



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



Yüksek Lisans Tezi

**GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ SOYA ÜRÜNLERİNDE GERÇEK
ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU BELİRLEME
METODLARININ VALİDASYONU**

Barbaros MÜLAYİM

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

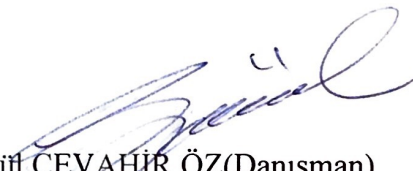
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ**

Haziran, 2019

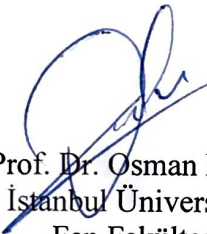
İSTANBUL

Bu çalışma, 12.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

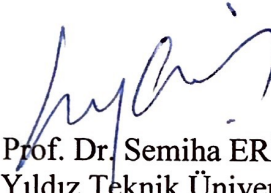
Tez Jürisi



Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Osman EROL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 24369 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca verdiği destek ve yardımlardan ötürü danışman hocam sn. Prof. Dr. Gül Cevahir ÖZ'e,

Laboratuvar çalışmalarım için uygun ortamın oluşturulmasını sağlayan ve deneysel çalışmalarımı yürütmemde yardımlarını esirgemeyen Uzm. Hande MORGİL'e,

Tez yazım sürecimdeki desteklerinden ötürü laboratuvar çalışma arkadaşlarım Uzm. Yusuf Can GERÇEK, Arş. Gör. Kadir BOZTAŞ, Kayhan DEREÇİK'e,

Tez yazım sürecimde benimle birlikte emek veren ve yardımcı olan arkadaşım Nurdan CÖMERT'e,

Maddi manevi hep yanımda olan öğrencim ve kardeşim Berkay ŞENOL'a,

Hayatımın en önemli anlarını paylaştığım, bana olan desteğini her zaman hissettiğim sevgili Büşra MİRZA'ya,

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen sevgili annem Münevver MÜLAYİM ve babam Halit MÜLAYİM'e sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2019

Barbaros MÜLAYİM

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1 SOYA BİTKİSİ (<i>GLYCINE MAX</i> L. MERR.) GENEL ÖZELLİKLERİ.....	5
2.1.1 Taksonomik Özellikleri	6
2.1.2 Dünyada ve Türkiye’de Ekimi	7
2.2 BİYOTEKNOLOJİ.....	9
2.2.1 Bitki Islahı.....	9
2.2.2 Tarımsal Biyoteknoloji ve Modern Biyoteknolojiye Geçiş Basamakları.....	11
2.2.3 Genetik Rekombinasyon.....	12
2.3 GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR	13
2.3.1 Tarihçesi.....	15
2.3.2 Potansiyel Yararları	17
2.3.3 Potansiyel Riskleri.....	18
2.3.4 Hukuksal Boyutu.....	20
2.3.5 Dünyada ve Türkiye’de Mevcut Durumu	22
2.4 ANALİZ YÖNTEMLERİ	24
3. MALZEME VE YÖNTEM	27
3.1 SERTİFİKALI REFERANS MATERYALLER.....	27
3.2 DNA İZOLASYONU	28
3.3 DNA SAFLIK VE MİKTARININ BELİRLENMESİ	29
3.4 GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İLE GDO TARAMA ÇALIŞMALARININ YAPILMASI.....	30
4. BULGULAR	34

4.1 DNA İZOLASYON SONUÇLARI.....	34
4.2 GERÇEK ZAMANLI PZR	34
4.2.3 MON87769 Değerlendirmesi.....	34
4.2.5 CV127 Değerlendirmesi	35
4.3 YÖNTEMLERİN LOD VALİDASYON SONUÇLARI	36
4.3.1 MON87769 Analiz Validasyon Parametreleri	37
4.3.2 CV127 Analiz Validasyon Parametreleri	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR.....	45
EKLER.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Glycine max</i> (sinonim <i>Delichos soja</i>) bitkisi illüstrasyonu (Jacquin, 1781)	5
Şekil 2.2: Yabani lahana bitkisinin farklı özellikteki varyasyonlarının çiftleştirilmesi ile ortaya çıkan varyeteler (Ruffell, 2018)	10
Şekil 2.3: Biyoteknolojinin geçmişten günümüze basamakları (Parsley, 1990)	12
Şekil 2.4: Genetiği değiştirilmiş ürün etiketlemesine örnek (Center for Food Safety, 2019)	15
Şekil 2.5: Transgenik bitkilerin küresel ekim alanlarının ülke dağılımı (ISAAA, 2017)	23
Şekil 2.6: Biyoteknolojik ürün ekimi yapan ve ithal eden ülkelerin küresel dağılımı (ISAAA, 2017).....	24
Şekil 3.1: 260 nm dalga boyunda pik yapan bir nükleik asidin spektrofotometrik ölçüm grafiği (Desjardins ve Conklin, 2010).....	29
Şekil 3.2: Özgül sıcaklıklarda gerçekleşen gerçek zamanlı PZR erime eğrisi analizi.....	33
Şekil 4.1: MON87769 kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 4.2: CV127 kalibrasyon eğrisi	36
Şekil 5.1: Gümrük Laboratuvarları Avrupa Ağı (CLEN) haritası.....	40

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Türkiye’de onaylanan soya tiplerinin listesi (Özbağ, 2018)	21
Tablo 2.2: 1996-2017 yılları arasındaki biyoteknolojik bitkilerin küresel ekim alanları (ISAAA, 2017).....	22
Tablo 3.1: Validasyon yapılan tip belirleme metotları	27
Tablo 3.2: Kullanılan tiplerin sertifikalı referans materyalleri.....	28
Tablo 3.3: Tez çalışmasında kullanılan gerçek zamanlı PZR şeması.....	31
Tablo 3.4: Standart gerçek zamanlı PZR bileşenleri	32
Tablo 3.5: Gerçek Zamanlı PZR analizinin programlanması.....	32
Tablo 4.1: Sertifikalı referans materyal DNA’larına ait nanofotometre sonuçları.....	34
Tablo 4.2: MON87769 LOD değerlendirmesi	35
Tablo 4.3: CV127 LOD değerlendirmesi.....	36
Tablo 4.4: MON87769 tip belirleme metodunun validasyon parametreleri	37
Tablo 4.5: CV127 tip belirleme metodunun validasyon parametreleri.....	37
Tablo 5.1: Ticaret Bakanlığının İthalatta Denetimini Gerçekleştirdiği Ürün Grupları	42

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

gr	: Gram
ml	: Mililitre
°C	: Selsiyus (Santigrad)
µl	: Mikrolitre
mg/µl	: Miligram/mikrolitre
xg	: Santrifüj dönüş hızı birimi
nm	: Nanometre
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
ng/µl	: Nanogram/mikrolitre

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

35S	: Karnabahar mozaik virüsü promotörü
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMIS	: Tarım Piyasası Bilgi Sistemi
AOCS	: American Oil Chemists' Society
ASA	: American Soybean Association
CRL	: EU-RL GMFF
CRM	: Certificate Reference Metarial
Ct	: Eşik Döngüsü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Avrupa Komisyonu
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EU	: Avrupa Parlementsusu ve Konseyi
EU-RL GMFF	: European Union Reference Laboratory for GMO Food and Feed
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FMV	: Figwort (Scrophularia) mozaik virüsü promotörü
gDNA	: Genomik DNA
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma

ISAAA	: International Service for the Aquisition of Agri-Biotech Applications
Le1	: Lectin geni
M.Ö.	: Milattan önce
M.S.	: Milattan sonra
NG	: Nontransgenik (Transgenik olmayan DNA)
NOS	: Agrobacterium tumefaciens bakterisinden elde edilen terminatör
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü
pDNA	: Plazmid DNA
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rDNA	: Rekombinant DNA
Rt- PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SRM	: Sertifikalı referans materyal
TAMRA	: Tetrametilrodamin
TG	: Transgenik DNA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
yy	: Yüzyıl

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ SOYA ÜRÜNLERİNDE GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU BELİRLEME METODLARININ VALİDASYONU

Barbaros MÜLAYİM

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Biyoteknolojik gelişmelerin bitki ve hayvanlarda kullanılmaya başlanması Genetiği Değiştirilmiş Organizmaları (GDO) ortaya çıkarmıştır. Herbisit ve insektisitlerin kullanımının azaltılması, meyve ve sebzelerin raf ömrünün uzatılması, alerjik kimyasalların bitkilerden uzaklaştırılması ve besin içeriğinin zenginleştirilmesi amacıyla canlılara, özellikle bitkilere, genetik modifikasyon uygulanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi bu genetik modifikasyonun rastgele mutagenler yerine, spesifik gen sekanslarıyla hedef DNA'nın değiştirilmesine olanak sağlamaktadır. Soya fasulyesi, doyurucu olması ve ihtiva ettiği protein, yağ ve karbonhidratlar bakımından besleyici değerinin yüksek olması sayesinde dünyada çok geniş ekim alanlarına sahiptir. Bu sebeple, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen genetiği değiştirilmiş soya bitkileri göze çarpmaktadır. Soyanın tarlada daha az zarar görmesi, besleyici değerinin artırılması biyoteknoloji firmalarının hedefi haline gelmiştir. Tüketicileri, bu transgenik bitkilerin olası olumsuz etkilerinden korumak için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarları tarafından analiz protokolleri ortaya konulmuştur. Bu protokollerin güvenilir ve doğru sonuç verip vermediği laboratuvarlar arası çalışmalar ile tekrarlanmalı ve uygulanmalıdır. Bu tez çalışmada; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tip belirleme (event-spesifik) metodlarının validasyonu yapılmıştır. MON87769 ve CV127 tiplerinin Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından belirlenen protokolleri valide edilmiş ve doğrulanmıştır.

Haziran 2019, 71 sayfa.

Anahtar kelimeler: Soya, Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO), MON87769, CV127, Event-Spesifik



SUMMARY

M.Sc. THESIS

VALIDATION OF THE EVENT-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION DETECTION METHODS ON GENETICALLY MODIFIED SOY PRODUCTS

Barbaros Mülayim

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gl CEVAHİR Z

The use of biotechnological developments in plants and animals has revealed Genetically Modified Organisms (GMOs). To reduce the use of herbicides and insecticides, prolong the shelf life of fruits and vegetables, remove allergic chemicals from plants and enrich the nutrient content, genetic modification is applied to living things, especially plants. Recombinant DNA technology allows this genetic modification to be replaced by specific gene sequences instead of random mutagens. Soya bean has a huge cultivation area in the world thanks to its satisfying and high nutritional value in terms of protein, fat, and carbohydrates it contains. Therefore, genetically modified soy plants produced by recombinant DNA technology are prominent. It has become the target of biotech firms to increase the nutritional value of soybean, less damage in the fight against pests and weeds. To protect consumers from the potential adverse effects of these transgenic plants, analysis protocols have been introduced by the European Union Reference Laboratories. Whether these protocols are reliable and accurate should be repeated and performed with inter-laboratory studies. In this thesis; event-specific real-time polymerase chain reaction methods have been validated. The protocols of MON87769 and CV127 types identified by the European Union Reference Laboratory have been verified and validated.

June 2019, 71 pages.

Keywords: Soybean, Genetically Modified Organism (GMO), MON87769, CV127, Event-specific



1. GİRİŞ

Dünyada en çok ekimi yapılan yağlı tohum bitkisi soya, baklagiller familyasına mensup tek yıllık bir bitkidir. Tarihsel olarak M. Ö. 1500-1000 yılları arasında bilinçli olarak ekimi yapılmaya başlanan soyanın anavatanının Çin olduğu bilinmektedir. İpek, baharat ve deniz ticaret yollarının etkisiyle M. S. İlk Çağ ve Orta Çağ'da soya fasulyesinin hızlı şekilde yayılması söz konusu olmuştur. 17.yy'dan itibaren Avrupalıların kullanmaya başladığı soya, Amerika kıtasına ancak 18.yy'da giriş yapmıştır. Soya, Amerika kıtasına diğer ülkelerden çok sonra ulaşmış olsa da Birleşik Devletler günümüzde en büyük soya üreticisi konumundadır (ASA, 2008). Ülkemizde ise ilk ekimleri Karadeniz bölgesinde 1930'larda başlayan soya bitkisi, 1980'li yıllara gelindiğinde Çukurova, Akdeniz ve Ege bölgelerinde büyük alanlara ekilmeye başlanmıştır (Köseoğlu, 2018).

Soya bitkisi, ihtiva ettiği yüksek protein, yağ ve karbonhidrat içeriği dolayısıyla dünya genelinde geniş bir yelpazede kendine kullanım alanı bulmaktadır. "Sarı Mücevher, Üreyen Altın" gibi isimlerle anılan soya bu sebeple, yağlı tohumlar arasında yadsınamaz bir öneme sahiptir (Köseoğlu, 2018). Soya, tofu (soya peyniri), süt, et ürünleri, sos, margarinler, yemek ve salata yağları gibi insan beslenmesinin temelini oluşturan bazı gıda maddelerinin üretiminde kullanılmaktadır. Özellikle vegan ve vejetaryen beslenmesinde kullanılabilen soya sütü, yoğurdu, soya fasulyesi yan ürünleri (tempeh vb.) hayvansal ürünlere alternatif olmayı başarmıştır. Soya unu ise, içerdiği yüksek miktarda proteinden dolayı hayvan yetiştiriciliğinde yem açısından en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Bunun yanında, kanatlı hayvan beslenmesinden organik balık yetiştiriciliğine kadar birçok alanda soya unundan yapılmış yemler tercih edilmektedir (Arıoğlu, 1999).

21.yy'da üçüncü dünya ülkeleri başta olmak üzere tüm toplumların ortak sorunu hızla büyüyen açlık problemidir. Açlıkla mücadelede protein, karbonhidrat ve yağ içeriği açısından yüksek oranlara sahip ürünlerin besin kaynağı olarak tercih edildiği bilinmektedir. Soya ve mısır başta olmak üzere, buğday, pirinç, kolza gibi besleyici değeri yüksek bitkilerin besin miktarının artırılması ve içeriğinin zenginleştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bu durumda, soya

bitkisi açlık sorunuyla mücadele için de dünya gündeminde kendine önemli bir yer bulmuştur (Kulaç ve diğ., 2006).

Soya fasulyesi, tohumunda yaklaşık %18 yağ, %40 protein ve %30 karbonhidrat ihtiva ettiği için buğday gibi sadece besleyici değeri yüksek doyurucu ürün olarak değil, aynı zamanda yağlı tohum olarak da değerlidir (Arioğlu, 2000). Bu sebeple, soya bitkisinin verimliliğinin artırılması ile gelecekte yaşanabilecek herhangi bir kıtlık sorununun da önüne geçilebilmesi mümkündür. Geçmişten günümüze devam eden bitki ıslah çalışmaları ile soya bitkisinden verimli soylar elde edilmeye çalışılmaktadır. Artan nüfusun doyurulması için yapılan tarım, günümüzde klasik ıslah çalışmalarıyla yeterli olmamaktadır. Bununla birlikte kentleşme sonucu tarım arazilerinin azalması, erozyon gibi sebepler de ortaya çıktıkça insanoğlu modern biyoteknolojiye yönelmiştir.

20.yy'ın sonlarından itibaren klasik ıslah çalışmaları mevcut şartlar düşünüldüğünde yetersiz kaldığından biyoteknolojik gelişmeler bitki ve hayvan ıslahında uygulanmaya başlanmıştır. Tarihte şarabın, yoğurdun ve ekmeğin yapılması ile başlayan biyoteknoloji, canlıları kullanarak yeni bir ürün üretmek anlamına gelir. Biyoteknoloji günümüzde DNA ve proteinlerin yeniden tasarlanmasına, suni insülin ve aşı üretilmesine olanak sağlamaktadır. Biyoteknolojik gelişmeler sayesinde, bitkilerin yetiştikleri ortamda maruz kaldıkları stres koşullarının etkilerini azaltmak için genetik yapılarına müdahale edilmektedir ve bu müdahale "GDO" terimini günlük hayatımızın bir parçası haline getirmiştir. Genetiği değiştirilmiş organizmalar anlamına gelen GDO, istenilen bir genin gen transfer yöntemleriyle hedef bitkiye eklenmesi ya da hedef bitkide istenmeyen bir gen ile değiştirilmesi ile oluşturulmuş canlılar olarak tanımlanabilir. Biyoteknolojik yöntemler ile gen transferi, özellikle bitkiler üzerinde yapılmaktadır. Bu canlılara "transgenik" de denmektedir (Mutlu, 2016). ISAAA (2019)'a göre GDO; modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen yeni bir genetik materyal kombinasyonuna sahip bir canlı olarak tanımlanmıştır.

