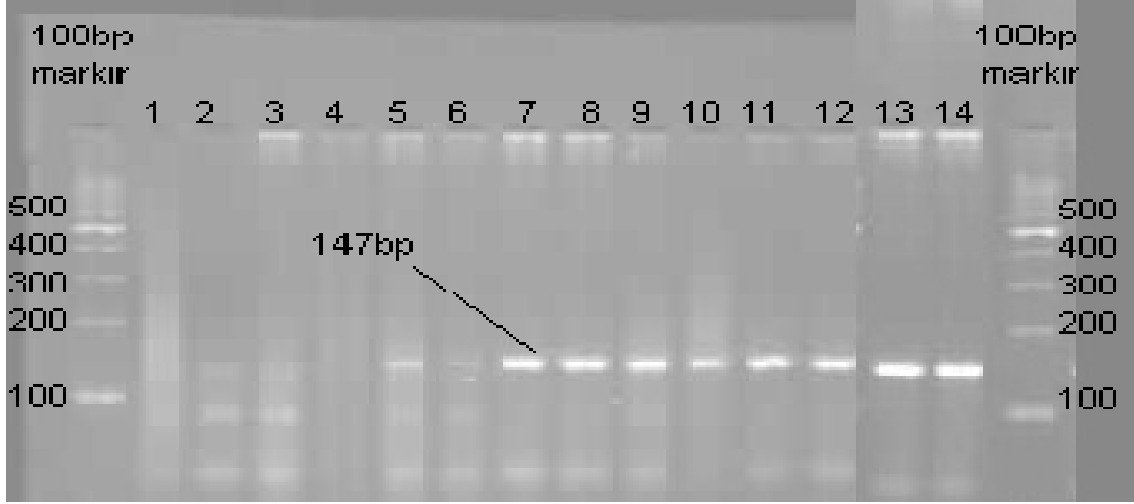
Bu çalışmada, 35S promotör bölgesinin tespiti için 35S3 ve 35S6 primerleri ile çalışılmıştır. NOS terminatör bölgesi için ise HA-nos 118-f ve HA-nos 118-r primerleri (Çizelge 3.7) kullanılmıştır.

Denemelerde, pozitif kontrol olarak % 5 ve % 0.5 Bt 176 standart referans materyaller ile negatif kontrol olarak % 0 Bt 176 standart referans materyal, miks' teki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

##### **4.4.1 Konvansiyonel PCR yöntemi ile 35S promotör varlığının araştırılması**

CaMV35S promotör bölgesinin saptanması amacıyla, 35S3 ve 35S6 (Çizelge 3.7) primer çifti kullanılmıştır. PCR işlemi sonunda oluşan ampliconların (ürünlerin) büyüklüğü 147 bp' dir.

35S promotör bölgesi tespitinde analizin hassasiyet ve tespit limitini belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda (% 0. 0.1, 0.5, 1 ve 2) Bt 11 içeren CRM' lerden DNA' lar High Pure GMO Sample Preparation Kit ile 2 paralelli olarak izole edilip, 35S bölgesinin tespiti için PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez tekniği ile jel dokümantasyon sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) 35S promotör bölgesinin saptanması

Çizelge 4.6 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) 35S promotör bölgesinin saptanması

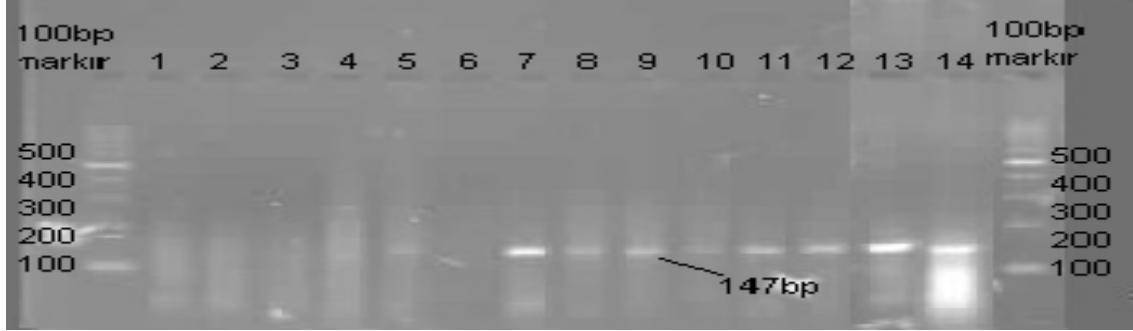
Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	K	-	8	%0.5 Bt11	+
2	EK	-	9	%1 Bt11	+
3	%0 Bt11	-	10	%1 Bt11	+
4	%0 Bt11	-	11	%2 Bt11	+
5	%0.1 Bt11	+	12	%2 Bt11	+
6	%0.1 Bt11	-	13	%5 Bt11	+
7	%0.5 Bt11	+	14	%5 Bt11	+

1 K: Kör, 2 EK: Ekstraksiyon kör

Şekil 4.6 ve Çizelge 4.6' ya göre, K, EK ve % 0 Bt11 CRM' lerinden negatif sonuç alınmıştır. % 0.1 Bt11 CRM' inin ise, paralellerinden biri negatif, diğeri pozitif sonuç verirken, diğerk CRM' lerin hepsi (% 0.5, % 1, % 2 ve % 5) pozitif sonuç vermiştir. Bu durumda, 35S promotör bölgesine ait, işlenmemiş mısır örnekleri ve mısır unu için saptama limiti (LOD) % 0.5 olarak belirlenmiştir.

Aynı amaçla, farklı konsantrasyonlarda (% 0, 0.1, 0.5, 1, 2, ve 5) RR Soya içeren CRM' lardan DNA' lar High Pure GMO Sample Preparation Kit ile 2 paralelli olarak izole edilip, 35S3-35S6 bölgesinin tespiti için PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen

PCR ürünleri agaroz jel elektroforez tekniği ile jel dokümantasyon sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Sertifikalı referans materyallerde (RR Soya) 35S promotör bölgesinin saptanması

Çizelge 4.7 Sertifikalı referans materyallerde (RRSoya) 35S promotör bölgesinin saptanması

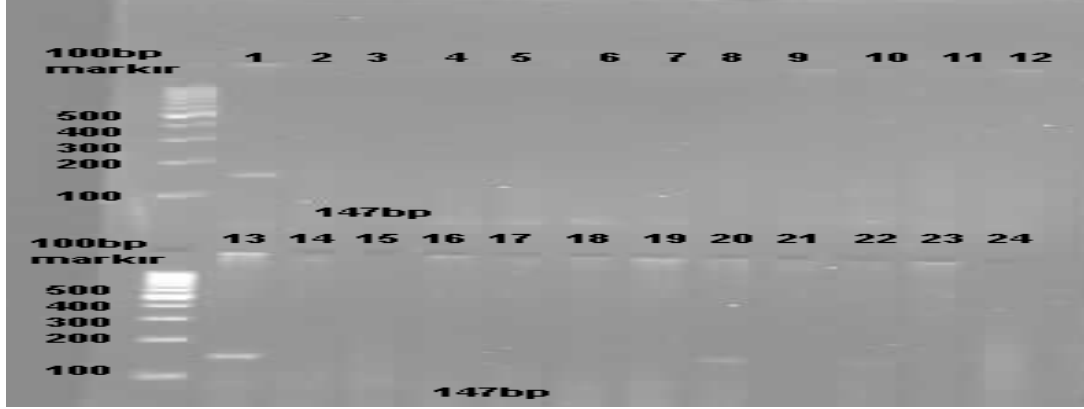
Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> K	-	8	%0.5 RR Soya	+
2	<sup>2</sup> EK	-	9	%1 RR Soya	+
3	%0 RR Soya	-	10	%1 RR Soya	+
4	%0 RR Soya	-	11	%2 RR Soya	+
5	%0.1 RR Soya	+	12	%2 RR Soya	+
6	%0.1 RR Soya	-	13	%5 RR Soya	+
7	%0.5 RR Soya	+	14	%5 RR Soya	+

1 K: Kör, 2 EK: Ekstraksiyon kör

Şekil 4.7 ve Çizelge 4.7' ya göre, K, EK ve % 0 Bt11 CRM' lerinden negatif sonuç alınmıştır. % 0.1 Bt11 CRM' inin ise, paralellerinden biri negatif, diğeri pozitif sonuç verirken, diğere CRM' lerin hepsi (% 0.5, % 1, % 2 ve % 5) pozitif sonuç vermiştir. Bu durumda, 35S promotör bölgesine ait, saptama limiti (LOD) yine % 0.5 olarak belirlenmiştir.

Daha sonra, 83 örneğin hepsinde 35S promotör varlığı araştırılmıştır. DNA büyüklüğünü belirlemek amacıyla, 100 bp markır kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak

% 1 oranında GM ürün içeren standart referans materyal (% 1 Bt 11), negatif kontrol olarak ise içinde GM ürün bulundurmeyen standart referans materyal (% 0 RR Soya) kullanılmıştır. PCR miksindeki olası bir bulaşma ise PCR miksinde sadece steril deiyonize katılmak suretiyle (kör) tespit edilmeye çalışılmıştır.



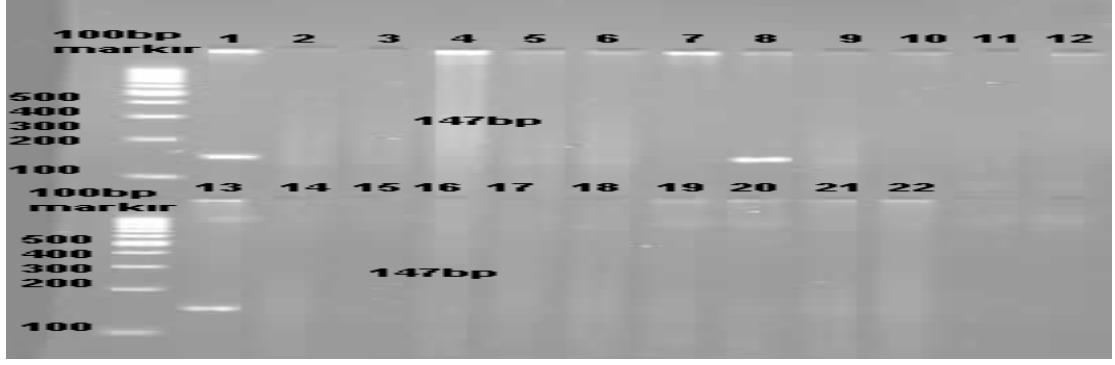
Şekil 4.8 35S3 ve 35S6 primer çifti ile mısır yemlerinde PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.8 Mısır yemlerinde CaMV35S promotör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	14	MY10	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	15	MY11	-
4	MY1	-	16	MY12	-
5	MY2	-	17	MY13	-
6	MY3	-	18	MY14	-
7	MY4	-	19	MY15	-
8	MY5	-	20	MY16	+
9	MY6	-	21	MY17	-
10	MY7	-	22	MY18	-
11	MY8	-	23	MY19	-
12	MY9	-	24	NK %0 RRSoya	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.8 ve Çizelge 4.8' göre, mısır yemi örneklerinden sadece bir tanesi (MY16) pozitif sonuç vermiştir.



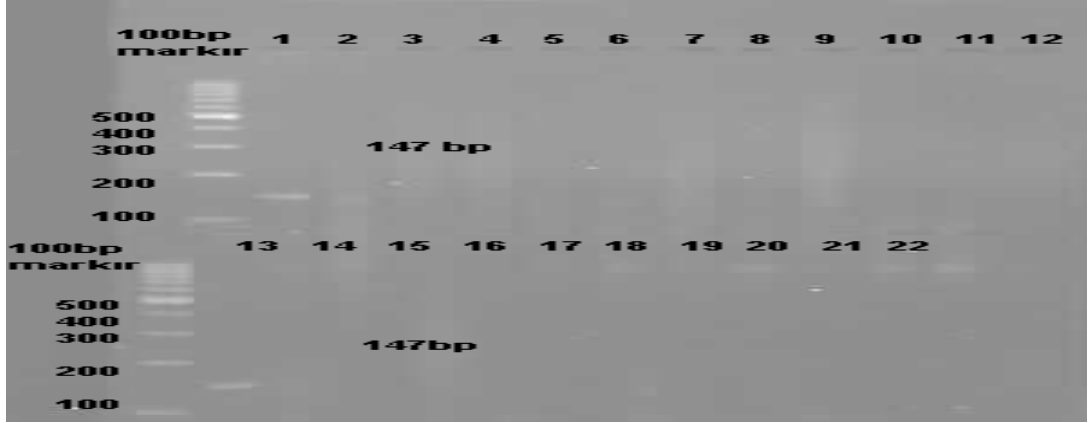
Şekil 4.9 35S3 ve 35S6 primer çifti ile mısır unlarında PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.9 Mısır unlarında CaMV35S promotör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MU9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MU1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MU2	-	16	MU10	-
6	MU3	-	17	MU11	-
7	MU4	-	18	MU12	-
8	MU5	+	19	MU13	-
9	MU6	-	20	MU14	-
10	MU7	-	21	MU15	-
11	MU8	-	22	MU16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.9 ve Çizelge 4.9' a göre, sadece bir mısır unu (MU5) pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.10 35S3 ve 35S6 primer çifti ile mısır nişastalarında PCR amplifikasyonu

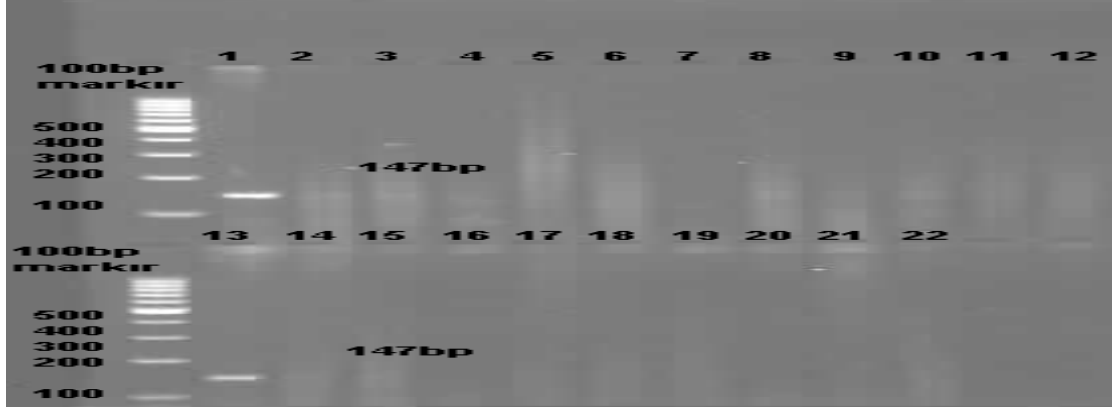
Çizelge 4.10 Mısır nişastalarında CaMV35S promotör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MNİŞ9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MNİŞ1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MNİŞ2	-	16	MNİŞ10	-
6	MNİŞ3	-	17	MNİŞ11	-
7	MNİŞ4	-	18	MNİŞ12	-
8	MNİŞ5	-	19	MNİŞ13	-
9	MNİŞ6	-	20	MNİŞ14	-
10	MNİŞ7	-	21	MNİŞ15	-
11	MNİŞ8	-	22	MNİŞ16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.10 ve Çizelge 4.10' a göre, mısır nişastası örneklerinden pozitif sonuç elde edilememiştir.





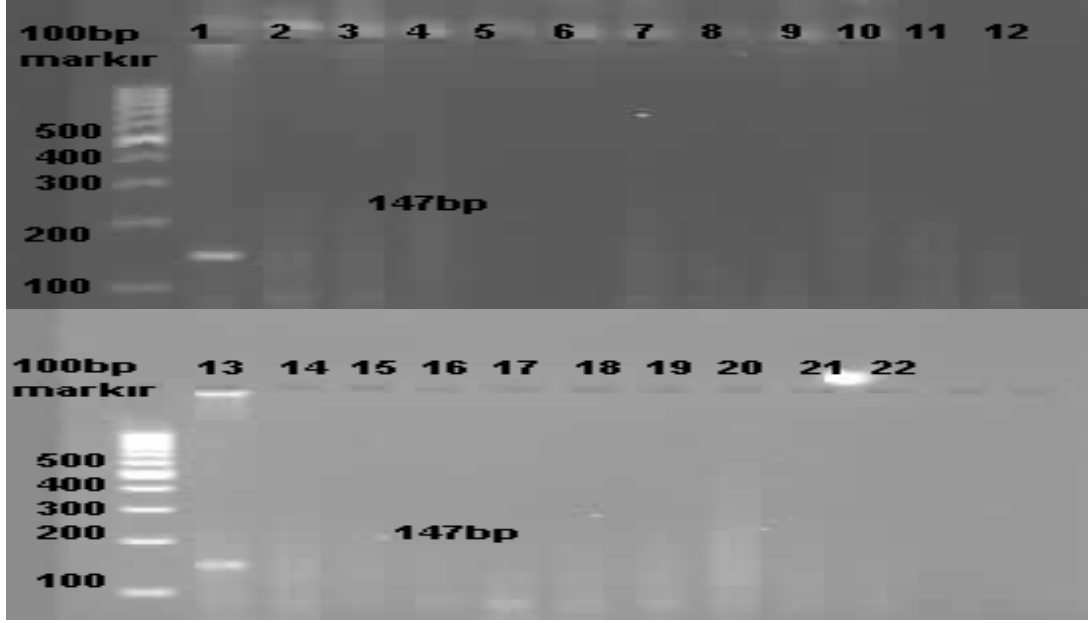
Şekil 4.11 35S3 ve 35S6 primer çifti ile mısır cipslerinde PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.11 Mısır cipslerinde CaMV35S promotör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MC9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK(%0 RRSoya)	-
4	MC1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MC2	-	16	MC10	-
6	MC3	-	17	MC11	-
7	MC4	-	18	MC12	-
8	MC5	-	19	MC13	-
9	MC6	-	20	MC14	-
10	MC7	-	21	MC15	-
11	MC8	-	22	MC16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.11 ve Çizelge 4.11' e göre, mısır cipsi örneklerinden pozitif sonuç elde edilememiştir.



Şekil 4.12 35S-3 ve 35S-6 primer çifti ile mısır gevreklerinde PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.12 Mısır gevreklerinde CaMV35S promotör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MNİŞ9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MG1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MG2	-	16	MG10	-
6	MG3	-	17	MG11	-
7	MG4	-	18	MG12	-
8	MG5	-	19	MG13	-
9	MG6	-	20	MG14	-
10	MG7	-	21	MG15	-
11	MG8	-	22	MG16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.12 ve Çizelge 4.12' ye göre, mısır gevreği örneklerinde 35S promotör yönünden herhangi bir amplifikasyon elde edilememiştir.

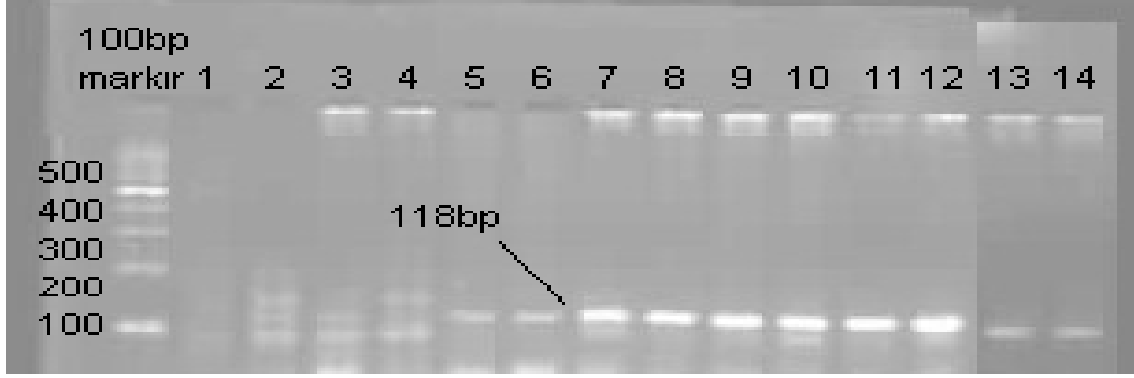
Sonuç olarak; MU5 ve MY16 örnekleri 35 promotör açısından pozitif sonuç verirken, diğer 81 örnek negatif sonuç vermiştir.

#### **4.4.2 Konvansiyonel PCR yöntemi ile NOS terminatör varlığının araştırılması**

NOS terminatör bölgesinin saptanması amacıyla, HaNOSf ve HaNOSr (Çizelge 3.7) primer çifti kullanılmıştır. PCR işlemi sonunda oluşan ampliconların (ürünlerin) büyüklüğü 118 bp' dir. NOS terminatör bölgesi tespitinde, analizin hassasiyet ve tespit limitini belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda (% 0. 0.1, 0.5, 1 ve 2) Bt 11 içeren CRM' lerden DNA' lar High Pure GMO Sample Preparation Kit ile 2 paralelli olarak izole edilip, NOS bölgesinin tespiti için PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez tekniği ile jel dokümantasyon sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.13).

Daha sonra, 83 örneğin hepsinde, NOS terminatör varlığı araştırılmıştır. DNA büyüklüğünü belirlemek amacıyla, 100 bp markır kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak % 1 oranında GM ürün içeren standart referans materyal (% 1 Bt 11), negatif kontrol olarak ise içinde GM ürün bulundurmayan standart referans materyal (% 0 RR Soya) kullanılmıştır. PCR miksindeki olası bir bulaşma ise PCR miksine sadece steril deiyonize katılmak suretiyle (kör) tespit edilmeye çalışılmıştır.

DNA büyüklüğünü belirlemek amacıyla, 100 bp markır kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak % 1 oranında GM ürün içeren standart referans materyal (% 1 Bt 11), negatif kontrol olarak ise içinde GM ürün bulundurmayan standart referans materyal (% 0 RR Soya) kullanılmıştır. PCR miksindeki olası bir bulaşma ise PCR miksine sadece steril deiyonize katılmak suretiyle (kör) tespit edilmeye çalışılmıştır.



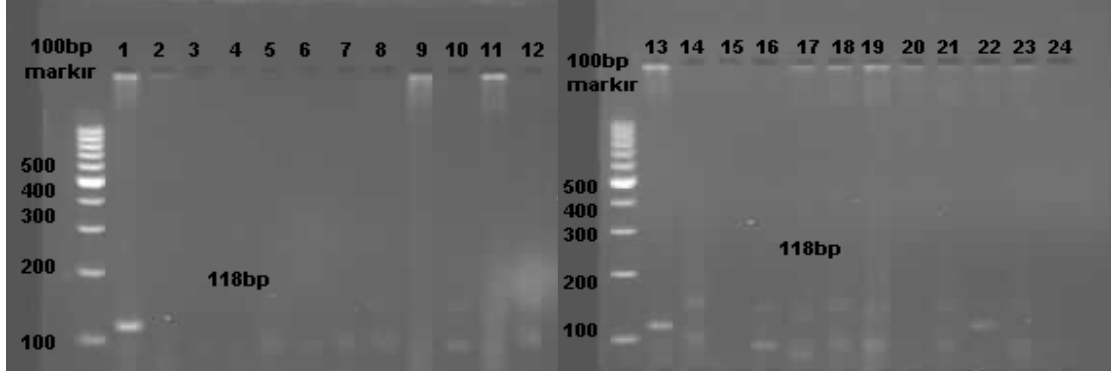
Şekil 4.13 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) NOS terminatör bölgesinin saptanması

Çizelge 4.13 Sertifikalı referans materyallerde (Bt11) NOS terminatör bölgesinin saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> K	-	8	%0.5 Bt11	+
2	<sup>2</sup> NK	-	9	%1 Bt11	+
3	%0 Bt11	-	10	%1 Bt11	+
4	%0 Bt11	-	11	%2 Bt11	+
5	%0.1 Bt11	+	12	%2 Bt11	+
6	%0.1 Bt11	+	13	%5 Bt11	+
7	%0.5 Bt11	+	14	%5 Bt11	+

1 K: Kör , 2 NK: Negatif Kontrol.

Şekil 4.13 ve Çizelge 4.13' e göre, K, NK ve % 0 Bt11 CRM' lerinden negatif sonuç alınmıştır. Diğer CRM' lerin hepsi (% 0.1, % 0.5, % 1, % 2 ve % 5) pozitif sonuç vermiştir. Bu durumda, NOS terminatör bölgesine ait saptama limiti (LOD) % 0.1 olarak belirlenmiştir.



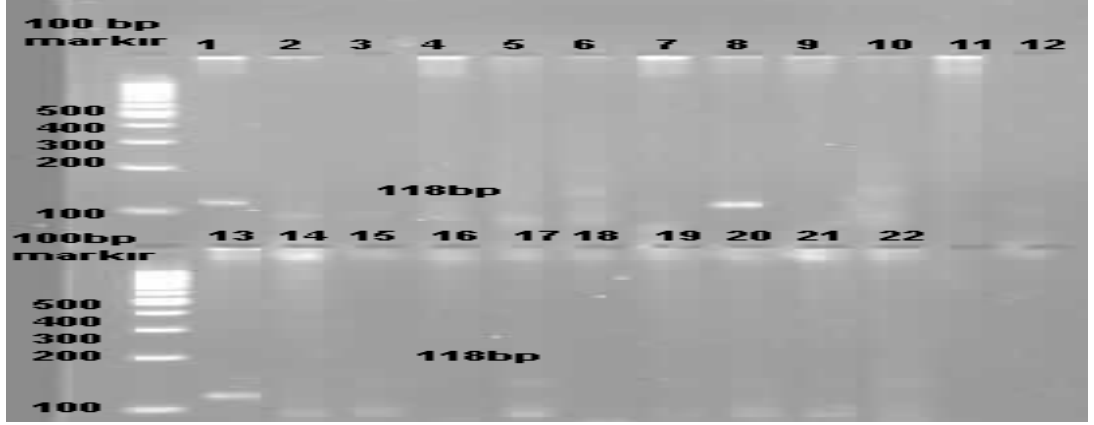
Şekil 4.14 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır yemlerinde PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.14 Mısır yemlerinde NOS terminatör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
2	<sup>2</sup> NK %0 RRSoya	-	14	MY10	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	15	MY11	-
4	MY1	-	16	MY12	-
5	MY2	-	17	MY13	-
6	MY3	-	18	MY14	-
7	MY4	-	19	MY15	-
8	MY5	-	20	MY18	-
9	MY6	-	21	MY17	-
10	MY7	-	22	MY16	+
11	MY8	-	23	MY19	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.14 ve Çizelge 4.14' e göre, bir mısır yemi örneğinde (MY16) NOS terminatör bölgesi tespit edilmiştir. Diğer mısır yemleri NOS terminatör açısından negatiftir.



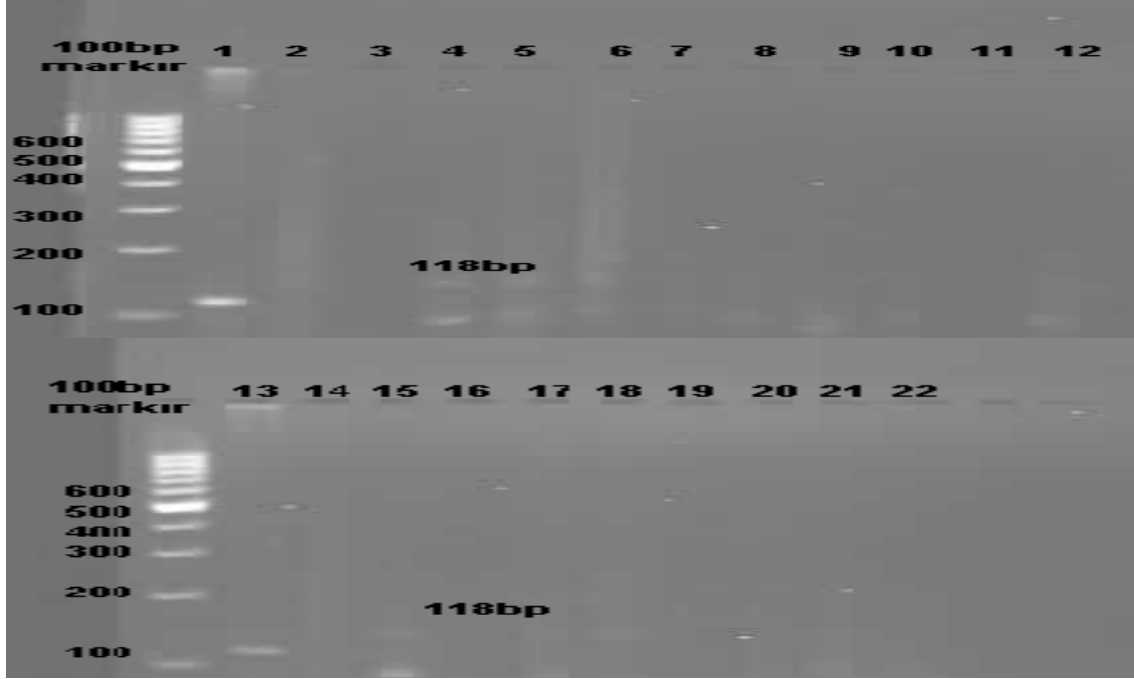
Şekil 4.15 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır unlarında PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.15 Mısır unlarında NOS terminatör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MU9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MU1	-	15	<sup>3</sup> K Su	-
5	MU2	-	16	MU10	-
6	MU3	-	17	MU11	-
7	MU4	-	18	MU12	-
8	MU5	+	19	MU13	-
9	MU6	-	20	MU14	-
10	MU7	-	21	MU15	-
11	MU8	-	22	MU16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.15 ve Çizelge 4.15' e göre, bir mısır unu örneğinde (MU5), NOS terminatör bölgesi tespit edilmiştir. Diğer mısır yemleri NOS terminatör açısından negatiftir.



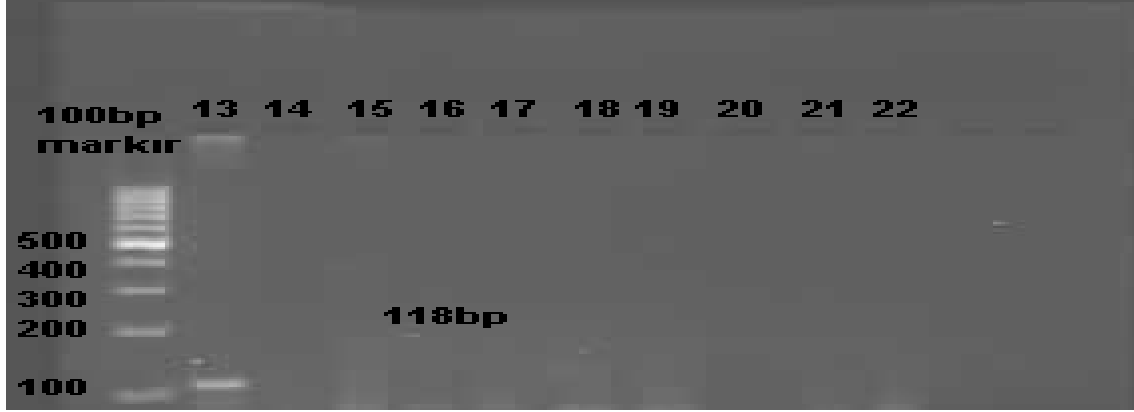
Şekil 4.16 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır cipslerinde PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.16 Mısır cipslerinde NOS Terminatör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MC9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MC1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MC2	-	16	MC10	-
6	MC3	-	17	MC11	-
7	MC4	-	18	MC12	-
8	MC5	-	19	MC13	-
9	MC6	-	20	MC14	-
10	MC7	-	21	MC15	-
11	MC8	-	22	MC16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.16 ve Çizelge 4.16' ya göre, mısır cipslerinde NOS terminatör bölgesine rastlanmamıştır.



Şekil 4.17 HaNOSf ve HaNOSr primer çifti ile mısır nişastalarında PCR amplifikasyonu

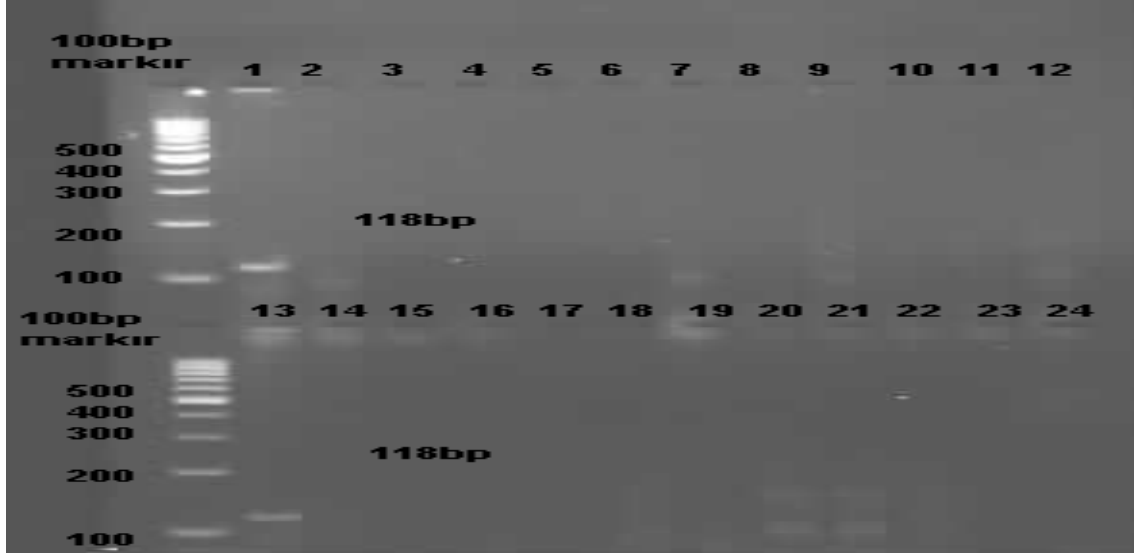
Çizelge 4.17 Mısır nişastalarında NOS terminatör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MNİŞ9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MNİŞ1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MNİŞ2	-	16	MNİŞ10	-
6	MNİŞ3	-	17	MNİŞ11	-
7	MNİŞ4	-	18	MNİŞ12	-
8	MNİŞ5	-	19	MNİŞ13	-
9	MNİŞ6	-	20	MNİŞ14	-
10	MNİŞ7	-	21	MNİŞ15	-
11	MNİŞ8	-	22	MNİŞ16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.17 ve Çizelge 4.17' ye göre, mısır nişastası örneklerinin hepsi NOS terminatör bölgesi açısından negatiftir.





Şekil 4.18 HaNOSf ve HaNOS primer çifti ile mısır gevreklerinde PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.18 Mısır gevreklerinde NOS Terminatör saptanması

Sıra No	Örnek Adı	Sonuç	Sıra No	Örnek Adı	Sonuç
1	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+	12	MNIŞ9	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	13	<sup>1</sup> PK (%1 Bt11)	+
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	14	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-
4	MG1	-	15	<sup>3</sup> K (Su)	-
5	MG2	-	16	MG10	-
6	MG3	-	17	MG11	-
7	MG4	-	18	MG12	-
8	MG5	-	19	MG13	-
9	MG6	-	20	MG14	-
10	MG7	-	21	MG15	-
11	MG8	-	22	MG16	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.18 ve Çizelge 4.18' e göre mısır gevreği örneklerinde NOS terminatör bölgesi açısından negatiftir.

Sonuç olarak, ön validasyon çalışmalarına göre, hem 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin tespitinde kullanılan metodun LOD değeri % 0.5 olarak tespit edilmiştir ve yöntemler aranan bölgeye spesifiktir.

83 numunede klasik PCR ile yapılan tarama sonucunda, sadece bir mısır unu (MU5) ve bir mısır yemi (MY16) numunesinde hem 35S promotör hem de NOS terminatör bölgeleri saptanmıştır. Mısır nişastası, mısır cipsi ve mısır gevreği örneklerinin hepsi GM negatif sonuç vermiştir.

#### **4.5 Real-Time PCR Yöntemi İle 35 S Promotör, NOS Terminatör ve Bitki Geni Varlığının Araştırılması**

35S promotör bölgesi ve NOS terminatör bölgesi tespiti için 35S-NOS Screening kit (Roche) kullanılmıştır. Bir tanesi 35S ve NOS bölgelerinin saptanması, diğeri ise bitki spesifik geni tespit amacıyla, 2 ayrı PCR miksi hazırlanmıştır. Sistemin güvenilir çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla ise bir pozitif kontrol, bir negatif kontrol kullanılmıştır.