Transgenik bitkiler, herbisit ve insektisit gibi zararlı organizmaları engellemek için kullanılan pestisitlerin kullanımının azaltılması, bitkilerden elde edilen meyve ve sebzelerin raf ömrünün uzatılması, bitkilerde bulunan alerjik bazı kimyasal maddelerin arındırılması ve besin içeriğinin zenginleştirilmesi gibi amaçlarla geliştirilmektedirler. Genetik modifikasyon sonucu

geliştirilen her bir GDO’lu ürüne tip, çeşit ya da “event” denir (James, 2007). 2019 yılı itibarıyla toplam 509 çeşit event bulunmaktadır. Bunların 42 tanesi soya bitkisi eventidir. Bunların 2’si abiyotik stres direnci, 1’i verim geliştirmesi, 33’ü herbisit direnci, 6’sı böcek direnci, 13’si ise modifiye ürün kalitesi eventidir. Bazı eventler birden fazla özelliğe sahip olabilmektedir (ISAAA, 2019).

GDO’lu ürünlere bu yönüyle baktığımızda doğal yollarla oluşan bitkilere göre çok daha kusursuz görünmektedirler. Ancak, bu yararlı olayların yanı sıra, potansiyel bazı zararları da beraberinde getirebilmektedir. Antibiyotiğe direnç genlerinin doğaya yayılması, bilinçsiz tüketimde oluşabilecek alerjik reaksiyonlar, doğal türlerdeki genetik çeşitliliğin kaybı ve doğal dengenin bozulması gibi ihtimaller genetiği değiştirilmiş organizmaların potansiyel riskleridir (Frewer ve diğ., 2003).

Transgenik organizmaların potansiyel tehlikelerine karşı Birleşmiş Milletlerin 17 Kasım 1995 tarihli konferansında alınan kararla biyolojik çeşitliliğin korunması ve modern biyoteknoloji kullanılarak değiştirilmiş canlı organizmalara karşı biyogüvenlik hakkında Cartagena Protokolü hazırlanarak imzalanmıştır. Ülkemizde de bu protokol kanunlaşarak 11 Ağustos 2003 tarihli Resmî Gazete’de yayımlanmıştır. GDO’lar ile ilgili Biyogüvenlik protokolümüz ise 18 Mart 2010 tarihinde kabul edilmiştir.

GDO ile ilgili biyogüvenlik protokolümüz, GDO ve ürünlerinin genetik değişiklikten dolayı, insan, hayvan ve bitki sağlığı, biyolojik çeşitlilik ve çevre üzerinde sebep olabileceği risklerin ve risk kaynağının belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu amaçla 21 Ekim 2010 tarihinde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (yeni ismiyle Tarım ve Orman Bakanlığı) tarama analiz sonucu negatif çıkan tüm gıda ve yem numunelerinde 35S, NOS, FMV içermeyen eventlerin de taranması gerektiği kararını almıştır.

Bu tez çalışmasında Tarım ve Orman Bakanlığının taranmasını istediği MON87769 ve CV127 soya tiplerinin analizi yapılmıştır. “Genel Kısımlar” bölümü soya bitkisinin önemi ve genetik değişiklik ile ilgili literatür incelemesi sonucu elde edilen bilgileri kapsamaktadır. “Malzeme ve Yöntem” kısmında ise araştırmada kullanılan soya DNA’sının izolasyonu, transgenlerin belirlenmesi ve DNA’nın seyreltilerek uygulanan metodun güvenilirliği detaylı bir şekilde

anlatılmıştır. “Bulgular” bölümünde yapılan analizlerin verileri tablo ve şekiller kullanılarak özetlenmiştir. “Tartışma ve Sonuç” kısmında da deney sonuçları diğer araştırmacıların verileriyle karşılaştırılıp yorumlanmıştır.

Bu tezin amacı İstanbul Üniversitesi Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyoteknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi’ne gönderilebilecek soya içeren herhangi bir ambalajlı gıda numunesinde GDO olup olmadığının kontrolünün yapılabilmesidir. Yapılan çalışmada teşhis limitinin (LOD – Limit of Detection) tespit edilebilmiştir. Soya içeren ambalajlı gıda numunesinde MON87769 ve CV127 soya eventleri için 5 gen kopya sayısına kadar GDO tayini yapılabilecektir. Bu tez çalışması ambalajlı gıda analizlerinde tüketici güvenilirliğinin artmasını sağlayacaktır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1 SOYA BİTKİSİ (*Glycine max* L. MERR.) GENEL ÖZELLİKLERİ

Soya fasulyesi (Şekil 2.1), otuz beşten fazla ülkede ticari ürün olarak yetiştirilen yağlı tohum bitkilerinden biridir. Tohum üretiminin yanı sıra, gıda ve sanayide çok sayıda kullanım alanına sahiptir. Hayvansal yem kullanımının, ayrıca yemeklik bitkisel yağ ve proteinlerin ana kaynaklarındandır. Soya bitkisi margarin, yemeklik ve salatalık yağ, soya peyniri, soya sütü gibi çok çeşitli gıda ürünlerinde, soya unu hayvancılık için yem rasyonlarında, ayrıca maya ve antikor üretiminden sabun ve dezenfektan üretimine kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir (OECD, 2000).



Şekil 2.1: *Glycine max* (sinonim *Delichos soja*) bitkisi illüstrasyonu (Jacquin, 1781)

Soyanın kültüre alınması, Çin’de yaklaşık M. Ö. 1500 ile 1027 yılları arasında yaşamış olan Shang Hanedanlığı döneminde gerçekleşmiştir (Hymowitz, 1970). Bununla birlikte tarihsel kanıtlar soyanın ürün olarak kullanılmasını M. Ö. 1027 ile 221 yılları arasındaki Zhou Hanedanlığı dönemini işaret etmektedir. Birinci yüzyıldan itibaren ise Çin’in kuzeydoğu bölgesinden Kore yarımadasına, oradan da Çin’in orta ve güney kesimlerine ulaştığı bilinmektedir (Ho, 1969;Hymowitz, 1970).

Ekili soya bitkileri tek yıllık bitkilerdir ve sadece tohumla çoğalmaktadırlar. Olgun bir soya tohumunun dormansi özelliği yoktur (TeKrony ve diğ., 1987). Kış aylarında tarlada bırakılırsa don olayından ötürü hayatta kalma olasılığı bulunmamaktadır (Rapes ve diğ., 1987). Soya tohumu ender olarak dormansi özelliği gösterdiği takdirde (Mallory-Smith ve Zapiola, 2008), yeterli sıcaklık ve nem altında hızlı bir şekilde çimlenebilen, potansiyel olarak kendi kendine yetişebilen bir bitkidir (OECD, 2000).

2.1.1 Taksonomik Özellikleri

Kültürü yapılan soya fasulyesi, bilimsel literatürde *Glycine max* (L.) Merr. olarak adlandırılmaktadır. Leguminosae (Baklagiller) familyasında, Papilionoideae (günümüzde bu alt familya, ayrı bir familya taksonu olarak kabul edilmektedir.) alt familyasında, *Glycine* Willd. cinsine ait bir bitkidir. 1,5 metre yüksekliğe ulaşabilen, dik, gür otsu bir bitki olan soya fasulyesi $2n=40$ kromozomludur. Soya fasulyesi çeşitlerinin hiçbirisi dona karşı dayanıklı değildir ve soğuk kış koşullarında hayatta kalamazlar. (Bernard, 1973). Soya fasulyesinin primer yaprakları unifoliat, opposit ve ovat olup, sekonder yaprakları trifoliat ve alternattır. Çeşitlerinin çoğunun üstü ince trikomlarla kaplıdır (OECD, 2000).

Soya fasulyesi, Kuzey ve Orta Çin’e özgü en eski ekili ürünlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bitkinin ilk kaydı, Çin’in çeşitli bitkilerinin tanımlandığı, M. Ö. 2838 yılında imparator Sheng Nung tarafından yazılan bir kitapta bulunmaktadır. Tarihi ve coğrafi kanıtlar, soya fasulyesinin ilk olarak Çin’in doğusunda, M. Ö. 17. ve 11. Yüzyılları arasında kültüre alındığını göstermektedir (Hymowitz, 1970). Amerika Birleşik Devletleri ise soya fasulyesiyle ilk olarak 1765 yılında tanışsa da, günümüzde en büyük üreticisi konumundadır (Hymowitz ve Harlan, 1983).

1712 yılında Japonya’da yaşamış olan Alman botanikçi Engelbert Keampfer, soya fasulyesini Avrupa’ya götürerek tanıtmıştır. 1877 yılında ise Avusturyalı araştırmacı Frederik Haberlandt

Çin ve Japonya'dan temin ettiği 19 çeşit soya fasulyesini ülkesinde yetiştirmiş ve bunlardan oluşturduğu 4 tohumu hasat ederek 1893 yılında Avrupa'ya dağıtmıştır. Ancak, Avrupa iklimi soya bitkisinin yetişmesi için gereken şartlara uygun olmadığından dolayı tarlada üretimi geniş olarak yapılamamıştır (Smith ve Huyser, 1987).

2.1.2 Dünyada ve Türkiye'de Ekimi

Avrupalılar tarafından 16.yy sonlarından başlayarak kullanılmaya başlanan soya bitkisi ve soya sosu doğudan batıya ticaretin ortak bir noktasıdır. Yeni Dünya'ya yapılan göçlerle birlikte 18.yy'da Amerika kıtasına giriş yapan soya fasulyesi ilk olarak 1851'de Illinois'de ve ardından Mısır Kuşağı (Corn Belt) boyunca tanıtılmıştır. Soya tohumları, 1853 yılında New York ve Massachusetts'ten çiftçilere gönderilmiş ve konvansiyonel ıslah programı yoluyla geniş çapta ekilmesi ve geliştirilmesi sağlanmıştır (Hymowitz ve Singh, 1987).

Dünya nüfusu 7,632,819,325'tir ve her geçen dakika artmaktadır (Worldometers, 2019). Artan kentleşme ekilebilir tarım arazilerini kısıtlamaktadır. Bu durum göz önüne alındığında, toplam ekim alanının önümüzdeki on yılda önemli ölçüde değişmesi beklenmektedir ve mahsul üretimindeki büyümenin sürdürülmesi için verimlilik artışının esas alınması gerekecektir. Bununla birlikte, alan tahsisinde ve verimlerdeki değişiklikler mahsul ve bölgelere göre değişiklik gösterecektir. Günümüzde, dünya üzerindeki ekim alanlarının yaklaşık yarısı tahıl ve yağlı tohumlara ayrılmıştır. Mısır ve diğer tahıllar için, üretim artışının çoğu, daha büyük arazi kullanımından değil (Latin Amerika'daki mısır hariç) daha yüksek verimden kaynaklanacaktır. Özellikle soya fasulyesi üretiminde arazi kullanımının daha büyük rol oynaması ön görülmektedir (OECD/FAO, 2018).

Günümüzde, Birleşik Devletler ve Brezilya küresel soyanın en büyük üreticileridir. Brezilya, mısır hasadının sonrasında aynı alanda ikinci ürün olarak soya fasulyesi elde ettiğinden, yıllık üretim miktarını korumaya devam edecektir. Ayrıca, bu gelişmeler bölgesel süt üretimi, yüksek proteinli gıda ve bitkisel yağ tedarikine girdi sağlayacaktır. Bu bağlamda, önümüzdeki 10 yıl için Kolombiya'nın hurma yağı (palm oil) yetiştiriciliği için ekim alanlarını genişletmesi beklenirken, Paraguay Brezilya'daki gelişimleri izleyerek soya fasulyesi üretimine ayrılmış ekim alanlarını genişleterek yağlı tohum üretimini artıracaktır. Küresel yağlı tohum üretiminin, son 10 yılın büyüme hızının çok altında kalarak yaklaşık %1,5 oranında artması beklenmektedir. Brezilya ve ABD'nin, yakın gelecekte benzer hacimlerde olmak üzere yine en

büyük soya üreticisi konumunda olması beklenmektedir. Soya fasulyesi, diğer yağlı tohumlar ve proteince zengin un ihracatında da Amerika kıtası ülkelerinin hâkim olmaya devam edeceği ön görülmektedir (OECD/FAO, 2018).

Çin, beslenme alışkanlıklarında çok önemli bir yere sahip olan soya fasulyesinin dünya üzerindeki ithalatının %63'ünü gerçekleştirmektedir. Bununla beraber, ABD ve Brezilya küresel soya ticaretinde Çin'e yüksek miktarlarda soya fasulyesi ihraç etmektedir. Çin, bu konumuyla ABD'nin en büyük ticaret ortağı durumundadır. 2017 yılında ABD'nin yapmış olduğu yaklaşık 20 milyar Amerikan doları bulan tarımsal ürün ihracatının 13 milyar dolarlık bölümünü soya fasulyesi oluşturmaktadır. Bu soya ihracatının yaklaşık %60'ı da Çin'e yapılmaktadır. Çin ise, 13 milyon ton soya üretmesine karşın 96 milyon ton soya ithal etmiştir (OECD/FAO, 2018).

Soya fasulyesi, Türkiye pazarına Birinci Dünya Savaşı yıllarında giriş yapmış ve tarımına ilk defa 1940 yılında Karadeniz Bölgesinde başlanmıştır. 1957 yılında Sümerbank Ordu'da bir soya yağ fabrikası kurmuştur. Ancak, ilerleyen yıllarda üretimi yapılan diğer tarla bitkileri ile mücadele edemez hale gelen soyanın üretimi giderek azalmıştır. Çukurova bölgesinde, pamuk bitkisine alternatif olarak yetiştirilmeye başlanan soya fasulyesi, daha sonraki yıllarda ana ürün olarak buğday ekilen tarlalarda ikinci ürün olarak yetiştirilmeye devam etmiştir (Arioğlu, 2007).

Türkiye'de toplam soya üretimi 2016/2017 yılında 164 bin ton, 2017/2018 yılında ise 139 bin tondur. 2018/2019 yılında da 140 bin ton olması beklenmektedir. Türkiye'de toplam soya tüketimi 2016/2017 yılında 2,453 milyon ton, 2017/2018 yılında ise 2,183 milyon tondur. Bu istatistiklerden yola çıkılacak olursa, Türkiye'de tüketilen soya bitkisi miktarı, üretiminin yaklaşık 15 katı kadardır. Dünyaya baktığımızda ise 2016/2017 yılında toplam soya üretimi 351,211 milyon ton, 2017/2018 yılında ise 341,532 milyon tondur. Dünyadaki soya tüketimi de 2016/2017 yılında 340,674 milyon ton, 2017/2018 yılında 349,668 milyon tondur. Bununla birlikte, ülkemizde ilk ihracatı 2012/2013 yılında yapılan soya bitkisinin 2017/2018 yılında üretilen 0,140 milyon tonluk kısmının 0,100 milyon ton kadarı ihraç edilmiştir (AMIS, 2019).

Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre; soya fasulyesinin ekim alanı 2016 yılında 381.804 dekar, 2017 yılında 316.695 dekar, 2018 yılında ise 328.483 dekardır. Soya fasulyesi ekili bu

alanlardan üretilen miktarı ise 2016 yılında 165 bin ton, 2017 ve 2018 yıllarında 140 bin ton olarak rapor edilmiştir (TÜİK, 2019).

2.2 BİYOTEKNOLOJİ

Biyoteknoloji, canlı organizmaları doğrudan veya bir parçalarını kullanarak, yeni ürünler yapmak, ürünleri değiştirmek, bitkileri ve hayvanları ya da spesifik kullanım için mikroorganizmaları geliştirmek amacıyla kullanılan tekniklerin genel adıdır. Biyoteknoloji, beşeri bilimlerden ayrı bir bilim dalı olarak düşünülmemelidir. Kimya mühendisliği, bilgi teknolojileri, robotik gibi uygulamalı bilimlerle bir araya gelerek üretken süreçlere dönüştürülen genetik ve moleküler biyolojinin oluşturduğu multidisipliner bir alandır. (Doyle ve Persley, 1996).

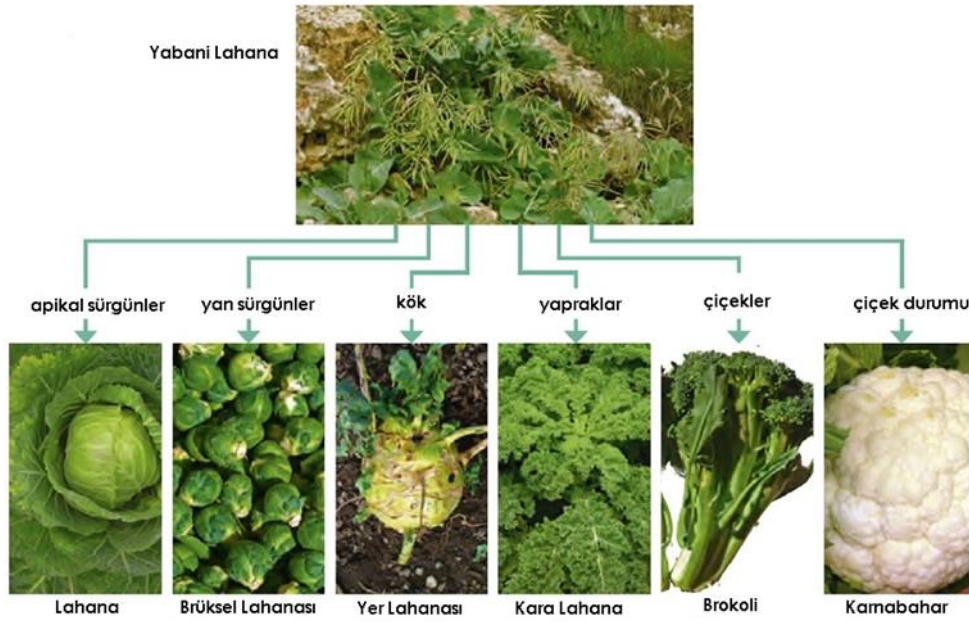
Bu alan, birkaç yüzyıldır kullanılan geleneksel biyoteknoloji yöntemlerinden, örneğin gıda fermentasyonu, modern biyoteknolojiye kadar uzanan bir gelişme sürecine sahiptir. Günümüzde biyoteknoloji, genetik mühendisliği olarak adlandırılan rekombinant DNA teknolojisi, CRISPR-Cas9 sistemi, monoklonal antikolar, yeni hücre ve doku kültürü yöntemlerinin kullanımını içerir (Global Knowledge Center on Crop Biotechnology, 2017; Doyle ve Persley, 1996).

Tarihsel gelişime bakıldığında biyoteknoloji, geleneksel ve modern olmak üzere iki kategoriye ayrılmıştır. Geleneksel biyoteknoloji, genellikle bakteri, maya ve mantar kullanılarak herhangi bir modifikasyon olmadan ekmek, peynir, alkol, sirke ve yoğurt gibi ürünlerin üretimini kapsamaktadır. Buna “Fermentasyon Teknolojisi” de denilmektedir. Modern biyoteknoloji ise, rekombinant DNA teknolojileri ve mutagenез kullanarak insan kanı proteinleri, hormon, insülin ve biyoteknolojik aşılarda elde edilmesini sağlamaktadır (Gartland ve diğ., 2015).

2.2.1 Bitki Islahı

Genel olarak bitki ıslahı, bitki özelliklerini, yapılarını ve kompozisyonlarını insanlara daha faydalı olacak şekilde manipüle etmek demektir. Bitkilerde yapılan bu değişiklikler kalıcı ve kalıtsaldır. Modern toplumlarda “bitki ıslahı” terimi daha çok “bitki geliştirme” şeklinde kullanılmaktadır. Tarih boyunca yetiştiriciler bitki ıslahıyla uğraşmışlardır. Yaklaşık 12-14.000 yıl önce yerleşik hayata geçtiği bilinen insanlar, bitkilerin yapay seçim yoluyla genetik yapısını, ekim özelliklerini ve beslenme kalitesi açısından insan gereksinimlerini karşılayacak

şekilde değiştirmişlerdir (Eriksson, 2019). Şekil 2.2’de gösterildiği üzere, günümüzdeki ekili bitkilerin birçoğu yabani atalarından oldukça farklı görünmektedir (Ruffell, 2018). Örneğin; yabani lahana bitkisinin sarı çiçeklerinin gür ve öbekler halinde bulunan bireylerinin birbirleriyle çaprazlanmaları sonucu daha gür ve öbeklenmiş olan çiçekler elde edilmiştir ve bu sayede brokoli bitkisi ortaya çıkmıştır (Bakırcı, 2016). Fakat bazı bitkiler bu manipülasyona elverişli değildir. Mendel’in genetik bilimine miras bıraktığı yasaların 20.yy başlarında tanınmasıyla başlayarak (Fischer, 1936), bu üreme süreci çiftliklerde yapılan kitle seçim prosedüründen, genetik materyaldeki varyasyonun aktif olduğu bir bilimsel prosedüre geçmiştir. Bu sayede, uygun genetik kombinasyonlar çok daha belirli ve hedefli bir şekilde seçilmiştir (Smýkal ve diğ., 2016). Günümüzde, bitki yetiştiricileri biyoteknolojinin de gelişmesiyle birlikte birçok doğal biyolojik engeli aşmışlardır (Acquaah, 2009).



Şekil 2.2: Yabani lahana bitkisinin farklı özellikteki varyasyonlarının çiftleştirilmesi ile ortaya çıkan varyeteler (Ruffell, 2018)

Bilimsel olarak yönlendirilen bitki ıslahının ilk aşamaları, uygun ana hatlar arasında yapılan kasten çaprazlamaları içermektedir. Daha sonra fizik ve kimya alanındaki yeni keşifler, radyasyon ve mutajen (mutasyona sebep olan) kimyasalların rastgele mutasyonlara yol açmasından dolayı faydalı özelliklere sahip soyların seçilmesi prosedürünün izlenmesini sağlamıştır (Ahloowalia ve Maluszynski, 2001). Geçmişte yapılan rastgele mutasyon yöntemlerinin aksine, genom düzenlenmesindeki yeni gelişmeler mutajenezin hedeflenmiş bir

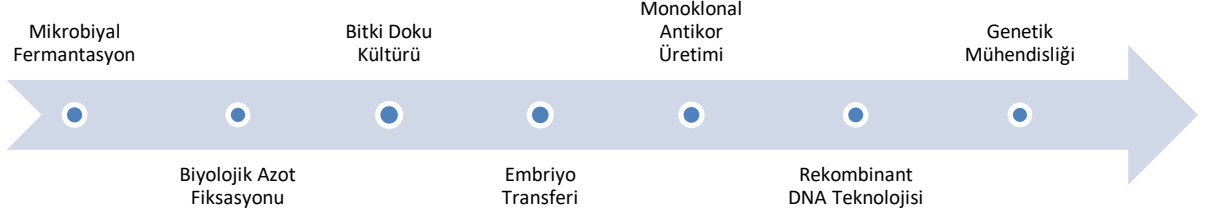
şekilde yapılmasına olanak sağlamıştır (Barabaschi ve diğ., 2016). Son 120 yılda gerçekleştirilen modern bitki ıslahı, mevcut mahsulleri daha verimli ve hedef kaynaklı yetiştirilmesini sağlamak için ilerlemeye devam etmektedir. Daha önceki ıslah teknikleri çoğunlukla rastgele genetik değişiklikleri üzerine kurulmuş olsa da, moleküler düzeyde yapılan ıslah çalışmaları daha hassas bir şekilde, sekans bilgisi mevcut olduğundan spesifik genlerin kesin olarak belirlenmesine ve bu genlerin modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır (Moose ve Mumm, 2008).

Yıllar içinde bitki hücresi ve doku kültüründe kaydedilen ilerlemeler, örneğin; protoplast füzyonu (Glimelius, 1988) ve anter kültürü (Germana, 2011), daha hızlı hibrit üremeye ve poliploidizasyon yoluyla iyileştirmeler ve geniş çaprazlamalar yapılmasına olanak sağlamıştır (Sattler ve diğ., 2016). 1970’li yıllarda moleküler biyolojinin gelişmesiyle beraber, bilim insanları nükleik asit sekanslarını spesifik bir şekilde klonlamayı, rekombine etmeyi ve yeni konak organizmaların genomuna transfer ederek organizmanın genetik dizilimine katmayı başarmışlardır (Barton ve diğ., 1983; Herrera-Estrella ve diğ., 1983). Tüm bu gelişmeler, ticari tohum sektörüne de yansımıştır ve ilk genetiği değiştirilmiş ürünler 1990’ların başında ticarileşmiştir.

2.2.2 Tarımsal Biyoteknoloji ve Modern Biyoteknolojiye Geçiş Basamakları

İnsanlar, avcı-toplayıcı kültürde elde ettiği doğa bilgilerini yerleşik hayata geçtikten sonra kullanmaya devam etmiştir. Genellikle verimi yüksek, doyurucu bitkileri ve hayvanları tercih etmişlerdir. Yabani türleri evcilleştirmiş, evcilleştirdiklerinden verimli nesiller veren bireyleri üremeye ayırmışlardır. Nüfus artışına karşı zamanla bu çabalar sayesinde yeni teknikler gelişmiştir (Çetiner ve Tuzla, 2005). Şekil 2.3’de görüldüğü üzere tarımsal biyoteknolojinin gelişim basamakları mikrobiyal fermentasyon ile başlayıp genetik mühendisliğine kadar ilerleyen tarihsel bir süreçtir.

Son 20 yılda ortaya çıkan yenilikler ile klasik ıslah çalışmaları yerini modern biyoteknolojiye bırakmıştır. Birden fazla fajın tek bir bakteride aynı anda çoğalıp çoğalamadığını belirlemek amacıyla yapılan bir deneyde genetik modifikasyondan şüphelenilmesine rağmen bunun mutasyon benzeri bir işleminden kaynaklandığı düşünülmüştür (Delbrück ve Bailey, 1946). Bu çalışmadan sonra geçen 2 yıl içinde Hershey ve Rotman’ın (1948) deneyleri sonucunda genetik modifikasyon tanımlanmıştır.



Şekil 2.3: Biyoteknolojinin geçmişten günümüze basamakları (Parsley, 1990)

Modern biyoteknolojinin temelinde, tüm canlıların genetik materyali olan DNA yer almaktadır. 1954 yılında DNA molekülünün çift sarmal yapısı keşfedilmiştir (Crick ve Watson, 1954). Keşif sayesinde, kalıtımın kimyasal ana hatlarının anlaşılmasının temeli atılmış ve modern biyoteknolojinin çağı başlamıştır. Hücre çekirdeğinde bulunan kromozomlar DNA'dan oluşmaktadır. DNA'nın moleküler yapısının keşfi, biyoteknolojinin tüm çalışma alanlarında hızlı gelişmelere öncülük etmiştir. Bir canlının DNA'sındaki yüzlerce genin tümünü doğal yollarla çaprazlayarak karıştırmak mümkün değildir. Ancak, günümüzde modern biyoteknoloji sayesinde bilim insanları belirli bir karakterden sorumlu olan geni seçebilmekte ve istedikleri canlıya aktararak doğal olarak değişemeyen türleri de değiştirebilmektedirler. Günümüzde ise bu teknik, aşı üretiminden hücre ve doku kültürüne, biyoyakıt çiftliklerinde verimliliğin zenginleştirilmesine, mevcut ilaçları daha ucuz ve kolay bir şekilde üretmeye kadar birçok alanda kullanılabilmektedir (Gartland ve diğ., 2015).

2.2.3 Genetik Rekombinasyon

Genetik materyalin çeşitlenmesi anlamına gelen rekombinasyon ilk olarak 1945 yılında bakteri virüslerinin genetik materyalinin bakteri DNA'larına katılmasıyla fark edilmiştir (Delbrück, 1945). Daha sonra genetik rekombinasyon Hershey ve Rotman'ın (1948) bakteriyofajlarda yaptığı çalışma ile kanıtlanmıştır. Radyoaktif olarak işaretlenmiş bakteriyofaj DNA'larının rekombinasyona uğraması sonucunda rekombinant DNA kavramı ortaya çıkmıştır (Meselson ve Weigle, 1961). Bakteri DNA'sının replikasyonunda DNA zincirlerinin ayrılması sırasında radyoizotopik rekombinant parçaların genomik DNA'ya katıldığı gözlenmiştir (Meselson, 1964). Kullanılan yöntemler geliştirilerek hayvan virüslerinden gelen DNA'yı bakteriyel DNA ile birleştirmek amacıyla kullanmak veya farklı viral kökenli genetik materyalleri bu

yöntemlerle bakteri DNA'sına katmak fikri hedeflenmiştir. Bu şekilde doğanın biyolojik aktivitesine sahip yeni tür hibrit plazmitler veya virüsler yaratılması amaçlanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu insan sağlığı problemlerini azaltacak bir potansiyel ortaya çıkmıştır (Singer ve Soll, 1973). Bilimsel adı *Xenopus laevis* (Daudin) olan Afrika pençeli kurbağasının DNA'sından ribozomal RNA'yı kodlayan kısmı alınmış ve o dönemde bilinen tek klonlama vektörü olan pSC101 DNA (Cohen ve diğ., 1973) plazmidine eklenmiştir. Ardından, bu plazmit *Escherichia coli* bakterisinin içerisine yerleştirilmiştir. Rekombinant plazmitlerin stabil şekilde çoğaldığı ve böylece *E.coli*'nin *X.laevis* rDNA'sını tamamlayıcı RNA'yı sentezleyebildiği gözlenmiştir. Bu çalışma bir türün genetik materyalinin bir canlıdan alınarak başka bir canlı türüne aktarılabilirliğini kanıtlamıştır ve bu gelişmeyle birlikte rekombinant DNA teknolojisinin doğduğu kabul edilmektedir. İnsan kaynaklı proteinlerin bakterilerde üretilmesi fikri de yine bu deneylerden sonra ortaya çıkmıştır; ancak, insan bağırsak florasının büyük çoğunluğu *E.coli* bakterilerinden oluştuğu için doğal suşlar insanlar için patojen olan yapay rekombinant bakteriler ile konjugasyon yaparak genetik bilgi alışverişinde bulunabilirler. Bu nedenle, rekombinant DNA teknolojisi hem insan sağlığı için muhteşem bir buluş hem de büyük bir tehdittir (Berg ve diğ., 1974). Rekombinant DNA teknolojisi herhangi bir organizmadan seçilen genlerin sınırsız miktarda başka canlılara eklenebilir olmasına ve hücreler her bölündüğünde bu genlerin de çoğalmasına olanak sağladığı için kanun koyucuların bu durumu titizlikle kontrol etmesi gerekmektedir. Hatta bu konu için kanunlar çıkartılması bile teklif edilmiştir (Halvorson, 1977).

2.3 GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bir canlı türündeki genetik materyalin doğal olarak veya geleneksel çaprazlama yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilemeyecek şekilde yapay olarak değiştirilmesiyle meydana gelen canlılara genetiği değiştirilmiş organizmalar denir (Tuğrul, 2016). Kısaca GDO olarak adlandırılan bu canlılar kalıcı ve kalıtsal genetik modifikasyona uğramışlardır. Bu canlılara aynı zamanda transgenik de denilmektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmalardan üretilen yiyeceklere ise genetiği değiştirilmiş (GD) ürünler/gıdalar denir. Rekombinant DNA teknolojisi ile gen aktarımının mümkün olmasından beri insanlar GD gıdalar konusunu tartışmaktadırlar. Kimi araştırmacılar, açlık, böcek ve yabani otlar ile mücadele, verim gibi sorunlarda çözüm için GDO'larda büyük bir potansiyel görmektedirler. Kimi araştırmacılar ise, genetiği değiştirilmiş ürünlerin çok riskli olduğuna ve insan sağlığını

bozacağına inanmakta ve bu ürünlerin titizlikle takip edilmesini ve düzenli olarak kontrol edilmesini savunmaktadırlar (Cardona ve diğ., 2018).

1950'lerden bu yana, böcek ve yabancı otların kontrolü için üretilen pestisit ve herbisitlerin kullanımı çarpıcı bir şekilde artmış ve üretimleri dünyanın en önemli ekonomik faaliyetlerinden birisi haline gelmiştir. Ancak, pestisit ve herbisitler haşere ve yabancı otların kontrolünü sağlasalar da topraktan emilerek yer altı sularına karışmaktadırlar. Toksik bileşikler olduklarından nehir ekosistemlerinde zararlı etkiye yol açar ve çevre kirliliğine sebep olurlar (Fuentes ve diğ., 2018). Transgenik bitkiler pestisit ve herbisit kullanımının azaltılması amacıyla, genellikle hastalıklara veya zararlı organizmalara karşı dirençli ve tarlada yabancı otlar için kullanılan herbisitlere dayanıklı olacak şekilde üretilmişlerdir (James, 2007).