**Kanal durumu :** 35S bölgesinin tespiti için soft-ware' in F2/Back-F1 kanalı, NOS bölgesi ve bitki geni tespiti için ise F3/Back-F2 kanalı kullanılmıştır.

**Sonuçların yorumu:** Crossing Point (CP); PCR amplifikasyonunun eksponansiyel faza başladığı döngü sayısıdır. CP>36 olan sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir. 32-36 CP arası kritik değerler olduğu için ilgili çizelgelerde belirtilirken, bu değerlerden daha düşük çıkan CP değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir. Çizelgelerde bahsi geçen ilk CP değerleri, real-time PCR' in soft-ware' inde otomatik olarak belirlediği base-line' a göre elde edilirken, Fit-point (FİTP), aynı analiz için, soft-ware' de CP değerlerini manuel olarak elde etmek için kullanılan bölümdür. Çizelge 4.19' da, mısır unu örneklerinde real-time PCR'da yapılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin CP verileri ve sonuç yorumları verilmiştir.

Çizelge 4.19 35S/NOS açısından analiz edilen mısır unu örnekleri ve sonuçları

ÖRNEKLER	35S	35S FİTP	NOS	NOS FİTP	BİTKİ GENİ	YORUM	TEKERRÜR SAYISI
MU1	34,36	-	> 36		+	-	4
MU1		-	> 36		+		
MU1	34,45	34,45	> 36		+		
MU1	+	-	> 36		-		
MU2	> 36	-	> 36		+	-	8
MU2		-	> 36		+		
MU2	-	-	+	> 36	+		
MU2	+	-	> 36		+		
MU2	35,64	-	-		> 36		
MU2	> 36	-	> 36		+		
MU2	+	> 36	> 36		+		
MU2	35,59	> 36	> 36		+		
MU3	-	-	> 36		+	-	5
MU3	+	35,73	> 36		+		
MU3	> 36	-	> 36		+		
MU3	-	-	-		+		
MU4	+	-	-		+	-	1
MU5	+	+	+	+	+	+	3
MU5	+	+	+	-	+		
MU5	+	+	+	+	+		
MU6	+	34,83	> 36	34,85	+	+	3
MU6	+	-	-	-	+		
MU6	+	+	-	-	+		
MU7	+	-	> 36		+	-	2
MU7	35,20	-	> 36		+		
MU8	+	+	+	+	+	+	2
MU8	+	+	+	+	+		
MU9	+	-	> 36		+	-	3
MU9	+	-	35,09		+		
MU9	+	-	-		+		
MU10	-	-	-		+	-	1
MU11	+	35,63	35,87	+	+	+	2
MU11	+	+	+	+			
MU12	-	-	-		+	-	1
MU13	> 36	> 36	35,58	> 36	+	-	2
MU13	-	-	-	-	+		
MU14	> 36	-	> 36	-	+	-	2
MU14	33,73	-	-	-	+		
MU15	-	-	-	-	+	+	1
MU16	+	-	+	+	+	+	3
MU16	-	-	-	-	+		
MU16	+	+	+	+	+		

Not: MU:Mısır unu

Çizelge 4.19' a göre, mısır unu örneklerinin hepsinde bitki geni saptanmıştır. MU5, MU8 ve MU11 örneklerinde hem 35S hem de NOS bölgesi pozitif sonuç vermiştir. MU6 örneğinde sadece 35S bölgesi pozitif sonuç vermiştir. MU16' da NOS bölgesinin

pozitif sonuç verdiği fit point CP' si ile doğrulanmıştır. MU16 rneğinde, 35S promotör bölgesi incelendiğinde pozitif çıkan 35S promotör değeri fit point sonucuna göre negatif çıkmıştır. Bu yüzden adı geçen rnek 35S negatif olarak kabul edilmiştir. MU12 ve MU15 örneklerinde her iki bölge açısından da bir amplifikasyona rastlanmamıştır. 2 paralel olarak çalışılan MU13 rneğinde, NOS terminatör bölgesinin CP değerlerinden bir tanesi 35.58'dir. Ancak, fit point sonucuna göre bu değerin negatif olduğu dikkati çekmektedir. Aynı şekilde MU14 rneğinin 35S promotörün CP değeri 36' dan küçük bir değer almasına, yani GM pozitif olmasına rağmen, örneğin fit point değeri incelendiğinde GM negatif olduğu görülmektedir. MU1, MU2, MU3, ve MU4 rneklerinin paralellerinde 35S promotör pozitif sonuçlara rastlansa da fit point CP değerlerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Adı geçen örneklerde NOS terminatör açısından pozitiflik rastlanmamıştır.

Çizelge 4.20' de, mısır yemi örneklerinde real-time PCR'da yapılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin CP verileri ve sonuç yorumları verilmiştir. Çizelge 4.20' ye göre, mısır yemi örneklerinin hepsinde bitki geni saptanmıştır. MY16 ve MY18 örneklerinde hem 35S hem de NOS bölgesi pozitif sonuç vermiştir. Beş mısır yemi rneğinde (MY9, MY10, MY13, MY17 ve MY19) her iki bölge açısından da bir amplifikasyona rastlanmamıştır. 2 paralel olarak çalışılan MY7 ve MY15 rneklerinde, 35S promotör bölgesinde amplifikasyona rastlanmazken, NOS terminatör bölgesinin CP değerlerinden birer tanesi 36' dan büyüktür. Bunun zerine adı geçen örneklerin, NOS terminatör bölgelerinin CP değeri fit point' te de incelenerek, negatiflikleri doğrulanmıştır. Diğer mısır yemi örneklerinin paralellerinde 35S promotör ve NOS terminatör bölgeleri açısından çoğu 36' dan büyük CP değeri elde edilerek, iz miktarda pozitif sonuçlara rastlansa da, fit point CP değerlerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Buna göre, mısır yemi örneklerinden sadece MY16 ve MY18 GM pozitif olarak kabul edilerek, tanımlama testlerinin ve miktar tayinlerinin yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.20 35S/NOS açısından analiz edilen mısır yemi örnekleri ve sonuçları

ÖRNEKLER	35S	35SFİTP	NOS	NOSFİTP	BİTKİ GENİ	YORUM	TEKERRÜR SAYISI
MY1	33,45	-	>36	34,62	+	-	4
MY1	34,41	-	-	-	+		
MY1	>36	-	-	-	+		
MY1	>36	-	34,58	-	+		
MY2	>36	-	-	-	+	-	5
MY2	+	-	>36	-	+		
MY2	+	-	>36	-	+		
MY2	>36	-	>36	-	+		
MY2	+	-	+	-	+		
MY3	+		>36		+	-	6
MY3	-		>36		+		
MY3	-	-	>36		+		
MY3	-	-	>36		+		
MY3	>36	-	-		+		
MY3	35,99	-	-		+		
MY4	34,14	-	>36		+	-	5
MY4	-	-	>36		+		
MY4	-	-	>36		+		
MY4	>36	-	-		+		
MY4	>36		+		+		
MY5	>36	-	>36		+	-	2
MY5	34,78	-	-		+		
MY6	>36	-	-		+	-	1
MY6	-		-		+		
MY7	-	-	>36		+	-	2
MY7	-	-	-		+	-	
MY8	>36	-	>36		+	-	4
MY8	-	-	>36		+		
MY8	+	-	-		+		
MY8		-	>36		+		
MY9	-	-	-		+	-	1
MY10	-	-	-		+	-	1
MY11	>36	-	-		+	-	1
MY12	>36	-	-		+	-	1
MY13	-		-		+	-	1
MY14	>36	-	-		+	-	1
MY15	-		-		+	-	2
MY15	-		>36		+		
MY16	+	34,78	+	+	+	+	3
MY16	+	35,56	>36		+	+	
MY16	+	+	+		+	+	
MY17	-		-		+	-	1
MY18	+	+	+	+	+	+	2
MY18	+	+	+	+	+	+	
MY19	-		-		+	-	1

Not: MY: Mısır yemi

Çizelge 4.21’ de mısır nişastası örneklerinde real-time PCR’da yapılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin CP verileri ve sonuç yorumları verilmiştir.

Çizelge 4.21 35S/NOS açısından analiz edilen mısır nişastası örnekleri ve sonuçları

ÖRNEKLER	35S	35S FİTP	NOS	NOS FİTP	BİTKİ GENİ	YORUM	TEKERRÜR SAYISI
MNİŞ1	-		-	-	+	+	3
MNİŞ1	35,80	-	+	+	+		
MNİŞ1	+	-	+	+	+		
MNİŞ2	-	-	>36		+	-	2
MNİŞ2	>36	-	-		+		
MNİŞ3	-	-	+	-	+	-	3
MNİŞ3	+	-	-	-	>36		
MNİŞ3	-	-	-	-	+		
MNİŞ4	-	-	>36		+	-	2
MNİŞ4	+	-	-		+		
MNİŞ5	-		-		+	-	1
MNİŞ6	>36	-	-		+	-	2
MNİŞ6	>36		-		+		
MNİŞ6		-	-		+		
MNİŞ7	-		-		+	-	1
MNİŞ8	>36		>36		+	-	2
MNİŞ8	+	-	-		+		
MNİŞ9	-	-	+	+	+	-	3
MNİŞ9	-	-	-	-	+		
MNİŞ9	-	-	-	-	+		
MNİŞ10	-	-	+	-	+	-	2
MNİŞ10	-	-	-		+		
MNİŞ11	-		-		+	-	1
MNİŞ12	-	-	-		+	-	2
MNİŞ12		-	-		>36		
MNİŞ13	>36	-	-		+	-	4
MNİŞ13	-	-	>36		+		
MNİŞ13		-	-		+		
MNİŞ13	-	-	-		+		
MNİŞ14	-	-	-		+	-	1
MNİŞ15	-	-	-		+	-	1
MNİŞ16	-	-	-		+	-	1

Not: MNİŞ: Mısır nişastası

Çizelge 4.21’ e göre, mısır nişastası örneklerinin hepsinde bitki geni saptanmıştır. Ancak, 2 mısır nişastası (MNİŞ3, MNİŞ12) örneğinin paralellerinin birinde yeterli DNA elde edilememiştir. MNİŞ1 örneğinde hem 35S hem de NOS bölgesi pozitif sonuç vermiştir. Ancak, fit-point sonuçları incelendiğinde, 35S promotöre ait piklerin gürültüden kaynaklandığı ve adı geçen örneğin sadece NOS açısından pozitiflik verdiği

anlaşılmıştır. Altı mısır nişastası örneğinde (MNİŞ7, MNİŞ11, MNİŞ12, MNİŞ14, MNİŞ15 ve MNİŞ16) her iki bölge açısından da bir amplifikasyona rastlanmamıştır. 3 paralel olarak çalışılan MNİŞ9 örneğinde iz miktarda NOS terminatör bölgesi saptandığı için NOS negatif kabul edilmiştir. Diğer mısır nişastası örneklerinin paralellerinde 35S promotör ve/veya NOS terminatör bölgeleri açısından çoğu 36' dan büyük CP değerleri elde edilerek, iz miktarda pozitif sonuçlara rastlansa da, fit point CP değerlerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Buna göre, mısır nişastası örneklerinden sadece bir tane (MNİŞ1) GM pozitif elde edilmiştir.

Çizelge 4.22' de, mısır cipsi örneklerinde real-time PCR'da yapılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin CP verileri ve sonuç yorumları verilmiştir. Çizelge 4.22' ye göre, bazı mısır cipsi örneklerinin (MC12, MC10) birkaç paralelinde bitki geni saptanamamıştır. Değerlendirmeler bitki geni elde edilen paraleller üzerinden yapılmıştır. Buna göre; MC2 ve MC4 örneklerinde hem 35S hem de NOS bölgesi pozitif sonuç vermiştir. MC10 örneği ise sadece NOS bölgesi açısından pozitif sonuç vermiştir. 3 paralel olarak çalışılan MC10 örneğinde, iz miktarda NOS terminatör bölgesi saptandığı için NOS negatif kabul edilmiştir. 8 mısır cipsi örneğinde (MC5, MC7, MC8, MC9, MC13, MC14, MC15, MC16) her iki bölge açısından da bir amplifikasyona rastlanmamıştır. MC11 35S promotör bölgesi açısından pozitif sonuç vermesine rağmen, fit point CP değerlerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Diğer mısır cipsi örneklerinin paralellerinde 35S promotör ve/veya NOS terminatör bölgeleri açısından, çoğu 36' dan büyük CP değerleri elde edilerek, iz miktarda pozitif sonuçlara rastlanmasına rağmen, fit point CP değerlerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Sonuç olarak, 3 mısır cipsi örneğinden (MC2, MC4 ve MC10) GM pozitiflik elde edilmiştir.

Çizelge 4.22 35S/NOS açısından analiz edilen mısır cipsi örnekleri ve sonuçları

ÖRNEKLER	35S	35SFİTP	NOS	NOSFİTP	BİTKİ GENİ	YORUM	TEKERRÜR SAYISI
MC1	-		>36		+	-	2
MC1	>36		-		+		
MC2	+	+	>36		+	+	3
MC2	-	-	-		+		
MC2	+	+	+		+		
MC3	+	-	-		+	-	1
MC4	+	+	+	+	+	+	3
MC4	+		>36	-	+		
MC4	+	+	+	+	+		
MC5	-		-		+	-	1
MC6	-		>36		+	-	2
MC6	-		-		+		
MC7	-		-		+	-	1
MC8	-		-		+	-	1
MC9	-		-		+	-	1
MC10	-	-	>36	+	+	+	3
MC10	-	-	+	+	-		
MC10	+	-	+	+	+		
MC11	+	-	-		+	-	1
MC12	>36	-	-		+	-	5
MC12	>36	-	>36		+		
MC12	-	-	-		-		
MC12	-	-	-		>36		
MC12	-	-	-		>36		
MC13	-		-		+	-	1
MC14	-		-		+	-	1
MC15	-		-		+	-	1
MC16	-		-		+	-	1

Not: MC: Mısır cipsi

Çizelge 4.23' de, mısır cipsi örneklerinde real-time PCR'da yapılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin CP verileri ve sonuç yorumları verilmiştir. Çizelge 4.23' e göre, bazı mısır gevreği örneklerinin birkaç paralelinde bitki geni saptanamamıştır. Değerlendirmeler bitki geni elde edilen paraleller üzerinden yapılmıştır. Buna göre; MG5 örneğinin sadece bir paralelinde yeterli bitki geni elde edilebildiği ve adı geçen paralelin 35S promotör açısından negatif, NOS terminatör bölgesi açısından ise pozitif olduğu görülmektedir. MG1 hem 35S hem de NOS bölgesi açısından pozitif sonuç vermiştir. MG7 ise sadece NOS bölgesi açısından pozitif sonuç vermiştir. 3 paralel olarak çalışılan 5 mısır gevreği örneğinde (MG3, MG8, MG9, MG14, MG16) her iki bölge açısından da bir amplifikasyona rastlanmamıştır. Diğer mısır gevreği örneklerinin bazı paralellerinde 35S promotör ve/veya NOS terminatör bölgeleri açısından çoğu 36'



dan büyük CP değerleri elde edilerek, iz miktarda pozitif sonuçlara rastlanmasına rağmen, fit point CP değerlerinde negatif sonuç elde edilmiştir. Buna göre, 3 mısır gevreği örneğinden (MG1, MG5, MG7) GM pozitiflik elde edilmiştir.

Çizelge 4.23 35S/NOS açısından analiz edilen mısır gevreği örnekleri ve sonuçları

ÖRNEKLER	35S	35SFİTP	NOS	NOSFİTP	BİTKİ GENİ	YORUM	TEKERRÜR SAYISI
MG1	+	+	+	+	+	+	1
MG2	>36	-	-		+	-	1
MG3	-	-	-		+	-	1
MG4	>36	-	-		+	-	1
MG5	-	-	-		>36		
MG5	-	-	-		>36	+	4
MG5	>36	-	+	34,15	+		
MG5	-	-	35,81	34,88	>36		
MG6	-	-	>36	-	>36	-	3
MG6	>36	-	>36		+		
MG6	-	-	-		+		
MG7	-	>36	-	+	34,60	+	3
MG7	35,61	-	+	+	+		
MG7	>36	-	-	+	35,63		
MG8	-	-	-		+	-	1
MG9	-	-	-		+	-	1
MG10	>36	-	>36	35,8	+	-	4
MG10	-	-	+	+	+		
MG10	-	-	-		>36		
MG10	>36	-	-		+		
MG11	>36	-	-		34,60	-	1
MG12	-	-	-		+	-	3
MG13	>36	-	>36		>36	-	4
MG13	-	-	-		>36		
MG13	-	-	-		35,75		
MG13	-	-	-		33,27		
MG14	-	-	-		+	-	1
MG15	-	-	-		+	-	4
MG15	-	-	>36		+		
MG15	-	-	>36		+		
MG15	>36	-	-		+		
MG16	-	-	-		+	-	

Not: MG: Mısır gevreği

Sonuç olarak, analize alınan işlenmiş ve işlenmemiş 83 mısır numunesinden 14 tanesi GM pozitif çıkmıştır. Bu numunelerden 3 mısır unu (MU5, MU8, MU11), 2 mısır cipsi (MC2, MC4), 1 mısır gevreği (MG1) ve 2 mısır yemi (MY16 ve MY18) numunesinde

hem 35S hem de NOS bölgesine rastlanmıştır. Bir mısır unu numunesi (MU16), 2 mısır gevreği numunesi (MG5 ve MG7), 1 mısır nişastası (MNIŞ1) ve 1 mısır cipsi (MC10) numunesinde ise sadece NOS bölgesi pozitif sonuç vermiştir. 1 mısır unu (MU6) numunesinde ise sadece 35S bölgesi pozitif sonuç vermiştir. EK K’de bazı örnekler için 35S promotör ve NOS terminatör real time PCR sonuçları verilmiştir.

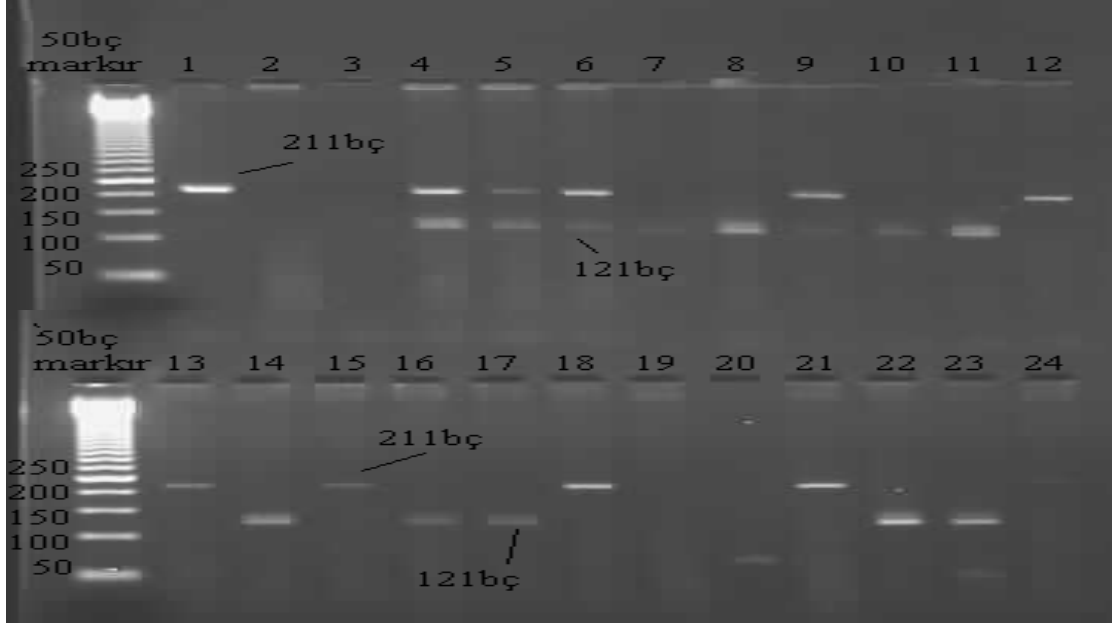
#### **4.6 Tanımlama Testleri**

Tanımlama amacıyla, tarama testleri sonucu GM pozitif çıkan ürünlerde Bt 176, CBH351, Bt11, T25 ve Mon 810 varlığı kalitatif olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, GMO Selection Module (Tepnel Biosystems) kitleri ile multipleks PCR yöntemi kullanılmıştır.

##### **4.6.1 Bt176 mısır tespiti**

Bt176 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol pod (Tepnel Biosystems) u kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Syngenta Seeds Inc. tarafından üretilen Bt176 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz) da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod’ da bulunan pozitif Bt176 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks’ teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR’ da kullanılan örnek DNA’ sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla, paralellerden birisine spike DNA’ sı ilave edilmiştir.

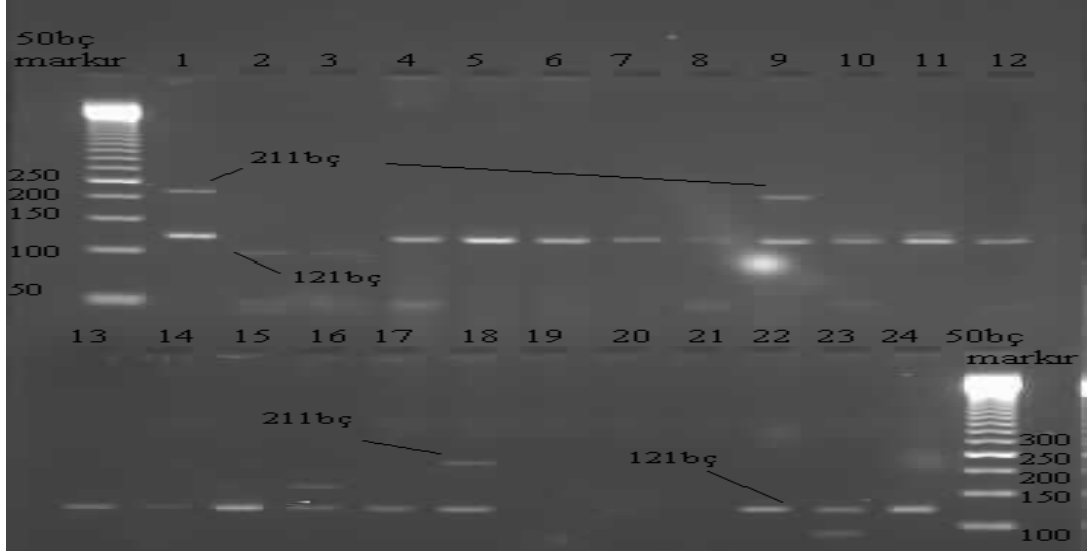


Şekil 4.19 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.24 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt176 211bp	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt176 211bp
1	<sup>1</sup> PK (Bt176 mısır)	+	+	13	MU11	-	+
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	-	14	MU11	+	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	-	15	MU11+S	-	+
4	MU5	+	+	16	MU16	+	-
5	MU5	+	+	17	MU16	+	-
6	MU5+S	+	+	18	MU16+S	-	+
7	MU6	+	-	19	MNİŞ1	-	-
8	MU6	+	-	20	MNİŞ1	-	-
9	MU6+S	+	+	21	MNİŞ1+S	-	+
10	MU8	+	-	22	MY18	+	-
11	MU8	+	-	23	MY18	+	-
12	MU8+S	+	+	24	MY18+S	-	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör



Şekil 4.20 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.25 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt176 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt176 211bp	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt176 211bp
1	<sup>1</sup> PK(Bt176 mısır)	+	+	13	MC10	+	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	-	14	MC10	+	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	-	15	MC10+S	+	-
4	MY16	+	-	16	MG1	+	-
5	MY16	+	-	17	MG1	+	-
6	MY16+S	+	-	18	MG1+S	+	+
7	MC2	+	-	19	MG5	-	-
8	MC2	+	-	20	MG5	-	-
9	MC2+S	+	+	21	MG5+S	-	-
10	MC4	+	-	22	MG7	+	-
11	MC4	+	-	23	MG7	+	-
12	MC4+S	+	-	24	MG7+S	+	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.19 ve 4.20'ye göre, mısır unu ve mısır yemi numunelerinin hepsinde invertaz bölgeleri saptanırken, diğer işlenmiş ürünlerden sadece mısır nişastası (MNİŞ1) ve bir mısır gevreğinde (MG5) invertaz bölgesi saptanamamıştır. Bu örneklerden ilkinde mısır DNA' sının, ikincisinde ise hem mısır DNA' sını hem de Bt176 hedef bölgesinin inhibisyona uğradığı spike DNA' sının çalışmaması ile anlaşılmıştır. Örneklerden mısır

unlarından birinde (MU5) Bt176 pozitiflik saptanırken, diğer bir tanesinde (MU11) metot LOD' sinin altında, iz miktarda Bt176 pozitiflik saptanmıştır. Mısır unu ve mısır yemi gibi işlenmemiş veya az işlenmiş mısır ürünlerinde spike içeren DNA' ların Bt176 bölgesinin düzgün bir şekilde çalıştığı, dolayısıyla ürün DNA' larından kaynaklanan herhangi bir inhibisyon olmadığı anlaşılmıştır. Ancak, spike içeren DNA' ların çoğunda, Bt176 PCR ürününün oluşumunun invertaz bölge oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir. Çok işlenmiş ürünlerde ise, MC2 ve MG1 numunelerinde spike içeren ürün DNA' sının iki bölgede de çalıştığı gözlenirken diğer spike içeren ürün DNA' larının Bt176 bölgesinin çalışmadığı gözlenmiştir. Bu durum bu şekilde sonuç veren ürün DNA' larının ilgili PCR sistemini inhibe ettiği anlamına gelmektedir ve ürünlerin işlenmeleri sırasında DNA' larda meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.6.2 Bt11 mısır tespiti**

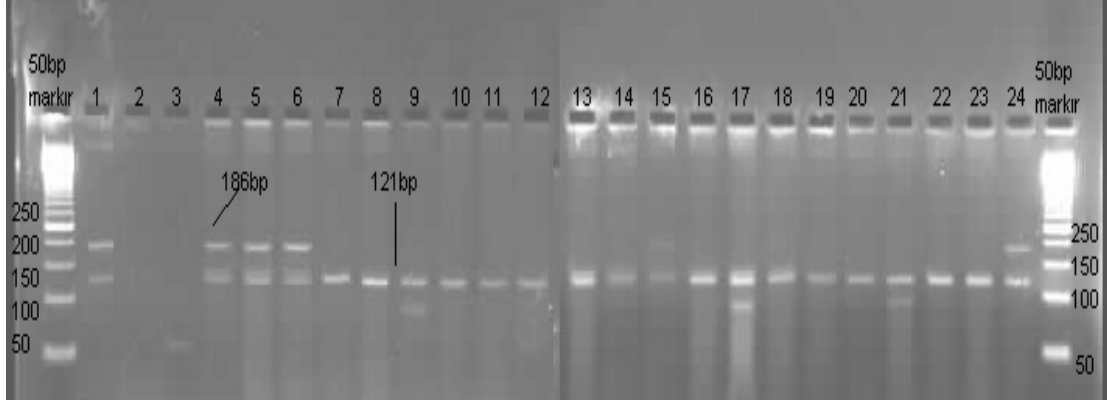
Bt11 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Syngenta Seeds Inc tarafından üretilen Bt11 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz)' da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif Bt11 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla, paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir.

#### **PCR Sonrası Analizler:**

0.5X TBE (Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromit çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA

markır 10  $\mu$ L, örnekler ise 15  $\mu$ L olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü Bt11 mısır için 186 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

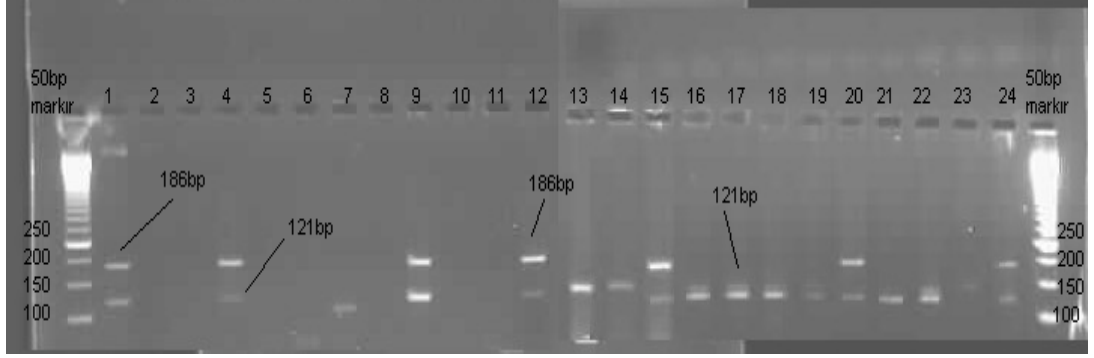


Şekil 4.21 GM pozitif mısır unlarında Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.26 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt11 186bp	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt11 186bp
1	PK(Bt11 mısır)	-	+	13	MU11	+	-
2	NK (%0 RRSoya)	-	-	14	MU11	+	-
3	Kör	-	-	15	MU11+S	+	+
4	MU5	+	+	16	MU16	+	-
5	MU5	+	+	17	MU16	+	-
6	MU5+S	+	+	18	MU16+S	+	-
7	MU6	+	-	19	MY16	+	-
8	MU6	+	-	20	MY16	+	-
9	MU6+S	+	-	21	MY16+S	+	-
10	MU8	+	-	22	MY18	+	-
11	MU8	+	-	23	MY18	+	-
12	MU8+S	+	-	24	MY18+S	+	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör



Şekil 4.22 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.27 GM pozitif mısır ürünlerinde Bt11 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt11 186bp	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Bt11 186bp
1	<sup>1</sup> PK(Bt11 mısır)	+	+	13	MC2	+	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	-	14	MC2	+	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	-	15	MC2+S	+	+
4	MG1	+	+	16	MC4	+	-
5	MG1	-	-	17	MC4	+	-
6	MG1+S	-	-	18	MC4+S	+	-
7	MG5	+	-	19	MC10	+	-
8	MG5	-	-	20	MC10	+	+
9	MG5+S	+	+	21	MC10+S	+	-
10	MG7	-	-	22	MNiŞ1	+	-
11	MG7	-	-	23	MNiŞ1	+	-
12	MG7+S	+	+	24	MNiŞ1+S	+	+

1PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol

### Sonuç:

Şekil 4.21 ve 4.22' ye göre; mısır unu ve mısır yemi numunelerinin hepsinde invertaz bölgeleri saptanmıştır. Diğer işlenmiş ürünlerden MG1' in bir paraleline ait DNA' nın tüm PCR' ı inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca, MG5' in bir paralelinde, MG7' nin ise iki paralelinde invertaz bölgesi saptanamamıştır. Örneklerden, mısır unlarından birinde (MU5) Bt176 pozitiflik saptanırken, iki mısır cipsinde (MC2, MC10) ve bir mısır gevreğinde (MG1) Bt11 pozitiflik saptanmıştır. Ancak, bahsi geçen numunelerden son üçünün (MC2, MC10 ve MG1) paralel DNA' larından birer tanesinin tüm PCR' ı inhibe

ettiği gözlenmiştir. Mısır unu ve mısır yemi gibi işlenmemiş veya az işlenmiş mısır ürünlerinde spike içeren DNA' ların Bt176 bölgesinin düzgün bir şekilde çalıştığı, dolayısıyla ürün DNA' larından kaynaklanan herhangi bir inhibisyon olmadığı anlaşılmıştır. Çok işlenmiş ürünlerden MG5 ve MG7 numunelerinde spike içeren ürün DNA' sının iki bölgede de çalıştığı gözlenirken, MG5' te invertaz bölgesi LOD' nin altında saptanmış, MG7' de ise saptanamamıştır. Bu durum, ürün DNA' sının ilgili PCR sistemini inhibe ettiği anlamına gelmektedir ve ürünlerin işleme sırasında DNA' larda meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.6.3 Mon810 mısır tespiti**

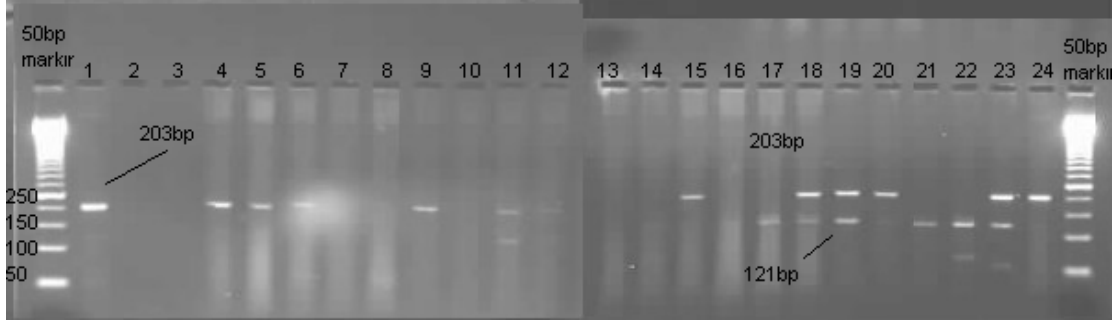
Mon810 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol pod (Tepnel Biosystems) u kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Monsanto tarafından üretilen Mon810 (YieldGard™) mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz) da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif Mon810 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla, paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir.

#### **PCR Sonrası Analizler:**

0.5X TBE (Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromür çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü Mon810 mısır için 203 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.





Şekil 4.23 GM pozitif mısır unlarında Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.28 GM pozitif mısır ürünlerinde Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu

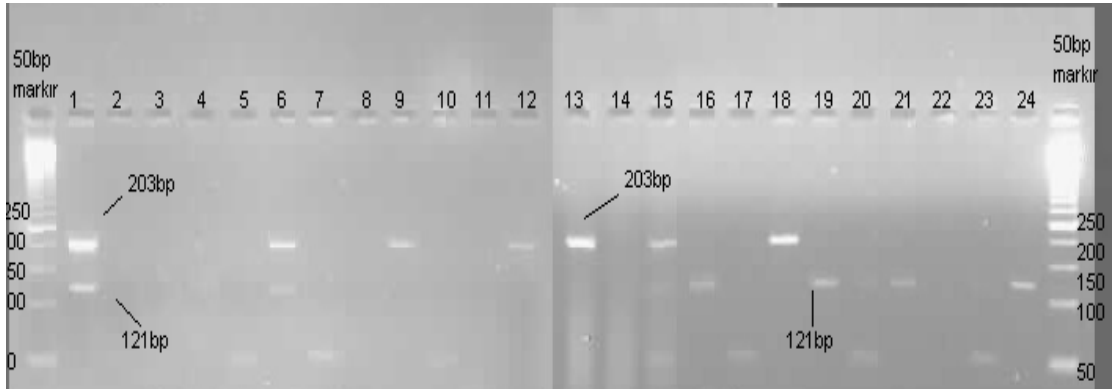
Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Mon810	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Mon810
1	PK (Mon810 mısır)	+	+	13	MU11	-	-
2	NK (%0 RRSoya)	-	-	14	MU11	-	-
3	Kör	-	-	15	MU11+S	-	+
4	MU5	-	+	16	MU16	+	-
5	MU5	-	+	17	MU16	+	-
6	MU5+S	-	+	18	MU16+S	+	+
7	MU6	-	-	19	MY16	+	+
8	MU6	-	-	20	MY16	+	+
9	MU6+S	-	+	21	MY16+S	+	-
10	MU8	-	-	22	MY18	+	-
11	MU8	+	+	23	MY18	+	+
12	MU8+S	-	+	24	MY18+S	-	+

PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

### Sonuç:

Şekil 4.23' e göre, MU5 numunesinde Mon810 bölgesi çalışırken invertaz bölgesi çalışmamıştır. Bu durum, multipleks PCR sisteminde Mon810 bölgesinin invertaz bölgesini baskıladığını göstermektedir. MU6 numunesinde ise invertaz bölgesi çalışmamış, ancak spike DNA' sını içeren çalışmada Mon810 bölgesinin çalıştığı gözlenmiştir. Böylelikle, bu ürünün de Mon810 açısından negatif olduğu, ancak ürün DNA' sının invertaz bölgesi oluşumu açısından PCR sistemini inhibe ettiği saptanmıştır. MU8 numunesinin ise sadece bir paraleli hem invertaz hem de Mon810 açısından negatif sonuç verirken, diğer bir paraleli her iki yönden pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca, ürünün spike içeren DNA' sını da Mon810 yönünden pozitif sonuç

vermiştir. Bu durum, ürün paralellerinden birinin invertaz bölge oluşumunu inhibe ederken Mon810 bölge oluşumuna etkili olmadığı ve negatif olduğunu göstermektedir. Böylelikle, Mon810 açısından bir paraleli negatif diğeri pozitif sonuç veren MU8' in metot LOD' sinin altında, yani iz miktarda Mon810 içerdiği veya Mon810 ile bulaşık olduğu sonucuna varılabilmektedir. MU11 numunesinin ise, spike içeren paraleli de dahil, invertaz bölgesi çalışmazken, Mon810 bölgesi sadece spike' lı paralelde pozitif sonuç vermiştir. Bu durumda, MU11 numunesinin invertaz bölgesini inhibe ederken Mon810 bölgesine etki göstermediği ve negatif olduğu söylenebilmektedir. İvertaz bölgesi, sadece MU16 ve MY16' da, tüm paralellerde pozitif sonuç vermiştir. MY18 numunesi ise sadece spike' lı paralelde invertaz açısından negatiftir. Mon810 bölgesi açısından MU16 negatif iken, MY16 pozitifdir. MY18 ise iz miktarda (metot LOD' sinin altında) Mon810 içermektedir.



Şekil 4.24 GM pozitif mısır unlarında Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.29 GM pozitif mısır ürünlerinde Mon810 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Mon810 203bp	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	Mon810 203bp
1	<sup>1</sup> PK (Mon810mısır)	+	+	13	MC2	-	+
2	<sup>2</sup> NK( %0 RRSoya)	-	-	14	MC2	-	-
3	Kör	-	-	15	MC2+S	-	+
4	MG1	-	-	16	MC4	+	-
5	MG1	-	-	17	MC4	-	-
6	MG1+S	+	+	18	MC4+S	-	+
7	MG5	-	-	19	MC10	+	-
8	MG5	-	-	20	MC10	+	-
9	MG5+S	-	+	21	MC10+S	+	-
10	MG7	-	-	22	MNİŞ1	-	-
11	MG7	-	-	23	MNİŞ1	-	-
12	MG7+S	-	+	24	MNİŞ1+S	-	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol

Şekil 4.24' e göre; MG1, MG5, MG7, MC2, MC4 ve MNİŞ1 gibi işlenmiş ürünlerde spike içeren paralellerde Mon810 saptanırken, MG1 hariç, tüm örneklerde invertaz bölgesi saptanmamıştır. Bu durum, bahsi geçen ürünlerden izole edilen DNA' nın PCR sistemini invertaz açısından inhibe ederken, Mon810 bölgesine herhangi bir baskılayıcı bir etkiye sahip olmadığına göstergesidir. Böylelikle, diğer paralellerinde de Mon810 bölgesi saptanamayan MG1, MG5, MG7, MC4 ve MNİŞ1 numunelerinin Mon810 açısından negatif, MC2 numunesinin ise iz miktarda olmak üzere pozitif olduğu sonucuna varılabilmektedir. MC4 numunesinin sadece bir paralelinde, MC10 numunesinin ise tüm paralellerinde invertaz bölgesi çalışmıştır. Ancak; MC10 numunesi, spike' lı paraleli de dahil olmak üzere, Mon810 açısından negatiftir. Yani, MC10 DNA' sı sistemi Mon810 açısından inhibe etmiştir. Bu yüzden, bahsi geçen numunenin Mon810 açısından negatif ya da pozitif olduğu konusunda net bir sonuca varmak mümkün değildir.

Sonuç olarak; MU8, MY18 ve MC2 numunelerinde iz miktarda olmak üzere MU5, MY16 numuneleri Mon810 açısından pozitif, MC10 hariç, diğerleri negatiftir. MC10' dan ise sağlıklı bir netice alınamamıştır.

#### 4.6.4 T25 mısır tespiti

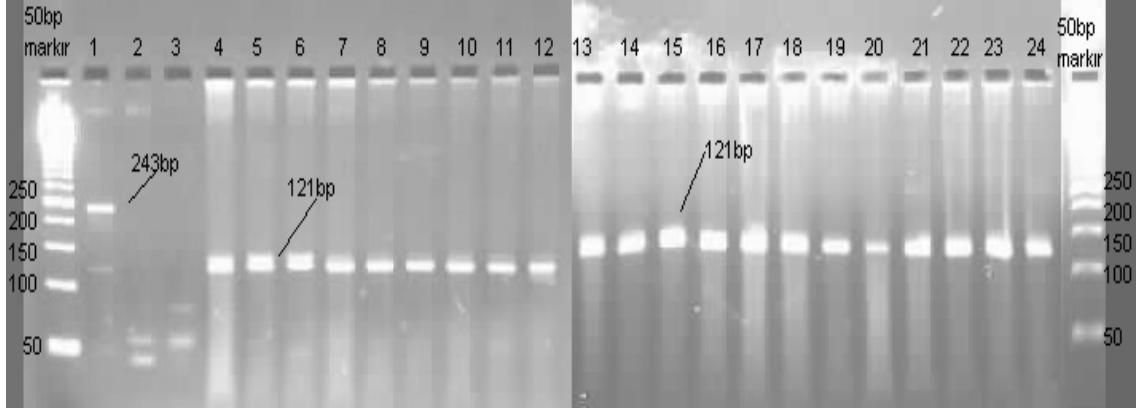
T25 mısır tespit edebilmek amacıyla, bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol pod (Tepnel Biosystems) u kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Aventis Crop Science tarafından üretilen T25 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz) da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif T25 mısır, negatif kontrol olarak % 0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir.

#### PCR Sonrası Analizler:

0.5X TBE (Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL etidium bromit çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü T25 mısır için 243 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

GM pozitif ürünlerde T25 mısır çalışması sonuçları Şekil 4.25, Şekil 4.26, Çizelge 4.30 ve Çizelge 4.31' de verilmiştir.

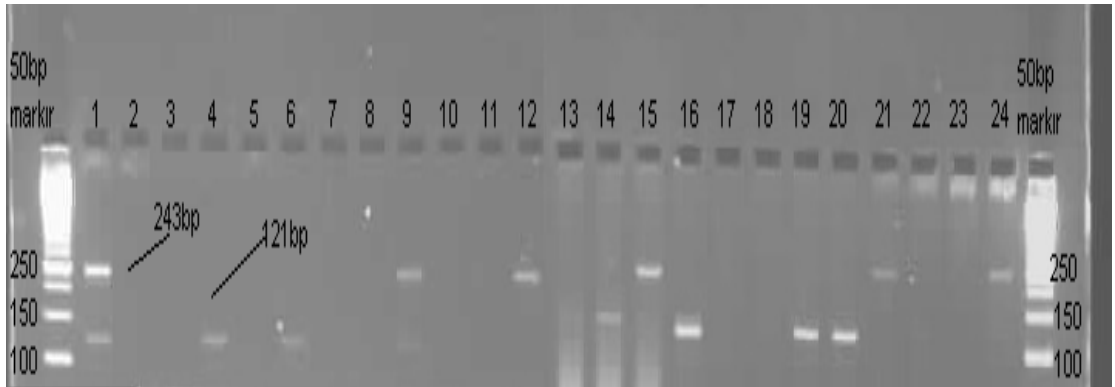


Şekil 4.25 GM pozitif mısır unlarında T25 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.30 GM pozitif mısır ürünlerinde T25 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	invertaz	T25 121 bp	T25 186 bp	Sıra No	Örnek Adı	invertaz	T25 121 bp	T25 186 bp
1	<sup>1</sup> PK(T25 mısır)	+	+	+	13	MU11	+	-	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	-	-	14	MU11	+	-	-
3	<sup>3</sup> K (Su)	-	-	-	15	MU11+S	+	-	-
4	MU5	+	-	-	16	MU16	+	-	-
5	MU5	+	-	-	17	MU16	+	-	-
6	MU5+S	+	-	-	18	MU16+S	+	-	-
7	MU6	+	-	-	19	MY16	+	-	-
8	MU6	+	-	-	20	MY16	+	-	-
9	MU6+S	+	-	-	21	MY16+S	+	-	-
10	MU8	+	-	-	22	MY18	+	-	-
11	MU8	+	-	-	23	MY18	+	-	-
12	MU8+S	+	-	-	24	MY18+S	+	-	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör



Şekil 4.26 GM pozitif mısır ürünlerinde T25 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.31 GM pozitif mısır ürünlerinde T25 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	T25 186bp	Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	T25 186bp
1	<sup>1</sup> PK (T25 mısır)	+	+	13	MC2	-	-
2	<sup>2</sup> NK (%0 RRSoya)	-	-	14	MC2	+	-
3	<sup>3</sup> K	-	-	15	MC2+S	-	+
4	MG1	+	-	16	MC4	+	-
5	MG1	-	-	17	MC4	-	-
6	MG1+S	+	-	18	MC4+S	-	-
7	MG5	-	-	19	MC10	+	-
8	MG5	-	-	20	MC10	+	-
9	MG5+S	-	+	21	MC10+S	-	+
10	MG7	-	-	22	MNİŞ1	-	-
11	MG7	-	-	23	MNİŞ1	-	-
12	MG7+S	-	+	24	MNİŞ1+S	-	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.25 ve 4.26' ya göre, mısır unu ve mısır yemi numunelerinin hepsinde invertaz bölgeleri saptanırken, T25 bölgesi inhibisyona uğramıştır. İşlenmiş mısır numunelerinden ise MG1, MC2 ve MC4' de iz miktarda invertaz bölgesi saptanırken, diğerlerinde invertaz bölgesi inhibisyona uğramıştır. MG1 ve MC4 numunelerinde de T25 bölgesi inhibisyona uğradığından, bu bölgeler hakkında kesin hükme varılamamıştır. MG5, MG7, MC10 ve MNİŞ1 numunelerinde ise spike' lı paraleller pozitif, diğer paraleller negatif sonuç vermiştir. Bu sebeple, bahsi geçen numuneler T25 açısından negatiftir.

#### 4.6.5 CBH351 mısır tespiti

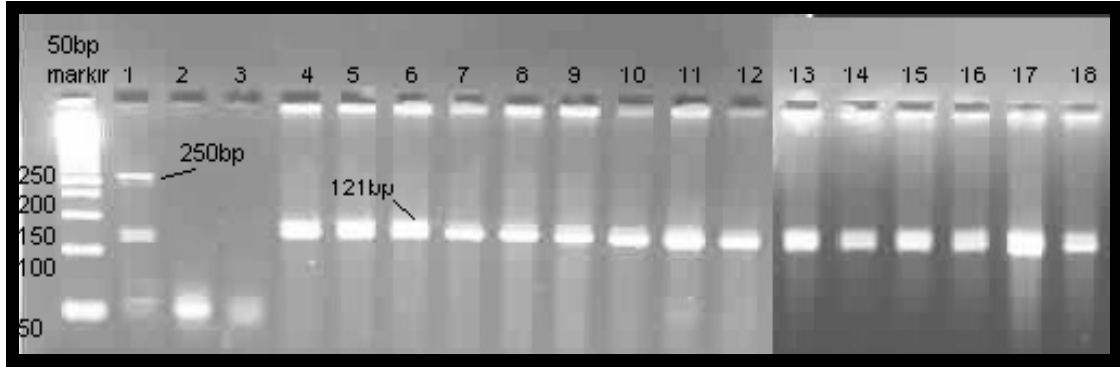
CBH351 mısır tespit edebilmek amacıyla bir multipleks PCR master miksi (Tepnel Biosystems) ile kontrol podu (Tepnel Biosystems) kullanılmıştır. Bu multipleks master miksi Aventis Crop Science tarafından üretilen CBH351 mısırı spesifik olarak saptarken, aynı zamanda örnekteki mısır varlığını (invertaz)' da saptamaktadır.

Denemelerde pozitif kontrol olarak kontrol pod' da bulunan pozitif CBH351 mısır %0 RR Soya sertifikalı standart referans materyal, miks' teki ve DNA izolasyonu sırasındaki olası bir bulaşmayı tespit etmek amacıyla ise ekstraksiyon kör kullanılmıştır. Örnekler 3 paralel çalışılmış olup, PCR' da kullanılan örnek DNA' sından meydana gelebilecek herhangi bir inhibisyonun saptanması amacıyla paralellerden birisine spike DNA' sı ilave edilmiştir.

### PCR Sonrası Analizler:

0.5X TBE (Tris Borat EDTA) Tampon ile % 3' lük agaroz jel hazırlanmıştır. 10 mg/mL Etidium Bromür çözeltisinden 5µL eklenmiştir. Kontrol pod'dan alınan 50 bp DNA markır 10 µL, örnekler ise 15 µL olacak şekilde jele yüklenmiştir. Beklenen bant büyüklüğü CBH351 mısır için 250 bp, invertaz için ise 121 bp' dir.

GM pozitif ürünlerde CBH351 mısır çalışması sonuçları, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29' da ve Çizelge 4.32, Çizelge 4.33 ve Çizelge 4.34' de verilmiştir.

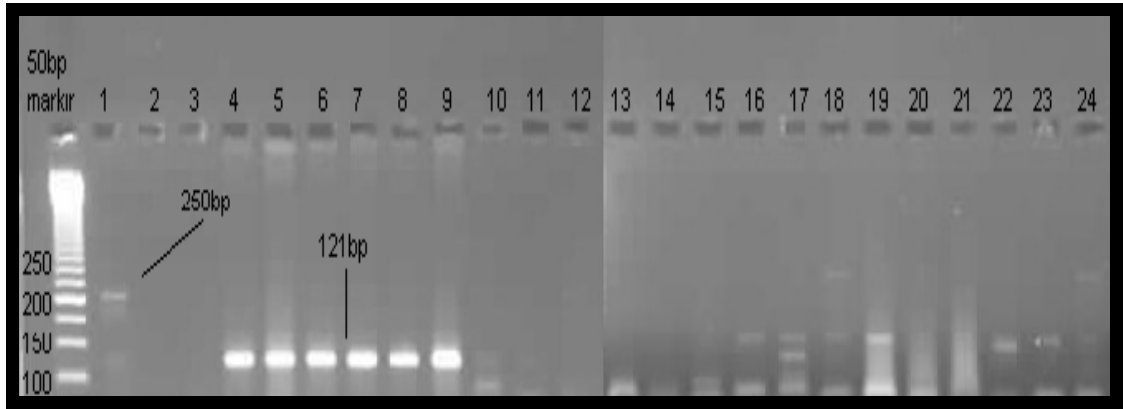


Şekil 4.27 GM pozitif mısır unlarında CBH351 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.32 GM pozitif mısır unlarında CBH351 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121 bp	CBH351 250 bp	Sıra No	Örnek Adı	invertaz	CBH351 250 bp
1	<sup>1</sup> PK (CBH351 mısır)	+	+	10	MU8	+	-
2	<sup>2</sup> NK( %0 RRSoya)	-	-	11	MU8	+	-
3	<sup>3</sup> K	-	-	12	MU8+S	+	-
4	MU5	+	-	13	MU11	+	-
5	MU5	+	-	14	MU11	+	-
6	MU5+S	+	-	15	MU11+S	+	-
7	MU6	+	-	16	MU16	+	-
8	MU6	+	-	17	MU16	+	-
7	MU6+S	+	-	16	MU16+S	+	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör



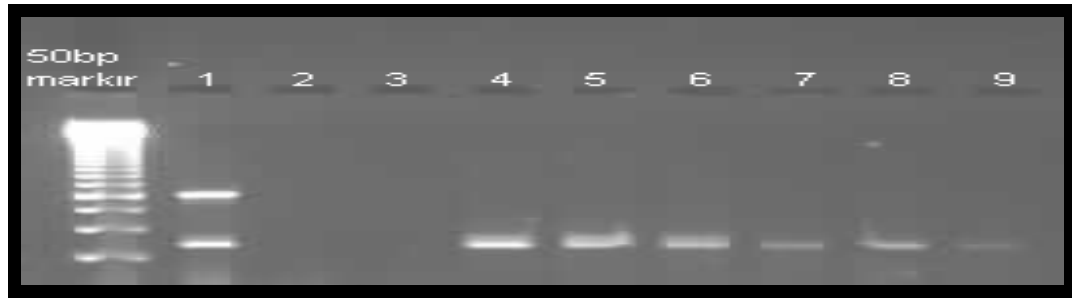
Şekil 4.28 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH351 multipleks PCR amplifikasyonu



Çizelge 4.33 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH351 multipleks PCR

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	CBH351 250bp	Sıra No	Örnek Adı	invertaz	CBH351
1	PK(CBH351 mısır)	+	+	13	MG5	-	-
2	NK(%0 RRSoya)	-	-	14	MG5	-	-
3	Kör	-	-	15	MG5+S	-	-
4	MY16	+	-	16	MG7	+	-
5	MY16	+	-	17	MG7	+	-
6	MY16+S	+	-	18	MG7+S	+	+
7	MY18	+	-	19	MC2	+	-
8	MY18	+	-	20	MC2	-	-
9	MY18+S	+	-	21	MC2+S	-	-
10	MG1	-	-	22	MNİŞ1	+	-
11	MG1	-	-	23	MNİŞ1	+	-
12	MG1+S	-	-	24	MNİŞ1+S	+	+

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör



Şekil 4.29 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH351 multipleks PCR amplifikasyonu

Çizelge 4.34 GM pozitif mısır ürünlerinde CBH351 multipleks PCR amplifikasyonu

Sıra No	Örnek Adı	İnvertaz 121bp	CBH351 250bp
1	PK (CBH351 mısır)	+	+
2	NK (%0 RRSoya)	-	-
3	Kör	-	-
4	MC4	+	-
5	MC4	+	-
6	MC4+S	+	-
7	MC10	+	-
8	MC10	+	-
9	MC10+S	+	-

1 PK: Pozitif Kontrol, 2 NK: Negatif Kontrol, 3 K: Kör

Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29' a göre; mısır yemi, mısır unu ve mısır nişastası gibi tüm işlenmemiş veya yarı-işlenmiş mısır örneklerinde invertaz saptanırken, çok işlenmiş mısır numunelerinin bazılarının (MG1, MG5) DNA' sının invertaz bölgesi açısından PCR' ı inhibe ettiği gözlenmiştir. Yine, MC2 numunesinin de sadece bir paralelinde invertaz bölgesi saptanırken diğer paraleli invertaz bölgesi açısından PCR' ı inhibe etmiştir. Diğer çok işlenmiş mısır numunelerinde ise invertaz bölgesi saptanmıştır. MG7 ve MNİŞ1 haricinde tüm örneklerin, spike' lı paralelleri dahil, hepsi CBH351 bölgesi açısından negatif sonuç vermiştir. Bu durum bahsi geçen numunelerin DNA' sının CBH351' i inhibe ettiğini göstermektedir. Yani, bu ürünler hakkında CBH351 açısından net bir yargıya varmak mümkün değildir. MG7 ve MNİŞ1 ise sadece spike' lı paralellerinde CBH351 açısından pozitif sonuç vermiş olup, ürün DNA' sı bu bölgede inhibe edici bir etkiye sahip değildir ve bu ürünler CBH351 açısından negatiftir.

#### **4.7 Miktar Analizleri**

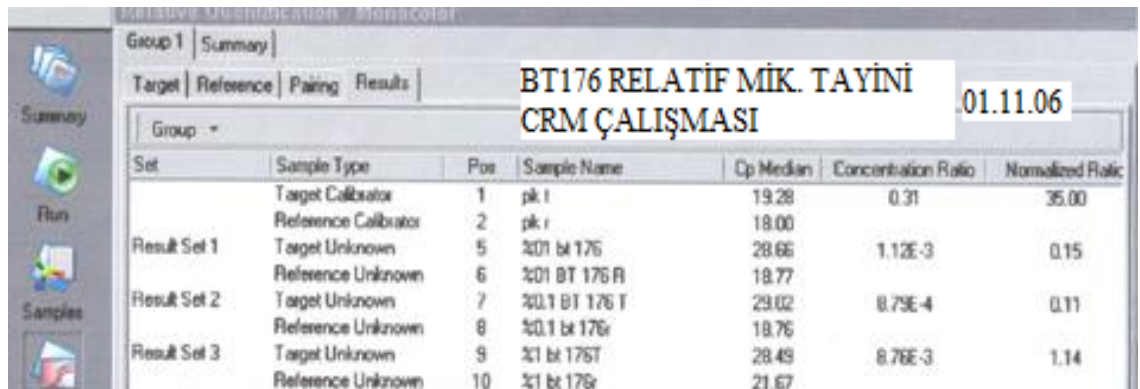
##### **4.7.1 Real-time PCR yöntemi ile Bt176 miktar tayini**

Bu amaçla Bt 176 Quntification (Roche) ve Sure Food Bt176 (R-Biofarm) kitleri kullanılmaktadır. Bu kitlerden ilki relatif kuantifikasyon amacıyla diğeri absolute kuantifikasyon amacıyla kullanılmaktadır. Her iki kitin de optimizasyon süreci tamamlanmıştır. Bt 176 Quntification Kit (Roche) için validasyon çalışmaları devam etmektedir. Bu amaçla materyal olarak IRRM' den temin edilmiş olan çeşitli oranlardaki Bt 176 standart referans materyaller kullanılmaktadır.

Sadece 35S promotör ve NOS terminatör bölgeleri pozitif sonuç veren örneklerde miktar tayin analizleri yapılmıştır.

#### 4.7.1.1 Bt 176 Quantification Kit (Roche) ile relatif kuantifikasyon (miktar tayini)

Bu kit ile bir gıda örneğindeki Bt 176 mısır miktarı, Bt 176 mısır DNA' sının örnekteki toplam mısır miktarına oranı olarak hesaplanır. Bir örneğin relatif GMO içeriğinin saptanması bir örneğin crossing point değerine ve PCR' in etkinliğine bağlıdır. Crossing point (CP) değeri PCR amplifikasyonunun eksponansiyel faza başladığı döngü sayısıdır. PCR' in verimliliği (efficiency) ise reaksiyon sırasındaki kinetikleri belirtir. Tüm reaksiyonun etkinliği ise kalibrasyon kurvesinin eğimi (slope) olarak ifade edilir (Vaerman 2004). Kullanılan hibridizasyon problemleri ve primerler, hem Bt176 hem de referans gene spesifik PCR verimliliklerine sahip olduklarından, kalibrasyon eğrileri ayrı olarak verilmelidir. Gıda prosesi sırasındaki DNA degradasyonu GMO miktar analizini etkileyebilmektedir. Şekil 4.30' da % 0.1 ve % 1' lik Bt176 CRM' lerine ait sonuçlar verilmiştir. Şekil 4.30' a göre ön validasyon çalışmalarında Bt176 relatif kantitasyon analizinin saptama limiti % 0.1 olduğu görülmektedir.



Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio
	Target Calibrator	1	pk i	19.28	0.31	35.00
	Reference Calibrator	2	pk i	18.00		
Result Set 1	Target Unknown	5	%01 bt 176	28.66	1.12E-3	0.15
	Reference Unknown	6	%01 BT 176 R	18.77		
Result Set 2	Target Unknown	7	%0.1 BT 176 T	29.02	8.73E-4	0.11
	Reference Unknown	8	%0.1 bt 176r	18.76		
Result Set 3	Target Unknown	9	%1 bt 176T	28.49	8.76E-3	1.14
	Reference Unknown	10	%1 bt 176r	21.67		

Şekil 4.30 % 0.1 ve % 1' lik CRM' lere ait Bt176 sonuçları

35S ve/veya NOS yönünden pozitif olan örneklerde Bt176 relatif miktar analizlerine ait şekillerin bir kısmı EK L' de verilmiştir. Çizelge 4.35' de ise analizlerin tümü verilerek sonuçlar yorumlanmıştır.

Çizelge 4.35 Bt176 açısından relatif miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları

ÖRNEK ADI	SONUÇ DEĞERLENDİRME	SONUÇ	CP T	CP R
MU5A	0.05	0.05	30.64	21.75
MU5A		0.05	30.62	21.70
MU5A		0.05	30.68	21.73
MU5B		0.06	30.8	21.98
MU5B		0.05	31.12	22.19
MU5B		0.05	31.07	22.22
MU6A	İz miktar	0	TE	22.24
MU6B		6.09E-03	34.64	
MU6A		0	TE	22.03
MU8	0	0	TE	
MU11A	0.01	9.94E-03	33.96	22.49
MU11A		0.01	33.76	22.51
MU11A		0.01	33.43	22.52
MU11B		0.02	33.47	22.64
MU11B		0.01	33.74	22.68
MU11B		0.01	33.75	22.68
MU16	İz miktar	7.95E-03	34.73	20.01
MY16A	0.04	0.05	33.51	23.87
MY16A		0.05	33.63	24.18
MY16B		0.03	33.89	23.83
MY16B		0.03	34.14	23.93
MY18A	İz miktar	0	TE	23.47
MY18B		0.07	32.63	23.62
MY18		0	TE	
MC2A	Sonuçlar çelişkili	25.13	35.48	33.95
MC2A	(≥5-iz miktar)	0	TE	34.78
MC2B		TE	TE	TE
MC2B		TE	36.37	TE
MC2A		0	TE	34.28
MC2B		1.95	37.94	34.22
MC2		96.94	34.44	33.77

Çizelge 4.35 Bt176 açısından relatif miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları  
(devam)

ÖRNEK ADI	SONUÇ DEĞERLENDİRME	SONUÇ	CP T	CP R
MC4A		TE	TE	TE
MC4A		TE	TE	TE
MC4B		TE	TE	TE
MC4B		TE	TE	TE
MC4A		0	TE	28,24
MC4A		0	TE	28.44
MC4B		95.3	26.53	28.47
MC4B	Sonuçlar çelişkili (≥5-iz miktar)	0.26	35.64	28.54
MC4		3.84E+0 3		
MC4		0.05		
MC4A		0.06		
MC4A		0.06		
MC4		0.56		
MC4		3.42		
MC4		0	TE	32.43
MC4		TE	36.26	TE
MC4		TE	TE	TE
MC10A		0		
MC10A		0		
MC10B		13.05		
MC10B		10.37		
MC10A		8.91		
MC10B	Sonuçlar çelişkili (≥5-iz miktar)	9.06		
MC10A		TE		
MC10A		TE		
MC10B		0.6		
MC10B		0.2		
MC10		0.72		
MC10		TE		
MC10		TE		

Çizelge 4.35 Bt176 açısından relatif miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları  
(Devam)

ÖRNEK ADI	SONUÇ DEĞERLENDİRME	SONUÇ	CP T	CP R
MG1A		TE	35.61	TE
MG1A		9.08	36.79	35.01
MG1B		5.76	37.35	35.27
MG1B		0	TE	35.26
MG1A		TE	TE	TE
MG1A		TE	TE	TE
MG1B		TE	TE	TE
MG1B	Sonuçlar çelişkili (≥5-iz miktar)	0	TE	34.46
MG1A		5.94	34.44	30.31
MG1B		8.77	34.11	30.57
MG1A		TE		TE
MG1A		TE		TE
MG1B		TE	35.91	TE
MG1B		TE	35.13	TE
MG1		67.69		
MG1		1.79E+02		
MG1		TE		TE
MG1		TE		TE
MG1		10.81	32.05	28.16
MG5A		0	TE	34.24
MG5A	0	0	TE	35.86
MG5B		TE	34.85	TE
MG5B		TE	TE	TE
MG7A		TE	36.62	TE
MG7A		9.68	36.24	34.97
MG7B		10.32	34.67	33.52
MG7B		10.3	33.9	32.77
MG7A		7.18	33.69	29.86
MG7B	≥5	8.73	33.25	29.72
MG7A		TE	35.69	TE
MG7A		TE	36.85	TE
MG7B		TE		TE
MG7B		TE		TE
MG7		4.9	34	28.88
MG7		TE		TE
MG7		TE		TE
MNİŞ1	0	0	TE	35.86

Te: Tespit edilemedi

\*Kit ancak % 5' e kadar GM içeren örneklerde güvenilir hesaplama yapılmasına imkan verdiği için numune sonuçlarından % 5' ten büyük olabileceği düşünülen örnekler >5 olarak belirtilmiştir.

Çizelge 4.35' de görüleceği üzere MU5, MU11 ve MY16 numunelerinde Bt176 relatif miktar tayininde güvenli pozitif sonuç vermiştir. Buna göre MU5, MU11 ve MY16 numuneleri, sırasıyla, % 0.05, 0.01 ve 0.04 oranlarında Bt176 mısır içermektedir ve bu değer, Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre, etiketleme sınırı olan %0.9' un altındadır. MU6, MU8, MU16, MY18, MG5 ve MNİŞ1 numuneleri ise Bt176 yönünden negatiftir. Ancak MU6, MU16 ve MY18 numunelerinin bazı paralelerinde metot LOD' sinin çok altında Bt176 gözlenmiştir. Bu durum, numunelerin iz miktarda genetik modifiye Bt176 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Çok işlenmiş mısır ürünlerinin çoğu ya yetersiz DNA içerdiği için analiz sonucu alınamıştır ya da paraleller arası değişken miktarlarda Bt176 mısır içerdiği saptanmıştır. Bu durumun, ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA' sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, ürün DNA' sında işleme sırasında olabilecek muhtemel zararlar, hedef bölge ve mısır geni (zein) üzerinde farklı derecelerde meydana gelebilmektedir.

#### **4.7.1.2 Sure Food Bt 176 Quntification Kit (R-Biofarm) ile absolute kuantifikasyon**

Bt176 bölgesinin saptanması amacıyla Sure food Bt176 Quantification Kit (R-Biofarm) kullanılarak absolute kuantifikasyon yapılmıştır

35S ve/veya NOS yönünden pozitif olan örneklerde Bt176 absolute miktar analizlerine ait şekillerin bir kısmı EK M' de verilmiştir. Çizelge 4.36' de ise analizlerin tümü verilerek sonuçlar yorumalanmıştır.

Çizelge 4.36 Bt176 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MU5	0.14	0.11	7.49E+01	9.02E+04	32.53	22.2	1 tekerrür
MU5		0.15	1.01E+02	8.93E+04	32.2	21.15	2 E. 2 P
MU5		0.11	6.28E+01	7.89E+04	32.83	21.62	
MU5		0.11	6.99E+01	7.97E+04	32.69	21.59	
MU6	0	0	TE	7.50E+04	TE	21.82	1 tekerrür
MU6		0	TE	6.85E+04	TE	21.78	1 E. 2 P
MU8	0	0	TE	6.30E+04	TE	22.3	2 tekerrür
MU8		0	TE	7.38E+04	TE	21.82	
MU8		0	TE	4.18E+01	TE	30.84	1. tekerrür 2 E. 1 P
MU11	İz miktar	0	[7.34E-01]	7.50E+04	37.09	21.78	2. tekerrür 1 E, 1 P
MU11		1.33E-03	TE	6.85E+04	TE	22.05	2 tekerrür
MU11		0	TE	5.19E+01	TE	30.62	1. tekerrür 2 E, 1 P
MU16	0	0	TE	7.12E+04	TE	21.93	2. tekerrür 1 E, 1 P
MU16		0	TE	7.83E+04	TE	21.65	1 tekerrür
MY16		0	TE	4.95E+03	TE	24.06	1 E, 2 P
MY16	İz miktar	0	TE	4950	TE	24.52	3 tekerrür
MY16		5.39E-04	[9.51E-02]	1.11E+04	38.19	24.24	1. ve 2. tekerrür
MY16		0	TE	1.12E+04	TE	24.23	1 E. 1 P
MY16		0	TE	1.07E+04	TE	24.3	3. tekerrür
MY16		0	TE	1.05E+04	TE	24.33	2 E. 2 P



Çizelge 4.36 Bt176 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları (Devam)

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MY18	İz miktar	0	TE	8.09E+03	TE	23.77	2 tekerrür
MY18		0	TE	1.66E+04	TE	23.62	
MY18		0	TE	1.70E+04	TE	23.58	1. tekerrür
MY18		0	TE	1.53E+04	TE		1 E, 1 P
MY18		1.10E-05		1.70E+04	>40	23.59	2. tekerrür
MNİŞ1	Sonuçlar çelişkili	0	TE	[1.06E-01]	TE	34.6	1 E, 3 P
MNİŞ1		1.58	[3.20E-01]	[6.43E-01]	36.62	33.05	2 tekerrür
MNİŞ1		50.49	[<2.3E-03]	[1.47E-01]		34.33	1 E, 3 P
					>40		2. tekerrür
MNİŞ1		3.20E-02	[<2.97E-03]	[5.80]	>40	35.96	2 E, 1 P
MNİŞ1		0	TE	[6.50]	TE	35.78	
MC2	İz miktar	0	TE	[2.02E+02]	TE	39.65	1. tekerrür
MC2		5.00E-03	[1.28E-02]	[3.56E+02]	37.94	39.86	1 E, 2 P
MC4	Sonuçlar çelişkili	0	TE	7.46E+03	TE	28.75	3 tekerrür
MC4	(≥5-iz miktar)	0	TE	6.67E+03	TE	29.08	
MC4		0	TE	1.01E+02	37.24	29.69	1. tekerrür
MC4		0	TE	4.43E+01	TE	28.46	1 E, 3 P
MC4		703.9	[4.68E-02]	4.17E+01	38.04	28.54	2. tekerrür
MC4		10.31	[<9.91E-02]	[1.12]	□40		2 E, 1 P
MC4		0	TE	[9.97E-01]	TE		3 tekerrür
MC10	Sonuçlar çelişkili	0	TE	1.28E-01	>40	35.5	3 tekerrür
MC10	(≥5-iz miktar)	1.51E+03	[<2.3E-03]	[4.41]	>40	32.44	
MC10		0	TE	[1.23]	TE	28.03	1. tekerrür
MC10		0	TE	53	TE	32.49	1 E, 1 P
MC10		6.11E-03	>40	30.6	>40	33.39	2. tekerrür
MC10		0	TE	28.4	TE	33.46	2 E, 1 P
MC10		0	TE	18.3	TE	34.15	3. tekerrür
							2 E, 2 P

Çizelge 4.36 Bt176 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları (Devam)

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MG1	Sonuçlar	0	TE	3.51E-01	>40	34.05	3 tekerrür
MG1	çelişkili	1.82E+03	[<2.30E-03]	[2.72]	>40	31.67	
MG1	(≥5-iz miktar)	8.73E+02	[<2.30E-03]	[2.01]	>40	31.94	1. tekerrür
MG1		0	TE	[6.20E+02]	TE	36.26	1 E, 1 P
MG1		0	TE	[4.58E+02]	TE	37.18	2. ve 3. tekerrür
MG5	0	0	TE	[3.35E+02]	TE	38.11	2 E, 1 P
MG5		0	TE	[2.05E+02]	TE	39.61	1 tekerrür
MG7	Sonuçlar	TE	TE	TE	TE	TE	1 E, 2 P
MG7	çelişkili	305.69	[<2.30E-03]	8.90E-01	>40	32.75	4 tekerrür
MG7	(≥5-iz miktar)	1.03E+02	[<2.30E-03]	3.00E-01	>40	33.72	1. tekerrür
MG7		8.79	[<9.91E-02]	1.29	>40	34.10	1 E, 1 P
MG7		0	TE	1.63	TE	33.90	
MG7		0.71	[3.58]	[6.8E+02]		35.98	2. ve 3. tekerrür
MG7		0	TE	[4.90E+02]	TE	36.97	2 E, 1 P
MG7		0	TE	[7.66E+02]	TE	35.62	4. tekerrür
MG7		0	TE	[4.13E+02]	TE	37.48	2 E, 1 P

E: Ekstraksiyon sayısı. P: Paralel sayısı, TE: Tespit edilemedi

Çizelge 4.36' da görüleceği üzere, sadece bir numune (MU5) Bt176 absolute miktar tayininde güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 0.14 Bt176 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre etiketleme sınırı olan % 0.9' un altındadır. MU6, MU8, MU16 ve MG5 numuneleri ise Bt176 yönünden negatiftir. Yine MU11, MY16, MY18 ve MC2 numunelerinin bazı paralelerinde metot LOD' sinin çok altında Bt176 gözlenmiştir. Bu durum, numunelerin iz miktarda genetik modifiye Bt176 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmı ya yetersiz ya da güvenilir olmayan sonuca sahiptir. Bu durum, saptanan zein geni ve hedef bölgedeki çelişkili veya güvenilir olmayan sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Her ne kadar belli oranlarda bütün ürünlerin zein geni içerdiği tespit edilse de, çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmı ya yetersiz ya da güvenilir sonuç alınamayacak olan absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan "50" kopyanın altındadır. Bu durumun, ürün işlenme sırasında işlenme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA' sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.7.2 Real-time PCR yöntemi ile MON810 miktar tayini**

MON810 bölgesinin saptanması amacıyla Sure food MON810 Quantification Kit (R-Biofarm) kullanılarak absolute kuantifikasyon yapılmıştır. 35S ve/veya NOS yönünden pozitif olan örneklerde MON 810 miktar analizlerine ait şekillerin bir kısmı EK 17' da verilmiştir. Çizelge 4.37' de ise analizlerin tümü verilerek sonuçlar yorumlanmıştır.