Genetiği değiştirilmiş organizmalar ile ilgili en büyük endişe transgenlerin genetik sürüklenme ile doğadaki yabancı bireylere katılmasıdır. Söz konusu GDO'lar olduğunda, biyoçeşitliliğin korunması temel hedef olmuştur. Bunun için 4 Haziran 1992'de, Birleşmiş Milletler Rio de Janeiro'da düzenlenen "Çevre ve Kalkınma" konferansında "Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi" ni imzaya açmıştır ve aradan 8 yıl geçtikten sonra "Cartagena Biyogüvenlik Protokolü" nü bu konvansiyona ek protokol olarak eklemiştir. Bu protokole göre taraf olan ülkeler biyoçeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir kullanımı üzerine herhangi bir olumsuz etkiye sahip olabilecek genetiği değiştirilmiş organizmalar üzerine biyogüvenlik için ortak bir karara varmışlardır. Protokol, GDO'ların sınır ötesi hareketini, transit geçişini, ağırlıklı olarak ele almaktadır. Bununla birlikte, GDO'ların muamelesi ve kullanımı ile ilgili bir ön bildirim ve izin sistemi de getirmiştir. Protokolde ambalaj, etiket, dokümantasyon, acil durum prosedürü gibi konulara da dikkat çekmektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmalardan yapılmış ürünlerin varlığının tespit edilmesi ve bunların etiketlenmesi çok büyük önem arz etmektedir. Şekil 2.4'te etiketlenmiş bir GDO'lu ürünün fotoğrafı gösterilmiştir.

etiketlenmesi zorunlu hale getirilmiştir. Bu kararlar, transgenik ürünlerin takibinin daha kolay ve hızlı yapılması amaçlanmıştır. Çünkü canlılar üzerinde yapılan rekombinant DNA teknolojisi çalışmaları günden güne artmakta, yeni genetiği değiştirilmiş bitkiler türetilmektedir (Tuğrul, 2016).

GD bitkilerin genetik materyali ana canlıdan farklılaştırılmış olduğu için aynı tür sayılsa da farklı bir şekilde isimlendirilmesi gerekmektedir. Tüm bunlar ortaya “event” teriminin çıkmasını sağlamıştır. Genetik modifikasyon sonucunda tek bir türe ait transgenik birey, diğer bireylerden bağımsız ve farklı bir genoma sahip ise bu bireye event (tip) denir ve bundan üretilen tohumlar da event olarak kabul edilir (James, 2007). 2019 yılı itibarıyla toplam 509 farklı event bulunmaktadır ve bunların 42’si soya tipidir (ISAAA, 2019). Bu çalışmada 42 soya tipinin 5 tanesine bakılması planlanmıştır. Ancak, projeye verilen bütçenin yetersiz kalmasından dolayı 2 soya tipiyle çalışılmıştır. Çalışılan soya eventleri MON87769 ve CV127 tipleridir.

MON87769 tipi soya glifosat herbisite karşı dirençli ve modifiye edilmiş yağ asitlerine sahip olacak şekilde üretilmiştir. Glifosat, dikamba gibi geniş spektruma sahip bir herbisittir. 1970 yılında Monsanto Şirketi’nde çalışan bir kimyager olan John E. Franz tarafından keşfedilmiştir. Glifosat, 1974 yılında Monsanto firması tarafından Roundup adıyla piyasaya sürülmüştür. Bu soya eventi de glifosata dayanıklı olarak üretilmiş olup tarlada kullanıldığında zarar görmesi engellenmiştir (Eck, 2011). Günümüzde glifosat herbisitinin çeşitli sorunlara yol açtığı ortaya konulmuştur. Hem dikamba hem de glifosata maruz kalan bakterilerin antibiyotik direncinin daha hızlı geliştiği görülmüştür (Kurenbach ve diğ., 2018).

Arjantin ve Brezilya’da kullanılan glifosata dirençli GDO’lu soya fasulyesi ile artan glifosat herbisit kullanımı, tarlalardaki baskın yabancı ot türlerinin yer değiştirmesine sebep olmuştur. Glifosat herbisitine dirençli olan yabancı ot türleri bu tarlalarda geniş yayılım göstermeye başlamıştır. Bu sebeple, bu yabancı otlar için glifosat yerine imazapir ve imazapik içeren imidazolinon herbisitler kullanılması gerek görülmüştür. CV127 tipi soya BASF tarafından imidazolinon herbisitlere dirençli olacak şekilde üretilmiştir. Hatta üretim aşamasında bu bitkinin Arjantin ve Brezilya koşullarında kullanılması hedef alınmıştır (BASF, 2011).

2.3.2 Potansiyel Yararları

Biyoteknolojik bitkilerin kendilerini yiyen böcekleri öldürmesi veya ekili alanlarında kullanılan herbisitlere karşı dirençli olmaları üreticiler için mükemmel bir olanak sağlamıştır. Genetiği değiştirilmiş bitkilerin ekim alanlarında artık insektisit kullanımına gerek kalmayacak ve dolayısıyla masraflı böcek ilacı yükü bitki yetiştiricilerinin sırtından kalkacaktır. Ayrıca, tarlalarda kullanılan herbisitler bitkilere karşı öldürücü etkiye sahip oldukları için ekili olan ürünlere de zarar verebilmektedirler. Bu sebeple, herbisit kullanımı ekili transgenik ürünlere zarar veremeyecek ve tarladan azami verim alınacaktır. Yetiştiricilerin tarlada ürettikleri tüm ürünleri eksiksiz pazara sunmaları tüketiciler için de bolluk ve bereket anlamına gelmektedir. Tüm bunların yanı sıra, insektisitlerin topraktan emilerek yer altı sularına karışması da önlenmiş olacak ve böylece insanların dolaylı yoldan tahrip ettiği ekosistemler düzelmeye başlayacaktır (Zhu, 2009; Rhonda ve Mannion, 2010).

Transgenik soya bitkisi yabani soyanın stres altında kaldığında hayatta kalamayacağı koşullarda yaşayabilecek şekilde üretilebilmektedir. Tuzlu ortamlara, farklı pH değerine, soğuğa, sıcağa, kuraklığa dirençli olarak üretilecek olan genetiği değiştirilmiş soya bitkisi hem ekim alanını genişletecektir hem de besleyici değeri göz önünde bulundurulduğunda çok daha fazla üretilebilecektir (Rood, 2006). Bu da potansiyel açlık sorunu için mücadelede büyük bir fayda sağlayacaktır. Daha fazla verim elde edilebilecek olan transgenik ürünler de bulunmaktadır. Örneğin; yine Monsanto tarafından geliştirilen bir soya olan tip MON87712 hem glifosat herbisitine dirençli hem de büyüme ve gelişimi artırılmış bir bitkidir (Eck, 2013). Raf ömrünün uzatılması ise başka bir husustur. İlk tescilli ticari GDO'lu ürün olan Flavr Savr domatesi ile başlayan bu durum, günümüzde birçok bitki eventi için geçerli bir özellik olmuştur. Transgen patates ile oral immünizasyonda yüzey antijen üretiminin sağlanması da rekombinant DNA teknolojisinin tıp alanındaki olumlu etkilerine örnek olmuştur (Richter ve diğ., 2000). Soya tohumunda bol miktarda bulunan glisinin proteininin de transgenik soya ile kalitesinin artırılması da başarıyla gerçekleşmiştir (El-Shemy ve diğ., 2007). Giderek artan dünya nüfusunun meydana getirdiği gıda ve ilaç ihtiyacı rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen ürünler ve genetiği değiştirilmiş bitkiler ile stokların istenildiği kadar artırılabilmesi düşünülmektedir (Uzogara, 2000).

2.3.3 Potansiyel Riskleri

Genetiği değiştirilmiş bitkilerin mahsullerinin büyük bir kısmı hayvancılıkta yem olarak kullanılmaktadır (Flachowsky ve diğ., 2012). Bu sebeple, transgenik bitki ürünlerinin hayvan ve halk sağlığı açısından güvenliğinin sağlanması ve değerlendirilmesi çok önem arz etmektedir. Avrupa’da genetiği değiştirilmiş organizma ürünlerinin gıda ve yem güvenliği Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (European Food Safety Authority, EFSA) tarafından sağlanmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığı üzerindeki olası olumsuz etkilerin toksikolojik, alerjenik ve beslenme açısından araştırılıp değerlendirilmesi gerekmektedir (EFSA, 2011).

Geleneksel bir ürün, modern biyoteknoloji teknikleri kullanılarak modifiye edildiğinde bunu ihtiva eden gıda ve yemlerin tüketilmesinin insan ve hayvanlara zarar vereceği endişesi her zaman var olmuştur. Yiyecek ve yemlerde kullanılması amaçlanan tüm transgenik ürünler değerlendirilirken çok yönlü ve doğru sonuçlar vermesi istenen yöntemler geliştirilmiştir. FAO, WHO ve OECD gibi uluslararası kuruluşların bir arada çalışması gıda ve yem riski değerlendirme yöntemlerinin artmasına olanak sağlamaktadır. Risk değerlendirmesi hükümetlerin ülkelerinde bir genetiği değiştirilmiş ürünün kullanımının onaylanıp onaylanmamasına katkıda bulunmak amacıyla yapılmaktadır. Bu sebeple risk değerlendirme yöntemlerinin amaca uygun olması ve sağlam bilimsel verilere dayanması şarttır (Garcia-Alonso, 2013).

Risk değerlendirmesi için yapılacaklardan birisi moleküler karakterizasyon karşılaştırması yapmaktır. Bu yöntem gerçekleştirilmek istenen genetik modifikasyonun amaçlandığı doğrultuda olup olmadığının moleküler seviyede kontrol edilmesine dayanır. Yapılmak istenen genetik modifikasyon harici başka herhangi bir bozulma olup olmadığı test edilir (Macdonald, 2012). Bir diğer yöntem ise kompozisyon analizi karşılaştırmasıdır. Kompozisyon analizi, bir transgenik ürünün bileşiminin, güvenli bir konvansiyonel ürünle “büyük ölçüde eşdeğer” olup olmadığını ve tek farklılıklarının amaçlanan genetik modifikasyonlar olup olmadığını tespit etmeye dayanmaktadır (Schauzu, 2000). Başka bir yöntem olan tarımsal ve fenotipik karşılaştırmalar ise transgenik mahsullerin geleneksel mahsuller ile farklılıklarına dayanmaktadır. Bu yöntemde genetiği değiştirilmiş bitki, çeşitli ortam koşullarında ve farklı sahalarda muadili ile birlikte yetiştirilir. Morfolojik ve fizyolojik parametrelere bakılarak ürünün tarımsal davranışları incelenir (Gray, 2012).

Karşılaştırmalı kompozisyon dışında insan sağlığı için çok önemli olan alerjenlilik değerlendirmesinin de yapılması gerekmektedir. Genetiği değiştirilmiş gıda ve yemler üretilirken türün daha önce içermediği alerjenik bir proteini kodlayan genin aktarılması insan sağlığı tehlike altına girebilir. Neredeyse tüm gıda alerjenleri protein yapıdadır ve bu nedenle transgenik ürünlerin alerjen potansiyeli değerlendirilmelidir. Alerjenite değerlendirmesi için kesin bir test bulunmamaktadır (Garcia-Alonso, 2013). Ancak, 1963 yılında FAO ve WHO tarafından uluslararası gıda standartları için kurulan Codex Alimentarius izlenecek yol ve süreçler ile ilgili gerekli adımları göstermiştir (Codex Alimentarius Commission, 2003). Alerjenite değerlendirmesi yapabilmek için genetik modifikasyonda kullanılan genlerin kaynağını bilmek, bilinen alerjen proteinin sekansı ile transgen türevli proteinin sekansının karşılaştırmasını yapmak, transgen proteinin enzim yıkımına karşı sindirimde dirençli olup olmadığını kontrol etmek ve yine transgen proteinin ısıya karşı dayanıklı olup olmadığını araştırmak gerekmektedir. Tüm bu çalışmalar doğrultusunda aktarılabilecek olan genin alerjen olup olmadığı ortaya çıkarılabilir (Goodman ve diğ., 2008).

Alerjenite testinin pozitif sonuç verdiği tek belgelenmiş durum Brezilya fıncığı proteini kullanılarak geliştirilmiş beslenme kalitesine sahip transgenik soya bitkisinde bulunmuştur (Nordlee ve diğ., 1996). Bu sebeple, genetiği değiştirilmiş organizmaların ve bunlardan elde edilen ürünlerin ortaya çıkardığı çok büyük felaketlerden söz edilemez. Bu protein, bilim insanlarının deneyi sonlandırmasına neden olan bir alerjen olarak tanımlanmış ve böylece bu soya eventi hiçbir zaman piyasaya sürülmemiştir (Global Knowledge Center on Crop Biotechnology, 2017). Ancak bu durum yine de GDO hakkındaki endişeleri gidermemelidir, aksine risk değerlendirme çalışmaları artırılmalı ve büyük bir titizlikle yapılmalıdır.

Alerjenite dışında zararlı böceklerin ve bitkilerin dirençli olan bireylerinin ortaya çıkması ve bu bireylerin popülasyondaki sayısının artması ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Monsanto firması, ürettiği Cry1Ac proteini içeren MON 87701 soya tipinde böceklerin evrim geçirip geçirmemesiyle ilgili bir garanti sunmamaktadır. Bu sebeple süper böcek olarak adlandırılabilir, böcek ilaçlarına karşı direnci olan canlılar ortaya çıkabilir. Aynı durum herbisite dirençli olan yabancı otlar için de geçerlidir. Doğal seçim yoluyla evrimleşebilecek olan bu bireylere karşı nasıl mücadele edileceği büyük bir soru işaretidir. İronik bir durum ise, bu genetiği değiştirilmiş bitkileri üreten firmalar aynı zamanda insektisit ve herbisit üreticileridir (Steinbrecher, 1996).

Riskler arasında sayılabilecek diğer bir husus da, üretilen transgenik bitkilerdeki genlerin akrabalarına kaçıp kaçamayacağı konusundaki belirsizliktir (Louda, 1999). Bu durum doğal dengenin bozulmasına ve transgenik olmayan bitkilerin de zararlılarını doğal olmayan yollarla öldürerek besin zincirinde kırılmalara sebep olabilir. Üstelik bu bitkiler kendileri için zararlı olmayan haşerelerin de ölümlerine yol açabilmektedir (Brian, 1999). Ayrıca, toksikolojik olarak bakıldığında, herbisit ve böceklerle karşı dirençli bitkilerden kaynaklanabilecek kalıntıların, toprakta yaşayan bakteriler, mantarlar, nematodlar ve diğer mikroorganizmalar gibi organizma gruplarına zarar verip vermeyeceği hakkında da daha fazla araştırma yapılmalıdır (Snow ve Palma, 1997).

Genetiği değiştirilmiş organizmalardan elde edilen ürünlerin marketlerde tüketiciye doğrudan satılması durumunda bu ürünleri tercih etmek istemeyenler için etiketleme konusu ortaya çıkmıştır. Birçok ülke, transgenik ürün olan tahıl yem ve gıda maddelerinin etiketlenmesi için mevzuat oluşturmuştur. Genellikle, GDO içeriğinin belirli bir eşik seviyesinin üstüne çıkması durumunda etiketleme zorunlu kılınmıştır (Lin ve Pan, 2016).

Ülkemizde, genetiği değiştirilmiş ürünlerden kaynaklanan muhtemel tehlikeler hakkında çok fazla yanlış bilgi dolaşmakta ve medyada birçok genetik mühendisliği karşıtı kampanya yürütülmektedir. Kamuoyunun görüşünde kanser ve genetik mühendisliği arasında bir bağlantı olduğuna dair yaygın bir fikir yanlışlığı vardır. Hükümetimiz, onayladıkları ürünlerin onay süreçlerinde gerçekleştirilen bilim ve güvenliği maalesef açıklığa kavuşturmamakta ve bu bilgi kirliliğini ortadan kaldırmamaktadır (Özbağ, 2018).