Çizelge 4.37 Mon810 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MU5		3.59	5.25E+02	1.69E+04	27.16	21.34	4 tekerrür
MU5		4.06	5.26E+02	1.50E+04	27.16	21.52	
MU5		3.98	5.63E+02	1.64E+04	27.06	21.39	1. tekerrür
MU5		3.2	4.07E+02	1.50E+04	27.53	22.29	2 E, 3 P
MU5		6.45	4.11E+02	7.64E+03	27.51	23.31	
MU5		3.06	4.17E+02	1.63E+04	27.49	22.16	2. 3. 4.
MU5A		2.35	1.56E+03	5.18E+04	26.84	20.81	tekerrür
MU5A		2.26	1.41E+03	4.86E+04	26.99	20.9	2 E, 2 P
MU5B		2.46	1.80E+03	5.71E+04	26.62	20.69	
MU5B		2.15	1.60E+03	5.80E+04	26.8	20.67	
MU5A	2.83	1.96	5.34E+02	2.13E+04	27.35	21.29	
MU5A		1.89	5.33E+02	2.20E+04	27.36	21.24	
MU5B		2.34	6.17E+02	2.06E+04	27.14	21.34	
MU5B		2.74	6.02E+02	1.72E+04	27.18	21.6	
MU5A		1.43	5.92E+02	4.42E+04	27.86	20.98	
MU5A		1.2	5.60E+02	4.97E+04	27.55	20.79	
MU5B		1.63	6.76E+02	4.43E+04	27.65	20.98	
MU5B		1.99	8.38E+02	4.51E+04	27.32	20.95	
MU6A	İz miktar	0.0074	[9.36E-01]	1.45E+04	35.55	21.57	1 tekerrür
MU6B		0	TE	1.29E+04	TE	21.74	2 E, 1 P
MU8A	İz miktar	8.06E-05	[2.19E-02]	3.15E+02	39.56	27.3	1 tekerrür
MU8B		0	TE	3.08E+02	TE	27.33	2 E, 1 P
MU11A	0	0	TE	3.08E+02	TE	27.34	1 tekerrür
MU11B		0	TE	2.92E+02	TE	27.42	2 E, 1 P

Çizelge 4.37 Mon810 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları (Devam)

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MU16A		İNV	4.05	TE	34.34	TE	3 Tekerrür
MU16B		0.86	3.28	4.57E+02	34.65	27.55	1. ve 2.
MU16A		0	TE	3.25E+04	TE	21.68	Tekerrür
MU16B		0	TE	3.19E+04	TE	21.71	2 E, 1 P
MU16B	İz miktar	8.00E-03	[4.12]	3.64E+04	35.78	21.28	3. Tekerrür
MU16B		1.32E-02	[4.23]	2.56E+04	35.74	21.74	2 E, 2 P
MU16B		1.39E-02	[9.19]	5.15E+04	34.63	20.82	
MU16B		1.71E-02	[10.9]	4.97E+04	34.37	20.87	
MY16		9.70E-02	2.02E+06	4.21E+02	36.83	22.53	3 Tekerrür
MY16A		5.20E-02	[4.9]	1.08E+04	33.59	22.01	1. Tekerrür
MY16B		5.20E-02	[4.93]	1.10E+04	3.58	21.98	1 E, 1P
MY16A	İz miktar	5.10E-02	4.78	1.01E+04	33.6	23.36	2. Tekerrür
MY16A		4.40E-02	43.2	1.05E+05	31.72	23.3	2 E, 1P
MY16B		3.60E-04	[3.53E-01]	1.05E+05	35.2	23.31	3. Tekerrür
MY16B		8.30E-05	[7.9E-01]	1.01E+04	34.75	23.37	2 E, 2 P
MY18		0.00E+00	TE	1.73E+02	21	TE	2 Tekerrür
MY18A	İz miktar	0.00E+00	TE	1.22E+04	21.82	TE	1. Tekerrür
MY18B		1.28E-04	[<1.40E-02]	1.26E+04	21.78	>40	1 E,1 P 2. Tekerrür 2 E, 1 P

Çizelge 4.37 Mon810 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları (Devam)

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MC2A		TE	TE	TE	TE	TE	3 Tekerrür
MC2B		TE	TE	TE	TE	TE	1. ve 2.
MC2A		TE	TE	TE	TE	TE	Tekerrür
MC2B		TE	TE	2,53E-01	TE	37,21	2 E, 1 P
MC2A	Yetersiz DNA	TE	TE	[8,75E-01]	TE	36,29	3. Tekerrür
MC2A		TE	TE	TE	TE	TE	2 E, 2 P
MC2B		TE	TE	[4,92E-01]	TE	37,15	
MC2B		TE	TE	[5,45E-01]	TE	36,99	
MC4		0	TE	6,43E+03	TE	27,08	2 Tekerrür
MC4A	0	0	TE	1,30E+02	TE	28,63	1. Tekerrür
MC4B		0	TE	1,40E+02	TE	28,52	1 E,1 P
							2. Tekerrür
							2 E, 1 P
MC10A	Yetersiz DNA	1,7	4,99	2,29E+02	35,51	27,92	6 Tekerrür
MC10B	Çelişkili Sonuç	0	TE	1,34+02	TE	28,62	1. Tekerrür
MC10		11,97	5,26E+06	1,35E+05	38,46	32,46	2 E,1 P
MC10A		TE	[6,21E-01]	2,12E-01	37,17	37,39	2. Tekerrür
MC10B		TE	[1,41]	TE	35,92	TE	1 E, 1 P
MC10A		TE	[6,05E-01]	2,61E+01	35,17	31,25	3. Tekerrür
MC10A		TE	[2,47E-03]	3,18E+01	38,99	30,96	2 E,1 P
MC10B		TE	TE	1,36E+01	TE	33,22	4. Tekerrür
MC10B		TE	TE	1,74E+01	TE	31,85	2 E, 2 P
MC10A		TE	TE	[7,95]	TE	33,18	5. Tekerrür
MC10B		TE	TE	1,21E+01	TE	32,74	2 E,1 P
MC10A		TE	[7,63]	2,46E+01	33,04	31,13	6. Tekerrür
MC10A		TE	[1,22]	2,68E+01	35,25	31,13	1 E, 3 P
MC10A		TE	[1,32E-01]	2,68E+01	37,71	31,10	

Çizelge 4.37 Mon810 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları (Devam)

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Cry Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MG1A	Yetersiz DNA	TE	TE	3.59E+01	TE	35.93	3 Tekerrür
MG1B		TE	TE	TE	TE	TE	
MG1A		TE	TE	TE	TE	TE	1. 2. 3.
MG1B		TE	TE	TE	TE	TE	Tekerrür
MG1A		TE	TE	35.97	TE	35.97	2 E, 1 P
MG1B		TE	TE	35.78	TE	35.78	
MG5A	Yetersiz DNA	TE	TE	TE	TE	TE	2 Tekerrür
MG5B		TE	TE	37.22	TE	37.22	1. 2.
MG5A		TE	TE	TE	TE	TE	Tekerrür
MG5A		TE	[4.57]	TE	35.64	TE	2 E, 1 P
MG7A	Yetersiz DNA	TE	TE	TE	TE	TE	2 Tekerrür
MG7B		TE	TE	29.46	TE	29.46	1. ve 2.
MG7A		TE	TE	37.39	TE	37.39	Tekerrür
MG7B		TE	TE	TE	TE	TE	2 E, 1 P
MNİŞ1A	Yetersiz DNA	TE	TE	34.64	TE	34.64	2 Tekerrür
MNİŞ1B		TE	TE	34.61	TE	34.61	1.ve 2.
MNİŞ1A		0	TE	28.75	TE	28.75	Tekerrür
MNİŞ1B		TE	TE	29.15	TE	29.15	2 E, 1 P

E: Ekstraksiyon sayısı, P: Paralel sayısı, TE: Tespit edilemedi

Çizelge 4.37’ de görüleceği üzere, sadece bir numune (MU5) Mon810 absolute miktar tayininde güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 2.83 Mon810 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre etiketleme sınırı olan % 0.9’ un üstündedir ve etiketlenmesi gerekmektedir. MU6, MU8, MU16 ve MG5 numuneleri ise Mon810 yönünden negatiftir. Yine MU11, MY16, MY18 ve MC2 numunelerinin bazı paralelerinde metot LOD’ sinin çok altında Mon810 gözlenmiştir. Bu durum, numunelerin iz miktarda genetik modifiye Mon810 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmı ya yetersiz ya da güvenilir olmayan sonuca sahiptir. Bu durum, saptanan zein geni ve hedef bölgedeki çelişkili veya güvenilir olmayan sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Her ne kadar belli oranlarda bütün ürünlerin zein geni içerdiği tespit edilse de, çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmı ya yetersiz ya da güvenilir sonuç alınamayacak olan absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan “50” kopyanın altındadır. Bu durumun ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA’ sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.7.3 Real-time PCR yöntemi ile Bt 11 miktar tayini**

Bt11 bölgesinin saptanması amacıyla Sure food Bt11 Quantification Kit (R-Biofarm) kullanılarak absolute kuantifikasyon yapılmıştır. 35S ve/veya NOS yönünden pozitif olan örneklerde Bt11 absolute miktar analizlerine ait şekillerin bir kısmı EK N’ de verilmiştir. Çizelge 4.36’ de ise analizlerin tümü verilerek sonuçlar yorumlanmıştır.



Çizelge 4.38 Bt11 açısından absolute miktar tayini yapılan numuneler ve sonuçları

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Sonuç	Target Konsantrasyon	Referans Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MU5	1.48	0.24	8.94E+01	2.92E+04	33.13	21.84	3 Tekerrür
MU5		0.16	6.48E+01	3.32E+04	3.51	21.65	1. Tekerrür
MU5		0.15	5.92E+01	3.28E+04	33.62	21.67	1 E, 3 P
MU5A		3.1	2.81E+03	4.87E+01	34.13	21.92	2. ve 3.
MU5A		4.05	2.90E+03	6.35E+01	33.7	21.88	Tekerrür
MU5B		4.17	5.85E+01	[<1.32]	□40	26.85	2 E, 2 P
MU5B		2.26	1.02E+02	[<1.32]	□40	26.07	
MU5A		0.16	1.71E+02	1.01E+05	32.96	20.86	
MU5A		0.19	Oca.00	7.65E+04	33.13	21.27	
MU5B		0.8	Oca.00	[1.44E+05]	33.41	20.35	
MU5B		0.19	1.76E+02	8.54E+04	32.92	21.11	
MU6A	0	0	TE	4.89E+04	TE	21.93	1 Tekerrür
MU6A		0	TE	1.60E+04	TE	23.57	1 E. 2 P
MU8A	0	0	TE	3.36E+04	TE	21.63	1 Tekerrür
MU8A		0	TE	2.50E+04	TE	22.07	1 E, 2 P
MU11	İz miktar	3.38E-04	[<8.14E-02]	1.95E+04	□40	22.44	2 Tekerrür
MU11		0	TE	3.24E+04	TE	22.54	1. Tekerrür
MU11		0	TE	2.89E+04	TE	22.71	1 E, 1 P
							2. Tekerrür
							2 E, 1 P

Çizelge 4.38 Bt11 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları(Devam)

Örnek Adı	Sonuç Değerlendirme	Sonuç	Target Konsantrasyon	Referans Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür Ve Paralel Sayısı
MU16	0	0	TE	3.19E+04	TE	21.71	1 Tekerrür
MU16		0	TE	3.25E+04	TE	21.68	1 E, 2 P
MY16	0	0	TE	1.50E+04	TE	22.84	1 Tekerrür
MY16		0	TE	1.61E+04	TE	22.73	1 E, 2 P
MY18	0	0	TE	1.42E+04	TE	22.91	1 Tekerrür
MY18		0	TE	2.07E+05	TE	22.68	1 E, 2 P
MC2	Yetersiz DNA	TE	TE	TE	TE	TE	1 Tekerrür
MC2		TE	TE	[1.68E-01]	TE	35.14	1 E, 2 P
MC4	0	0	TE	1.09E+02	TE	29.74	1 Tekerrür
MC4		0	TE	2.14E+02	TE	28.95	1 E, 2 P
MC10	Yetersiz DNA	TE	TE	1.64E+01	TE	31.69	1 Tekerrür
MC10		TE	TE	[1.54]	TE	33.77	1 E, 2 P
MG1A	Yetersiz DNA	TE	TE	[1.26]	TE	33.94	1 Tekerrür
MG1A		TE	TE	[3.66E-01]	TE	34.91	1 E, 2 P
MG5A	Yetersiz DNA	TE	TE	[3.94E-01]	TE	34.77	1 Tekerrür
MG5A		TE	TE	[3.10E-01]	TE	34.81	1 E, 2 P
MG7A	Yetersiz DNA	TE	TE	[2.13E-01]	TE	35.03	1 Tekerrür
MG7B		TE	TE	[1.77E-02]	TE	36.01	1 E, 2 P
MNİŞ1A	Yetersiz DNA	TE	TE	[5.54]	TE	34.65	1 Tekerrür
MNİŞ1B		TE	TE	[1.50]	TE	33.8	1 E, 2 P

E: Ekstraksiyon sayısı, P: Paralel sayısı, TE: Tespit edilemedi

Çizelge 4.38’ de görüleceği üzere, sadece bir numune (MU5) Bt11 absolute miktar tayininde güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 1.48 Bt11 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre etiketleme sınırı olan % 0.9’ un üstündedir ve etiketlenmesi gerekmektedir. MU6, MU8, MU11, MU16, MY16, MY18 ve MC4 numuneleri ise Bt11 yönünden negatiftir. Yine MU11 numunesinin paralelerinden birinde metot LOD’ sinin çok altında Bt11 gözlenmiştir. Bu durum, adı geçen numunenin iz miktarda genetik modifiye Bt176 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi ya yetersiz ya da güvenilir olmayan sonuca sahiptir. Bu durum, saptanan zein geni ve hedef bölgedeki çelişkili veya güvenilir olmayan sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Her ne kadar belli oranlarda bütün ürünlerin zein geni içerdiği tespit edilse de, çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmı ya yetersiz ya da güvenilir sonuç alınamayacak olan absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan “50” kopyanın altındadır. Bu durumun, ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA’ sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı sebeplerden ötürü yarı-işlenmiş mısır ürünlerinden ise MNİŞ1 numunesinden de yeterli miktarda mısır geni elde edilememiştir.

#### **4.7.4 Real-time PCR yöntemi ile T25 miktar tayini**

T25 bölgesinin saptanması amacıyla Sure Food T25 Quantification Kit (R-Biofarm) kullanılarak absolute kuantifikasyon yapılmıştır. 35S ve/veya NOS yönünden pozitif olan örneklerde T25 absolute miktar analizlerine ait şekillerin bir kısmı EK Ö’ de verilmiştir. Çizelge 4.39’ da ise analizlerin tümü verilerek sonuçlar yorumlanmıştır.

Çizelge 4.39 T25 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları

Örnekler	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Glu Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür Ve Paralel Sayısı
MU5A	0.16	0.19	1.26E+02	[1.09E+05]	32.68	22.46	2 tekerrür
MU5B		0.11	[91.5]	[1.34E+05]	33.11	22.16	
MU5A		0.14	1.01E+02	9.59E+04	33.03	22.26	1. tekerrür
MU5A		0.22	1.58E+02	9.79E+04	32.4	22.23	2 E, 1 P
MU5B		0.16	1.29E+02	[1.14E+05]	32.69	22.01	2. tekerrür
MU5B		0.16	1.35E+02	[1.15E+05]	32.62	21.99	2E, 2 P
MU6A	0	0	TE	[1.30E+05]	TE	22.21	1 Tekerrür
MU6B		0	TE	7.71E+04	TE	22.97	1 E. 2 P
MU8A	iz	0.015	[8.69]	9.84E+04	36.16	22.62	2 tekerrür
MU8B		0.091	[1.82E+01]	3.35E+04	35.22	24.19	
MU8A		0	TE	5.16E+04	TE	23.18	1. tekerrür
MU8A		0	TE	6.29E+04	TE	22.88	2 E. 1 P
MU8B		0.1	24.9	3.32E+04	TE	23.83	2. tekerrür
MU8B		0	TE	2.93E+04	TE	24.01	2E. 2 P
MU11A	0	0	TE	7.10E+04	TE	23.09	1 Tekerrür
MU11B		0	TE	6.79E+04	TE	23.16	1 E. 2 P
MU16A	0	0	TE	7.54E+04	TE	23.01	1 Tekerrür
MU16B		0	TE	1.02E+05	TE	22,57	1 E. 1 P

Çizelge 4.39 T25 açısından absolute miktar tayini yapılan örnekler ve sonuçları (Devam)

Örnekler	Sonuç Değerlendirme	Analiz Sonuçları	Glu Konsantrasyon	Zein Konsantrasyon	Cp T	Cp R	Tekerrür ve Paralel Sayısı
MY16A		0	TE	1.94E+04	TE	24.99	1 Tekerrür
MY16B		0	TE	1.01E+05	TE	22.57	2 E. 1 P
MY18A	0	0	TE	[1.20E+05]	TE	22.32	1 Tekerrür
MY18B		0	TE	3.71E+04	TE	24.04	2 E. 1 P
MNİŞ1A	0	0	TE	6.72E+02	TE	29.92	1 Tekerrür
MNİŞ1B		0	TE	8.73E+02	TE	29.54	2 E. 1 P
MC2A	Yetersiz	TE	TE	[5.86]	TE	35.94	1 Tekerrür
MC2B	Referans	TE	TE	[2.05]	TE	36.87	2 E. 1 P
MC4A	0	0	TE	2.53E+03	TE	27.98	1 Tekerrür
MC4B		0	TE	1.57E+03	TE	28.67	2 E. 1 P
MC10A	Yetersiz	TE	TE	2.01E+01	TE	34.7	1 Tekerrür
MC10B	Referans	TE	TE	2.87E+01	TE	34.3	2 E. 1 P
MG1A	Yetersiz	TE	TE	[7.34]	TE	35.72	1 Tekerrür
MG1B	Referans	TE	TE	[2.83]	TE	36.59	2 E. 1 P
MG5A	Yetersiz	TE	TE	[1.87E-01]	TE	38.51	1 Tekerrür
MG5B	Referans	TE	TE	[2.86E-01]	TE	38.2	2 E. 1 P
MG7A	Yetersiz	TE	TE	[8.72E-01]	TE	37.35	1 Tekerrür
MG7B	Referans	TE	TE	TE	TE	TE	2 E. 1 P

E: Ekstraksiyon sayısı, P: Paralel sayısı, TE: Tespit edilemedi

Çizelge 4.39’ da görüleceği üzere, sadece bir numune (MU5) T25 absolute miktar tayininde güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 0.16 T25 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifinde belirtilen etiketleme sınırı olan % 0.9’ un altındadır. MU6, MU11, MU16, MY16, MY18, MC4 ve MNİŞ1 numuneleri ise T25 yönünden negatiftir. Yine MU8’ in bazı tekerrür ve paralellerinde metot LOD’ sinin çok altında T25 gözlenmiştir. Bu durum, numunelerin iz miktarda genetik modifiye Bt176 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca, her ne kadar çoğu ürünün zein geni içerdiği tespit edilse de, absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan “50” kopyanın altındadır. Bu durumun, ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA’ sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılamadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.8 Genel Değerlendirmeler**

Çizelge 4.40. Çizelge 4.41. Çizelge 4.42, Çizelge 4.43 ve Çizelge 4.44’ te analizlerin genel değerlendirmeleri verilmiştir. PCR’ in etkinliği, DNA’ nın kalitesine ve saflığına bağlıdır. DNA’ nın kalitesi, fragmentlerin uzunluğuna ve zarar görme oranına göre belirlenmektedir. Sıcaklık, düşük pH ve/veya nükleazlar DNA hidrolizine, safsızlığına ve/veya enzimatik degradasyona sebep olabilmektedir. İşlenmiş gıdalardan izole edilen gıdalar ve bazı tarımsal ürünler, genellikle düşük kalitede olup hedef bölgeleri daha kısadır (Lipp and Anklam 2002). Yetersiz/zarar görmüş DNA gibi nedenlerle sağlıklı sonuç elde edilemeyen ürünler, çizelgelerde TE (tespit edilemedi) şeklinde yorumlanmıştır. Sonuçlar yok/negatif (-), var/pozitif (+), iz miktar (iz) ve % ortalamalar olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.40’ da, mısır örneklerinin Bt 176 bölgesi yönünden yapılan analizlerinin genel değerlendirmesi verilmiştir. Buna göre; hem konvansiyonel PCR’ da hem de real-time PCR’ da yapılan analizlerde, 35S promotör ve NOS terminatör yönünden pozitif sonuç

veren MU5 no'lu mısır unu örneği, konvansiyonel PCR' da Bt 176 ve mısır invertaz bölgesi yönünden de pozitif sonuç vermiştir. Bu örnek kalitatif analizde Bt176 yönünden pozitiflik veren iki örnekten biridir. Absolute miktar tayinine göre 0.14 oranında Bt176 mısır içerdiği tespit edilen örnekte bu oran, relatif metotta 0.05 oranında saptanmıştır. Relatif miktar tayinine göre, sırasıyla, 0.01 ve 0.04 oranında Bt176 içerdiği tespit edilen MU8 ve MY16 örnekleri ise absolute miktar tayininde ancak iz miktarda tespit edilebilmiştir. MU8 örneği aynı zamanda kalitatif açıdan da iz miktarda saptanabilmiştir. Her iki yöntemde de 4' ü (MC4, MC10, MG1, MG7) aynı örnek olmak üzere toplam 5' er örnekte sağlıklı ölçüm yapılamamıştır. Absolute kantitasyonda sağlıklı sonuç vermeyen MNİŞ1 örneği relatifte iz miktarda saptanırken, MC2 örneğinde tam tersi gerçekleşmiştir. MU6, MU8, MU16 ve MG5 örneklerinde ise, absolute miktar tayinine göre Bt176 bölgesi tespit edilemezken, adı geçen ürünlerde relatif miktar tayinine göre iz miktarda Bt176 mısır varlığı saptanmıştır.

Sonuçlardan da görüleceği üzere, genel olarak Bt176 mısır tespitinde real-time PCR, özellikle de işlenmiş ürünlerde daha çok pozitif sonuç verdiği için, konvansiyonel PCR' dan daha hassas sonuç verdiği söylenebilmektedir. Çok işlenmiş ürünlerde ise absolute ve relatif yöntemler açısından bariz bir fark göze çarpmazken, az işlenmiş ürün grubunda, iz miktarda da olsa, relatif yöntemin absolute yöntemden daha fazla pozitiflik saptayabildiği dikkati çekmektedir. Yöntemler arasındaki farklılıkların istatistikî açıdan önemli olup olmadığı Bölüm 4.8' de tartışılmıştır.

Çizelge 4.41' de, mısır örneklerinin Bt 11 bölgesi yönünden yapılan analizlerinin genel değerlendirmesi verilmiştir. Buna göre; hem konvansiyonel PCR' da hem de real-time PCR' da yapılan analizlerde, 35S promotör ve NOS terminatör yönünden pozitif sonuç veren MU5 no'lu mısır unu örneği, konvansiyonel PCR' da Bt 11 ve invertaz bölgesi yönünden de pozitif sonuç vermiştir. Kantitatif analizde, 1.48 oranında mısır içerdiği tespit edilen örnek, Avrupa Birliği direktiflerine göre etiketlenmesi gerekmektedir. Bt11 açısından kantitatif analizde iz miktarda pozitiflik veren diğer örnek MU11 olup, kalitatif analizde negatif sonuç vermiştir.

MU6, MU8, MU16, MY18 ve MC4 örneklerinde, hem kalitatif hem de kantitatif yöntemde Bt11 bölgesine rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra MC2, MC10 ve MG1 örneklerinde sadece kalitatif Bt11 mısır varlığı iz miktarda saptanırken, kantitatif analizden sağlıklı bir sonuç alınamamıştır. Kalitatif ve kantitatif yöntemler arasındaki benzerlik, Kappa istatistiği uygulanarak değerlendirilmiştir.

Kalitatif analizinde Mon810 bölgesi içerdiği saptanan MU5 örneğinin kantitatif analizinde, bu miktarın 2.83 gibi Avrupa Birliği direktiflerine göre etiketlemeyi gerektirecek yükseklikte olduğu belirlenmiştir. MY18 ve MC2 örneklerinde, hem kalitatif hem kantitatif yöntemde iz miktarda Mon810 varlığı saptanırken; MU6, MU16 ve MC4 numunelerinde Mon 810 varlığı saptanamamıştır. İz miktarda kalitatif mısır varlığı belirlenen MU8 numunesinde miktar tayininde negatif sonuç alınmıştır. Kalitatif açıdan pozitif olan MY16 numunesi kantitatif açıdan iz miktarda saptanabilmiştir.

Çok işlenmiş ürün olan MC10 örneğinde ise, hem kalitatif hem de kantitatif yöntemde sağlıklı sonuç alınamamıştır. Analize tabi tutulan mısır gevreği örneklerinin hepsinde kalitatif açıdan yapılan analizde Mon810' a rastlanamamış; ancak, kantitatif açıdan sağlıklı sonuç alınamadığından, mısır gevrekleri açısından bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

Çizelge 4.43' de, mısır örneklerinin T25 bölgesi yönünden yapılan analizlerinin genel değerlendirmesi verilmiştir. Buna göre; hem konvansiyonel PCR' da hem de real-time PCR' da yapılan analizlerde, 35S promotör ve NOS teminatör yönünden pozitif sonuç veren MU5 no'lu mısır unu örneği, konvansiyonel PCR' da yapılan kalitatif analizde sadece invertaz bölgesi yönünden pozitif sonuç vermiştir. MU5 örneği, kalitatif analizde T25 yönünden negatif sonuç vermesine rağmen, real-time PCR' da yapılan absolute T25 analizinde % 0.16 oranında T25 içerdiği belirlenmiştir. MU8 örneğinde ise, yine sadece real-time PCR' da gerçekleştirilen kantitatif analizde, iz miktarda T25 bölgesine rastlanmıştır. Diğer işlenmemiş ve az işlem görmüş örneklerde yapılan kantitatif analiz sonucunda T25 bölgesine rastlanmazken negatif sonuç veren MC4 hariç tüm çok işlenmiş örneklerde sağlıklı sonuç alınamamıştır. Konvansiyonel PCR' da ise, tam



tersine, işlenmemiş ve az işlem görmüş ürünlerde ürün DNA' ları T25 bölgesinin oluşumuna inhibe edici etkiye bulunduğundan, bu ürünlerde sağlıklı sonuç alınmamıştır. T25 yönünden her iki sistemde de negatif sonuç veren tek örnek ise MNİŞ1' dir.

CBH351 bölgesi tespitinde de T25 bölgesi kalitatif analizinde ortaya çıkan benzer sorunlarla karşılaşmıştır. Sadece invertaz bölgesi tespit edilen örneklerden yalnızca MNİŞ1 ve MG7' de kalitatif olarak CBH bulunmadığı kanıtlanabilmiştir. Diğer örneklerde her ne kadar CBH351 bölgesine rastlanmasa dahi, spike' lı örneklerinde çalışmadığından dolayı ürün DNA' larının sistemi inhibe etme olasılığı kesin bir hükme varmayı engellemektedir. MC2, MG5 ve MG7' de ise, ya iz miktarda invertaz bölgesi tespit edilmiş ya da invertaz bölgesi sonuçlarından da sağlıklı sonuç alınmamıştır.

Bazı ürünlerin (MU5, MU8, MU11, MY16) birden fazla genetik modifiye mısır varyetesi içerdiği saptanmıştır. Bu durumda daha önceki bölümlerde belirtildiği üzere, eğer herhangi bir ürün birden fazla GM mısır varyetesi içeriyorsa, üründe bulunan tüm varyetelerin içerdiği % GM miktarı toplanır. Eğer toplam % 0.9'u geçiyor ise, Avrupa Birliği' nin ilgili direktifine göre etiketlenmesi gerekmektedir. Adı geçen örneklerden MU5 % 0.10 oranında Bt176, % 1.48 oranında Bt11, % 2.83 oranında Mon810 ve % 0.16 oranında T25 bölgesi içermesi ile pek çok bölgeyi içinde barındıran, piyasa şartlarında nadir bulunabilecek bir örnektir. Örneğin içerdiği T25 ve Bt176' ın % oranları, Avrupa Birliği direktiflerine göre % 0.9' dan küçük olduğu için etiketlemeyi gerektirmiyor gibi görünse de, ürünün içerdiği Mon810 ve Bt11 oranı etiketleme sınırı üstündedir ve toplamda % 4.57 oranında GM mısır ürünü içermektedir.

Relatif miktar tayininde iz miktarda Bt176 içeren MU8 örneğinin, T25 miktar tayininde de iz miktarda T25 içerdiği saptanmıştır. Ayrıca; aynı örneğin, kalitatif Mon810 tayininde de iz miktarda Mon810 içerdiği tespit edilmiştir. Bu yüzden, içerdiği GM varyete miktarı, etiketleme sınırının altındadır.

Relatif miktar tayinine göre % 0.01, absolute miktar tayinine göre ise iz miktarda Bt176 içeren MU11 örneğinin, kantitatif analiz sonuçlarına göre iz miktarda Mon810 içerdiği de saptanmıştır. MY16 % 0.04 oranında Bt176, iz miktarda Mon810 içermektedir ve etiketleme sınırının altındadır. Sonuç olarak, Avrupa Birliği' nin ilgili direktiflerine göre etiketlenmesi gereken tek rn MU5' dir.

Çizelge 4.40 Mısır ürünlerinde Bt176 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi

Örnekler	Bitki Spesifik PCR		GM Tarama Testi						Bt176	
	Zein Konv. PCR	Bitki Geni RT PCR	Konv. PCR		RT PCR		Tanımlama Konv. PCR		Absolute Miktar tayini Real-time PCR %	Relatif Miktar tayini Real-time PCR %
			35S	NOS	35S	NOS	Bt176	İnv.		
MU5	+	+	+	+	+	+	+	+	0.14	0.05
MU6	+	+	-	-	+	-	-	+	-	iz
MU8	+	+	-	-	+	+	-	+	-	iz
MU11	+	+	-	-	+	+	iz	+	iz	0.01
MU16	+	+	-	-	+	+	-	+	-	iz
MY16	+	+	+	+	+	+	-	+	iz	0.04
MY18	+	+	-	-	+	+	-	+	iz	iz
MNİŞ1	-	+	-	-	-	+	-	-	te	iz
MC2	-	+	-	-	+	+	-	+	iz	te
MC4	-	+	-	-	+	+	-	+	te	te
MC10	-	+	-	-	+	+	-	+	te	te
MG1	-	+	-	-	-	+	-	+	te	te
MG5	-	+	-	-	-	+	-	-	-	iz
MG7	-	+	-	-	-	+	-	+	te	te

te: Tespit edilemedi, iz: iz miktarda rastlanmıştır

Çizelge 4.41 Mısır ürünlerinde Bt11 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi

Örnekler	Bitki Spesifik PCR		GM Tarama Testi				Bt11		
	Zein Konv. PCR	Bitki Geni RT PCR	Konv. PCR		Real-time PCR		Tanımlama Konv. PCR		Absolute Miktar tayini Real-time PCR Bt11
			35S	NOS	35S	NOS	Bt11	İnv.	
MU5	+	+	+	+	+	+	+	+	1.48
MU6	+	+	-	-	+	-	-	+	-
MU8	+	+	-	-	+	+	-	+	-
MU11	+	+	-	-	+	+	-	+	iz
MU16	+	+	-	-	+	+	-	+	-
MY16	+	+	+	+	+	+	-	+	-
MY18	+	+	-	-	+	+	-	+	-
MNiŞ1	-	+	-	-	-	+	-	+	te
MC2	-	+	-	-	+	+	iz	+	te
MC4	-	+	-	-	+	+	-	+	-
MC10	-	+	-	-	+	+	iz	+	te
MG1	-	+	-	-	-	+	iz	+	te
MG5	-	+	-	-	-	+	-	iz	te
MG7	-	+	-	-	-	+	-	-	te

Te: Tespit edilemedi, iz: iz miktarda rastlanmıştır

Çizelge 4.42 Mısır ürünlerinde Mon810 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi

Örnekler	Bitki Spesifik PCR		GM Tarama Testi				Mon810		
	Zein Konv. PCR	Bitki Geni RT PCR	Konv. PCR		RT PCR		Tanımlama Konv. PCR		Absolute Miktar Tayini Real-time PCR Mon810
			35S	NOS	35S	NOS	İnv.	Mon810	
MU5	+	+	+	+	+	+	te	+	2.83
MU6	+	+	-	-	+	-	te	-	-
MU8	+	+	-	-	+	+	iz	iz	-
MU11	+	+	-	-	+	+	te	-	iz
MU16	+	+	-	-	+	+	+	-	-
MY16	+	+	+	+	+	+	+	+	iz
MY18	+	+	-	-	+	+	+	iz	iz
MNiŞ1	-	+	-	-	-	+	te	-	-
MC2	-	+	-	-	+	+	te	iz	iz
MC4	-	+	-	-	+	+	iz	-	-
MC10	-	+	-	-	+	+	+	te	te
MG1	-	+	-	-	-	+	te	-	te
MG5	-	+	-	-	-	+	iz	-	te
MG7	-	+	-	-	-	+	-	-	te

Te: Tespit edilemedi, iz: iz miktarda rastlanmıştır

Çizelge 4.43 Mısır ürünlerinde T25 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi

Örnekler	Bitki Spesifik PCR		GM Tarama Testi				T25		Absolute Miktar Tayini Real-time PCR
	Zein Konv. PCR	Bitki Geni RT PCR	Konv. PCR		RT PCR		Tanımlama Konv. PCR		
			35S	NOS	35S	NOS	İnv.	T25	
MU5	+	+	+	+	+	+	+	te	0.16
MU6	+	+	-	-	+	-	+	te	-
MU8	+	+	-	-	+	+	+	te	iz
MU11	+	+	-	-	+	+	+	te	-
MU16	+	+	-	-	+	+	+	te	-
MY16	+	+	+	+	+	+	+	te	-
MY18	+	+	-	-	+	+	+	te	-
MNiŞ1	-	+	-	-	-	+	te	-	-
MC2	-	+	-	-	+	+	te	-	te
MC4	-	+	-	-	+	+	te	te	-
MC10	-	+	-	-	+	+	te	-	te
MG1	-	+	-	-	-	+	te	te	te
MG5	-	+	-	-	-	+	te	-	te
MG7	-	+	-	-	-	+	te	-	te

Te: Tespit edilemedi, iz: iz miktarda rastlanmıştır

Çizelge 4.44 Mısır ürünlerinde CBH351 mısır sonuçlarının genel değerlendirilmesi

Örnekler	Bitki Spesifik PCR		GM Tarama Testi				CBH351	
	Zein Konv. PCR	Bitki Geni Real-time PCR	Konv. PCR		Real-time PCR		Tanımlama Konv. PCR CBH351	İnv.
35S			NOS	35S	NOS			
MU5	+	+	+	+	+	+	te	+
MU6	+	+	-	-	+	-	te	+
MU8	+	+	-	-	+	+	te	+
MU11	+	+	-	-	+	+	te	+
MU16	+	+	-	-	+	+	te	+
MY16	+	+	+	+	+	+	te	+
MY18	+	+	-	-	+	+	te	+
MNİŞ1	-	+	-	-	-	+	-	+
MC2	-	+	-	-	+	+	te	iz
MC4	-	+	-	-	+	+	te	+
MC10	-	+	-	-	+	+	te	+
MG1	-	+	-	-	-	+	te	te
MG5	-	+	-	-	-	+	te	te
MG7	-	+	-	-	-	+	-	+

Te: Tespit edilemedi, iz: iz miktarda rastlanmıştır

## 4.9 İstatistiksel Sonuçlar

### 4.9.1 Eş yapma t testi

Mısır örneklerine ait relatif ve absolute miktar tayini ortalamaları, standart sapması, standart hatası ve minimum-maksimum değerleri Çizelge 4.45’ de verilmiştir. Mısır örneklerinde elde edilen ve % olarak verilen değerlere ait ortalamalar eş yapma T testine göre analiz edilmiştir (Çizelge 4.46).

Çizelge 4.45 Mısır örneklerinde Bt176 relatif ve absolute miktar tayini yönünden tanıtıcı istatistikler

ÖRNEK	Değişken	Örnek sayısı	Ortalama	Standart hata	Standart sapma	Minimum	Maksimum
MISIR UNU	Bt176 Relatif Miktar Tayini	5	0.0241	0.0240	0.0536	0.0000	0.1200
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	5	0.01466	0.00948	0.02120	0.0000	0.05167
MISIR YEMİ	Bt176 Relatif Miktar Tayini	2	0.000068	0.000066	0.000094	0.000002	0.000135
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	2	0.02561	0.00228	0.00322	0.02333	0.02789
MISIR CİPSİ	Bt176 Relatif Miktar Tayini	3	0.574	0.572	0.991	0.001	1.718
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	3	13.18	6.00	10.40	4.77	24.80
MISIR GEVREĞİ	Bt176 Relatif Miktar Tayini	3	0.528	0.528	0.914	0.000	1.583
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	3	7.34	3.94	6.83	0.00	13.51



Çizelge 4.46 Mısır örneklerinde Bt176 relatif ve absolute miktar tayinine ait eş yapma t testi değerleri

ÖRNEK	Değişken	Örnek sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	P değeri	T değeri
MISIR UNU	Bt176 Relatif Miktar Tayini	5	0.0241	0.0536	0.0240	0.560	0.63
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	5	0.0147	0.0212	0.0095		
	Fark	5	0.0094	0.0332	0.0149		
MISIR YEMİ	Bt176 Relatif Miktar Tayini	2	0.00007	0.00009	0.00007	0.055	-11.55
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	2	0.02561	0.00322	0.00228		
	Fark	2	-0.02554	0.00313	0.00221		
MISIR CİPSİ	Bt176 Relatif Miktar Tayini	3	0.57	0.99	0.57	0.178	-2.04
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	3	13.18	10.40	6.00		
	Fark	3	-12.61	10.70	6.18		
MISIR GEVREĞİ	Bt176 Relatif Miktar Tayini	3	0.53	0.91	0.53	0.223	-1.75
	Bt176 Absolute Miktar Tayini	3	7.34	6.83	3.94		
	Fark	3	-6.81	6.75	3.90		

Çizelge 4.45 göre, mısır ununa ait Bt176 relatif miktar tayini ortalaması 0.0241 iken, Bt176 Absolute miktar tayin ortalaması 0.0147 olup, birbirlerine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Yapılan eş yapma t testi sonucunda mısır yemi ve mısır unu örneklerinde relatif miktar tayin ortalamaları ile absolute miktar tayini ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Mısır cipsi örneklerinde elde edilen verilere uygulanan eş yapma t testi sonuçlarına göre relatif miktar tayin ortalamaları ile absolute miktar tayini ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Fakat ortalamalar incelendiğinde, absolute miktar değerinin 13.18 iken, relatif miktar değerinin 0.57 gibi küçük bir değer aldığı görülmektedir. Çok işlenmiş veya fermente gıdalarda genlerin değişme ihtimalinin olması, saptama işlemini güçleştirebilmektedir (Lin et al. 2001). Bu durum, çok işlenmiş ürünlerden sağlıklı sonuç alınmasını güçleştirmekte ve varyansın yüksek olmasına sebep olmaktadır. Grup içindeki değişimin (varyansın) yüksek oluşu, yani deneme hatasının yüksekliği gruplar arası farklılığı örtmektedir. Dolayısıyla, istatistiksel olarak bu fark önemli olmamaktadır.

Mısır gevreğinde elde edilen verilere yapılan eş yapma t testi sonuçlarına göre, relatif miktar tayin ortalamaları ile absolute miktar tayini ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Fakat ortalamalar incelendiğinde absolute miktar değerinin 7.34 iken, relatif miktar değerinin 0.53 gibi küçük bir değer aldığı görülmektedir. Grup içindeki değişimin (varyansın) yüksek oluşu, yani deneme hatasının yüksekliği gruplar arası farklılığı örtmektedir. Dolayısıyla, istatistiksel olarak bu farkı ortaya koyamamaktadır.

Mısır nişastasını örneklerinde ise, her iki yöntemle analize alınan sadece bir adet nişasta örneği bulunduğundan istatistiksel bir değerlendirme yapılması mümkün olmamıştır.

## 4.9.2 Kappa istatistiği

### 4.9.2.1 35S promotör-NOS terminatör bölgeleri için real-time PCR ve konvensiyonel PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Mısır unu ve yeminde 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin real-time PCR ve konvensiyonel PCR’ da tespitinde elde edilen verilerde (var-1. yok-0) yapılan iki yönlü tablo ve Kappa istatistiği sonuçları Çizelge 4.47 ve Çizelge 4.48’ deki gibidir.

Çizelge 4.47 Mısır unu ve yeminde real-time PCR ile konvensiyonel PCR’da 35S promotör-NOS terminatör için Kappa istatistik sonuçları

Örnekler	Kappa Değeri	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.	Örnek Sayısı
Mısır Unu (35S)	0.256	0.215	1.532	0.126	16
Mısır Unu (NOS)	0.600	0.242	2.619	0.009	16
Mısır Yemi (35S)	0.642	0.326	2.995	0.003	19

Çizelge 4.48 Mısır örneklerinde Kappa istatistiğine göre real-time PCR ile konvensiyonel PCR’da 35S promotör ve NOS terminatör sonucu karşılaştırılması

MISIR UNU 35S	Konvensiyonel PCR Değerleri (NOS)		Toplam
	0 (Yok)	1 (Var)	
0 (Yok)	12	0	12
Real-Time PCR Değerleri (NOS)			
1 (Var)	2	2	4
Toplam	14	2	16
MISIR UNU NOS	Konvensiyonel PCR Değerleri (35S)		Toplam
	0 (Yok)	1 (Var)	
0 (Yok)	11	0	11
Real-Time PCR Değerleri (35S)			
1 (Var)	4	1	5
Toplam	15	1	16
MISIR YEMİ 35S	Konvensiyonel PCR Değerleri (35S)		Toplam
	0 (Yok)	1 (Var)	
0 (Yok)	17	0	17
Real-Time PCR Değerleri (35S)			
1 (Var)	1	1	2
Toplam	18	1	19

Mısır unu örneklerinde, NOS terminatör bölgesi için, elde edilen Kappa değeri 0.6 olarak bulunmuş olup, Çizelge 3.28' deki Kappa skalası incelendiğinde belirgin bir benzerlik görüldüğü söylenebilir. Yine mısır unu örneklerinde, 35S promotör bölgesi için elde edilen Kappa değeri 0.256 olarak bulunmuş olup, Çizelge 3.28' deki Kappa skalasında incelendiğinde mısır ununda konvansiyonel ve real-time PCR uygulamalarının benzerliğinin zayıf olduğu görülmektedir.

Mısır yeminde ise 35S bölgesinin saptanmasından elde edilen verilerden hesaplanan Kappa istatistiği 0.642 olarak bulunmuş olup 2 metot arasında güçlü bir benzerlik olduğu, Kappa skalasına bakılarak, söylenebilir. Mısır yeminde konvansiyonel PCR' da NOS terminatör bölgesi saptanamadığından, dolayısı ile 1-var değeri elde edilemediğinden, mısır yeminde NOS terminatör bölgesi ölçümlerine ait, Kappa istatistiği hesaplanamamıştır.

Mısır nişastası, mısır gevreği ve mısır cipsinde konvansiyonel PCR' da NOS terminatör bölgesi ve 35S promotör bölgesi saptanamadığından, dolayısı ile 1-var değeri elde edilemediğinden, Kappa istatistiği hesaplanamamıştır.

#### **4.9.2.2 Bt 176, Bt11. Mon810 ve T25 genetik modifiye mısırların kalitatif ve kantitatif sonuçlarının karşılaştırılması**

Daha önceki bölümlerde de bahsi geçtiği üzere, toplam 83 örnekten 14 tanesi 35S promotör ve/veya NOS terminatör yönünden pozitiflik vermiştir. Kappa istatistiği, Bt 176, Bt11. Mon810 ve Bt176 mısır yönünden taranması yapılan bu 14 GM pozitif örneğe uygulanmıştır. Kappa istatistiği ile kalitatif ve kantitatif yöntemlerin benzerliğini araştırmak için, kantitatif olarak veri elde edildi ise var, edilemedi ise yok şeklinde yorumlanarak 2 farklı çizelge elde edilmiştir. Çizelge 4.49' da kalitatif ve kantitatif sonuçların var-yok çaprazlama değerlerini (karşılaştırmalarını) verirken, Çizelge 4.50' de Kappa istaistik değerleri verilmektedir.

Çizelge 4.49 GM pozitif mısır örneklerinde Kappa istaistiğine göre Bt11. Bt176 ve Mon810 kalitatif-kantitatif karşılaştırmaları

BT 176 MISIR		Kalitatif Tayin		Toplam
		0	1	
0		5	0	5
1	Relatif Miktar Tayini	7	2	9
	Toplam	12	2	14
BT 176 MISIR		Kalitatif Tayin		Toplam
		0	1	
0	Absolute Miktar	5	0	5
1	Tayini	7	2	9
	Toplam	12	2	14
BT11 MISIR		Kalitatif Tayin		Toplam
		0	1	
0	Absolute Miktar	9	1	10
1	Tayini	3	1	4
	Toplam	12	2	14
MON 810 MISIR		Kalitatif Tayin		Toplam
		0	1	
0	Absolute Miktar	7	1	8
1	Tayini	2	4	6
	Toplam	9	5	14

Çizelge 4.50 GM pozitif mısır örneklerinde Bt11, Bt176 ve Mon810 kalitatif-kantitatif Kappa istatistik sonuçları

Örnekler	Kappa Değeri	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.	Örnek Sayısı
Bt176-1	0.169	0.124	1.139	0.255	14
Bt176-2	0.169	0.124	1.139	0.255	14
Bt11	0.176	0.272	0.725	0.469	14
Mon810	0.553	0.225	2,093	0.036	14

Çizelge 4.50' ye göre, Bt176 bölgesinin hem relatif hem de absolute miktar tayininden elde edilen verilerin kalitatif yöntemden elde edilen değerle karşılaştırılmasından hesaplanan Kappa istatistikleri 0.169 olarak bulunmuş olup, her 2 metodun da kalitatif yöntemle arasında benzerliğin zayıf olduğu, Kappa skalasına bakılarak, söylenebilir. Bt11 bölgesinin absolute miktar tayininden elde edilen verilerin kalitatif yöntemden elde edilen değerle karşılaştırılmasından hesaplanan Kappa istatistiği 0.176 olarak bulunmuş olup, kantitatif yöntemin kalitatif yöntemle arasındaki benzerliğin zayıf olduğu, yine Kappa skalasına bakılarak söylenebilir. Mon810 bölgesinin absolute miktar tayininden elde edilen verilerin kalitatif yöntemden elde edilen değerle karşılaştırılmasından hesaplanan Kappa istatistiği 0.553 olarak bulunmuş olup, kantitatif yöntemin kalitatif yöntemle arasında belirgin bir benzerlik olduğu, Kappa skalasına bakılarak, söylenebilir. Konvansiyonel PCR' da T25 bölgesi saptanamadığından, dolayısı ile 1-var değeri elde edilemediğinden, T25 bölgesi ölçümlerine ait Kappa istatistiği hesaplanamamıştır. Çizelge 4.51' de, istatistik açıdan değerlendirmelerin özeti verilmiştir.

Çizelge 4.51 İstatistiksel açıdan değerlendirmelerin özeti

KONVENSİYONEL PCR								REAL-TİME PCR
	BÖLGE	35S	NOS	Bt176	Bt11	Mon810	T25	Bt176 <sup>1</sup> Rel.
REAL-TIME PCR	35S	Kappa MU:0.256 Y:0.642						
	NOS		Kappa MU:0.6					
	Bt176 <sup>1</sup> Rel.			Kappa (0.169)				
	Bt176 <sup>2</sup> Abs.			Kappa (0.169)				Eş Yapma T Testi- Önemsiz
	Bt11				Kappa (0.176)			
	Mon810					Kappa (0.553)		
	T25						Kappa a (-)	

<sup>1</sup>Rel: Relatif miktar tayini, <sup>2</sup>Abs: Absolute miktar tayini, (-): örnek sayısı yetersiz olduğu için yapılamamıştır.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde GM tohum ithalatını düzenlemek için 1998’ de bir genelge yayınlanmıştır ve bu kapsamda mısır, pamuk ve patates gibi ürünlerde alan deneme çalışmaları yapılmaktadır. Ancak, ürün bazında TKB (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı)’ nın KKGGM (Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü) bünyesinde yürüttüğü izleme programı için yayınlanan genelge dışında yasal bir düzenleme bulunmamaktadır. Bu durum, Türkiye piyasasında satılan özellikle ithal mısır ve soya ürünlerinde genetik modifikasyon bulunduğu şüphesini artırmıştır. Çünkü, 2004 verilerine göre mısır ve soya dış alımının büyük çoğunluğu en büyük GM mısır ve soya üretici ülkelerden olan ABD ve Arjantin’ den yapılmıştır.

Bu çalışma ile, Nisan 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında, Türkiye piyasasından toplanan işlenmiş mısır ürünleri ile işlenmemiş yemlik tane mısır ürünleri olmak üzere toplam 83 mısır örneğinde genetik modifikasyon durumu araştırılmıştır. Genetik modifikasyonu saptama işlemi DNA’ ya dayalı yöntemlerle yapılmıştır. Tüm numunelerde, 35S promotör ve NOS terminatör taranması önce konvensiyonel PCR ile yapıp, daha sonra real-time PCR ile doğrulanmıştır. Bu şekilde, real-time PCR’ ın konvensiyonel PCR’ a üstünlüğü de vurgulanmıştır. Ayrıca, Türkiye’ de kısıtlı veriye sahip olan Bt11 mısırın yanında hakkında hiçbir veri bulunmayan Bt176, Mon810. T25 ve CBH351 mısırları, öncelikle konvensiyonel PCR’ da multipleks PCR yöntemi ile kalitatif olarak aranmış, daha sonra CBH351 hariç, hepsinde real-time PCR yöntemi ile miktar tayinine gidilmiştir. Ayrıca, yöntemler arasındaki benzerlikler eş yapma t testi ve Kappa istatistiği uygulanarak ortaya konmuştur. GM ürünlerin saptanmasına yönelik pek çok makale bulunmasına rağmen (El-Sanhoty et al. 2002), yöntem benzerliğinin istatistiki olarak araştırıldığı bir makaleye ulaşılamamıştır. Tez bu bakımdan bir ilktir. Aşağıda, bu çalışma kapsamında yapılan işlemlere ilişkin sonuçlar ve öneriler maddeler halinde özetlenmiştir:

1-) Toplam 83 örnekte, konvensiyonel PCR ile zein geni taranmıştır. İşlenmemiş örneklerin (mısır yemi) hepsinde zein geni saptanmıştır. Az işlem görmüş ürün grubundan mısır unu örneklerinin yine tümünde zein geni saptanırken, mısır nişastası

örneklerinin sadece ikisinde (MNİŞ8 ve MNİŞ9) zein geni saptanmıştır. Çok işlem görmüş örneklerin ise sadece ikisinde (MC1 ve MG9) zein geni saptanmıştır. Bu durum, işlem görmüş ürünlerin, işlem derecelerine bağlı olarak, DNA' larının zarar gördüğünün bir göstergesidir. Çok işlenmiş ürünlerin DNA izolasyonu için, daha hassas tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ürünlerin real-time PCR ile çalışılması sırasında, çok işlenmiş ürün gruplarının çoğunda, diğer bitki genlerinin ve/veya zein genlerinin tespit edildiği göze çarpmaktadır. Bu durumda, real-time PCR tekniklerinin saptama limitinin konvensiyonel PCR' dan daha düşük olduğu söylenebilir.

2-) Daha sonra, 83 numune, klasik PCR ile, 35S promotör ve NOS terminatör açısından taranmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda, sadece bir mısır unu (MU5) ve bir mısır yemi (MY16) numunesinde hem 35S promotör hem de NOS terminatör bölgeleri saptanmıştır. Diğer mısır yemi, mısır unu, mısır nişastası, mısır cipsi ve mısır gevreği örneklerinin hepsi GM negatif sonuç vermiştir.

3-) Örnekler, sonuçların verifikasyonu amacıyla, 35S promotör ve NOS terminatör açısından, real-time PCR ile tekrar taranmıştır. Buna göre, işlenmiş ve işlenmemiş 83 mısır numunesinden 14 tanesi GM pozitif çıkmıştır. Bu numunelerden 3 mısır unu (MU5, MU8, MU11), 2 mısır cipsi (MC2, MC4), 1 mısır gevreği (MG1) ve 2 mısır yemi (MY16 ve MY18) numunesinde hem 35S hem de NOS bölgesine rastlanmıştır. Bir mısır unu numunesi (MU16), 2 mısır gevreği numunesi (MG5 ve MG7), 1 mısır nişastası (MNİŞ1) ve 1 mısır cipsi (MC10) numunesinde ise sadece NOS bölgesi pozitif sonuç vermiştir. 1 mısır unu (MU6) numunesinde ise sadece 35S bölgesi pozitif sonuç vermiştir. Tanımlama ve miktar belirlemek amacıyla, hem real-time PCR' da hem de konvensiyonel PCR' da GM pozitif çıkan örneklerin tümü kullanılmıştır.

4-) Konvensiyonel PCR ve real-time PCR ile yapılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin saptanmasında, aynı örneklerde elde edilen sonuçlardaki farklılıktan ötürü, yöntemlerin benzerliği, Kappa istatistiği ile araştırılmıştır. Buna göre, mısır unu örneklerinde hem 35S promotör hem de NOS terminatör bölge, mısır yemi örneklerinde ise sadece NOS terminatör bölge taramalarından elde edilen sonuçlar, Kappa istatistiği

açısından, yöntem benzerliklerinin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Mısır unu örneklerinde, NOS terminatör bölgesi açısından iki yöntem arasında belirgin bir benzerlik görülürken, 35S promotör bölgesi için konvansiyonel ve real-time PCR uygulamalarının benzerliğinin zayıf olduğu görülmüştür. Mısır yeminde ise 35S bölgesinin saptanmasından elde edilen verilerden hesaplanan Kappa istatistiğine göre, 2 metot arasında güçlü bir benzerlik olduğu saptanmıştır. Diğer ürün gruplarında yeterli sayıda örnek bulunamadığından, yöntemler arası benzerlik irdelenememiştir.

5-) GM pozitif örneklerin, Bt176 açısından, hem konvansiyonel PCR ile tanımlama testleri hem de real-time PCR ile miktar tayinleri yapılmıştır. Miktar tayini için 2 farklı yöntem (Relatif ve Absolute) kullanılmıştır. Miktar tayin yöntemlerinin birbirleri ile benzerlikleri eş yapma t testi, konvansiyonel PCR yöntemi ile benzerlikleri ise Kappa istatistiği ile incelenmiştir.

Konvansiyonel PCR ile, mısır unlarından birinde (MU5), belirgin bir biçimde, Bt176 pozitiflik saptanırken, bir diğerinde (MU11) iz miktarda Bt176 pozitiflik saptanmıştır.

Bt176 relatif miktar tayinine göre, 3 örnekte pozitif sonuç alınmıştır. MU5, MU11 ve MY16 numuneleri, sırasıyla, % 0.05, 0.01 ve 0.04 oranlarında Bt176 mısır içermektedir ve bu değer, Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre, etiketleme sınırı olan % 0.9' un altındadır. Yine MU6, MU16 ve MY18 numunelerinin bazı paralelerinde metot LOD' sinin çok altında Bt176 gözlenmiştir. MU6, MU8, MU16, MY18, MG5 ve MNİŞ1 numuneleri ise Bt176 yönünden negatiftir. Ancak, çok işlenmiş mısır ürünlerinin çoğu ya yetersiz DNA içerdiği için analiz sonucu alınamamıştır ya da paraleller arası değişken miktarlarda Bt176 mısır içerdiği saptanmıştır. Bu durumun, ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA' sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılamadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, ürün DNA' sında işleme sırasında olabilecek muhtemel zararlar, hedef bölge ve mısır geni (zein) üzerinde farklı derecelerde meydana gelebilmektedir.

Bt176 absolute miktar tayininde ise, sadece bir numune (MU5) pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 0.14 Bt176 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre etiketleme sınırı olan % 0.9' un altındadır. Yine MU11, MY16, MY18 ve MC2 numunelerinin bazı paralelerinde metot LOD' sinin çok altında Bt176 gözlenmiştir. MU6, MU8, MU16 ve MG5 numuneleri ise Bt176 yönünden negatiftir. Relatif miktar tayinine benzer şekilde, çok işlenmiş mısır ürünlerinin çoğu ya yetersiz DNA içerdiği için analiz sonucu alınamamıştır ya da paraleller arası değişken miktarlarda Bt176 mısır içerdiği saptanmıştır.

Yapılan eş yapma T testi sonucunda mısır yemi, mısır unu, mısır cipsi ve mısır gevreği örneklerinde relatif miktar tayin ortalamaları ile absolute miktar tayini ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Çok işlenmiş veya fermente gıdalarda genlerin değişme ihtimalinin olması, saptama işlemini güçleştirebilmektedir (Lin et al. 2001). Bu durum, çok işlenmiş ürünlerden sağlıklı sonuç alınmasını etkilemekte ve varyansın yüksek olmasına sebep olmaktadır. Grup içindeki değişimin (varyansın) yüksek oluşu, yani deneme hatasının yüksekliği ise gruplar arası farklılığı örtmektedir. Dolayısıyla, istatistik olarak bu fark önemli olmamaktadır. Mısır nişastası örneklerinde ise, her iki yöntemle analize alınan sadece bir adet nişasta örneği bulunduğundan istatistiki olarak bir değerlendirme yapılması mümkün olmamıştır.

Bt176 bölgesinin hem relatif hem de absolute miktar tayininden elde edilen verilerin kalitatif yöntemden elde edilen değerle karşılaştırılmasından hesaplanan Kappa istatistikleri ise her iki miktar tayin yönteminde de 0.169 olarak bulunmuş olup, 2 metodun da kalitatif yöntemle arasında benzerliğin zayıf olduğu, Kappa skalasına bakılarak, anlaşılmıştır.

6-) 14 adet GM pozitif örnek, Bt11 açısından önce konvensiyonel PCR ile tanımlama testine tabi tutulmuş, daha sonra real-time PCR ile miktar tayinleri yapılmıştır. 2 yöntem arasındaki benzerlik Kappa istatistiği ile araştırılmıştır.

Konvensiyonel PCR ile yapılan analizde, mısır unlarından birinde (MU5) Bt11 pozitiflik saptanırken, iki mısır cipsinde (MC2, MC10) ve bir mısır gevreğinde (MG1) iz miktarda Bt11 pozitiflik saptanmıştır.

Bt11 absolute miktar tayininde ise, aynı numune (MU5) güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 1.48 Bt11 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre etiketleme sınırı olan % 0.9' un üstündedir ve etiketlenmesi gerekmektedir. MU11' de ise metot LOD' sinin çok altında Bt11 gözlenmiştir. MU6, MU8, MU11. MU16, MY16, MY18 ve MC4 numuneleri Bt11 yönünden negatiftir. Ayrıca, absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan PCR ürünü kopya sayısı 50 olup, çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmından elde edilen PCR ürünleri bu değer altındadır. Bu durumun, ürün işlenme sırasında işlenme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA' sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılamadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı sebeplerden ötürü, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinden MNİŞ1 numunesinden de yeterli miktarda mısır geni elde edilememiştir.

Bt11 bölgesinin absolute miktar tayininden elde edilen verilerin kalitatif yöntemden elde edilen değerle karşılaştırılmasından hesaplanan Kappa istatistiği 0.176 olarak bulunmuş olup, kantitatif yöntemin kalitatif yöntemle arasındaki benzerliğin zayıf olduğu, yine Kappa skalasına bakılarak, anlaşılmıştır.

7-) 14 adet GM pozitif örnek, Mon810 açısından önce konvensiyonel PCR ile tanımlama testine tabi tutulmuş, daha sonra real-time PCR ile miktar tayinleri yapılmıştır. 2 yöntem arasındaki benzerlik Kappa istatistiği ile araştırılmıştır.

Konvensiyonel PCR sonuçlarına göre; MU8, MY18 ve MC2 numunelerinde iz miktarda olmak üzere MU5, MY16 numuneleri Mon810 açısından pozitif, MC10 hariç, diğerleri negatiftir. MC10' dan ise sağlıklı bir netice alınamamıştır.

Absolute miktar tayininde ise, sadece bir numune (MU5), Mon810 güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 2.83 Mon810 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifine göre, etiketleme sınırı olan % 0.9' un üstündedir ve etiketlenmesi gerekmektedir. MU6, MU8, MU16 ve MG5 numuneleri ise Mon810 yönünden negatiftir. Yine MU11, MY16, MY18 ve MC2 numunelerinin iz miktarda Mon810 gözlenmiştir. Bu durumun, numunelerin iz miktarda genetik modifiye Mon810 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmı ya yetersiz ya da güvenilir olmayan sonuca sahiptir. Bu durum, saptanan zein geni ve hedef bölgedeki çelişkili veya güvenilir olmayan sonuçlardan kaynaklanmaktadır. Çünkü, absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan PCR ürünü kopya sayısı 50 olup, çok işlenmiş mısır ürünlerinin hepsi, yarı-işlenmiş mısır ürünlerinin ise bir kısmından elde edilen PCR ürünleri bu değer altındadır. Bu durumun, ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA' sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mon810 bölgesinin absolute miktar tayininden elde edilen verilerin kalitatif yöntemden elde edilen değerle karşılaştırılmasından hesaplanan Kappa istatistiği 0.553 olarak bulunmuş olup, kantitatif yöntemin kalitatif yöntemle arasında belirgin bir benzerlik olduğu, Kappa skalasına bakılarak, söylenebilir.

8-) 14 adet GM pozitif örnek, T25 açısından önce konvensiyonel PCR ile tanımlama testine tabi tutulmuş, daha sonra real-time PCR ile miktar tayinleri yapılmıştır. 2 yöntem arasındaki benzerlik Kappa istatistiği ile araştırılmıştır.

Konvensiyonel PCR ile yapılan tanımlama testinde, mısır unu ve mısır yemi numunelerinin hepsinde T25 bölgesi inhibisyona uğramıştır. MG1 ve MC4 numunelerinde de T25 bölgesi inhibisyona uğradığından, bu bölgeler hakkında kesin

hükme varılamamıştır. MG5, MG7, MC10 ve MNİŞ1 numuneleri ise T25 açısından negatiftir.

Absolute miktar tayininde ise, sadece bir numune (MU5), T25 güvenli pozitif sonuç vermiştir. MU5 numunesi % 0.16 T25 mısır içermektedir ve bu değer Avrupa Birliği EC-2003/1830 sayılı direktifinde belirtilen etiketleme sınırı olan % 0.9' un altındadır. MU6, MU11, MU16, MY16, MY18, MC4 ve MNİŞ1 numuneleri ise T25 yönünden negatiftir. Yine MU8' in bazı tekerrür ve paralellerinde metot LOD' sinin çok altında T25 gözlenmiştir. Bu durumun, numunelerin iz miktarda genetik modifiye T25 mısır içerdiğini gösterebileceği gibi, bazı mısır ürünlerinin işleme, taşıma veya depolama gibi işlemler sırasında GM pozitif ürünlerle bulaştığının bir göstergesi olabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca, her ne kadar çoğu ürünün zein geni içerdiği tespit edilse de, absolute kuantifikasyonda hesaplama yapılabilmesi için gerekli olan "50" kopyanın altındadır. Bu durumun, ürün işleme sırasında işleme derecesine bağlı olarak ürünlerin DNA' sında meydana gelmiş olabilecek zararlardan dolayı aranan bölgelerin yeterince elde edilemediği ya da çoğaltılmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Konvansiyonel PCR' da T25 bölgesi saptanamadığından, dolayısı ile 1-var değeri elde edilemediğinden, T25 bölgesi ölçümlerine ait Kappa istatistiği hesaplanamamıştır.

9-) MG7 ve MNİŞ1 haricinde tüm örneklerin, spike' lı paralelleri dahil, hepsi CBH351 bölgesi açısından negatif sonuç vermiştir. Bu durum, bahsi geçen numunelerin DNA' sının CBH351' i inhibe ettiğini göstermektedir. Yani, bu ürünler hakkında CBH351 açısından net bir yargıya varmak mümkün değildir. MG7 ve MNİŞ1 ise, sadece spike' lı paralellerinde CBH351 açısından pozitif sonuç vermiş olup, ürün DNA' sı bu bölgede inhibe edici bir etkiye sahip değildir ve bu ürünler CBH351 açısından negatiftir.

10-) Görüldüğü üzere, bazı ürünlerin (MU5, MU8, MU11, MY16) birden fazla genetik modifiye mısır varyetesi içerdiği saptanmıştır. Bu durumda, eğer herhangi bir ürün birden fazla GM mısır varyetesi içeriyorsa, üründe bulunan tüm varyetelerin içerdiği %

GM miktarı toplanır. Eğer toplam % 0.9'u geçiyor ise, Avrupa Birliği' nin ilgili direktifine göre etiketlenmesi gerekmektedir.

11-) MU5 rneği, % 0.10 oranında Bt176, % 1.48 oranında Bt11, % 2.83 oranında Mon810 ve % 0.16 oranında T25 bölgesi içermesi ile pek çok bölgeyi içinde barındıran, piyasa Şartlarında nadir bulunabilecek bir örnektir. Örneğin içerdiği T25 ve Bt176' nın toplam % oranları, Avrupa Birliği direktiflerine göre % 0.9' dan küçük olduğu için etiketlemeyi gerektirmemektedir. Ancak, ürünün içerdiği Mon810 ve Bt11 oranı etiketleme sınırı stndendir ve toplamda % 4.57 oranında GM mısır ürünü içermektedir.

12-) Birden fazla genetik modifiye mısır ürününü bünyesinde barındıran diğer bir rnek MU8' dir. Relatif miktar tayininde iz miktarda Bt176 içeren MU8 rneğinin, T25 miktar tayininde de iz miktarda T25 içerdiği saptanmıştır. Ayrıca; aynı örneğin, kalitatif Mon810 tayininde de iz miktarda Mon810 içerdiği tespit edilmiştir. Adı geçen tüm bölgeleri yalnızca iz miktarda bulunduran MU8 örneğinin içerdiği GM varyete miktarı, etiketleme sınırının altındadır.

13-) Relatif miktar tayinine göre % 0.01, absolute miktar tayinine göre ise iz miktarda Bt176 içeren MU11 örneğinin, kantitatif analiz sonuçlarına göre iz miktarda Mon810 içerdiği de saptanmıştır. MY16 % 0.04 oranında Bt176, iz miktarda Mon810 içermektedir ve etiketleme sınırının altındadır. Dolayısıyla, MU11 ve MY16 rneklelerinin de AB direktiflerine göre etiketlenmesine ihtiyaç duyulmamaktadır. Sonuç olarak, Avrupa Birliği' nin ilgili direktiflerine göre etiketlenmesi gereken tek rn MU5' dir.

14-) Analizler neticesinde, Türkiye piyasasında genetik modifiye ürün bulunduğu kanıtlanmıŐtır. Ancak, işlenme derecelerine bağlı olarak, gıda ürünlerinde genetik modifikasyonun saptanmasında sağlıklı DNA izolasyonu gibi bazı engeller bulunmaktadır ve yöntemlerin validasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü, Avrupa Birliği 1829/2003' e göre, yeni bir GM ürünün kabul edilebilmesi için bu ürünün



örnekleme, tanımlanması ve saptanması için uygun metodlar önerilmelidir. Bu metodlar, ulusal referans laboratuvarlarının oluşturduğu bir topluluk olan European Network of GMO Laboratories (ENGL)' nin yardımı ile birliğin referans laboratuvarı olan Joint Research Centre'da valide edilmektedir. Yine de, valide edilmiş metodlar ile çalışmak, metodların bir örnek ve karşılaştırılabilir olduğu anlamına gelmemekte ve bütün laboratuvarların her bir metodu kendi şartlarında, aynı şekilde, çalıştırabileceğini göstermesi gerekmektedir (Zel *et al.* 2006).

15-) Dünya' da genetik modifiye ürünlerle ilgili her gün yeni çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu çeşitli ihtiyaçlar doğrultusunda yeni GM ürün geliştirilmesi ve bu ürünlerin güvenilir ve hızlı bir şekilde tespitine yönelik metod gelişimi ile ilgilidir. GM ürünlerin tespiti ile ilgili metotlardan proteine dayalı olanlar, çeşitli avantajlarından dolayı (Lin *et al.* 2001) yerlerini DNA' ya dayalı yöntemlere bırakmaya başlamıştır. Ayrıca, aynı anda bir üründe çoklu GM tespiti yapmaya yardımcı olabilecek mikroarray gibi yöntemler ise halen geliştirme aşamasındadır. Piyasaya sürülen genetik modifiye ürünlerin çokluğu, yine mikroarray yönteminin, real-time teknikleri ve diğer yöntemler ile kombinasyonunu içeren, yeni tekniklerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapıldığı literatürlerde mevcuttur. PCR amplifikasyonu ile microarray tekniğinin tanımlama sisteminin bir arada kullanıldığı MPLA metodu (Dijk *et al.* 2008), buna örnek olarak verilebilir.

GM ürünlerin çeşitli bilim çevreleri tarafından sağlık, çevre ve sosyo-ekonomik konular üzerinde olumsuz etkileri olabileceği düşünülmektedir ve özellikle insan sağlığı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Modern biyoteknoloji tekniklerinin uygulamalarının ve modern biyoteknoloji ürünlerinin insan ve hayvan sağlığı, çevre üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin belirlenmesini ve belirlenen risklerin oluşma olasılığının ortadan kaldırılması ya da meydana gelmesi durumunda oluşacak zararların kontrol altında tutulması için alınması gereken önlemler "biyogüvenlik" kavramı içinde değerlendirilmektedir. Türkiye' nin de taraf olduğu uluslararası "Biyogüvenlik Protokolü" ile biyogüvenlik unsurları belirlenmiş ve uygulamaya konulmuştur. Bu antlaşmanın en önemli unsurlarından olan izleme, izsürülebilirlik ve bunlara bağlı olarak etiketlemeyi sağlayabilmek, GM ürünlerinin güvenli bir şekilde saptanabildiği laboratuvarlar ve

altyapı ile mümkün olacaktır. Yine biyogüvenlik unsurlarından “halk katılımı ve eğitimi” sağlanarak, en önemli grup olan tüketiciler GM ürünler konusunda bilinçlendirilmeli ve bu ürünleri tüketmeyi seçme hakkı etiketleme ile tüketicilerin kendisine bırakılmalıdır.