2.3.4 Hukuksal Boyutu

Yetersiz yerli üretim ve artan talep nedeniyle ülkemiz, kümes hayvanları, hayvancılık ve su ürünleri sektörleri için önemli miktarda yem mahsulü ithal etmektedir. Ülkemizde 20 Ekim 2018 itibarıyla, gıda kullanımı için genetik olarak tasarlanmamış olan, sadece yem kullanımı için 26 mısır ve 10 soya fasulyesi eventi onaylanmıştır. Ülkenin soya fasulyesine olan ihtiyacı arttığından dolayı soya yeminin ithalatı GDO'lu ürün ihtimali endişesiyle sınırlandırılmıştır. Ayrıca, genetik mühendislik ürünlerinin Türkiye limanlarından geçişine Orman ve Su İşleri Bakanlığının onayıyla izin verilmektedir (Özbağ, 2018).

Türkiye, başvuru sürecinde onay bekleyen transgenik özellikler için yemde %0,1 toleransa sahiptir. Onaylanmamış transgenik özellikler için bu tolerans değeri sıfırdır. Ülkemizdeki

Biyogüvenlik Yasası, ağır para cezaları ve hapis cezaları gibi ağır sorumluluk ve ceza hükümlerini içermektedir. 5977 sayılı Biyogüvenlik Yasası 26 Eylül 2010 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Kanun, her türlü genetiği oynanmış ürünün gıda ek maddesi olarak kullanılmasını, transgenik bitki ve hayvanların yetiştirilmesini ve üretilmesini yasaklamaktadır.

Ülkemize bugüne kadar hiçbir biyoteknoloji şirketi Biyogüvenlik Kurulu tarafından incelenmek üzere başvuruda bulunmamıştır. Bunun yerine, tarım endüstrisi dernekleri başvuruda bulunmuşlardır. Türkiye’de onaylanmış olan soya tiplerinin listesi Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Türkiye’de onaylanan soya tiplerinin listesi (Özbağ, 2018)

Geliştirici Firma	Tip	OECD Kimliği	Onay Tarihi
Bayer CropScience	A2704-12	ACS-GM005-3	01/01/2011
Monsanto	MON40-3-2	MON-04032-6	01/01/2011
Monsanto	MON89788	MON-89788-1	01/01/2011
Monsanto	MON87701	MON-87701-2	16/07/2015
Monsanto	MON87701xMON89788	MON-87701-2 X MON-89788-1	16/07/2015
DuPont (Pioneer Hi-Bred International Inc.)	DP356043	DP-356043-5	05/11/2015
Bayer CropScience	A5547-127	ACS-GM006-4	05/11/2015
Monsanto	MON87708	MON-87708-9	02/08/2017
BASF	CV127	BPS-CV127-9	02/08/2017
Monsanto	MON87705	MON-87705-6	08/02/2017

AB yönetmeliklerinden (EC) 1829/2003 gereğince, herhangi bir transgenik gıda veya yemin pazara sürülmeden önce EFSA'ya başvurusunun yapılması gerekmektedir (EU, 2003a). (EC) 1830/2003 yönetmeliğine göre ise % 0,9'dan fazla GDO içeren ürünlerin etiketlenmesi yasal bir zorunluluktur (EU, 2003b). Avrupa Birliği ülkeleri dışında Rusya %0,9, Avustralya, Brezilya, Yeni Zelanda, Suudi Arabistan ve İsrail %1, Şili %2, Kore %3, Filipinler, Endonezya, Tayvan ve Japonya %5 üzerinde GDO içeren gıdalarda etiketleme zorunluluğu getirmiştir (Kamle ve Ali, 2013). Ülkemizde ise GDO'lu gıda yasak iken, %0,1'in üzerinde transgen tespit edilen yemlerin ülke sınırlarına girmesi yasaktır. Ancak, Biyogüvenlik Yasası ve yönetmeliklerine göre, 2011 yılında dönemin Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı genetiği değiştirilmiş ürünler içeren veya bunlardan türetilen ithal gıda ve yemlerin eğer %0,9'un üzerinde ise etiketlenmesi zorunluluğu getirmiştir. Ülkemizde genetiği değiştirilmiş hayvanların üretilmesi yasaktır. Fakat ithalatında kanunen bir yasaklama bulunmamaktadır. Bununla beraber herhangi bir teknoloji şirketi başvuruda bulunmamıştır (Özbağ, 2018).

2.3.5 Dünyada ve Türkiye'de Mevcut Durumu

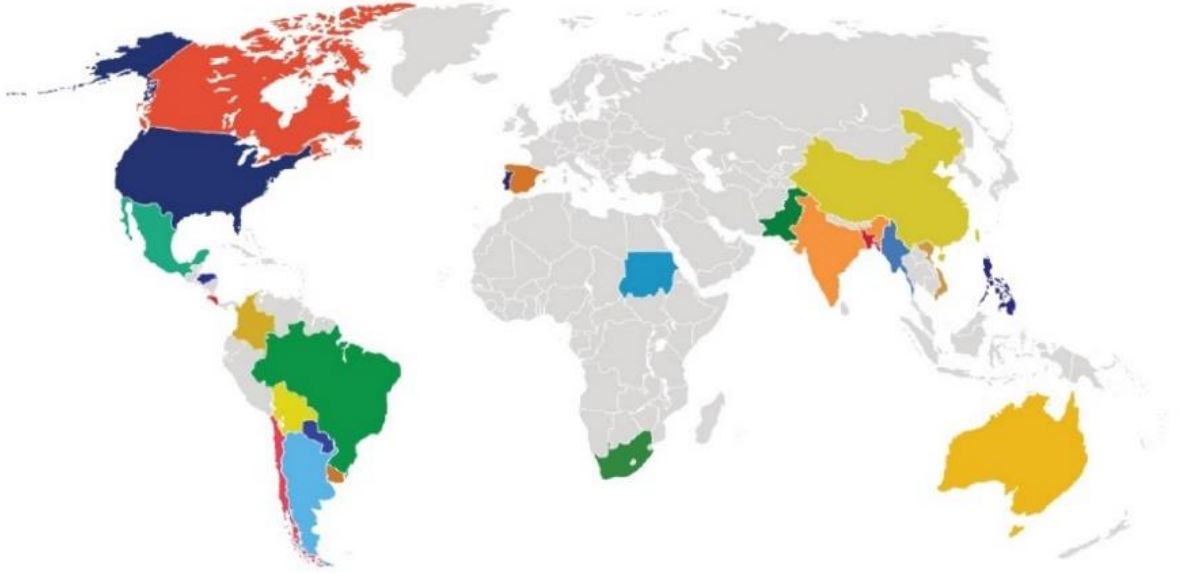
Biyoteknoloji ürünlerinin ticari olarak ekildiği 1996 yılından beri, dünyanın birçok yerinde 60'tan fazla ülke bu bitkileri ve ürünleri ekmekte veya ithal etmektedir. ABD, Çin, Arjantin, Kanada, Avustralya ve Meksika üretici konumundaki ilk ülkelerdir. Günümüzde ise, 17 milyona yakın çiftçi biyoteknolojik ürünlerin ekimini yapmıştır. Bu çiftçilerin %95'i geliştirmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. 43 ülke ise GDO'lu ürünleri gıda ve yem olarak ithal etmişlerdir. 2017 yılında dünyada ekilen biyoteknolojik ürün miktarı yaklaşık 189,8 milyon hektardır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: 1996-2017 yılları arasındaki biyoteknolojik bitkilerin küresel ekim alanları (ISAAA, 2017)

Yıl	1996	1998	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2012	2014	2016	2017
Hektar (milyon)	1,7	27,8	44,2	58,7	81,0	102,0	125,0	148,0	170,3	181,5	185,1	189,8

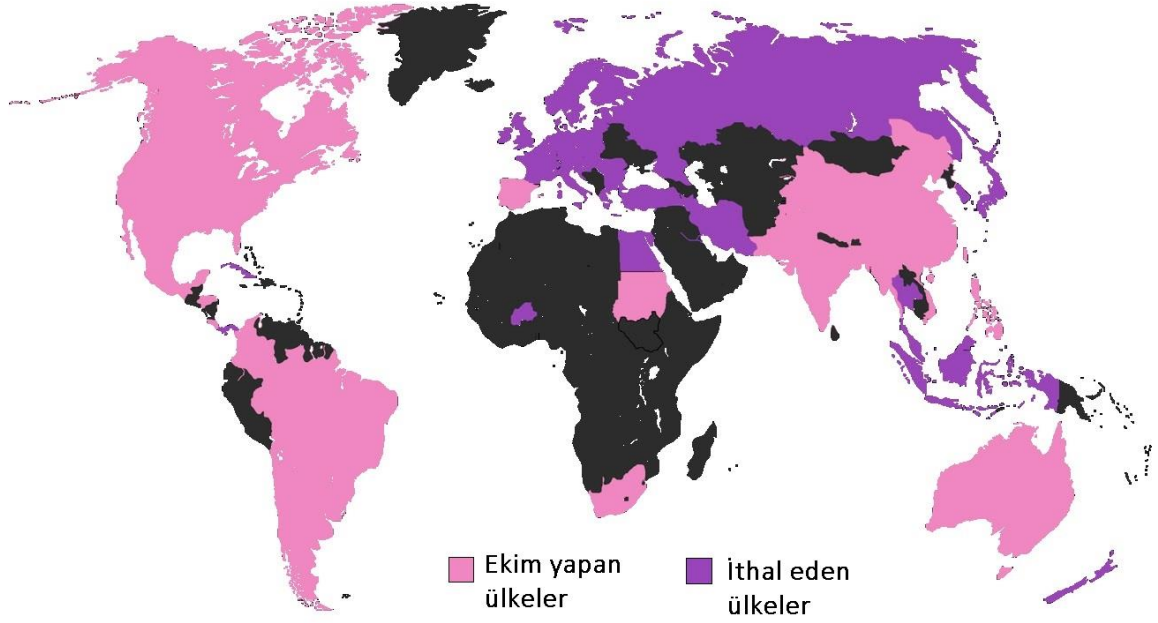
ABD, dünyadaki en büyük üretici konumundadır ve transgenik bitkilerin küresel anlamda ekim alanlarının %39,4'üne sahiptirler. Kanada'da tüketici endişelerinin giderek azaldığı ve halkın %95'i biyoteknolojik kanolayı kullanmayı kabul ettiği ortaya koyulmuştur. Latin Amerika'da tam 10 ülke biyoteknolojik soya ekimi yapılmaktadır. Brezilya, büyük bir iş başararak dünyadaki transgenik bitkilerin ekiminde en çok geliştirmekte olan ülke haline gelmiştir. Aynı

zamanda Brezilya dünyadaki transgenik bitki ekim alanlarının %26'sına sahiptir. Avrupa'da biyoteknolojik mısır ekimini başlatan ilk ülke İspanya olmuştur. Afrika'da ise Sudan 2012 yılından beri Bt pamuk ekimi yapmaktadır. 2017 yılında Hindistan'da tam 7,5 milyon çiftçi biyoteknoloji tarlalarında çalışmıştır ve 11,4 milyon ha Bt pamuk ekilmiştir. Çok yüksek üretim sayılarına ulaşmalar da Avrupa'da Portekiz, Asya'da Vietnam ve Filipinler biyoteknolojik mısır ekimi yapmaktadır. Myanmar ve Pakistan Bt pamuk ekimi yapan ülkelerdir. Bangladeş'te ise transgenik patlıcan üretimi yapılmaktadır. Şekil 2.5'te gösterilen 24 ülkenin transgenik bitki ekim alanı toplamda 1996 yılında 1,7 milyon ha iken, bugün yaklaşık 112 kat artarak büyüme göstermiştir (ISAAA, 2017).



Şekil 2.5: Transgenik bitkilerin küresel ekim alanlarının ülke dağılımı (ISAAA, 2017)

24 ülke biyoteknolojik bitkilerin ekimini yaparken, diğer ülkelerde ekimi yapılması yasaktır. Ancak, Şekil 2.6'da gösterildiği üzere, bu ülkelerden bazıları bu ürünleri hayvan yemi ve/veya gıda maddesi olarak ithal etmektedirler. Ülkemiz de bunlardan birisidir. Türkiye'de transgenik bitkilerin ekimi yasaktır. Ancak, yem olarak ithal edilebilmektedir. Dolayısıyla ülkemizde GDO tamamen yasak değildir.



Şekil 2.6: Biyoteknolojik ürün ekimi yapan ve ithal eden ülkelerin küresel dağılımı (ISAAA, 2017)

2.4 ANALİZ YÖNTEMLERİ

Genetiği değiştirilmiş bitkilerden elde edilen gıda, yem ve tohumların rutin analizlerinde bu bitkilere yerleştirilen gen dizilerinin tespiti için genellikle PZR'ye dayalı tarama yöntemleri kullanılmaktadır (Holst-Jensen ve diğ., 2003). PZR yaygın olarak kullanılan bir nükleik asit ampfilikasyon tekniğidir ve Cetus Corporation bünyesinde çalışan Kary Mullis bu icadıyla 1993 yılında Kimya Nobel Ödülü'ne hak kazanmıştır. PZR, enzimlerin gerçekleştirdiği ve aracılık ettiği bir reaksiyonda nükleotidlerin polimerleştirilmesini içerir ve uygun sıcaklık koşulları PZR'nin her bir döngüsünde nükleik asit miktarının teorik olarak ikiye katlanmasına neden olur. Gerçek zamanlı PZR (Rt-PCR) ise, amplifikasyon işlemine floresan boya kullanılarak oluşturulan bir algılama stratejisi eklemektedir. PZR'nin hedef bölgede yeni nükleik asit sentezlendiğinde floresanın serbest kalması sağlanır. Floresan sinyal ne kadar büyükse, örnekteki hedef gen miktarı da o kadar fazla demektir. Floresan sinyal PZR'deki her bir eşik döngüsünde (Ct) izlenebilmektedir. Genetik değişiklik sekanslarının varlık ve yokluğunu tespit etmek için PZR yöntemleri kullanılmaktadır (Committee on PCR Standards for the BioWatch Program, 2015). PZR yöntemleri DNA kaynaklı iken, protein kaynaklı analiz yöntemleri de mevcuttur. Proteine dayalı analiz yöntemleri için ilgili proteine karşı geliştirilmiş

özel antikorlar kullanılarak immünokimyasal analizler (ELISA) ile tespit edilir. Fakat protein temelli analizler, işlem sırasında antijenin antikora bağlandığı kısmın (epitop) bozunma ihtimali sebebiyle, işlenmiş gıdalar için pek uygun değildir. Dolayısıyla, DNA proteinlere göre GDO tarama analizlerinde daha fazla tercih edilen bir analittir (Elenis ve diğ., 2008).

Ticari olarak piyasada bulunan GDO'ların sayısı gün geçtikçe artmakta ve bu da moleküler tespit teknikleri için olası hedef dizilerinin çeşitliliğini artırmaktadır. GDO laboratuvarları ve gıda üretim endüstrisi genetiği değiştirilmiş ürünleri güvenilir bir şekilde test etmek için birçok farklı yöntem uygulamak zorunda kalmaktadır. Gerçek zamanlı PZR yöntemlerinin özgül, duyarlı, güvenilir ve niceleme olasılığının bulunması, mevcut yöntemler arasında GDO tespiti için daha çok kabul görmektedir. DNA'nın, proteinlere kıyasla, bozulmaya daha dayanıklı olması onu hedef molekül haline getirmiştir. Tarama testleri, promotörler, terminatörler ve antibiyotik direncini kodlayan genler gibi yaygın olarak kullanılan genetik elementler için özgüdür. Bir genetik materyalde karnabahar mozaik virüsü veya *Agrobacterium tumefaciens* gibi konukçu organizmaların genetik elementinin varlığı GDO türevli DNA varlığına işaret etmektedir (Dörries ve diğ., 2010).

Genetiği değiştirilmiş ürünlerin analizinde doğrulanmış ve standartlaştırılmış tarama yöntemlerinin kullanılması, sonuçların karşılaştırılabilirliğine katkı sağlamaktadır. Tarama yöntemlerinin hedeflenen transgenik bitki tiplerini tespit etmesi sadece sekans bilgisine göre değil, aynı zamanda yöntemin özgüllüğünü ve duyarlılığını tanımlamak için referans materyaller ile de kanıtlanmalıdır. Sertifikalı referans materyallerinin kullanılması piyasada bulunan transgenik bitkiler dışında, aynı zamanda ticarileştirilebilecek ürünler için de önemlidir (Stein ve Rodríguez-Cerezo, 2010).