Ulusal Biyogüvenlik Çerçeve Programı kapsamında hazırlanan “Biyogüvenlik Yasa Taslağı” nın bir an önce yasa haline getirilip ilgili denetim mekanizmasının oluşturulması ve ülkedeki ilgili laboratuvarların altyapı olarak, özellikle çoklu GM saptama yöntemleri açısından geliştirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aarts, JM. H., Van Rie and Kok, E. 2002. Traceability of genetically modified organisms. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2 (1). 69-77.
- Andersen, C. B., Holts-Jensen, A., Berdal, K. G., Thorstensen, T. and Tengs, T. 2006. Equal performance of Taqman, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assay in detection and quantification of roundup ready soybean. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 9658-9663.
- Andow, D. A. and Hilbeck, A. 2004. Science-based risk assesment for nontarget effects of transgenic crops. 54 (7), 637-649.
- Anklam, E. 1998. The validation of methods based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisims in food. *Analytica Chimica Acta*. 393, 177-179.
- Anonim. 1998. Transgenik Bitkilerin Alan Denemeleri Hakkında Talimat (Legislation on the field trials of transgenic plants). Tarımsal Üretim Ve Geliştirme Genel Müdürlüğü. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. web sitesi: <http://www.tarim.gov.tr>. Erişim Tarihi:06.08.2008
- Anonim. 2001. Türkiye Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi Eylem Planı. Çevre ve Orman Bakanlığı. <http://www.bcs.gov.tr>. Erişim Tarihi:06.08.2008
- Anonim. 2002. Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve gıda güvenliği. Tarım Bakanlığı Yayınları. 16s.
- Anonim. 2005a. Ulusal Biyogüvenlik Kanun Taslağı. web sitesi: [www.tagem.gov.tr](http://www.tagem.gov.tr). TKB. Erişim Tarihi:16.12.06.
- Anonim. 2005b. Süs Bitkileri (Gtip No: 0601-0602 grupları) Çoğaltım Materyali İthalat Uygulama Genelgesi. (Genelge No: 2005/3). Tarımsal Üretim Ve Geliştirme Genel Müdürlüğü. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. web sitesi: <http://www.tarim.gov.tr>. Erişim Tarihi:06.08.2008
- Anonim. 2005c. Meyve ve Asma Fidanları İle Sebze ve Çilek Fidesi İthalat Uygulama Genelgesi (Genelge No: 2005/2). Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. web sitesi: <http://www.tarim.gov.tr>. Erişim Tarihi:06.08.2008
- Anonymous. 1992. EURACHEM/WELAC (Cooperation for Analytical Chemistry in Europe/Western European Legal Metrology Cooperation).. Information Sheet No. 1 (Draft): Guidance on the Interpretation of the EN 45000 series of Standards and ISO Guide 25. 27 pp.
- Anonymous. 2001. ACS-ZM004-3 (CBH351). [www.agbios.com](http://www.agbios.com). Erişim Tarihi:05.08.2008
- Anonymous. 2002. Guide to quality in analytical chemistry. An aid to accreditation. CITAC Eurochem Guide.57 p.
- Anonymous. 2003a. Genetically modified foods for human healt and nutrition: the scientific basis for benefit/risk assessment. *Trends in Food Science and Technology*,14.175-181s.

- Anonymous. 2003b Genetically modified food and feed. web sitesi: [www.foeeurope.org](http://www.foeeurope.org). Erişim tarihi:12.12.2003
- Anonymous. 2003c. BATS report. Genetically modified (GM) crops: molecular and regulatory details. Version (2),192p.
- Anonymous. 2003d. A Guide to method validation. Reagecon. 16p.
- Anonymous. 2004a. GM labelling. Food Standart Agency. web sitesi: <http://www.food.gov.uk>. Erişim Tarihi:16.12.05.
- Anonymous. 2004b. Bt-11 Sweet corn updata. [www.syngenta.com](http://www.syngenta.com). Erişim Tarihi:15.07.2008.
- Anonymous. 2005a. Detailed description on new GMO labelling rules in EU. web sitesi: [www.organicconsumers.org](http://www.organicconsumers.org). Erişim Tarihi:16.12.05
- Anonymous. 2005b. SYN-BTØ11-1 (BT11 (X4334CBR, X4734CBR)). web sitesi: [www.agbios.com](http://www.agbios.com). Erişim Tarihi:05.08.2008
- Anonymous. 2005c. MON-ØØ81Ø-6 (MON810). web sitesi: [www.agbios.com](http://www.agbios.com). Erişim Tarihi:05.08.2008
- Anonymous. 2005d. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. ENGL Method Performance Requirements. European network of GMO laboratories (ENGL). Version, 25.01.05.
- Anonymous. 2006a. SYN-EV176-9 (176). web sitesi: [www.agbios.com](http://www.agbios.com). Erişim Tarihi:05.08.2008
- Anonymous. 2006b. ACS-ZMØØ2-1 / ACS-ZMØØ3-2 (T14, T25). web sitesi: [www.agbios.com](http://www.agbios.com). Erişim Tarihi:05.08.2008
- Anonymous. 2007a. Biosafety and risk assesment in agricultural biotechnology. A workbook for technical training. Part 5: Monitoring. web sitesi: [www.iaa.msu.edu](http://www.iaa.msu.edu). Erişim Tarihi:14.09.07.
- Anonymous. 2007b. Information on GM approved products. web sitesi: [www.agbios.com](http://www.agbios.com), Erişim Tarihi: 04.12.2007. Erişim Tarihi:16.12.05
- Anonymous. 2007c. Mon810.[www.gmo-compass.com](http://www.gmo-compass.com). Erişim Tarihi:15.07.2008.
- Anonymous. 2008. Laboratory techniques for GMO analysis. web sitesi: [www.labplusinternational.com](http://www.labplusinternational.com). Erişim Tarihi:11.07.2008.
- Anonymous. 2008b. Bt11 maize: Key facts. [www.europabio.org](http://www.europabio.org). Erişim Tarihi:15.07.2008.
- Anonymous. 2008c. FDA Withdraws stralink corn testing guidance. web sitesi: [www.starlink.com](http://www.starlink.com). Erişim Tarihi:15.07.2008.
- Arda, M. ve Yardımcı, H. 2005. Hayvancılıkta modern biyoteknoloji uygulamaları. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 1-28.
- Aydın, G. 2004. Detection of genetically modified maize via polymerase chain reaction, Yüksek Lisans tezi, ODTÜ.
- Baran, M. 2003. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik. TürkTarım. Mart-Nisan, 12-15.
- Baran, M. and Yılmaz, R. 2008. The biosafety policy on genetically modified organisms in Turkey. Guest Edit. Environ Biosafety Res. 7, 57-59.
- Baran, M. ve Özçelik, F. 2007. GDO'larda izleme (monitoring) ve etiketleme. Türkiye 15. Biyoteknoloji Kongresi. 28-31Ekim 2007. Bildiri Kitabı, 169-171. Antalya.

- Baran, M. ve Özçelik, F. 2008. Halkın farkındalığı, eğitimi ve katılımının biyogüvenlik unsurlarına etkisi ve Türkiye’ de yapılan çalışmalar. Akademik Gıda. 6 (3), 37-42.
- Bardocz, S., Pusztai, A. and Hansen, M. 2005. Post-release monitoring of transgenic plants. Tromso Biosafety Course Notes. 22 August-3 September.
- Bergen, G. 2001. Final Report Contract NP/42/026.
- Bertolle, F. and Simonet, P. 1997. Potentialities for DNA transfer from plants to soil microorganisms. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants. 12-13 Haziran. Oslo, Norway. 40-42.
- Bonfini, L., Heinze, P., Kay, S. and Van den Eedde, G. 2001. Review of GMO detection and quantification techniques. EU Joint Research Center, Institute of Health Consumer Protection. Final Report. 67p. Ispra, Italy.
- Bucchini, L. and Goldman, L. R. 2002. Starlink corn: a risk analysis. Environ. Health Perspect. 110 (1), 5-13.
- Bunning, V.K. 1995. Biotechnology consultation note to the file BNF no: 000029.USDA. web sitesi: [www.cfsan.fda.gov.tr](http://www.cfsan.fda.gov.tr). Erişim Tarihi:15.07.2008.
- Bustin, S.A. 2005. Real-time PCR. encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics. Marcel Dekker Inc.1117-1125.
- Ching, L. L. 2005. Policy and regulatory overview: What are the issues? TWN. Tromso Biosafety Course Notes. 22 August-3 September.
- Demir, A., Seyis, F. ve Kurt, O. 2006. Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar: 1. Bitkiler. J. of Fac. of Agric., OMU. 21 (2). 249-260.
- Dijk, J. V., Prins, T., Voorhuijzen, M., Van Hoef, Aarts, H. and Kok, E. 2008. A multiplex padlock-ligation GMO detection method. 1st Global Conference on GMO Analysis. 24-27 June. Como. Italy. 36p.
- El Sanhoty, R., Broll, H., Grohmann, I., Linke, B., Spiegelberg, A., Bögl, K-W and Zagon, J. 2002. Genetically modified maize and soybean on the Egyptian food market. Nahrung Food. 46 (5), 360-363.
- Ergül, O. 2005. Biyoteknoloji ve Hukuk. Modern Biyoteknoloji Uygulamaları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. 1-38s.
- Eser, V. ve Kılınçarslan, H. 2005a. GDO’ lar ile ilgili sorular ve cevaplar. Modern Biyoteknoloji Uygulamaları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.1-38.
- Eser, V. ve Kılınçarslan, H. 2005b. Modern biyoteknolojide güvenlik. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. 80s.
- Farid, E.A. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology. 20 (5). 215-223.
- Fernandez-Cornejo, J. 2007. Adoption of genetically engineered crops in the U.S: corn varieties. web sitesi: <http://www.ers.usda.gov>. Erişim Tarihi:14.08.2008.
- Giglio, S., Monis, P. T. and Saint, C.P. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. Nucleic Acids Research. 31 (22), 1-5.
- Goldstein, W. E. 1997. Considerations for development and commercialization of plant cell processes and products. Chapter 7. Technology transfer of plant biotechnology. Ed. Peter M. Gresshoff. A. CRC Series. 25-40. Florida. 95-109.

- Göçmen, M. 2002. Transformasyon. Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Uygulamalı Eğitim Programı III. Kurs Notları. Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya.4s.
- Gözükırmızı, N. 2002. Biyogüvenlik sistemlerinin oluşmasında Türkiye’deki durum. Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Uygulamalı Eğitim Programı III. Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Gebze-Kocaeli. 85-89.
- Guerra, F. X. M. 2005. Development of technique for the quantification of DNA from genetically modified organisms in processed foods. Lehrstuhl für Allegement Lebensmitteltechnologie. Technische Universität München. 118p.
- Haspolat, I. 2004. Genetik olarak değiştirilmiş ürünlerin üretimi, ticareti ve ticaretin düzenlenmesi. Y.Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 157 s.
- Haver, V. E., Schijver, A.D., Devos, Y., Lievens, S., Renckens, S. and Moens, W. 2003. Guidance notes for the safety assessment of genetically modified crops for food and feed use. 8 April 2003. Scientific Institute of Public Health. Royal Library of Belgium Deposit N<sup>o</sup>: D/2003/2505/16.
- Heinemann, A. J. 1997. Assessing the risk of interkingdom DNA transfer. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants. 12-13 Haziran. Oslo, Norway. 17-28.
- Heinemann, A. J. and Traavik, T. 2004. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. Nature Biotechnology. V(22) No9. 1105-1109
- Heinemann, A. J., Sparrow, A. D. and Traavik, T. 2004. Gene ecology guide to: Is confidence in the monitoring of GE foods justified? Trends Biotechnol. 22, 7s.
- Ho, M.W., Traavik, T., Olsvik, O., Midtvedt, T., Tappeser, B., Howard, C. V., Weisacker, C. V. and McGvain, G. 2004. Has the frequency of horizontal gene transfers increased recently? Gene Technology in the Etiology of Drug-Resistant Diseases. TWN Biotechnology and Biosafety Series 2. Jutaprint, Malaysia. 102p.
- Holts-Jensen, A., Ronning, S. B., Lovseth, A. and Berdal, K. G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). Anal. Bioanal. Chem. 375, 985-993.
- İpekçi, Z. 2002a. Genetik Olarak Değiştirilmiş Bitkilerin Analiz Yöntemleri. Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Uygulamalı Eğitim Programı III. Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Gebze-Kocaeli. 58-62.
- İpekçi, Z. 2002b. Lateral Flow Strip Uygulaması. Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Uygulamalı Eğitim Programı III. Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Gebze-Kocaeli. 123-124.
- James, C. 2006. Global status of commercialized transgenic crops. ISAAA Report.
- Kapuscinski, A. R. 2005. From reactive to pro-active biosafety: Science, technology and capacity needs. Norway/UN Conference on Technology Transfer and Capacity Building. 92-100.

- Kay, S. and Paoletti, S. 2001. Sampling strategies for GMO detection and/or quantification. Rev 4.2, 23 Nov. 2001. EC. Directorate general JRC. IHCP (Institute for Health and Consumer Protection). Food Products Unit: GMO: Food and Environment. 13p.
- Kuiper, A. H., Kleter, G. A. and Noordam, M. Y. 2000. Risks of the release of transgenic herbicide-resistant plants with respect to humans, animals and the environment. *Crop Protection*. 19, 773-778.
- Kuvshinov, V., Koivu, K., Kanerva, A. and Pehu, E. 2001. Molecular control of transgene escape from genetically modified plants. *Plant Science*. 160. 517-522.
- Lin, H.Y., Chiang, J-W. and Shih, D. Y-C. 2001. Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits, *Journal of Food and Drug Analysis*. 9 (3), 160-166.
- Lin, L. L. 2005. Cartagena Protokol on Biosafety. Tromso Biosafety Course. 22 August-3 September. 1-7.
- Ling, C.Y. and Lin, L.L. 2005. Public participation in implementation of the biosafety protocol. *Biosafety Briefing*. February. TWN. 2p. Tromso Biosafety Course. 22 Ağustos-3 Eylül. Kurs Notları. Tromso University-GENOK, Tromso, NORVEÇ.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyguem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van Den Eede, G. and Anklam, E. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*. 212, 497-504
- Lipp, M. and Anklam, E. 2002. Validation of an immunoassay for the detection and quantification of roundup-ready soybean in food and feed fraction by the use of reference materials. European Commission Joint research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. Food Production and Consumer Goods Unit. 260p. Ispra, Italy.
- Lipp, M., Shilto, R., Giroux, R., Spigelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D. and Song, P. 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *J. of AOAC Inter*. 88 (1), 136-155.
- Lübeck, M. 2002. Detection of genetically modified plants – methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. Report. Danish Forest and Nature Agency (Skov & Naturstyrelsen). 32p. web sitesi: [www2.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm](http://www2.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm). Erişim Tarihi: 13.08.2008.
- Martineau, B. 1996. From lab bench to marketplace: The Calgene FLAVR SAVR Tomato. *Technology Transfer of Plant Biotechnology*. Ed. Peter M. Gresshoff. A. CRC Series. 13-23. Florida.
- Mitten, H. D., McDonald, R. and Klonus, D. 1999. Regulation of foods derived from genetically crops. *Current Opinion in Biotechnology*. 10. 298-302.
- Moen, W. 2003a. Report on molecular characterization of the genetic map of event Bt176. Scientific Institute of Public Health. 3p.
- Moen, W. 2003b. Report on molecular characterization of the genetic map of event Mon810. Scientific Institute of Public Health. 3p.
- Myhr, A. I. and Traavik, T. 2002. Genetically modified (GM) crops: precautionary science and conflicts of interests. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 16, 227-247.

- Nicholl, D. S. T. 2002. Selection, screening and analysis of recombinants. Genetic Engineering. Cambridge University Pres. Second ed. 292p.
- Nielsen, C. and Andersan, K. 2005. GMOs trade policy, and welfare in rich and poor countries. Tromso Biosafety Course. 22 Agust-3 September.
- Nielsen, K. M. and Townsend, J. P. 2005. Monitoring and odelling horizontal gene transfer. Nature Biotechnology. 22 (9). 1110-1114.
- Nielsen, M. K. 1997. Horizontal gene transfer from genetically modified plants (GMP) to soil associated bacteria. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants. 12-13 Haziran. Oslo, Norway. 29-39.
- Nielsen, M. K., Bones, A. M., Smalla, K. and Elsas, J. D. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria- a rare event? Fems. Microbiology Reviews. 22, 9-103.
- Okusu, H., 2003. Socio-economic and ethical aspects of GMOs. Genetically Modified Organisms (GMO) Impact on Environment and Health Risk Assessment Training Workshop NamPower. Convention Centre. Windhoek. 17-19 November 2003
- Özcan, S ve Sancak, C. 2005. Modern biyoteknolojinin bitkisel üretimde kullanımı. Modern Biyoteknoloji Uygulamaları. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. 1-21
- Özgen, A. M., Tunail, N., Eser, V. ve Tuncer, B. 1997. Tarımsal biyoteknoloji. Türk Ziraat Yüksek Mühendisliği Birliği ve Vakfı. Çalışma Komisyonu Raporlar Dizisi. 8., 27s.
- Pauli, U., Liniger, M., Zimmerman, A. and Schrott, M. 2000. Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs. Mitt. Lebensm. Hyg. 91: 491-501.
- Querci, M., Van den Eede, G. and Jermi, M. 2002. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. European Commission. Joint Research Centre Manual. Bölüm 2, 5-8.
- Raymond, P. Gendron, L., Paul, S., Moreau, M.E., Cote, M. J. and Laberge, S. 2008. New DNA insert fingerprint method for the detection and identification of GMO in mixtures.
- Roger, S. O. and Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from miligram amounts of fresh, herbarium and plant tissues. Plant Mol. Biol. 5, 69-76.
- Salyers, A. A. 1997. Horizontal gene transfer between prokaryotes. Nordic Seminar on Antibiotic Resistance Marker Genes and Transgenic Plants. 12-13 Haziran. Oslo, Norway. 8-16.
- Schreiber, G. A. 1999. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. Food Control. 10. 351-352.
- Sheskin, D.J. 2000. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall/CRC.
- Sim, J. and Wright, C. C. 2005. The Kappa Statistic in reliability studies: Use, interpretation, and sample size requirements. Physical Therapy. 85, 257-268
- Smalla, K. and Vogel, T.M. 2007. Presentation of the thematic issue on horizontal gene transfer. Guest Editorial. Environ. Biosafety Res. 6, 1-2.
- Somma, M. 2003. Quantitative PCR for the detection of GMOs. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. Joint Research Centre. 3-7 Şubat, Ispra, İtalya.



- Stewart, P. A. and Sorensen, A. A. 1997. Field testing of genetically engineered crops: Public-private institution comparison. *Technology. Transfer of Plant Biotechnology*. Ed. Peter M. Gresshoff. A. CRC Series. 191-205. Florida.
- Tozzini, A., Martinez, M.C., Lucca, M. F., Rovere, C. and Distefano, A. J. 2000. Semiquantitative detection of genetically modified grain based on CaMV 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3. 149-153.
- Tuzun, S., Gay, P.A., Lawrence, C.B., Robertson, T. L. and Sayler, R. J. 1996. Biotechnical applications of inheritable and inducible resistance to diseases in plants. Chapter 3. *Technology Transfer of Plant Biotechnology*. Ed. Peter M. Gresshoff. A. CRC Series. 25-40. Florida.
- Uzogora, S. G. 2000. The impact of genetic modification of human foods in the 21 st century: A review. *Biotechnology Advances*.18, 179-206.
- Vaerman, J. L., Saussoy, P. and Ingargiola, I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. *Jour. Of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 18, 212-214.
- Watson, D. J, Gilman, M., Witkowksi, J. and Zoller, M. 1998. Recombinant DNA in medicine and industry. Chapter 23. *Recombinant DNA*. Scientific American Books. USA,
- Yücel, F., 2002. ELISA test sistemleri. *Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Uygulamalı Eğitim Programı III*. Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Gebze-Kocaeli. 45-52.
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. and Stewart Jr, C. N. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 7 (85), 1-12.
- Zarilli, S. 2004. International trade in GMOs: Legal frameworksand developing country concerns. *United Nations Conference on Trade and Development*.
- Zel, J., Cankar, K., Ravnkar, M., Camloh, M. and Gruden, K. 2006. Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection. *Accred Qual Asur*. (10); 531-536.

## **EKLER**

**EK. 1 KİMYASALLAR VE KAYNAKLARI**

**EK. 2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER**

**EK. 3 ENZİMLER, MARKÖRLER, AYRAÇLAR**

**EK. 4 TÜRKİYE’NİN MISIR VE SOYA İTHALATI VE DEĞERİ**

**EK.5 TÜRKİYE ULUSAL BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK STRATEJİSİ EYLEM PLANI**

**EK. 6 AMERİKADA YETİŞTİRİLEN GM MISIRLARIN YÜZDE ORANLARI (FERNANDEZ 2007)**

**EK .7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (ANONYMOUS 2007B)**

**EK. 8 İŞLENMİŞ MISIR ÜRETİMİ AKIM ŞEMASIMISIR UNU ÜRETİMİ**

**EK .9 BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERİN 1996-2006 YILLARI ARASINDAKİ EKİM ALANLARI (MİLYON HEKTAR) (JAMES 2006)**

**EK. 10 TKB GMO’ LAR İLE İLGİLİ GENELGELER VE GENELGELERE AİT TAAHHÜTNAMELER**

**EK. 11 BAZI ÖRNEKLERDE DNA MİKTAR SONUÇLARI**

**EK. 12 BAZI ÖRNEKLERDE 35S VE NOS ANALİZ SONUÇLARI**

**EK. 13 BAZI ÖRNEKLERDE BT176 MISIR (RELATİF) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI**

**EK 14 BAZI ÖRNEKLERDE BT 176 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI**

**EK. 15 BAZI ÖRNEKLERDE BT11 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI**

**EK. 16 BAZI ÖRNEKLERDE MON810 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI**

**EK.17 BAZI ÖRNEKLERDE T25 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI**

**EK.18 ÜLKEMİZDEKİ TRANSGENİK BİTKİLERİN ALAN DENEMELERİ**

## EK 1 KİMYASALLAR VE KAYNAKLARI

Kimyasallar	Kaynak
Agaroz	Sigma
Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	Sigma
Sodium Chloride (NaCl)	Scharlau
Ethidium Bromide	Sigma
Ethanol (EtOH)	Scharlau
Isopropanol	Scharlau
Tris-Asetik Asit-EDTA	Scharlau
Tris (hydroxymethyl) aminomethane Tris- HCl	Scharlau
Na <sub>2</sub> EDTA	Scharlau
Xylene cyanole FF	Sigma
NaOH	Scharlau
İsoamilalkol	Scharlau
Tris Borat EDTA (TBE)	Scharlau

## **EK 2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER**

### **1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**

#### **1.1 Hexadecyltrimetil-amonyum bromid (CTAB) tampon çözeltisi**

CTAB	4 g
NaCl	16.4g
Tris HCl	3.15 g
Na <sub>2</sub> EDTA	1.5 g
Deiyonize su	100 mL

1M NaOH ile pH 8'e ayarlanır.

Deiyonize su ile 200 mL' ye tamamlanır ve otoklavlanır.

#### **1.2 CTAB presipitasyon çözeltisi**

CTAB	1 g
NaCl	0.5 g

Deiyonize su ile 100mL' ye tamamlanan çözeltinin pH' sı 1M NaOH ile 8'e ayarlanır.

Deiyonize su ile 200 mL' ye tamamlanır ve otoklavlanır.

Çözelti +4°C' de 6 ay saklanır.

#### **1.3 1 M NaOH**

NaOH	10 g
------	------

Deiyonize suda çözülerek 250 mL' ye tamamlanır.

## **EK 2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER (Devam)**

### **1. 4 1.2 M NaCl**

NaCl                    7 g

Deiyonize suda çözümlenerek 100 mL' ye tamamlanır.

Otoklavlanır ve oda sıcaklığında saklanır.

### **1.5 %70 Etanol çözeltisi**

30 mL su

70 mL etanol

## **2. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler**

### **2.1 Etidium bromid çözeltisi**

10 mg/mL EtBr deiyonize suda çözülür

### **EK 3 ENZİMLER, MARKÖRLER, AYRAÇLAR**

<b>Enzimler, Markörler ve Ayraçlar</b>	<b>Kaynak</b>
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Genmark, Fermentase
100 bp DNA Marker	Fermentase
50 bp DNA Marker	R-Biofarm
Ribonükleaz A (RNase A) 10 mg/mL	Roche
Proteinaz K 20 mg/mL	Roche
Hot Taq DNA Polymerase	Applied Biosystem, Fermentase

**EK. 4 TÜRKİYE’NİN MISIR VE SOYA İTHALATI VE DEĞERİ**

Ürün	Ülkeler	1996		1997		1998		1999		2000		2001		2002		2003	
		Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)
Mısır	A.B.D.	594 571	115 773	552 747	85 673	394 454	54 530	640 296	73 791	954 670	107 510	460 959	55 146	697 430	76 225	1 113 684	175 832
	Arjantin	134 360	27 827	202 338	29 105	56 481	7 400	30 076	4 066	23 204	4 102	2 100	742	39 524	6 490	356 754	53 671
	Diğer	168 509	32 089	98 724	15 615	318 311	35 584	168 723	20320	308 316	35 275	74 421	9 747	442 982	51 039	348 020	46 679
	TOPLAM	897 440	175 689	853 809	130 393	769 246	97 514	839 095	98 177	1286 190	146 887	537 480	65 635	1179 936	133 754	1818 458	276 182
Soya	Ülkeler	1996		1997		1998		1999		2000		2001		2002		2003	
		Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)	Miktar (ton)	Değer (1000 \$)
	A.B.D.	113 608	35 358	172 483	55 506	158 892	44 494	258 254	54 622	301 327	64 569	301 353	63 193	541 248	124 918	399 328	110 765
	Arjantin	5 869	1 894	---	---	11 300	2 849	38 034	7 412	17 990	3 976	---	---	71 230	14 686	336 991	88 847
Diğer	29 775	9 014	69 322	25 261	115 000	31 123	56 978	12 431	67 388	14 392	19 898	4 194	----	----	95 134	26 913	
TOPLAM	149 252	46 266	241 805	80 767	285 192	78 466	353 266	74 465	386 705	82 937	321 251	67 387	612 478	139 604	831 453	226 525	

Kaynak: Devlet İstatistikleri Enstitüsü (Haspolat 2004)

## EK 5 TÜRKİYE ULUSAL BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK STRATEJİSİ EYLEM PLANI

### Ekolojik Planlama ve Yönetim

Bu bölümde biyolojik çeşitliliğin korunması ve biyolojik kaynakların sürdürülebilir biçimde kullanımı için gerekli olan unsurlar ana hatlarıyla belirtilmiştir. Hedef 1' e ulaşabilmek için, aşağıda belirtilen konuları temel alan bir ekolojik yönetim yaklaşımı uygulanmalıdır:

- Yabani flora ve fauna populasyonlarının korunması;
- Koruma altındaki alanlar ağının tamamlanması;
- Türlerin ve bozulmuş ekosistemlerin restorasyonu ve rehabilitasyonu;
- Biyolojik çeşitliliğin korunmasını ve biyolojik kaynakların sürdürülebilir kullanımını destekleyen step, orman ve sulak alan ekosistemlerine yönelik entegre kaynak kullanımı politikalarının, planlarının, yasal düzenlemelerin ve programların geliştirilmesi ve uygulanması;
- Yabancı ve modifiye (genetik değişime uğramış) organizmaların biyolojik çeşitliliği olumsuz yönde etkilemesini önleyecek önlemlerin geliştirilmesi ve uygulanması;**
- İnsan nüfusundaki artışın ve insan yerleşiminin ekosistemler, türler ve genetik kaynaklar üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılmasına yönelik önlemlerin geliştirilmesi ve uygulanması.



**EK 6 AMERİKADA YETİŞTİRİLEN GM MISIRLARIN YÜZDE ORANLARI (Fernandez 2007)**

ABD' deki GM mısır çeşitleri, 2000-2007																
	Böcek Dirençli (Bt)								Herbisit toleranslı							
State	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
	<i>Percent of all corn planted</i>								<i>Percent of all corn planted</i>							
Illinois	13	12	18	23	26	25	24	19	3	3	3	4	5	6	12	15
Indiana	7	6	7	8	11	11	13	12	4	6	6	7	8	11	15	17
Iowa	23	25	31	33	36	35	32	22	5	6	7	8	10	14	14	19
Kansas	25	26	25	25	25	23	23	25	7	11	15	17	24	30	33	36
Michigan	8	8	12	18	15	15	16	19	4	7	8	14	14	20	18	22
Minnesota	28	25	29	31	35	33	28	26	7	7	11	15	17	22	29	32
Missouri	20	23	27	32	32	37	38	30	6	8	6	9	13	12	14	19
Nebraska	24	24	34	36	41	39	37	31	8	8	9	11	13	18	24	23
North Dakota 1/						21	29	29						39	34	37
Ohio	6	7	6	6	8	9	8	9	3	4	3	3	4	7	13	12
South Dakota	35	30	33	34	28	30	20	16	11	14	23	24	30	31	32	34
Texas 1/						21	27	22						42	37	37
Wisconsin	13	11	15	21	22	22	22	19	4	6	9	9	14	18	18	23
Other States 2/	10	11	14	17	19	19	20	20	6	8	12	17	21	19	25	33
U.S.	18	18	22	25	27	26	25	21	6	7	9	11	14	17	21	24

**EK 6 AMERİKADA YETİŞTİRİLEN GM MISIRLARIN YÜZDE ORANLARI (Fernandez 2007) (Devam)**

State	Çoklu gen içeren çeşitler								Tüm GM çeşitleri							
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
	<i>Tüm mısır içindeki yüzde oranları</i>								<i>Tüm mısır içindeki yüzde oranları</i>							
Illinois	1	1	1	1	2	5	19	40	17	16	22	28	33	36	55	74
Indiana	*	*	*	1	2	4	12	30	11	12	13	16	21	26	40	59
Iowa	2	1	3	4	8	11	18	37	30	32	41	45	54	60	64	78
Kansas	1	1	2	5	5	10	12	21	33	38	43	47	54	63	68	82
Michigan	*	2	2	3	4	5	10	19	12	17	22	35	33	40	44	60
Minnesota	2	4	4	7	11	11	16	28	37	36	44	53	63	66	73	86
Missouri	2	1	2	1	4	6	7	13	28	32	34	42	49	55	59	62
Nebraska	2	2	4	5	6	12	15	25	34	34	46	52	60	69	76	79
North Dakota 1/						15	20	22						75	83	88
Ohio	*	*	*	*	1	2	5	20	9	11	9	9	13	18	26	41
South Dakota	2	3	10	17	21	22	34	43	48	47	66	75	79	83	86	93
Texas 1/						9	13	20						72	77	79
Wisconsin	1	1	2	2	2	6	10	22	18	18	26	32	38	46	50	64
Other States 2/	1	1	2	2	6	6	10	14	17	20	27	36	46	44	55	67
U.S.	1	1	2	4	6	9	15	28	25	26	34	40	47	52	61	73
* %1 den az																

## EK.7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (Anonymous 2007b)

ACS-ZMQQ3-2 x MON-QQ81Q-6	Bayer Crop Science (Aventis Crop Science [AgrEvo])	T25 ve MON810 hatlarının konvensiyonel metotla çaprazlanması sonucu böcek dirençliliği ve herbisit toleranslılığın birleştirildiği mısır hibritleridir.
DAS-06275-8	DOW AgroSciences LLC	<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>aizawai</i> 'den elde edilen <i>CryIF</i> geni aktararak lepidopteran böcek dirençliliği kazandırılması ve <i>Streptomyces hygrosopicus</i> ' tan ise fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc.	<i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 suşundan elde edilen <i>Cry34Ab1</i> ve <i>Cry35Ab1</i> genleri aktararak mısır kök kurduna dirençlilik için üretilmiştir. <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ' ten fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan gen ise seçici markır olarak aktarılmıştır.
DAS-59122-7 X NK603	DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc.	DAS-59122-7 ve NK603 genetik modifiye mısırların geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş böcek dirençlilik ve herbisit toleranslılığın birleştirildiği hibrit mısırlardır. Mısır kök kurdu dirençliliği <i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 suşundan elde edilen <i>Cry34Ab1</i> ve <i>Cry35Ab1</i> genlerinin aktarıldığı DAS-59122-7' den, glufosat herbisitine toleranslılık ise NK603' ten sağlanmaktadır.
DAS-59122-7 X TC1507 X NK603	DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc.	DAS-59122-7 ve TC1507 ile NK603' ün geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş böcek dirençlilik ve herbisit toleranslılığın birleştirildiği hibrit mısırlardır. Mısır kök kurdu dirençliliği <i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 suşundan elde edilen <i>Cry34Ab1</i> ve <i>Cry35Ab1</i> genlerinin aktarıldığı DAS-59122-7' den, glufosinat amonyum herbisitine ve toleranslılık ve lepidopteran böceklere dirençlilik TC1507' den, glufosat herbisitine toleranslılık ise NK603' ten sağlanmaktadır.

## EK. 7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (Anonymous 2007b) (Devam)

EXP1910IT	Syngenta Seeds Inc.(öncesi Zeneca Seeds)	Asetolaktat (ALS) enziminin Etilmetanosülfonat (EMS) kullanılarak mutagenesi ile imidazilinin herbisitine dirençlilik için üretilmiştir.
GA21	Monsanto Şirketi	Aromatik aminoasitlerin üretiminden sorumlu şikimat biyokimyasal yolunda kullanılan ve modifiye bir enzim olan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintaz (EPSPS) kodlayan genin partikül bombardmanı yöntemi ile aktarılması sonucu üretilen bir mısırdır.
IT	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Embriyoların imidazolinon içeren bir ortamda kültüre edilmesi ile imidazolinon herbisitine dirençli somoklonal varyantların seçimi.
LY038	Monsanto Şirketi	Corynebacterium glutamicum' dan dihidrodipikolinatsintaz (cDHDPS) enzimini kodlayan cordapA geninin aktarımı ile özellikle lizin üretim miktarını artırarak amino asit içeriğini değiştirmek amacıyla üretilmiştir.
MIR604	Syngenta Seeds Inc.	Modifiye bir Cry3A geninin transformasyonu ile mısır kök kurduna dirençlilik için üretilmiştir. E. Coli' den aktarılan fosfomanoz izomeraz enzimi ise seçici markır olarak kullanılmıştır.
MONQQ6Q3-6 X MON-QQ81Q-6	Monsanto Şirketi	MON810 ile NK603' ün geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş böcek dirençlilik ve herbisit toleranslığının birleştirildiği hibrit mısırlardır.
MON-QQ81Q-6 X LY038	Monsanto Şirketi	MON810 ile LY038'in geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş, böceğe dirençli ve linsince zenginleştirilmiş mısırın birleştirildiği hibrit mısırlardır.
MON-QQ863-5 X MON-Q81Q-6	Monsanto Şirketi	MON810 ile MON863' ün geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş, böceğe dirençli mısırların birleştirildiği hibrit mısırlardır.
MON-QQ863-5 X MON-Q81Q-6 X MON-QQ6Q3-6	Monsanto Şirketi	Hibrit MON-QQ863-5 X MON-Q81Q-6 ile NK603' ün geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş böcek dirençlilik ve herbisit toleranslığının birleştirildiği hibrit mısırlardır.
MON-QQQ21-9 X MONQQ81Q-6	Monsanto Şirketi	MON810 ile GA21' in geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş, böceğe dirençli mısırların birleştirildiği hibrit mısırlardır.

## EK. 7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (Anonymous 2007b) (Devam)

MON80100	Monsanto Şirketi	Böcek dirençli mısır; tarımda mısırın en önemli böcek zararlısı olan ECB ( <i>Ostrinia nubilalis</i> ) tarafından yapılan ataklara karşı spesifik bir dirençlilik kazandırılması için geliştirilmiştir. <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i> 'den elde edilen Cry1Ab geni içermektedir.
MON802	Monsanto Şirketi	<i>Bacillus thuringiensis</i> ' den elde edilen Cry1Ab geni aktararak böcek dirençlilik kazandırılması için, <i>A. tumefaciens</i> ' in CP4 suşundan ise 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintaz (EPSPS) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
MON809	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Sentetik bir Cry1Ab geni aktararak böcek dirençlilik kazandırılması için, bir bitki enzimi olan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintaz (EPSPS)' in bakteriyel versiyonunu kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
MON810 X MON88017	Monsanto Şirketi	MON810 ile MON88017' nin geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş, böcek dirençlilik ve herbisit toleranslığın birleştirildiği hibrit mısırlardır. Lepidopteran böceklere dirençlilik <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i> ' nin HD1 suşundan türetilen ve bir insektisidal proteinin kesik (truncated) versiyonu olan Cry1Ab' yi üreten MON810' dan, mısır kök kurdu dirençliliği <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kumamotoensis</i> 'in EG4691' den elde edilen Cry3Bb1 geninin aktarıldığı MON88017' den, glufosat herbisitine toleranslık ise yine, <i>A. tumefaciens</i> ' in CP4 suşundan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintaz (EPSPS) kodlayan genin aktarıldığı MON88017' den sağlanmaktadır.

## EK. 7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (Anonymous 2007b) (Devam)

MON832	Monsanto Şirketi	Glifosat oksidaz (GOX) enzimini kodlayan genin ve aromatik aminoasitlerin üretiminden sorumlu şikimat biyokimyasal yolunda kullanılan ve modifiye bir enzim olan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintaz (EPSPS) kodlayan genin partikül bombardımanı yöntemi ile aktarılması sonucu üretilen bir mısırdır.
MON863	Monsanto Şirketi	Bacillus thuringiensis subspecies kumamotoensis'in EG4691' den elde edilen Cry3Bb1 geninin aktarıldığı ve mısır kök kurdu dirençliliği için üretilmiş bir mısırdır.
MON88017	Monsanto Şirketi	Mısır kök kurdu dirençliliği için Bacillus thuringiensis subspecies kumamotoensis'in EG4691' den elde edilen Cry3Bb1 geninin aktarıldığı ve glufosat herbisitine toleranslılık için A. tumefaciens' in CP4 suşundan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintaz (EPSPS) kodlayan genin aktarıldığı bir mısırdır.
MS3	Bayer Crop Science (Aventis Crop Science [AgrEvo])	Bacillus amyloliquefaciens' den barnaz ribonükleaz enzimini kodlayan genin aktarımı ile erkek kısırılığı (kendine dölleme) sağlanmıştır; PPT dirençliliği ise PPT-asetiltransferaz (PAT) etkisi ile olmaktadır.
MS6	Bayer Crop Science (Aventis Crop Science [AgrEvo])	Bacillus amyloliquefaciens' den barnaz ribonükleaz enzimini kodlayan genin aktarımı ile erkek kısırılığı sağlanmıştır; PPT dirençliliği , PPT-asetiltransferaz (PAT) etkisi ile olmaktadır.
NK603	Monsanto Company	Aromatik aminoasitlerin üretiminden sorumlu şikimat biyokimyasal yolunda kullanılan ve modifiye bir enzim olan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsintazı (EPSPS) kodlayan genin partikül bombardımanı yöntemi ile aktarılması sonucu üretilen bir mısırdır.

## EK. 7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (Anonymous 2007b) (Devam)

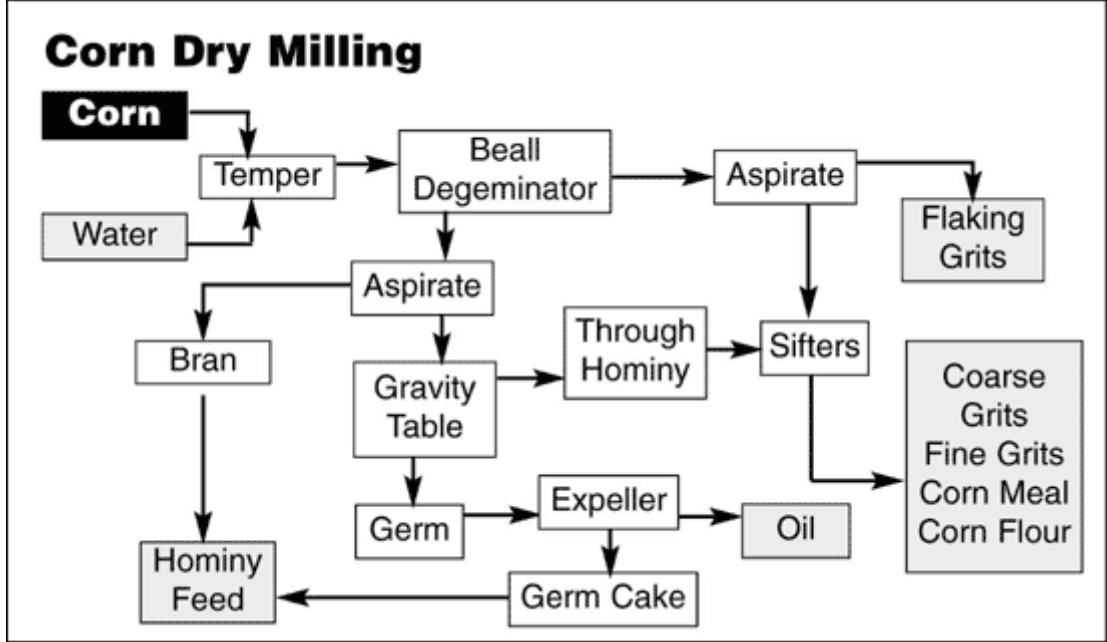
TC1507	Mycogen (c/o Dow agroSciences) Pioneer (c/o Dupont)	Bacillus thuringiensis var aizawai'den elde edilen Cry1F geni aktararak lepidopteran böcek dirençliliği kazandırılması ve Streptomyces viridochromogenes' ten ise fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
TC1507 X DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc.	TC1507 ile DAS-59122-7' nin geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş böcek dirençlilik ve herbisit toleranslığının birleştirildiği hibrit mısırlardır. Mısır kök kurdu dirençliliği Bacillus thuringiensis PS149B1 suşundan elde edilen Cry34Ab1 ve Cry35Ab1 genlerinin aktarıldığı DAS-59122-7' den, lepidopteran böcekler için dirençlilik Bacillus thuringiensis var aizawai'den elde edilen Cry1F geninin aktarıldığı TC1507' den, glufosat herbisitine toleranslık ise Streptomyces viridochromogenes' ten ise fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarıldığı yine TC1507' den sağlanmaktadır.
3751 IR	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Embriyoların imidazolinon içeren bir ortamda kültüre edilmesi ile imidazolinon herbisitine dirençli somoklonal varyantların seçimi.
676, 678, 680	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Escheria coli' den DNA adenin metilaz kodlayan genin, Streptomyces viridochromogenes' ten ise fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarılması ile sırası ile erkek kısırılığı ve bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
B16 (DLL25)	Dekalp Genetics Corporation	Streptomyces hygroscopicus' tan fosfotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.

## EK.7 TİCARİ BAZI GM MISIR ÇEŞİTLERİ (Anonymous 2007b) (Devam)

DAS-Q15Q7-1 X MONQQ6Q3-6	DOW AgroSciences LLC	1507 ile NK603' ün geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş böcek dirençlilik ve herbisit toleranslığın birleştirildiği hibrit mısırlardır.
DBT418	Dekalp Genetics Corporation	Bacillus thuringiensis subs. kurstaki'den elde edilen Cry1AC geni aktararak böcek dirençlilik kazandırılması için, Streptomyces hygroscopicus' tan ise fosfinotrisin asetiltransferaz (PAT) kodlayan genin aktarılması ile bir herbisit olan glufosinat amonyuma dirençlilik için üretilmiştir.
DK404SR	BASF Inc.	Embriyoların sethoxydim zenginleştirilmiş ortamda kültivasyonu ile modifiye asetil-CoA Karboksilaz (ACCase) içeren Somaklonal türler seçilmiştir.
SYN-BTQ11-1 X MON-QQQ21-9	Syngenta Seeds Inc.	BT11 ile GA21' in geleneksel çaprazlanması ile oluşturulmuş, böceğe dirençli mısırların birleştirildiği hibrit mısırlardır.

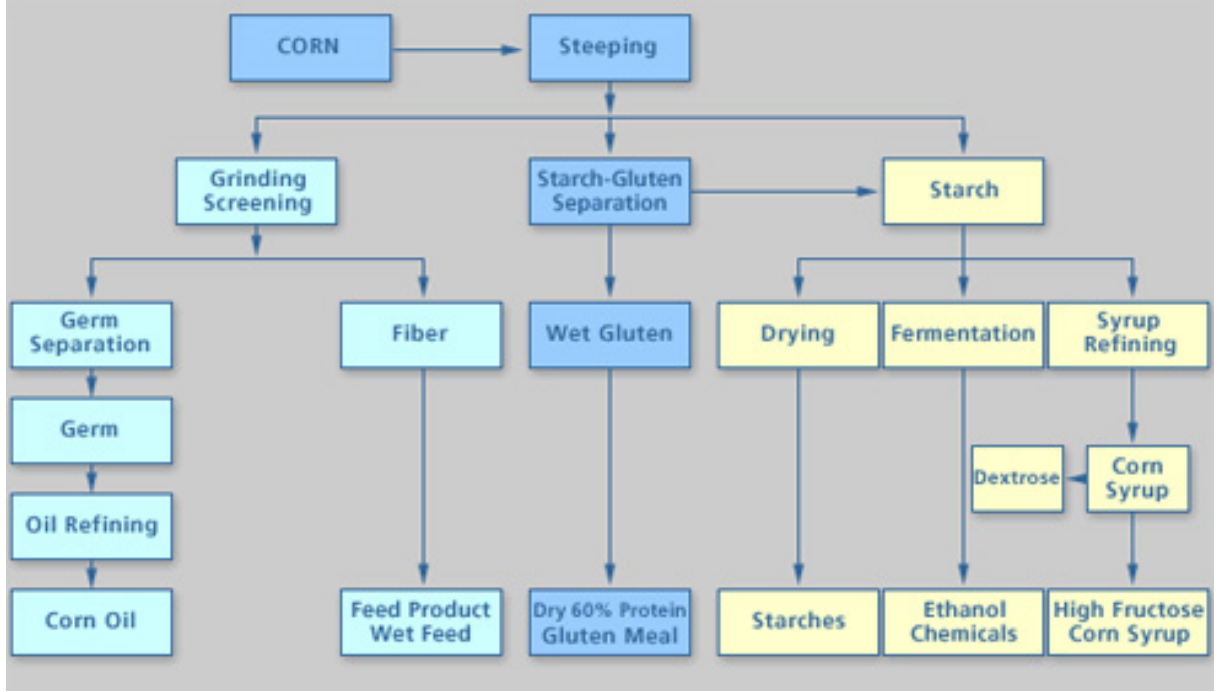


## EK. 8 İŞLENMİŞ MISIR ÜRETİMİ AKIM ŞEMASIMISIR UNU ÜRETİMİ



Şekil 1 Mısır unu üretimi akış şeması (www.iowacorn.org. Erişim Tarihi: (15.07.2008)

## EK.8 İŞLENMİŞ MISIR ÜRETİMİ AKIM ŞEMASIMISIR UNU ÜRETİMİ (Devam)



Şekil.2 Mısır nişastası üretimi akış şeması

(<http://www.ethanolrfa.org/resource/made/> Erişim tarihi:15.07.2008)

**EK. 9 BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERİN 1996-2006 YILLARI ARASINDAKİ EKİM ALANLARI (MİLYONHEKTAR) (James 2006)**

Yıllar	Ekim Alanı (Milyon Hektar)
1996	1.7
1997	11
1998	27.8
1999	39.9
2000	44.2
2001	52.6
2002	58.7
2003	67.7
2004	81.0
2005	90.0
2006	102.0
TOPLAM	576.6

## EK.10 TKB GMO' LAR İLE İLGİLİ GENELGELER VE GENELGELERE AİT TAAHHÜTNAMELER

**Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Süs Bitkileri (Gtip No: 0601-0602 Grupları)  
Çoğaltım Materyali İthalat Uygulama Genelgesi. (Genelge No: 2005/3)**

İç ve dış mekan süs bitkilerinin estetik ve işlevsel amaçlarla toplumumuz tarafından kullanılması giderek yaygınlık kazanmakta, bu bitkilerin üretim ve pazarlaması ülkemiz için önemli bir tarımsal faaliyet alanına dönüşmektedir. Bu iş kolunda üretim yapan işletmelerin ve tüm kullanıcıların kaliteli aşı gözü, çelik, fide, fidan, anaç bitki gibi çoğaltım materyali ihtiyaçlarının karşılanması hususunda gerekli tedbirleri almak Bakanlığımıza düşen bir görevdir. Bu nedenle süs bitkilerinin ithalatında uygulanacak esas ve kurallar aşağıda belirtilmiştir.

**17. Transgenik bitkilere veya transgenik çoğaltım materyallerinin ithalatına izin verilmez.** İthal edilecek materyalin transgenik olmadığına proforma faturada ifade edilmesi gerekir.

### TAAHHÜTNAME

..... tarihli dilekçe ile ..... Tarım İl Müdürlüğü'ne müracaat ederek ithalat izni talebinde bulunduğumuz süs bitkisi materyalleri ile ilgili olarak; sunulan bilgi ve belgelerin içeriğinin doğruluğunu, ithal edilen materyallerin **transgenik** (aktarma genli) olmadığını, ayrıca sağlık ve kalite yönünden ülke zararına yol açmayacağını garanti eder, bu konulardan doğabilecek her türlü hukuki ve cezai sorumluluklar ile, meydana gelmesi muhtemel zararların tarafımızdan karşılanacağını kuruluşum adına kabul ve taahhüt ederim. Ayrıca firma ile Bakanlık arasında bu konuda vuku bulacak hukuki davalarda ..... Mahkemelerini sorumlu olarak kabul ediyorum.

(Tarih)

(Yetkili İsim ve İmzası, Firma kaşesi)

**EK.10 TKB GMO' LAR İLE İLGİLİ GENELGELER VE GENELGELERE AİT  
TAAHHÜTNAMELER (Devam)**

**Tarım Ve Köyışleri Bakanlığı Tarımsal Üretim Ve Geliştirme Genel Müdürlüğü  
Meyve Ve Asma Fidanları İle Sebze Ve Çilek Fidesi İthalat Uygulama Genelgesi  
(Genelge No: 2005/2)**

10. Aktarmagenli (transgenik) çeşitlerin ve çoğaltım materyallerinin ithaline izin verilmez, ithal müracaatlarında ithalatçı ve ihracatçı firmaların, çeşidinin **aktarma genli** olmadığına dair taahhütname vermeleri gerekir. Bu husus ihracatçı firma tarafından proforma faturada da belirtilebilir.

**TAAHHÜTNAME**

..... tarihli dilekçe ile .....TÜGEM/Tarım İl Müdürlüğü'ne müracaat ederek ithalat izni talebinde bulunduğumuz .....(meyve ve asma fidanı/sebze ve çilek fidesi) çoğaltım materyalleri ile ilgili olarak; sunulan bilgi ve belgelerin içeriğinin doğruluğunu, sözkonusu materyalin **transgenik** (aktarmagenli) olmadığını ve ithal edilecek materyallerin sağlık ve kalite yönünden ülke zararına yol açmayacağını garanti eder, bu konulardan doğabilecek her türlü hukuki ve cezai sorumluluklar ile, meydana gelmesi muhtemel zararların tarafımızdan karşılanacağını..... (şahsım/ kuruluşum) adına kabul ve taahhüt ederim.

Ayrıca firma ile Bakanlık arasında bu konularda vuku bulacak hukuki davalarda ..... Mahkemelerini sorumlu olarak kabul ediyorum.

(Tarih)

(Yetkili İsim ve İmzası, Firma kaşesi)

**EK.10 TKB GMO' LAR İLE İLGİLİ GENELGELER VE GENELGELERE AİT  
TAAHHÜTNAMELER (Devam)**

**Tohumluk İthalat Uygulama Genelgesi (Genelge No: 2005/1)**

Bakanlığımızın bitkisel üretim konusundaki temel politikası, üstün niteliklere sahip yeni bitki çeşitlerinin kesintisiz bir şekilde ülke tarımının hizmetine sokulmasıdır. Bu hususta çiftçilerimizden gelecek, üstün vasıflı ve kaliteli her türlü tohumluk taleplerin karşılanabilmesi amacıyla, Bakanlığımız ilke olarak bir yandan yurt içi tohumluk üretimini artırma yönünde çaba göstermekte diğer yandan ise ileri teknolojilerin ülkemize transferini mümkün kılmak için gerekli her türlü destek ve kolaylığı sağlamaktadır. Bu maksatla tohumluk ithalatı ile ilgili usul ve esaslar aşağıdaki gibidir

6. Genetik Mühendisliği yöntemleri ile elde edilmiş aktarma genli (**transgenik**) bitki çeşitlerine ait tohumluklara, ürün yetiştirmede kullanma amacıyla ithal izni verilmez. Bununla beraber, yalnızca araştırma ve deneme amaçlı olmak üzere, Bakanlıkça uygun görülen bu tip tohumlukların ithaline mevzuat çerçevesinde izin verilir.

7. Ne maksatla olursa olsun yapılacak tüm aktarma **genli (transgenik) olmayan** bitki çeşitlerine ait tohumlukların ithalatında ithalatçı firma ve yurtdışındaki satıcı firma tarafından söz konusu tohumluğun aktarmagenli olmadığı Proforma faturada belirtilmeli veya taahhüt edilmelidir. (İthalatçı kuruluşun müracaat formundan hariç olarak ayrıca taahhütname tanzim etmesi bu taahhütnamede gerekli isim, imza ve firma kaşesi bulunması gereklidir.

**TAAHHÜTNAME**

**T.C.  
TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI  
MÜDÜRLÜĞÜNE**

Türkiye'ye ithal etmek istediğim aşağıda detayı verilmiş bulunan tohumlukların, ..... Giriş Gümrük Müdürlüğünden yurda girişi yapılacak olup, Bitki İthal Permisi ise ..... Müdürlüğünden alınacaktır.  
İthalini talep etmiş olduğumuz tohumlukların **transgenik olmadığını** taahhüt eder verilen bilgilerin doğruluğunu beyan ederek ithal izni verilmesi hususunda gereğini arz ederim.

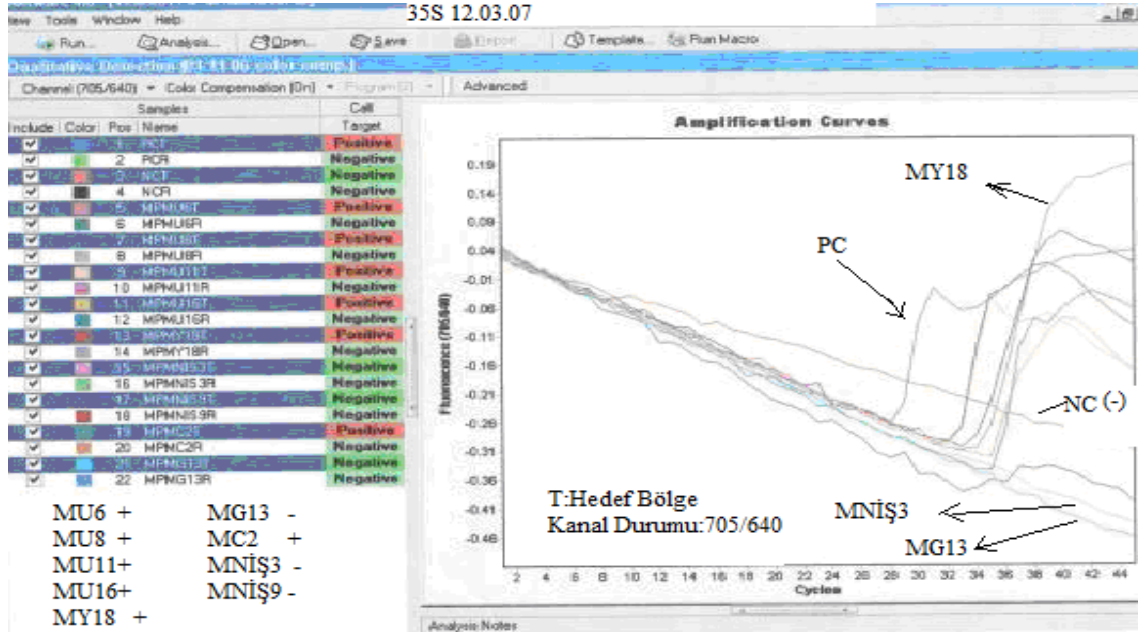
(Tarih)

(Yetkili İsim ve İmzası, Firma kaşesi)

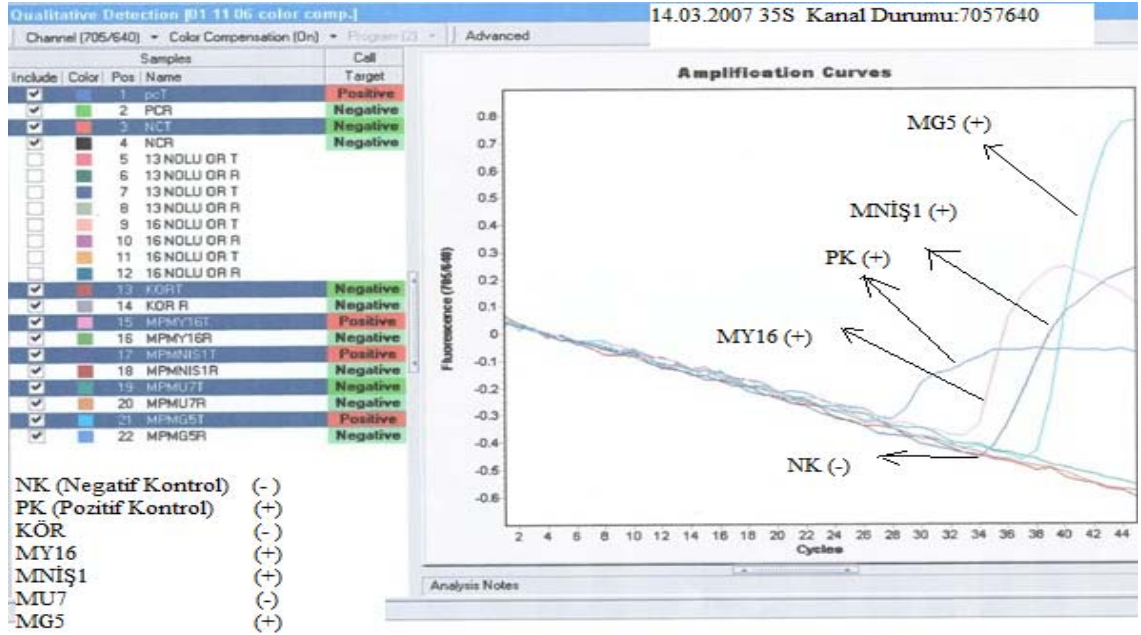
### EK.11 BAZI ÖRNEKLERDE DNA MİKTAR SONUÇLARI

ÖRNEKLER	260 nm	280 nm	260/280 nm	DNA miktarı (ng)
KÖR	0.000	0.000	0.500	0
MU5A	0.168	0.119	1.561	84
MU5B	0.225	0.179	1.571	112.5
MC2A	0.180	0.125	1.469	90
MC2B	0.210	0.167	1.433	105
MC4A	0.111	0.105	1.800	55.5
MC4B	0.047	0.042	1.731	23.5
MC10A	0.121	0.112	2.028	60.5
MC10B	0.068	0.063	1.704	34
MG1A	0.095	0.089	2.200	47.5
MG1B	0.026	0.024	1.471	13
MG5A	0.047	0.042	1.741	23.5
MG5B	0.101	0.094	1.823	50.5
MG7A	0.086	0.080	1.961	43
MG7B	0.033	0.029	1.586	16.5

## EK.12 BAZI ÖRNEKLERDE 35S VE NOS ANALİZ SONUÇLARI



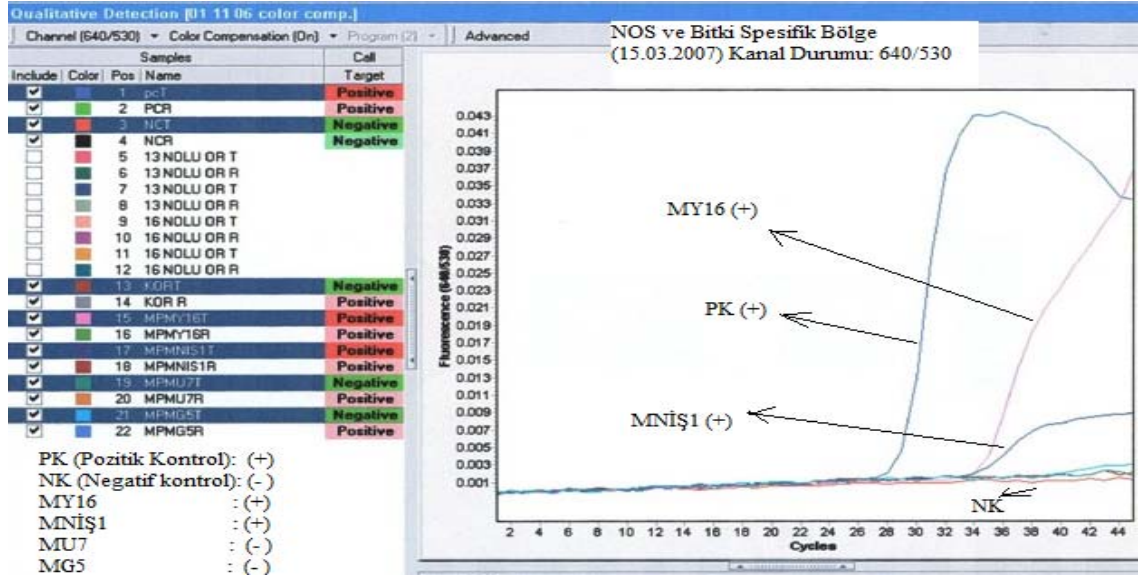
Şekil .1 Bazı Örneklerde 35S Analiz Sonuçları



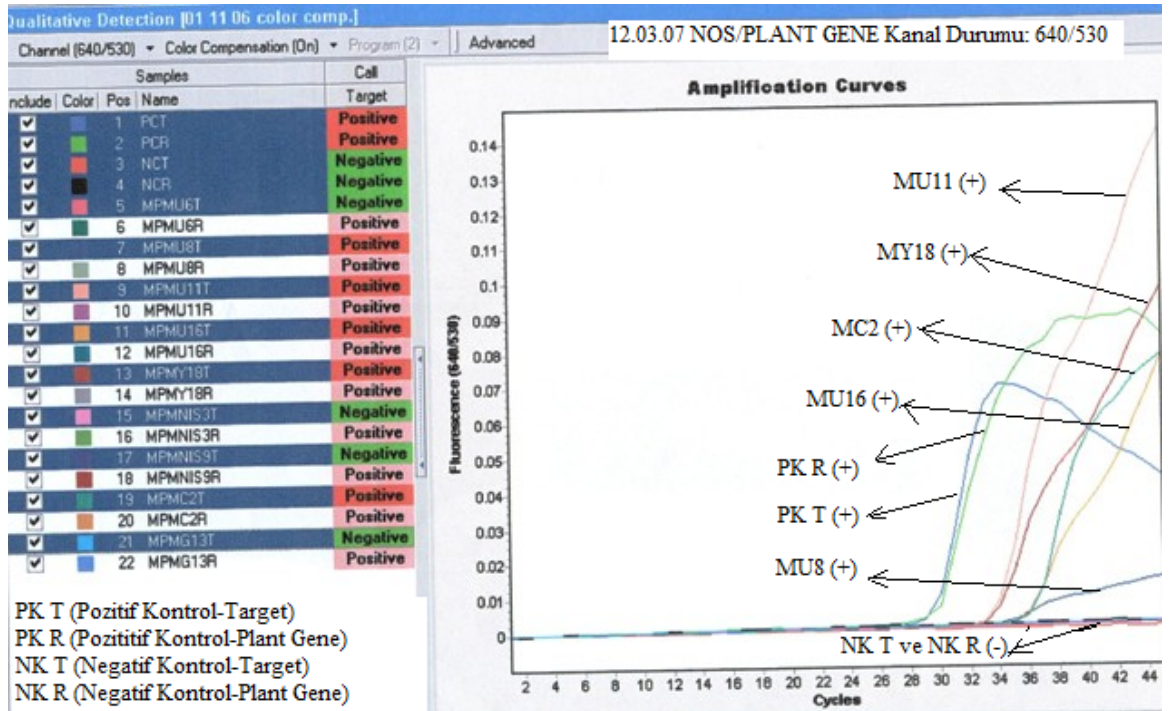
Şekil .2 Bazı Örneklerde 35S Analiz Sonuçları



## EK.12 BAZI ÖRNEKLERDE 35S VE NOS ANALİZ SONUÇLARI (Devam)



Şekil .3 Bazı Örneklerde NOS Analiz Sonuçları



Şekil .4 Bazı Örneklerde NOS Analiz Sonuçları

## EK.13 BAZI ÖRNEKLERDE BT176 MISIR (RELATİF) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI

Relative Quantification - Monocolor							
Group 1 Summary							
Target	Reference	Pairing	Results	BT176 RELATİF KUANTİFİKASYON 17.05.2007			
Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...
Result Set 1	Reference Calibrator	2	PCR	20.40		0.05	35/0.87
	Target Unknown	5	MPMY16 AT	33.51	1.44E-3		
Result Set 2	Reference Unknown	6	MPMY16A R	23.87		0.05	35/0.87
	Target Unknown	7	MPMY16 AT	33.63	1.63E-3		
Result Set 3	Reference Unknown	8	MPMY16A R	24.18		0.03	35/0.87
	Target Unknown	9	MPMY16BT	33.89	1.09E-3		
Result Set 4	Reference Unknown	10	MPMY16A R	23.83		0.03	35/0.87
	Target Unknown	11	MPMY16BT	34.14	9.89E-4		
Result Set 5	Reference Unknown	12	MPMY16BR	23.93		0	35/0.87
	Target Unknown	13	MPMC4T		0		
Result Set 6	Reference Unknown	14	MPMC4T	28.24		0	35/0.87
	Target Unknown	15	MPMC4T		0		
Result Set 7	Reference Unknown	16	MPMC4R	28.44		95.30	35/0.87
	Target Unknown	17	MPMC4T	26.53	3.00		
Result Set 8	Reference Unknown	18	MPMC4R	28.47		0.26	35/0.87
	Target Unknown	19	MPMC4T	35.64	8.12E-3		
Result Set 9	Reference Unknown	20	MPMC4R	28.54		0	35/0.87
	Target Unknown	21	MPMC10t		0		
Result Set 10	Reference Unknown	22	MPMC10R	33.85		0	35/0.87
	Target Unknown	23	MPMC10t		0		
Result Set 11	Reference Unknown	24	MPMC10R	33.95		13.05	35/0.87
	Target Unknown	25	MPMC10t	34.12	0.41		
Result Set 12	Reference Unknown	26	MPMC10R	32.91		10.37	35/0.87
	Target Unknown	27	MPMC10t	34.19	0.33		
Result Set 13	Reference Unknown	28	MPMC10R	32.64		0	35/0.87
	Target Unknown	29	MPMY18T		0		
Result Set 14	Reference Unknown	30	MPMY18R	23.47		0	35/0.87
	Target Unknown	31	MPMY18T	32.63	2.17E-3		
	Reference Unknown	32	MPMY18R	23.62		0.07	35/0.87

Şekil .1 Bazı örneklerde Bt176 mısır (relatif) miktar analiz sonuçları-1

Relative Quantification - Monocolor							
Group 1 Summary							
Target	Reference	Pairing	Results	12.12.06 BT176 RELATİF KUANTİFİKASYON			
Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	
Result Set 1	Target Calibrator	1	pct	19.04	0.39	35.00	
	Reference Calibrator	2	pct	18.14			
	Target Unknown	5	mpmc4t	34.78	0.05	4.79	
Result Set 2	Reference Unknown	6	mpmc4r	30.31			
	Target Unknown	7	mpmc4t	40.00	2.12E-3	0.22	
Result Set 3	Reference Unknown	8	mpmc4r	30.78			
	Target Unknown	9	mpmc10t	34.28	0.09	8.91	
Result Set 4	Reference Unknown	10	mpmc10r	30.75			
	Target Unknown	11	mpmc10t	34.52	0.09	9.06	
Result Set 5	Reference Unknown	12	mpmc10r	31.01			
	Target Unknown	13	MPMG1T	34.44	0.06	5.94	
Result Set 6	Reference Unknown	14	MPMG1R	30.31			
	Target Unknown	15	MPMG1T	34.11	0.09	8.77	
Result Set 7	Reference Unknown	16	MPMG1R	30.57			
	Target Unknown	17	MPMG7T	33.69	0.07	7.18	
Result Set 8	Reference Unknown	18	MPMG7R	29.86			
	Target Unknown	19	MPMG7T	33.25	0.09	8.73	
Result Set 9	Reference Unknown	20	MPMG7R	29.72			
	Target Unknown	21	MPMY16T		0	0	
Result Set 10	Reference Unknown	22	MPMY16R	21.49			
	Target Unknown	23	%0.5 BT176T	26.88	4.37E-3	0.45	
	Reference Unknown	24	%0.5 BT176R	19.07			

Şekil .2 Bazı örneklerde Bt176 mısır (relatif) miktar analiz sonuçları

## EK.13 BAZI ÖRNEKLERDE BT176 MISIR (RELATİF) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI (Devam)

Relative Quantification - Monocolor							
18.05.2007 RELATİF KUANTİFİKASYON							
Group	Target	Reference	Pairing	Results			
Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...
	Target Calibrator	1	PC T	19.23	0.54	35.00	
	Reference Calibrator	2	PCR	18.80			
Result Set 1	Target Unknown	5	MPMC2T	35.48	0.34	25.13	35/0.87
	Reference Unknown	6	MPMC2R	33.95			
Result Set 2	Target Unknown	7	MPMC2T		0	0	35/0.87
	Reference Unknown	8	MPMC2R	34.78			
Result Set 3	Target Unknown	9	MPMC2T		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	10	MPMC2R				
Result Set 4	Target Unknown	11	MPMC2T	36.37	Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	12	MPMC2R				
Result Set 5	Target Unknown	13	MPMC4T		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	14	MPMC4R				
Result Set 6	Target Unknown	15	MPMC4T		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	16	MPMC4R				
Result Set 7	Target Unknown	17	MPMC4T		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	18	MPMC4R				
Result Set 8	Target Unknown	19	MPMC4T		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	20	MPMC4R				
Result Set 9	Target Unknown	21	MPMG1 AT		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	22	MPMG1 AR				
Result Set 10	Target Unknown	23	MPMG1 AT		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	24	MPMG1 AR				
Result Set 11	Target Unknown	25	MPMG1 BT		Invalid	Invalid	35/0.87
	Reference Unknown	26	MPMG1 BR				
Result Set 12	Target Unknown	27	MPMG1 BT		0	0	35/0.87
	Reference Unknown	28	MPMG1 BR	34.46			
Result Set 13	Target Unknown	29	%0.1 BT176 26.01.07 T	29.96	1.68E-3	0.12	35/0.87
	Reference Unknown	30	%0.1 BT176 26.01.07 R	20.64			
Result Set 14	Target Unknown	31	%0.1 BT176 26.01.07 T	30.00	1.02E-3	0.08	35/0.87

Şekil .3 Bazı örneklerde Bt176 mısır (relatif) miktar analiz sonuçları

LightCycler Software 4.0 - (2007.04.27 10:40:00) MP101 12453663 BT176							
27.04.2007 BT176 RELATİF KUANTİFİKASYON							
Group	Target	Reference	Pairing	Results			
Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...
	Target Calibrator	1	PC T	19.46	1.71	35.00	
	Reference Calibrator	2	PCR	20.73			
Result Set 1	Target Unknown	5	MPMUS AT	30.64	2.26E-3	0.05	35/0.87
	Reference Unknown	6	MPMUS A R	21.75			
Result Set 2	Target Unknown	7	MPMUS AT	30.62	2.21E-3	0.05	35/0.87
	Reference Unknown	8	MPMUS A R	21.70			
Result Set 3	Target Unknown	9	MPMUS AT	30.78	2.03E-3	0.05	35/0.87
	Reference Unknown	10	MPMUS A R	21.73			
Result Set 4	Target Unknown	11	MPMUS B T	30.80	2.37E-3	0.06	35/0.87
	Reference Unknown	12	MPMUS B R	21.98			
Result Set 5	Target Unknown	13	MPMUS B T	31.12	2.22E-3	0.05	35/0.87
	Reference Unknown	14	MPMUS B R	22.19			
Result Set 6	Target Unknown	15	MPMUS B T	31.07	2.34E-3	0.06	35/0.87
	Reference Unknown	16	MPMUS B R	22.22			
Result Set 7	Target Unknown	17	MPMU11 A T	33.96	4.23E-4	8.98E-3	35/0.87
	Reference Unknown	18	MPMU11 AR	22.48			
Result Set 8	Target Unknown	19	MPMU11 A T	33.76	4.90E-4	0.01	35/0.87
	Reference Unknown	20	MPMU11 AR	22.51			
Result Set 9	Target Unknown	21	MPMU11 A T	33.43	6.10E-4	0.01	35/0.87
	Reference Unknown	22	MPMU11 AR	22.52			
Result Set 10	Target Unknown	23	MPMU11 B T	33.47	6.41E-4	0.02	35/0.87
	Reference Unknown	24	MPMU11 BR	22.64			
Result Set 11	Target Unknown	25	MPMU11 B T	33.74	5.51E-4	0.01	35/0.87
	Reference Unknown	26	MPMU11 BR	22.68			
Result Set 12	Target Unknown	27	MPMU11 B T	33.76	5.54E-4	0.01	35/0.87
	Reference Unknown	28	MPMU11 BR	22.68			
Result Set 13	Target Unknown	29	MPMUS T		0	0	35/0.87
	Reference Unknown	30	MPMUS R	22.24			
Result Set 14	Target Unknown	31	MPMUS T	34.64	2.58E-4	6.09E-3	35/0.87