Tarama analizleri, spesifik tahlilleri, referans materyali veya dizileri bulunmayan, onaylanmamış GDO'ları tespit etmek için de analitik strateji sağlamaktadır. Tip belirleme yöntemlerinde test edilen onaylanmış ve onaylanmadığı bilinen GDO'ların varlığı tespit edilebilir ve analiz sonucunun pozitif olması ve tipe özgü olarak hepsinin negatif olması durumunda, bilinmeyen bir onaylanmamış GDO'nun var olduğu sonucuna da varılabilir (Tengs ve diğ., 2007). GDO analizi için yaygın olarak kullanılan sertifikalı referans materyali (CRM), içerisinde tipe özgü genomik DNA (gDNA) veya plazmid DNA (pDNA) içeren kurutulmuş tozlardır (Caprioara-Buda ve diğ., 2012). Plazmid kalibratörleri uzun süre saklanabilir olmaları, düşük maliyetleri ve tamamen karakterize edilmiş bir sekansa sahip olmaları sebebiyle daha

çok tercih edilmektedirler (Meng ve diğ., 2011). Bu tez kapsamında sertifikalı referans materyaller kullanılmış olup, her bir soya tipine özel ikiye primer ve prob kullanılmıştır. Her bir soya tipi için GD Gıda ve Yem için kurulan Avrupa Birliği Referans Laboratuvarının (EU-RL GMFF) protokol olarak sunduğu belirleme metodları denenmiştir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında deney materyali olarak, *Glycine max* L. Merr. türüne ait sertifikalı referans materyaller kullanılmıştır. Sertifikalı referans materyalleri Amerikan Kimyacılar Birliği (AOCS – American Oil Chemists’ Society) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan sertifikalı referans materyaller, genetiği değiştirilmiş soya tipleridir. Bu soya tiplerinin bir tanesi Türkiye’de onaylanmış, bir tanesi onay bekleyenler listesinde. Bir tanesi de içerisinde genetiği değiştirilmiş organizma bulunmayan soyadır.

Validasyon yapılan tip belirleme (event-spesifik) metotlarının listesi aşağıda verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Validasyon yapılan tip belirleme metotları

EU-RL GMFF Protokol Kodu	Metot ismi
CRLVL01/09VP	Event-specific Method for the Quantification of Soybean CV127 Using Real-time PCR - Protocol
CRLVL07/09VP	Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON87769 Using Real-time PCR - Protocol

3.1 SERTİFİKALI REFERANS MATERYALLER

Sertifikalı referans materyal, event spesifik genomik DNA veya plazmid DNA’sına sahip kurutulmuş tozlardır. Bu tez çalışmasında kullanılan tiplerin sertifikalı referans materyalleri, Tablo 3.2’de referans alınan validasyon metotları, primerleri ve problemleri ile birlikte verilmiştir. Primer 1 yazılı olanlar forward primer, Primer 2 yazılı olanlar ise reverse primerlerdir.

Tablo 3.2: Kullanılan tiplerin sertifikalı referans materyalleri

Amplikon uzunluğu	İsim		Oligonükleotit sekansı (5'-3')	Validasyon Referansı
MON87769 (87 baz çifti)	MON87769	Primer 1	5'-CATACTCATTGCTGATCCATGTAGATT-3'	(Mazzara ve diğ., 2012)
	MON87769	Primer 2	5'-GCAAGTTGCTCGTGAAGTTTTG-3'	
	MON87769	Prob	5'-FAM-CCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAC- TAMRA-3'	
CV127 (88 baz çifti)	CV127	Primer 1	5'-AACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAGAC-3'	(Savini ve diğ., 2011)
	CV127	Primer 2	5'-CATTCGTAGCTCGGATCGTGTAC-3	
	CV127	Prob	5'-FAM-TTTGGGGAAGCTGTCCCATGCCC-TAMRA- 3'	

3.2 DNA İZOLASYONU

Bu çalışmada izolasyon malzemesi olarak Eurofins GeneSpin DNA Extraction Kit (Katalog Numarası: 5224400605) kullanılmış ve kit talimatnamesine uyulmuştur. Hazır toz halindeki numunelerden 0,2 gr örnek alınarak 2 ml'lik eppendorf tüpüne konulmuş ve tartımları hassas terazide yapılmıştır. Tartılan örnekler passbox aracılığıyla DNA izolasyonu yapılacak odaya aktarılmıştır. Lizis CF tamponu 65 °C de ısıtılmış, ısıtılan tampondan 550 µl, passboxtan alınan, içerisinde numune bulunan eppendorf tüpüne eklenmiş ve 15 saniye vortekste karıştırılmıştır (Ekstraksiyon kontrolü için lizis işleminden itibaren boş örneğe (blank) aynı protokol uygulanır). 10 µl Proteinaz K eklenmiş ve 2-3 saniye tekrar karıştırılmıştır. Eğer lizis tamponunun hacmi, örneklerin tamamen çözülmesini sağlamamışsa, numunelere yeniden tampon (Proteinaz K ile doğru orantılı olmak koşulu ile) ilave edilerek resüspanse edilmiş ve karışım 30 dakika 65 °C de inkübe edilmiştir. Her 550 µl lizis tamponu için 10 µl RNase (20 mg/ml) eklenmiştir. Tüm örnekler vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Karışım 10 dakika en az 11.000 xg'de santrifüj edilir. Santrifüj edilen karışımın temiz süpernatantı (yaklaşık 300 µl) alınmış ve 1,5 ml'lik yeni reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. Aktarılan süpernatant miktarı kadar C4 tamponu ve etanol ilave edilmiştir (Örneğin 300 µl süpernatant aktarıldıysa 300 µl C4 ve etanol ilave edilir). Oluşan karışım 30 saniye vortekslenmiştir. 2 ml'lik temiz toplama tüpüne GeneSpin kolonu yerleştirilmiş ve sonra kolona

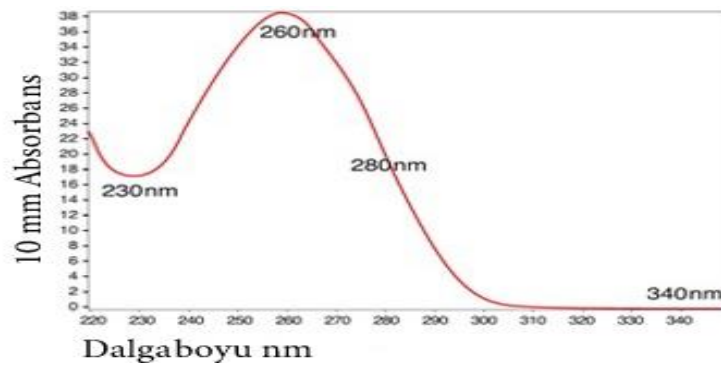
karışımdan 700 µl aktarılıp 1 dakika 11.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde kalan solüsyon atılmış ve toplama tüpü en fazla 750 µl alabildiğinden bu işlem tekrar edilmiştir. GeneSpin kolonu yeni bir toplama tüpüne alınarak üzerine 400 µl CQW eklenmiş ve 1 dakika 11.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde kalan solüsyon atılmış ve GeneSpin kolonu yeni bir toplama tüpüne alınarak üzerine 700 µl C5 tamponu eklenerek 1 dakika 11.000xg'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde kalan solüsyon atılır ve GeneSpin kolonu yeni bir toplama tüpüne alınarak üzerine 200 µl C5 tamponu eklenerek ve 2 dakika 11.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kolonlar yeni bir 1,5 ml'lik reaksiyon tüpüne oturtulmuş, önceden 70 °C'ye ısıtılmış olan CE tamponundan membrana 100 µl eklenmiştir. Oda sıcaklığında (18-25 °C) 5 dakika inkübe edilmiş ve DNA'yı toplamak için 1 dakika 11.000 xg'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında filtre atılmış ve elde edilen DNA ağzı kapaklı eppendorf tüpüne alınmıştır. DNA örnekleri hemen kullanılmayacaksa, kısa dönemli kullanım için +4 °C' de, uzun süreli kullanım için -20 °C' de saklanabilmektedir.

3.3 DNA SAFLIK VE MİKTARININ BELİRLENMESİ

DNA'nın miktar ve saflığı, nanofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerler ile saptanmaktadır. Örnek olarak çift iplikli DNA için miktar tayininde aşağıdaki formülünden yararlanılmaktadır;

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans Değeri)} \times \text{Sulandırma Oranı} \times 50$$

DNA'nın temizliği için A(260/280) ve A(260/230) değerlerine bakılmaktadır (Şekil 3.1). Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlar da 230nm dalga boylarında pik (en yüksek değer) yapmaktadır (Desjardins ve Conklin, 2010).



Şekil 3.1: 260 nm dalga boyunda pik yapan bir nükleik asidin spektrofotometrik ölçüm grafiği (Desjardins ve Conklin, 2010)

Temiz DNA örneğinde;

$$A_{260}/A_{280} = 1,7 - 2,0$$

$$A_{260}/A_{230} > 2,0$$

$A_{260}/A_{280} > 2,0$ ise RNA kontaminasyonunu işaret eder.

$A_{260}/A_{230} < 1,7$ ise protein kontaminasyonunu işaret eder.

DNA miktarı; DNA ($\mu\text{g/ml}$)=260 nm'deki OD (Absorbans değeri) x sulandırma oranı x 50 ile hesaplanmıştır. Ayrıca, DNA bütünlüğünün kontrolünün yapılması amacıyla, örnekler jel elektroforez yöntemiyle yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.4 GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İLE GDO TARAMA ÇALIŞMALARININ YAPILMASI

Çalışmada validasyon işlemi Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından validasyonu yapılan ve yayımlanan (CRL) yöntemlerine göre yapılmıştır (Hougs ve diğ., 2017). Referans materyallerin GDO miktarları prosedürde belirlenen şekilde %0,9 ile %10,0 arasında ayarlanarak PZR yapılmıştır. Her bir PZR için metot parametreleri sıralanan şekilde dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir; Doğruluk, Kesinlik, Amplifikasyon verimliliği, Belirleme limiti (LOD) (yüzdelik olarak). Sonuçlar değerlendirilirken [-3,1 ve -3,6] aralığında olmalıdır ki bu da %90 - %110 arasında amplifikasyon verimine karşılık gelmektedir. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek olmalıdır. Tekrarlanabilirlik standart sapmasının ise sertifikalı referans materyal örneklerinin paralellerinin arasında %25'ten küçük bulunması gerekmektedir.

SRM'ler genetik modifiye gıdaların tespitinde kullanılan metotların geçerliliğini denetlemek için kullanılır. DNA miktar tayini türüne bağlı olarak değişebildiğinden SRM'lerden biri veya daha fazlası bilinmeyen örneklerin ölçümünden miktar tayini sonuçları oluşturması için denemeye alınmak zorundadır.

Roche Lightcyler 480 cihazı kullanılarak yapılan GDO tarama çalışmalarında sonuçlar Relative Quantification başlığı altında değerlendirilir. Buna bağlı olarak, deney sonuçları Abs Quant/2nd Derivative Max hesaplaması yapılarak sonuçlandırılmıştır. Miktar tayini çalışmalarında RT-

PZR kabul koşulları şu şekilde sıralanabilir. PZR veriminin %90 ile %100 arasında olması, yüksek hassasiyet ile çalışılmış olunması, Crossing point (Cp) değerlerinin kendi içinde tutarlılık göstermesi, belirlenen miktar ölçümünün miktar ölçüm standartından sapma oranının +/- %30 olması, NTC (No Template Control)'lerin (hedef GDO sekansını tanımlayacak kırmızı mastermix) amplifikasyon göstermemesi gerekmektedir.

Çalışmada gerçek zamanlı PZR için kullanılan plate set up Tablo 3.3'te gösterilmiştir. A sütununda Le1 geninin primer ve problemleri kullanılmış, transgenik olmayan DNA için kontrolü yapılmıştır. A7 ve A8 kuyucuklarında ise genetik materyal yerine su konularak primer ve problemlerin negatif kontrolleri yapılmıştır. B sütununda Le1 geninin primer ve problemleri kullanılmış, transgenik DNA için kontrolü yapılmıştır. B7 ve B8 kuyucuklarında genetik materyal yerine plazmid DNA'sı konularak primer ve problemlerin negatif kontrolleri yapılmıştır. C sütununda DNA'ya eklenen genin primer ve problemleri kullanılmış, transgenik DNA için kontrolü yapılmıştır. C7 ve C8 kuyucuklarında genetik materyal yerine su konularak primer ve problemlerin negatif kontrolleri yapılmıştır. D sütununda DNA'ya eklenen genin primer ve problemleri kullanılmış, transgenik olmayan DNA için kontrolü yapılmıştır. D7 ve D8 kuyucuklarında ise genetik materyal yerine plazmid DNA'sı konularak primer ve problemlerin negatif kontrolleri yapılmıştır. Her iki gen bölgesi için ikişer kopya çalışılmış olup, negatif ve pozitif kontrollerine bakılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Tez çalışmasında kullanılan gerçek zamanlı PZR şeması

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1:1 NG	1:1 NG	1:5 NG	1:5 NG	1:10 NG	1:10 NG	NTC Su (Le1)	NTC Su (Le1)
B	1:1 TG	1:1 TG	1:5 TG	1:5 TG	1:10 TG	1:10 TG	NTC Plazmid (Le1)	NTC Plazmid (Le1)
C	1:1 TG	1:1 TG	1:5 TG	1:5 TG	1:10 TG	1:10 TG	NTC Su (Transgen)	NTC Su (Transgen)
D	1:1 NG	1:1 NG	1:5 NG	1:5 NG	1:10 NG	1:10 NG	NTC Plazmid (Transgen)	NTC Plazmid (Transgen)

*NG: Transgenik olmayan DNA, TG: Transgenik DNA, Le1: Lectin geni, NTC: No Template Control. Turuncu renk amplifikasyon var, yeşil renk amplifikasyon yok anlamına gelmektedir.

Farklı deneyler arasındaki olası istatistiksel sapmaları önlemek için referans gen ölçümü ve GDO spesifik sekans ölçümü farklı değil, aynı PZR çalışmasında (koamplifikasyon) gerçekleştirilmelidir. CV127 ve MON87769 soya tipleri için gerçek zamanlı PZR analizi için hazırlanan mastermix Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Standart gerçek zamanlı PZR bileşenleri

dNTP Karışımı	10 µl
DNA	3 µl
Forward Primer	0,8 µl
Reverse Primer	0,8 µl
Prob	0,4 µl
dH ₂ O	5 µl
Toplam	20 µl

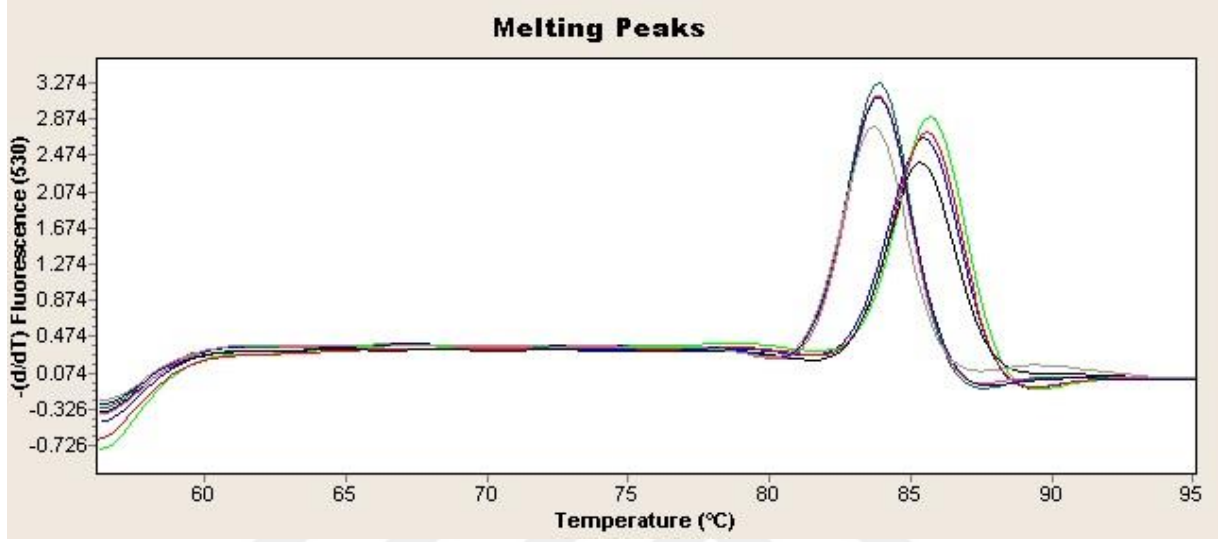
Gerçek zamanlı PZR cihazının programlanması her bir döngü için Tablo 3.5'te gösterildiği gibi ayarlanmıştır. İki soya tipi için de aynı şekilde uygulanmış, FAM ve TAMRA floresans sinyaller cihaz tarafından taranmıştır.

Tablo 3.5: Gerçek Zamanlı PZR analizinin programlanması

Termal Cykler (Döngü) Süre ve Sıcaklıkları		
1 Hold (Bekleme)	Cycle (45 Tekrar)	
Enzim Aktivasyonu	Denatürasyon	Yapışma ve Uzama
10 dakika 95 °C	15 saniye 95 °C	90 saniye 60 °C

FAM ve TAMRA floresan boyalar ortamda hedef gen bulunmamasına rağmen, primerlerin kendi aralarında bağlanabilme ihtimallerinden dolayı spesifik olmayan sinyaller

verebilmektedir. Bu olumsuz durumu engellemek amacıyla amplifike ürünlerin erime eğrisi analizi (melting peaks) yapılmaktadır (Şekil 3.2). Her bir çift sarmallı DNA'nın erime derecesi (T_m) özgülüdür. Bu sebeple, cihazın tespit etmiş olduğu erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun erime sıcaklığı saptanabilmektedir.



Şekil 3.2: Özgül sıcaklıklarda gerçekleşen gerçek zamanlı PZR erime eğrisi analizi

Bir eş zamanlı PZR analizinin planı şunları içermelidir: GDO-spesifik hedef DNA sekansını belirlemek için tasarlanan bir PZR sistemi, türe özgü GD göreceli derişimlerinin hesaplanmasında “normalleştirici” olarak da kullanılan endojen (referans) gen sekansını belirlemek için tasarlanmış ikinci bir PZR sistemi, hem hedef hem de endojen referans sekansları için standart eğriler. Her deney örneği için hedef ve endojen referansın miktarı uygun standart eğriler ile belirlenir (Hübner ve diğ., 2001). Bu belirleme bağlamında validasyon çalışmamızda hedef ve referans miktarlar her kit için aynı PZR döngüsünde beraber çalışılmıştır. Hedefin miktarı, endojen referansın miktarı ile normalleştirilerek göreceli derişim elde edilir. İstatistiksel gereklilikleri karşılamak için standart eğriler en az 4 farklı derişim noktası içermelidir. Bu dört farklı derişim noktası Eurofins kitlerinin içinde hazır bir şekilde bulunmakta ve uygulanmaktadır. Buna ek olarak her analiz hem referans gen, hem de GDO ölçümleri için negatif bir kontrol (NTC-hedef içermeyen kontrol) içermelidir. Negatif DNA hedef kontrolü, pozitif DNA hedef kontrolü de ayrıca yapılabilir. Analizin sonucunun değerlendirilebilmesi için, SRM’de amplifikasyonun görülmesi gerekmektedir. Negatif kontrolde ise herhangi bir amplifikasyonun olmaması gerekmektedir.

4. BULGULAR

4.1 DNA İZOLASYON SONUÇLARI

Validasyon çalışması için izole edilen DNA'ların miktar ve saflığı nanofotometrede kontrol edilmiştir. Her örnek ikiyeşerli olarak iki ayrı günde izole edilmiştir.

Tablo 4.1: Sertifikalı referans materyal DNA'larına ait nanofotometre sonuçları

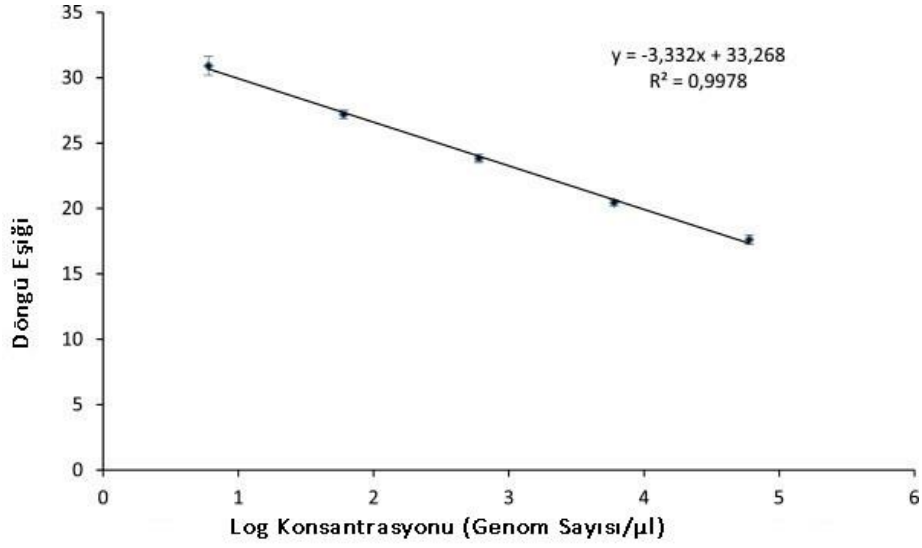
Örnek	OD 260/280	Nükleik Asit Konsantrasyonu	OD 260/280	Nükleik Asit Konsantrasyonu
MON87769	2,03	692 ng/μl	2,02	464 ng/μl
CV127	1,97	312 ng/μl	1,99	383 ng/μl
0906-A	2,01	746 ng/μl	2,02	383,9 ng/μl

*0906-A: Monsanto Şirketi tarafından üretilen modifiye edilmemiş (transgenik olmayan) soyanın sertifikalı referans materyali

4.2 GERÇEK ZAMANLI PZR

4.2.3 MON87769 Değerlendirmesi

MON87769 sertifikalı referans materyalleri ile verifikasyon çalışması yapılmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi [-3,1 ve -3,6] aralığında saptanmıştır (Şekil 4.1). Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1). Sertifikalı referans materyal örneklerinin paralelleri arasındaki standart sapma %25'ten küçük bulunmuştur (Tablo 4.2). Hazırlanan örneklerle ait % GDO değerleri beklenen değere göre [-%25 ve +%25] aralığında saptanmıştır.



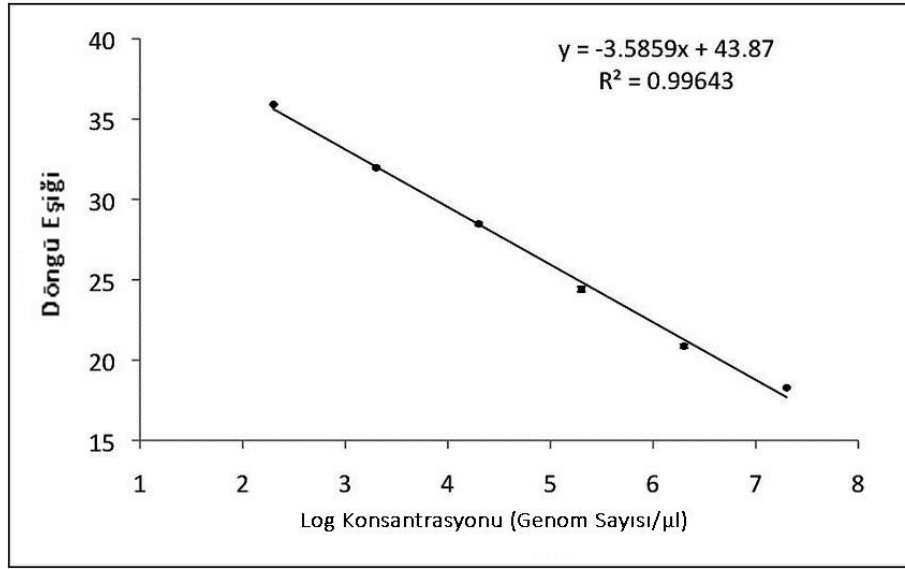
Şekil 4.1: MON87769 kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.2: MON87769 LOD değerlendirmesi

Örnek	Lektin				MON87769				Sonuç	SD	RSD (%)
	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD			
DNA-1	81410,00	83733,67	2013,92	5,48	101,00	95,20	11,86	12,46	0,11	0,01	6,21
	84841,00				92,00						
	84950,00				76,00						
DNA-2	81210,00	82493,67	1503,007	4,96	153,00	118,20	21,00	17,77	0,55	0,03	5,85
	83741,00				100,00						
	83880,00				114,00						

4.2.5 CV127 Değerlendirmesi

CV127 sertifikalı referans materyalleri ile verifikasyon çalışması yapılmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi [-3,1 ve -3,6] aralığında saptanmıştır (Şekil 4.2). Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek bulunmuştur (Şekil 4.2). Sertifikalı referans materyal örneklerinin paralelleri arasındaki standart sapma %25'ten küçük bulunmuştur (Tablo 4.3). Hazırlanan örneklere ait % GDO değerleri beklenen değere göre [-%25 ve +%25] aralığında saptanmıştır.



Şekil 4.2: CV127 kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.3: CV127 LOD değerlendirmesi

Örnek	Lektin				CV127				Sonuç	SD	RSD (%)
	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD			
DNA-1	82310,00	87607,00	1989,411	8,84	115,25	108,9167	8,79	10,46	0,13	0,02	8,49
	85731,00				98,87						
	85780,00				112,63						
DNA-2	80320,00	82496,00	1887,916	7,87	102,00	111,66	9,073	14,77	0,45	0,03	4,80
	83698,00				120,00						
	83470,00				113,00						

4.3 YÖNTEMLERİN LOD VALİDASYON SONUÇLARI

Yapılan verifikasyon çalışmaları sonucunda elde edilen validasyon parametreleri ENGL tarafından 2009 yılında yayımlanan “Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories, 2009” dökümanına göre hesaplanmıştır.

4.3.1 MON87769 Analiz Validasyon Parametreleri

MON87769 soya tipinin LOD değerlendirmesinin validasyon parametreleri özeti Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4: MON87769 tip belirleme metodunun validasyon parametreleri

Parametre Adı	Değeri
Doğruluk	$\leq \pm 25\%$
S_R (Tekrar Edilebilirlik Standart Sapması)	0,02
RSD_R (Bağıl Tekrar Edilebilirlik Standart Sapması)	14,42
Ubias r (%) Miktardan Kaynaklanan Ölçüm Belirsizliği	25,59
LC (Kritik Düzey)	0,027
Yöntemin LOD Değeri (%)	0,045 – 5 Kopya

4.3.2 CV127 Analiz Validasyon Parametreleri

CV127 soya tipinin LOD değerlendirmesinin validasyon parametreleri özeti Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5: CV127 tip belirleme metodunun validasyon parametreleri

Parametre Adı	Değeri
Doğruluk	$\leq \pm 25\%$
S_R (Tekrar Edilebilirlik Standart Sapması)	0,03
RSD_R (Bağıl Tekrar Edilebilirlik Standart Sapması)	14,54
Ubias r (%) Miktardan Kaynaklanan Ölçüm Belirsizliği	26,88
LC (Kritik Düzey)	0,029
Yöntemin LOD Değeri (%)	0,049 – 5 Kopya

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genetiği değiştirilmiş bitkilerin yıllar içerisinde geniş alanlarda ekilmesi, bu bitkilerden elde edilen ürünlerin daha fazla üretilmesine ve piyasaya sürülmesine olanak sağlamıştır. Uzun yıllardır genetiği değiştirilmiş ürünlerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkileri ile ilgili endişeler bu sebeple güçlenmiştir. Bu ürünlerin mevcut ve/veya potansiyel yararları göz önünde bulundurulduğunda, yasaklanmaları mümkün olmadığından üretim aşamalarının denetlenmesi ve üretilen ürünlerin çok sayıda risk değerlendirmesine tabi tutulması gerekmektedir. Tüketicilerin bilinçli olması ve bilgilendirilmeleri bu durumda çok önemlidir. Avrupa Birliği bu hususta tüketicilerin bilgilendirilmelerinin yasal bir hak olduğunu düşünerek %0,9'un üzerinde GDO içeren ürünlerin etiketlenmesini zorunlu kılmıştır. %0,9'un altında GDO ihtimali bulunması, önlenemeyecek kontaminasyonlardan kaynaklanabileceğinden tolere edilebilir sınırdır (EU, 2003b).

Ülkemiz, transgenik ürünler konusunda, Avrupa Birliği gibi, oldukça hassas yasalara sahiptir. Öyle ki, genetiği değiştirilmiş bitkilerin ekilmesi, ürünlerinin üretilmesi, gıda ve malzemelerinin ithal edilmesi yasaktır. Sadece %0,1'e kadar GDO içeren yemlerin ithalatına izin verilmektedir. Avrupa Birliği ile uyum çerçevesinde, %0,9'un üzerinde GDO içeren ürünlerin ülkemizde de etiketlenme mecburiyeti bulunsa da bu ürünlerin ithalatı yasak olduğu için kanunen böyle bir etiketleme mümkün değildir. Tüm bunların yanı sıra, transgenik hayvanlara ilişkin bir yasal düzenleme bulunmaması (Özbağ, 2018) aslında bir risktir. Genetik modifikasyona ilişkin yasal düzenlemelerin bitkilerle kısıtlı olmaması gerekmektedir. Avrupa Birliği Mayıs 2013'te transgenik hayvanların risk değerlendirmesi hakkında bir rehber yayımlamıştır. Ülkemiz, tıpkı transgenik bitkilerde olduğu gibi, transgenik hayvanlar konusunda Avrupa Birliği mevzuatlarını örnek alabilir. Genetiği değiştirilmiş ve değiştirilmekte olan yaklaşık 74 tane hayvan bulunmaktadır. Bu tiplerin birçoğunun gıda piyasasına doğrudan sürülmesi amaçlanmaktadır. Bu 74 hayvan eventinin yaklaşık 56'sının hedef gen sekansı bilindiğinden, GDO'lu hayvan analizleri çok daha önem kazanmıştır. Genetiği değiştirilmiş bir somon türü olan AquAdvantage® Salmon'un dünyada üretimine başlanmıştır. Piyasaya sürülen transgenik hayvanlar ile besin zincirine modifiye edilmiş genetik materyalin karışması ihtimali daha da artacaktır. Bu kontaminasyonun engellenmesi için izlenebilirlik çalışmaları yapılmalıdır (Lievens ve diğ., 2015).

Avrupa Birliği'nin genetiği değiştirilmiş organizmalar yönetmeliği sadece GDO'lu ürünleri kapsamaktadır. 22 Eylül 2003 tarihli 1829/2003 numaralı yönetmeliğin 16.maddesine göre, GDO'lu yem ile beslenen hayvanlardan üretilen ürünler GDO'lu olarak kabul edilmez ve dolayısıyla etiketleme zorunluluğu yoktur. Ülkemiz, GDO'lu yem ile beslenen bir hayvandan üretilen ürünün GDO'lu olarak kabul edilip edilmediği ile ilgili bir bilgi vermemektedir.

Avrupa Komisyonu, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesinden (EFSA) önceden onaylanan GDO'lu ürünler için yeniden analiz yapılmasını isteyebilmektedir. Avrupa Komisyonu, 16 Şubat 2018'de CV127 (BPS-CV127-9) tipi soya için nükleik asit sekans verilerini tekrardan analiz edilmesini ve biyoinformatik verilerinin güncellenmesini talep etmiştir. Bunun sonucunda EFSA, önceki verilere göre 2 nükleotidin farklı olduğunu tespit etmiştir. Bu farklı nükleotitlerin yabani soya bitkisinde bulunduğu belirlenince güvenlik sorunu görülmemiş ve mevcut risk değerlendirmesi ile devam edilmiştir (Papadopoulou ve Ramon, 2018). Buradan yola çıkılarak, ülkemizde de yem kullanımı için onaylanmış olan tiplerin tekrar kontrol edilmesi gerekmektedir. Tarım ve Orman Bakanlığının (o dönemki adıyla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı) 27 Ekim 2015 tarihinde Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğünde düzenlediği GDO Analiz Stratejisi toplantısında MON87769 ve CV127 tiplerinin dâhil olduğu birçok tipin yeniden analiz edilmesi kararı alınmıştır. CV127 tipi onaylı, MON87769 tipi ise onay sürecindedir.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tip belirleme metotlarının eventlere tek tek uygulanması hem fazla zaman almakta hem de maliyeti artırmaktadır. Bu sebeple çoklu (multipleks) PZR analiz metotlarının geliştirilmesi de gerekmektedir. Mevcut protokollerin kombinasyonlarıyla geliştirilebilen çoklu PZR yöntemleri uygulama konusunda çoklu PZR analiz yöntemleri, mevcut protokollerin kombinasyonlarıyla geliştirilmektedir. Avrupa Birliği Referans Laboratuvarının protokol olarak ortaya koyduğu çoklu PZR analiz yöntemi bulunmasa da geliştirilen bazı teknikler uygulamanın mümkün olabileceğini göstermiştir (Grohmann ve diğ., 2017). Güney Kore'de dört GDO'lu soya event (CV127, MON87705, FG72 ve MON87701) için çoklu PZR metodu geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Choi ve diğ., (2018) Güney Kore çok fazla soya fasulyesi ithal ettiği ve dünyada üretilen transgenik soya yüksek miktarlarda olduğu için böyle bir tekniği geliştirmeye ihtiyaç duymuştur. Ülkemiz de, ürettiğinden fazla soya ithal ettiğinden, kullanıma uygun bir, çoklu PZR metodunun geliştirilmesine gereksinim duymaktadır. Cottenet, ve diğ., (2019) düşük maliyetli ve hızlı

sonuç veren çoklu PZR yöntemi geliştirmeyi başarmış ve 40 dakikada sonuçlanarak 4-16 kopya sayısı veren bir metot geliştirmişlerdir. Yaptıkları testlerde, ekimi yapılan tüm tiplerin %100 başarıyla tespit ettiklerini açıklamışlardır. Geliştirilen çoklu PZR metotları, kısa zamanda doğru sonuçlar vermeye devam ettikçe kullanım alanları yaygınlaşacak, limanlarda ve gümrüklerde uygulanabilir hale gelecektir.