Şekil .4 Bazı örneklerde Bt176 mısır (relatif) miktar analiz sonuçları

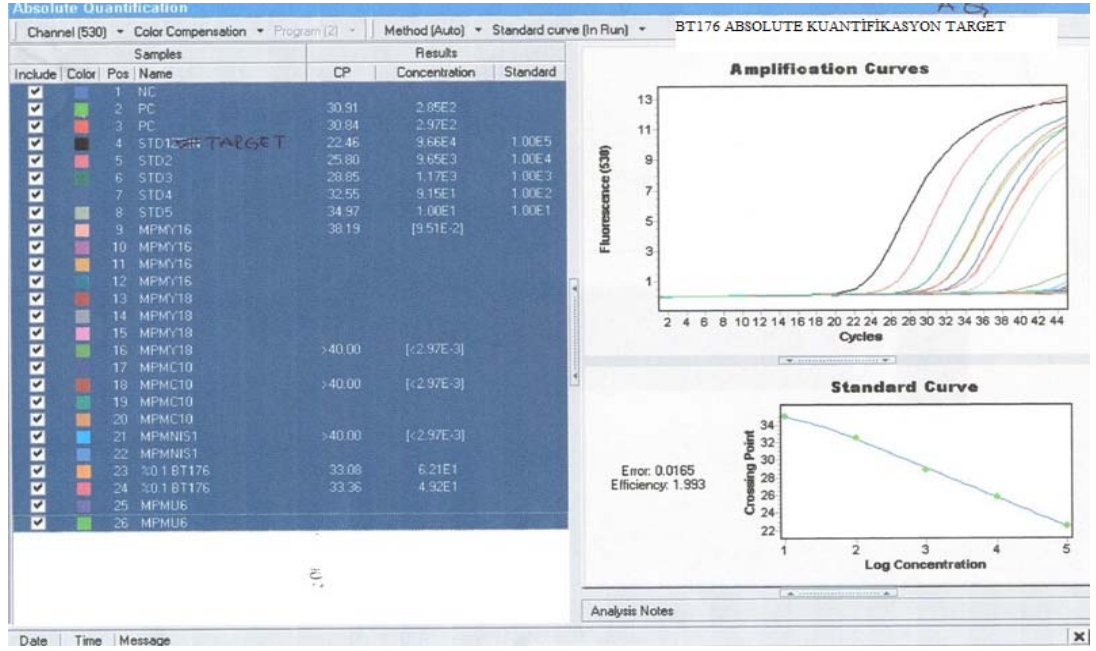


### EK.13 BAZI ÖRNEKLERDE BT176 MISIR (RELATİF) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI (Devam)

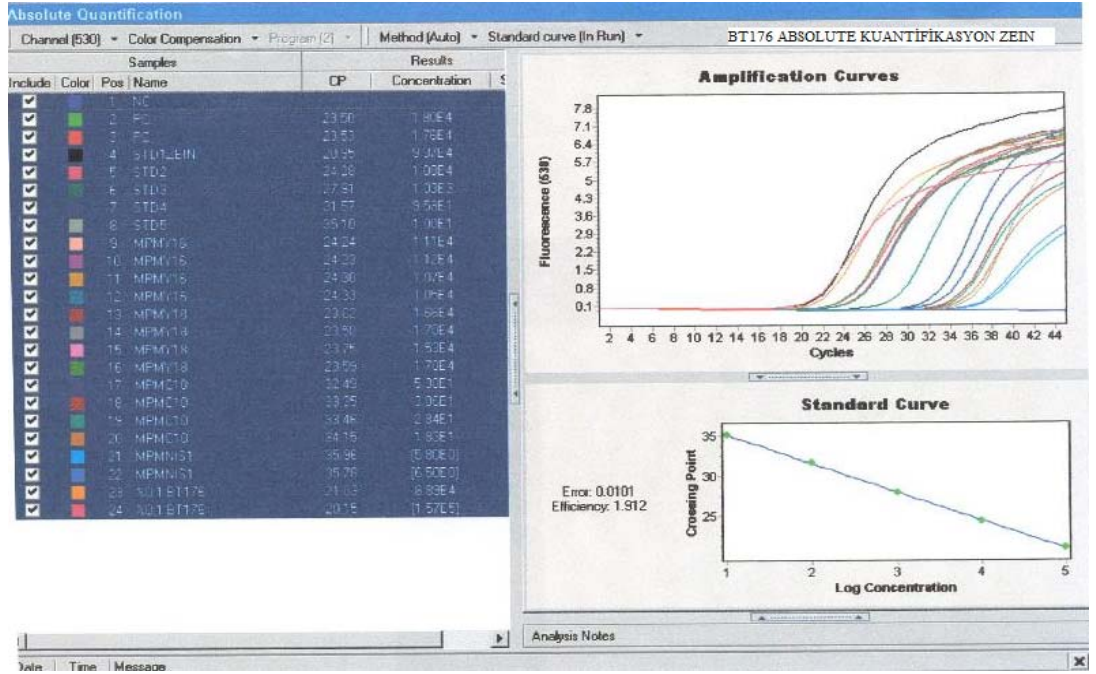
Relative Quantification - Monocolor								
Group 1		Summary						27.04.07 BT176 RELATİF KUANTİFİKASYON
Target	Reference	Pairing	Results					
Group ▾								
Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...	
	Target Calibrator	1	PC T	19.03	1.69	35.00		
	Reference Calibrator	2	PCR	20.30				
Result Set 1	Target Unknown	5	MPMG1 AT	35.61	Invalid	Invalid	35/0.87	
	Reference Unknown	6	MPMG1 AR					
Result Set 2	Target Unknown	7	MPMG1 AT	36.39	0.39	9.08	35/0.87	
	Reference Unknown	8	MPMG1 AR	35.01				
Result Set 3	Target Unknown	9	MPMG1 BT	37.35	0.24	5.76	35/0.87	
	Reference Unknown	10	MPMG1 BR	35.27				
Result Set 4	Target Unknown	11	MPMG1 BT		0	0	35/0.87	
	Reference Unknown	12	MPMG1 BR	35.56				
Result Set 5	Target Unknown	13	MPMC2T		0	0	35/0.87	
	Reference Unknown	14	MPMC2R	34.28				
Result Set 6	Target Unknown	15	MPMC2T	37.94	0.08	1.95	35/0.87	
	Reference Unknown	16	MPMC2R	34.23				
Result Set 7	Target Unknown	17	MPMG5T		0	0	35/0.87	
	Reference Unknown	18	MPMG5R	34.24				
Result Set 8	Target Unknown	19	MPMG5 A T		0	0	35/0.87	
	Reference Unknown	20	MPMG5 AR	35.96				
Result Set 9	Target Unknown	21	MPMG5 BT	34.85	Invalid	Invalid	35/0.87	
	Reference Unknown	22	MPMG5 BR					
Result Set 10	Target Unknown	23	MPMG5 BT		Invalid	Invalid	35/0.87	
	Reference Unknown	24	MPMG5 BR					
Result Set 11	Target Unknown	25	MPMG7 AT	36.62	Invalid	Invalid	35/0.87	
	Reference Unknown	26	MPMG7 AR					
Result Set 12	Target Unknown	27	MPMG7 AT	36.24	0.41	9.68	35/0.87	
	Reference Unknown	28	MPMG7 AR	34.97				
Result Set 13	Target Unknown	29	MPMG7 BT	34.67	0.43	10.32	35/0.87	
	Reference Unknown	30	MPMG7 B R	33.52				
Result Set 14	Target Unknown	31	MPMG7 BT	33.90	0.43	10.30	35/0.87	

Şekil .5 Bazı örneklerde Bt176 mısır (relatif) miktar analiz sonuçları

## EK.14 BAZI ÖRNEKLERDE BT 176 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI

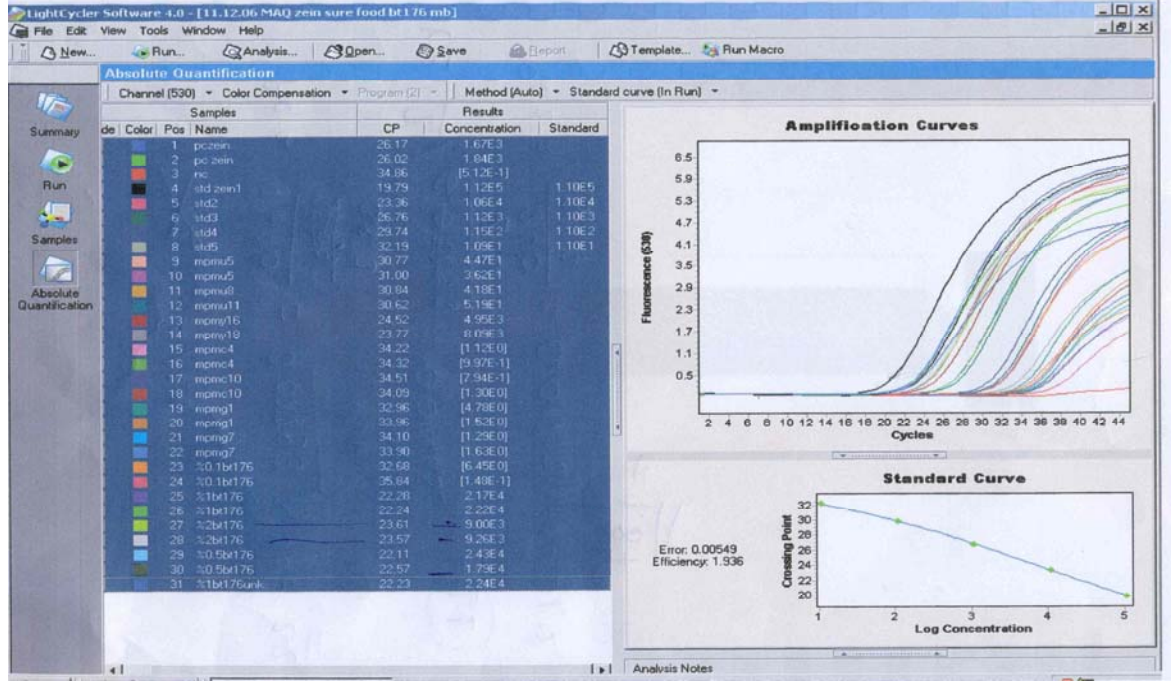


Şekil .1 Bt176 absolute miktar analiz sonuçları- cry geni

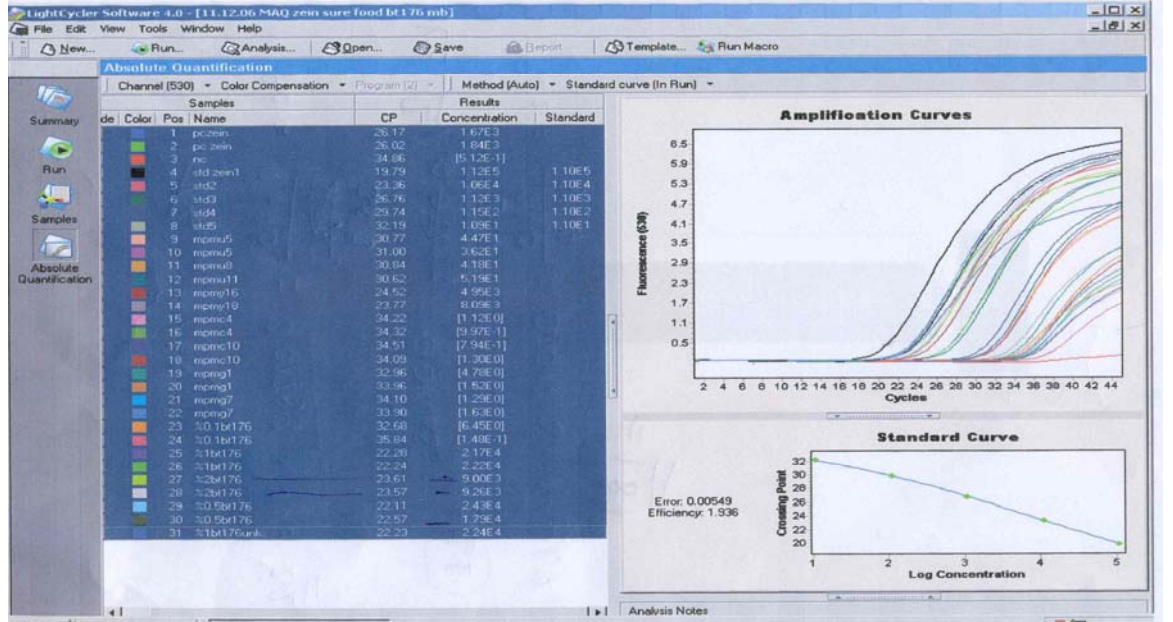


Şekil .2 Bt176 absolute miktar analiz sonuçları- zein geni

## EK.14 BAZI ÖRNEKLERDE BT 176 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI (Devam)



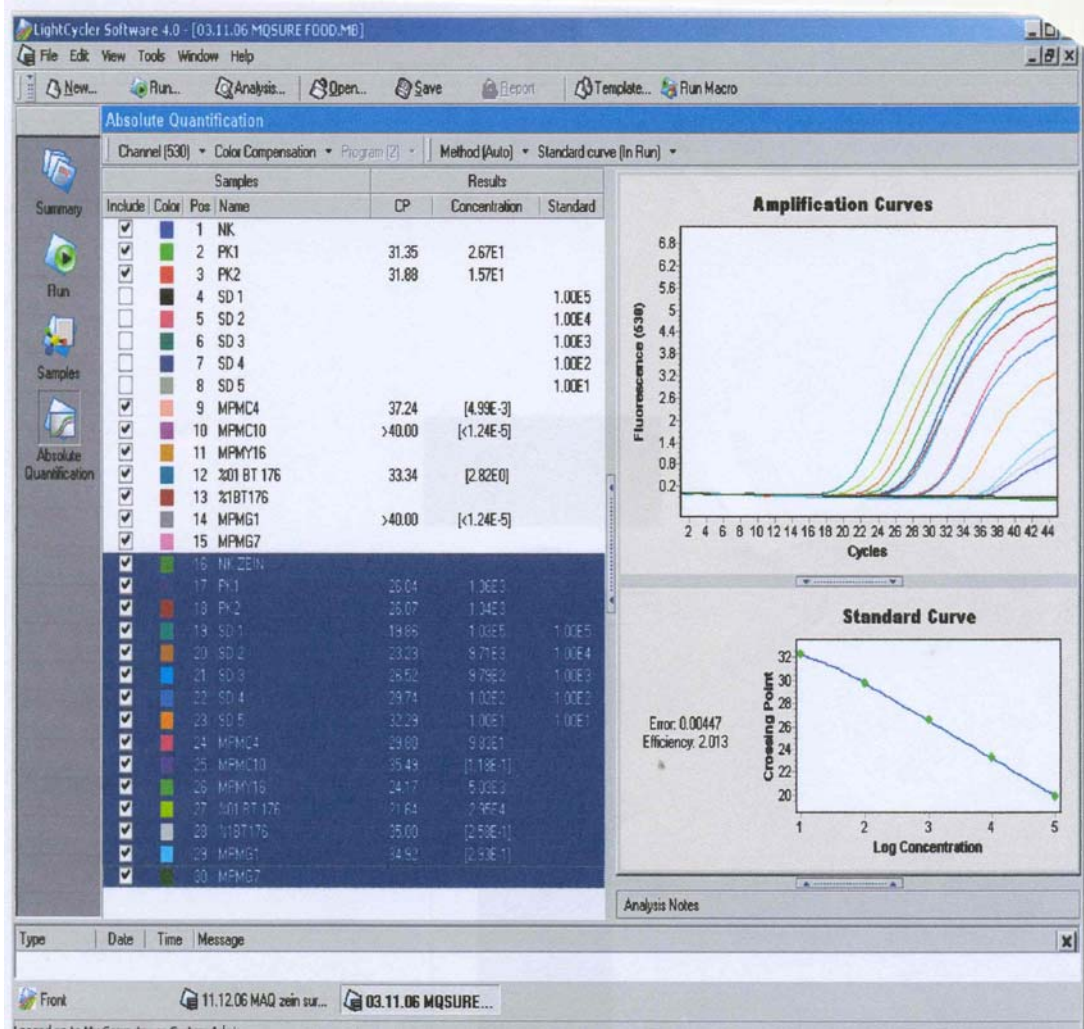
Şekil .3 Bt176 absolute miktar analiz sonuçları- cry geni



Şekil .4 Bt 176 absolute miktar analiz sonuçları- zein geni

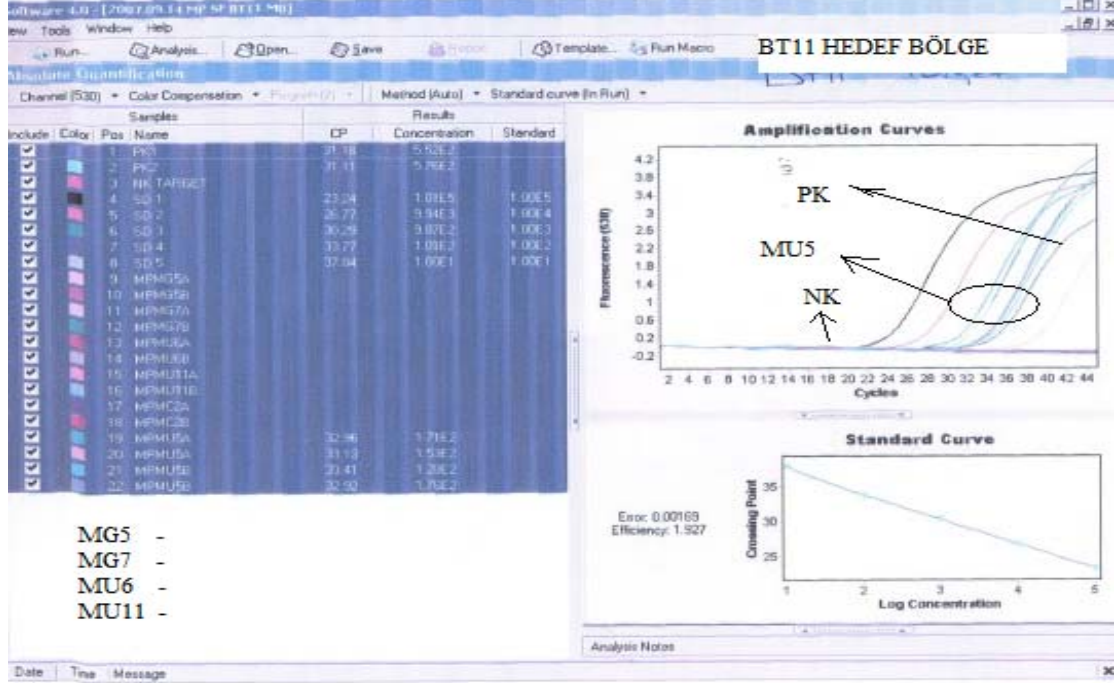


## EK.14 BAZI ÖRNEKLERDE BT 176 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI (Devam)

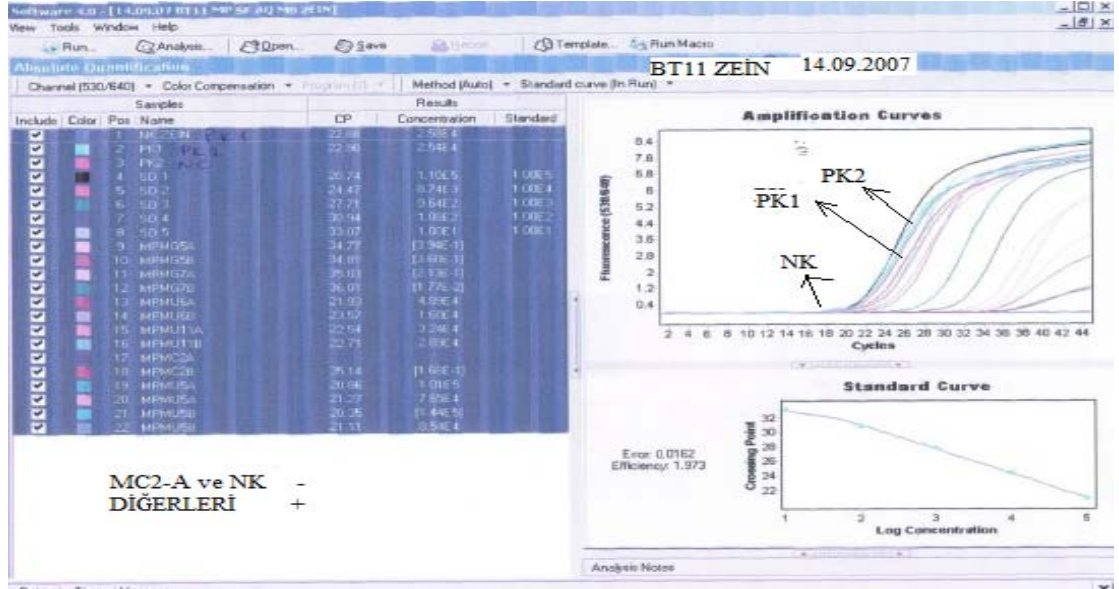


Şekil .5 Bt 176 absolute miktar analiz sonuçları- zein geni

## EK.15 BAZI ÖRNEKLERDE BT11 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI



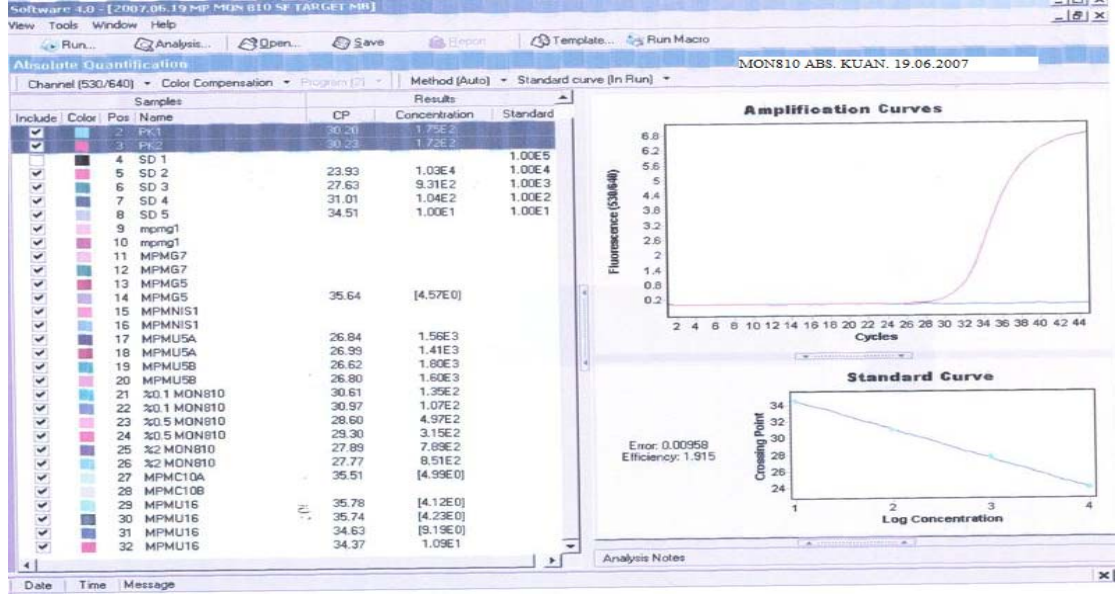
Şekil .1 Bt11 miktar analiz sonuçları- ivs geni



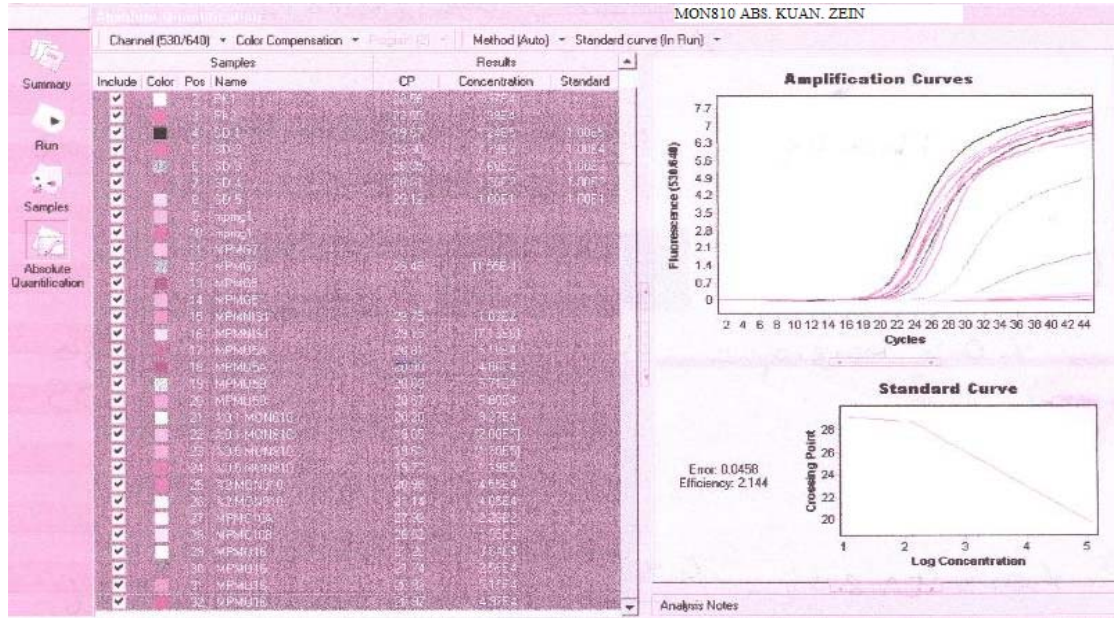
Şekil .2 Bt11 miktar analiz sonuçları- zein geni



## EK.16 BAZI ÖRNEKLERDE MON810 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI

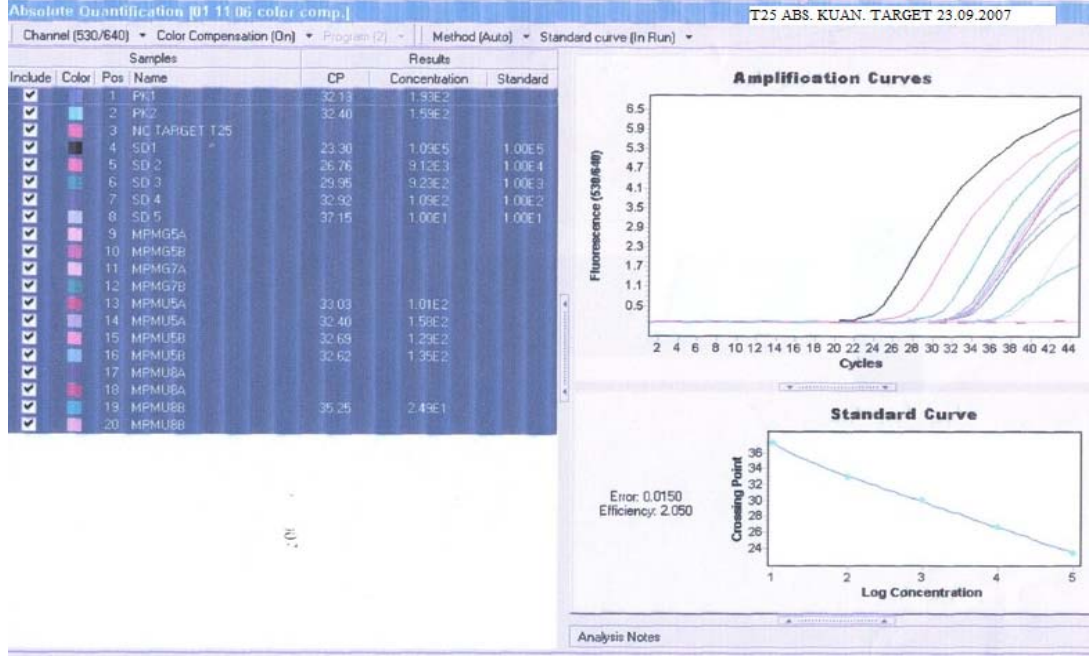


Şekil .1 Mon810 miktar analiz sonuçları- hsp geni

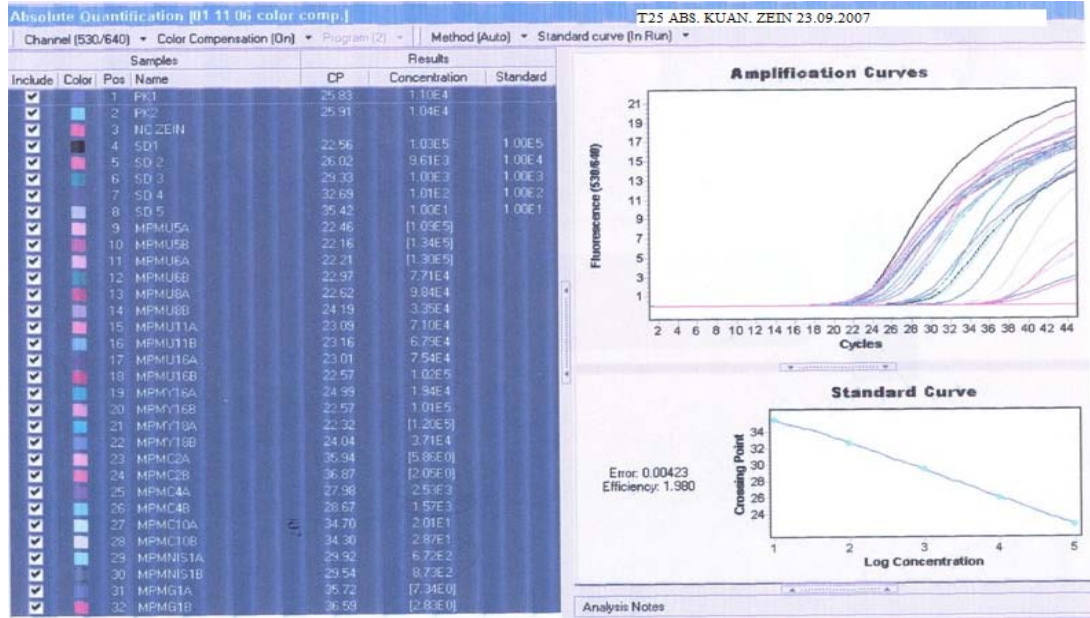


Şekil .2 Mon810 miktar analiz sonuçları- zein geni

## EK.17 BAZI ÖRNEKLERDE T25 MISIR (ABSOLUTE) MİKTAR ANALİZ SONUÇLARI



Şekil .1 T25 miktar analiz sonuçları- glu geni



Şekil .2 T25 miktar analiz sonuçları- zein geni

## EK.18 ÜLKEMİZDEKİ TRANSGENİK BİTKİLERİN ALAN DENEMELERİ

### P.1 Ülkemizdeki transgenik bitkilerin alan denemeleri

Transgenik Bitki Türü	Transgenik Bitki Çeşidi	Denemenin yürütüldüğü il
<b>PAMUK</b>  1998-2000  Tarla denemeleri yapıldı, Halen laboratuvar çalışmaları devam ediyor	Herbisite dayanıklı DP 5690 RR	<b>AYDIN</b>
	Herbisite ve yeşil kurt ( <i>Heliothis armigera</i> spp.) ile pembe kurta ( <i>Pectinophora gossypiella</i> ) dayanıklı DP 20 B/RR	<b>DİYARBAKIR</b>  (Başvuru firma sahibi tarafından geri çekilmiştir)
	Herbisite ve Yeşil Kurt ( <i>Heliothis armigera</i> spp.) ile pembe kurta ( <i>Pectinophora gossypiella</i> ) dayanıklı <b>DP 410 B</b>	<b>ADANA</b>
<b>MISIR</b>  1998-2000  Tarla denemeleri Yapıldı,  Halen laboratuvar çalışmaları devam ediyor	Mısır koçan kurdu ( <i>Sesamia nanogrioides</i> Lef.) ve mısır kurdu ( <i>Ostrinia nubilalis</i> Hübn.)' na dayanıklı <b>DK 626 Bt, RX 770 Bt, P.33A14Bt. B.33V08Bt, Mon 810</b>	<b>ADANA</b>
<b>MISIR</b>  2004 yılında tarla denemelerine başlandı	Mısır koçan kurdu ( <i>Sesamia nanogrioides</i> Lef.) ve mısır kurdu ( <i>Ostrinia nubilalis</i> Hübn.)' na dayanıklı  <b>Mon 810</b>	<b>Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Adana Zirai Mücadele Araş. Ens.</b>
<b>PATATES</b>	Patates böceği ( <i>Leptinotarsa decemlineate</i> SAY.)' ne dayanıklı <b>New Leaf Russet Burbank</b>	<b>Niğde Patates Araştırma Ens., Ankara Zirai Müc. Araş. Ens.</b> (Başvuru sahibi firma tarafından geri çekilmiştir)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Melike BARAN EKİNCİ

Doğum Yeri : Kulu/KONYA

Doğum Tarihi : 30.06.1978

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Kulu Lisesi (1992-1994)

Lisans :Selçuk üniversitesi (1994-1998)

Yüksek Lisans :Süleyman Demirel Üniversitesi (1998-2002)

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Gül, Dereli ve Yayla Ekmek Fırınları-İSPARTA (1999)

Süleyman Demirel Üniversitesi (1999-2002)

Tarım İl Müdürlüğü-SAKARYA ( 2002)

İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü-ANKARA 2002 -

### Yayımları

#### 1.Uluslararası Dergilerde (SCI) Makaleleri

**Baran, M.,** Yılmaz, R., 2008. Guest Editorial. The biosafety policy on genetically modified organisms in Turkey. Environ. Biosafety Res. 7. 57-59.

#### 2.Ulusal hakemli dergilerde makaleleri

**Baran, M.,** Özçelik, F., 2008. Halkın Farkındalığı, Eğitimi ve Katılımının Biyogüvenlik Unsurlarına Etkisi ve Türkiye’ de Yapılan Çalışmalar. Akademik Gıda. 6 (3), 37-42.

### 3.Ulusal hakemsiz dergilerde makaleleri

**Baran, M.** 2008. Biyogüvenlik ve Türkiye’ de Uygulanabilme Düzeyi. Tütev Teknik. 7 (15 Eylül 2008). 38-46.

**Baran, M.**, 2003. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik. Türktarım, Mart-Nisan . 12-15.

Baran, M. 2004. Japonya. Tütev Teknik. 32-39.

### 4. Bildirileri

#### Sözlü

**Baran, M.**, Özçelik,F., 2007. GDO’larda İzleme (Monitoring) ve Etiketleme. *Türkiye 15. Biyoteknoloji Kongresi* Bildiri Kitabı, 169-171. 28-31 Ekim 2007, Antalya. (Tam metin).

#### Poster

**Baran, M.**, Özçelik, F., 2006. Biyogüvenlik ve Türkiye’ de Uygulanabilme Düzeyi. *Türkiye 9. Gıda Kongresi* Bildiriler Kitabı, Sayfa 849-850. Poster Bildiri, 24-26 Mayıs 2006, Bolu. (Özet).

**Baran, M.**, Karahan, A. G. 2005. Alpha-amylase enzyme production and purification from Myxobacteria. *1.International Food and Nutrition Congress* Bildiriler Kitabı. Tubitak Marmara Research Centre. Food Science and Technology Research Institute. 15-18 Haziran. İstanbul (Özet).