Hem Avrupa Birliğinde hem de ülkemizde gümrük laboratuvarları bulunmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde 89 gümrük laboratuvarı bulunmaktadır ve bu laboratuvarlar Şekil 5.1’de gösterilmiştir (European Commission, 2019). Ülkemizde ise Ankara, Bursa, İstanbul, İzmir, Kocaeli ve Mersin olmak üzere toplam 6 gümrük laboratuvarı bulunmaktadır (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019). Çoklu PZR metotların geliştirilmesi, kısa zamanda çok geniş yelpazede tip analiz etmesi bu laboratuvarların sayısını artıracak, hatta gümrük kapılarında analiz yapma imkânı sunacaktır.



Şekil 5.1: Gümrük Laboratuvarları Avrupa Ağı (CLEN) haritası

Limanlarda ve gümrüklerde, validasyonu yapılan tip belirleme metotlarının tüm ithal gıda ürünlerinde uygulanması gerekmektedir. Sınırlarımıza bir şekilde girebilecek olan GDO'lu ürünlerin market raflarında kendisine yer bulabileceği aşîkârdır. Tüketicilerimizin bilinçlendirilmeden, farkında olmadan GDO'lu ürünleri tüketmesi hem onların sağılığını tehlikeye atabilir hem de mevcut yabani türlerin DNA'larına çaprazlama yoluyla transgen kaynaklarının katılması ihtimali doğabilir. Çünkü böyle bir durum gerçekleştiğinde, artık, transgenlerin kontrol altına alınması çok zor olacaktır. Bunun için bir acil durum planının oluşturulması, biyolojik çeşitliliğimizin olası kontaminasyondan asgari şekilde etkilenmesi için çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Türkiye Cumhuriyeti Ticaret Bakanlığı 24 Ocak 2019 yılında yapmış olduğı duyuruda ithalatta denetimi gerçekleştirilen ürün grupları Tablo 5.1'de gösterilmiştir (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019). Tüketici ürünlerini kapsayan yönetmeliğın açıklaması "Emzik, biberon, bebek bakım ürünleri, kırtasiye malzemeleri, mouse padler, imitasyon takılar, kol saatleri vb. bazı ürünlerin insan sağılığı, can ve mal güvenliğı, çevre ve tüketicinin korunması yönünden uygunluğı ithalat aşamasında gümrük beyannamesinin tescili öncesinde Ticaret Bakanlığıınca TAREKS üzerinden denetlenmektedir." şeklindedir. Yani, insan sağılığı, çevre ve tüketicinin korunması yönünden uygunluğun denetlendiğı belirtilmiştir. Fakat 30 Aralık 2018'de 30641 sayılı Resmî Gazete'deki Tüketici Ürünlerinin İthalat Denetim Tebliğı'nde genetiğı değıştirilmiş organizmalardan bahsedilmemektedir. Doğrudan GDO üreten biyoteknoloji şirketlerinden ithalat yapılmasının yasaklanması, ithal edilecek gıdaların GDO içermediğini garanti etmemektedir. Bu şüphenin giderilmesi ve gümrük laboratuvarlarında bu ürünlerin de kontrollerinin yapılması gerekmektedir. Buna rağmen, 27671 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan genetik yapısı değıştirilmiş organizmalar ve ürünlerine dair yönetmeliğın 23.maddesinde GDO ve ürünleri ile GDO'lardan elde edilen ürünlerden Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağılığı, Gıda ve Yem Kanununa göre numune alınıp analiz yapılması ve analiz işlemlerinin Bakanlık tarafından belirlenen laboratuvarlar tarafından gerçekleştirilmesi bilgisi verilmiştir.

Tablo 5.1: Ticaret Bakanlığının İthalatta Denetimini Gerçekleştirdiği Ürün Grupları

• Avrupa Normlarına Uygunluk (CE) İşareti Taşınması Gereken Ürünler	• Sanayi Girdileri
• Atıklar	• Oyuncaklar
• Uyuşturucu ve Psikotrop Maddeler ve Müstahzarları	• Yapı Malzemeleri
• Kimyasallar	• Pil ve Akümülatörler
• Tıbbi Ürünler ve İlaç Hammaddeleri	• Tıbbi Cihazlar
• Telsiz ve Telekomünikasyon Terminal Ekipmanları	• Metal Hurdalar
• Kişisel Koruyucu Donanımlar	• Katı Yakıtlar
• Tüketici Ürünleri	• Araç Parçaları

DNA'nın proteinlere göre daha dayanıklı olması, GDO analizinde yaygın olarak PZR yönteminin kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Protein kaynaklı bir analiz yöntemi olan ELISA proteinin bozunmaması ve tespit edilebilmesi koşuluyla kullanılabilir. Üstelik PZR yöntemine göre pratik ve etkilidir. Ancak, işlenmiş gıdalarda tespit eşiğinin proteinler için düşük olması ve proteinlerin sıcaklığa karşı dayanıksız olması, bilim insanlarını DNA'ya yönlendirmiştir (Ahmed, 2002). Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (EU-RL GMFF) onaylanan ve onaylanmayı bekleyen tipler için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu event-spesifik (tip belirleme) metotlarını protokol haline getirmiş ve açık kaynak olarak sunmaktadır. CRLVL01/09VP protokolü CV127 tipi için, CRLVL07/09VP protokolü ise MON87769 tipi için halka açık olarak yayımlanmıştır. Bu protokollere validasyon metotları denir. Çünkü bu metotların laboratuvarlar arası çalışmalarda uygulanması ve onaylanması gerekmektedir. Bu durum, hem Avrupa Birliği Referans Laboratuvarının güvenilirliğini artırmak hem de ülkemiz açısından bu metotların kullanılabilir olduğunu göstermek açısından önem arz etmektedir.

Yapılan deneyler, protokollerin sertifikalı referans materyallere uygulanmasını ve metotlar ile birbirine paralel sonuçları almayı kapsamaktadır. Protokollerin doğruluğu, güvenilirliği ve uygulanabilirliği konusunda validasyon çalışması büyük önem taşıdığı ortaya konmuştur. TÜRKLAB Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği'nin ve Ulusal Gıda Referans

Laboratuvar Müdürlüğünün bu protokol validasyonlarına önem vermesi, metotları GDO analizlerinde uygulaması, ayrıca çoklu tip belirleme PZR metotlarının gelişimlerini takip etmeleri gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında soyaya ait iki gen bölgesinde deneysel validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Her iki gen bölgesi (MON87769 ve CV127) için LOD 5 kopya sayısı olarak bulunmuştur. Tüm sertifikalı referans materyalleri ikişer tekrar olacak şekilde Eurofins GeneSpin yöntemi ile DNA izolasyonları yapılmıştır. Sonuçlar DNA saflığı ve konsantrasyonu yönünden değerlendirilmiştir. Konsantrasyon açısından değerlendirildiğinde Eurofins yönteminin izolasyon verimi valide olarak kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen veriler Avrupa Birliği Referans Laboratuvarının ortaya koyduğu protokolleri doğrulamaktadır.

Gün geçtikçe, genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretimi ve genetiği modifiye edilen türlerin sayısı artmaktadır. Yeni üretilen transgenik bitkiler, Avrupa Birliğinin ortak araştırma laboratuvarlarında henüz onaylanmamış veya tip belirleme analizleri yapılarak bir protokol çalışmasına tabi tutulmamış olabilir. Bu sebeple, piyasanın sıkı takip edilmesi, yeni üretilmiş genetiği değiştirilmiş organizmalar için GDO analiz protokollerinin ortaya konulması ve bunların açık erişime sunularak laboratuvarlar arası çalışmalar ile validasyonlarının yapılması şarttır. Yeni üretilen transgenik bitkilerin sertifikalı referans materyalleri de henüz hazırlanmamış ve satışa sunulmamış olma olasılığı yüksektir. Guertler ve diğerleri (2019) yaptıkları bir araştırmada 3 yonca eventi için tip belirleme PZR metodu geliştirmişler ve proje sırasında bu yonca tiplerinin sertifikalı referans materyali bulunmadığı için her üç tipin de hedef sekanslarını barındıran bir plazmit tasarlamışlardır.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında elde edilen veriler, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tip belirleme metotlarının GDO analizinde çok büyük önem arz ettiğini göstermektedir. Ayrıca, bu bulgular, ülkemizde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tip belirleme metotlarının uygulanabilir oluşunu göstermiş olup, bu metotların çoklu PZR yöntemlerinin geliştirilmesine de öncü olduğu ortaya çıkmıştır. Çoklu polimeraz zincir reaksiyonu metotlarının geliştirilmesi gümrük laboratuvarlarına hız kazandıracak, dolayısıyla zaman ve maliyet gibi konulardan kazanç sağlanacaktır. Ülkemizde geliştirilebilecek olan çoklu PZR metotları, gümrük ve limanlara kurulabilecek GDO analiz laboratuvarlarında uygulanarak ülkemize giren her türlü gıda, ilaç ve ürünlerin pratik olarak analizlerinin yapılmasına olanak sağlayacaktır. Ülkemize girmesi yasak olan GDO'lu gıda, ilaç ve ürünlerinin de böylece çok

daha kolay ve güvenilir bir şekilde kontrolleri yapılmış olacak ve böylece halkın insan ve hayvan sağlığı açısından endişeleri azalacaktır. İmkânlar doğrultusunda, Avrupa Birliği ortak araştırma laboratuvarlarının henüz protokolü bulunmayan transgenik bitkiler için ölkemizde yeni metotların geliştirilebileceğini göstermektedir. Hatta geliştirilen protokoller Avrupa Birliği ortak araştırma laboratuvarlarında denenerek açık erişime sunularak laboratuvarlar arası çalışmalar ile valide edilerek resmi metot olarak literatüre geçebilir.



KAYNAKLAR

- Acquaah, G. (2009). *Principles of Plant Genetics and Breeding*. John Wiley & Sons.
- Ahloowalia, B. S., & Maluszynski, M. (2001). Induced Mutations—A New Paradigm in Plant Breeding. *Euphytica*, 167-173.
- Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *TRENDS in Biotechnology*, 20(5), 215-223.
- AMIS. (2019). *AMIS Agricultural Management Information System Statistics*. <http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html#HOME>, [Ziyaret tarihi: 03.27.2019].
- Arioğlu, H. H. (1999). *Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı*. Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Arioğlu, H. H. (2000). *Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı*. Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Arioğlu, H. H. (2007). *Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı*. Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- ASA. (2008). *Soy Stats 2008*. St. Louis, Missouri: American Soybean Association.
- Bakırcı, Ç. M. (2016). *Evrin Kuramı ve Mekanizmaları*. Ginko Bilim.
- Barabaschi, D., Tondelli, A., Desiderio, F., Volante, A., Vaccino, P., Valè, G., & Cattivelli, L. (2016). Next Generation Breeding. *Plant Science*, 3-13.
- Barton, K. A., Binns, A. N., Matzke, A. J., & Chilton, M. D. (1983). Regeneration of Intact Tobacco Plants Containing Full Length Copies of Genetically Engineered T-DNA, and Transmission of T-DNA To R1 Progeny. *Cell*, 1033-1043.
- BASF. (2011). BASF Plant Science, L.P., Petition for the Determination of Nonregulated Status for Imidazolinone-tolerant Soybean BPS-CV127-9. *Submitted by J.M. Ligon, Research Triangle Park, NC*.

- Berg, P., Baltimore, D., Boyer, H. W., Cohen, S. N., Davis, R. W., Hogness, D. S., & Zinder, N. D. (1974). Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science*, 185(4148), 303.
- Bernard, R. L. (1973). Soybeans: Improvement, Production, and Uses. *Qualitative Genetics*.
- Brian, H. (1999). Unintended effects of Bt crops. *World Watch*, 12, 9-10.
- Bruening, G., & Lyons, J. (2000). The case of the FLAVR SAVR tomato. *California Agriculture*, 54(4), 6-7.
- Caprioara-Buda, M., Meyer, W., Jeynov, B., Corbisier, P., Trapmann, S., & Emons, H. (2012). Evaluation of plasmid and genomic DNA calibrants used for the quantification of genetically modified organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(1), 29-42.
- Cardona, T. J., Speelman, S., & Sanou, E. (2018). Farmers attitudes towards GMO crops: comparison of attitudes towards first and second generation crops in Burkina Faso.
- Center for Food Safety. (2019). *Food movement opposes "backroom deal" on gmo labeling*. <https://www.centerforfoodsafety.org/press-releases/4418/food-movement-opposes-backroom-deal-on-gmo-labeling>, [Ziyaret tarihi: 27 Nisan 2019].
- Chmielewski, J., Ochwanowska, E., Czarny-Działak, M., & Łuszczki, J. J. (2017). Genetically modified foods in the opinion of the second-year students of biology, biotechnology and tourism and recreation of the Jan Kochanowski University in Kielce—a preliminary study. *Ochrona Srodowiska i Zasobów Naturalnych*, 28(4), 56-62.
- Choi, W., Seol, M. A., Jo, B. H., Kim, I. R., & Lee, J. R. (2018). Development and application of a novel multiplex PCR method for four living modified soybeans. *Applied Biological Chemistry*, 61(6), 635-641.
- Codex Alimentarius Commission. (2003). Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. *CAC/GL*, 45(2003), 1-13.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240-3244.

- Committee on PCR Standards for the BioWatch Program. (2015). *BioWatch PCR Assays: Building Confidence, Ensuring*. Washington,: THE NATIONAL ACADEMIES PRESS.
- Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V., & Chuah, P. F. (2019). Two FAST multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food. *Food chemistry*, 274, 760-765.
- Crick, F. H., & Watson, J. D. (1954). The Complementary Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 223(1152), 80-96.
- Çetiner, S., & Tuzla, İ. (2005). Türkiye ve Dünyada Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvencesi:Sorunlar ve Öneriler.
- Delbrück, M. (1945). The Burst Size Distribution in the Growth of Bacterial Viruses (Bacteriophages). *Journal of Bacteriology*, 50(2), 131.
- Delbrück, M., & Bailey, W. T. (1946). Induced Mutations in Bacterial Viruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (Vol. 11, pp. 33-37).
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565.
- Doyle, J. J., & Persley, G. J. (1996). *Enabling The Safe Use of Biotechnology; Principles and Practice*. Enviromentally Sustainable development Studies and Monograph Series, (10).
- Dörries, H. H., Remus, I., Grönewald, A., Grönewald, C., & Berghof-Jäger, K. (2010). Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2043-2054.
- Eck, C. (2011). *Monsanto Petition (09-SY-2000U) for Determination of Non-Regulated of (MON 87769) Stearidonic Acid Soybean*. Riverdale, Maryland: APHIS.

- Eck, C. (2013). Monsanto Petition (11-202-01p) for Determination of Non-regulated Status of MON87712 Soybean.
- EFSA, P. (2011). Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal*, 9(5), 2150.
- Elenis, D. S., Kalogianni, D. P., Glynou, K., Ioannou, P. C., & Christopoulos, T. K. (2008). Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(3), 347-354.
- El-Shemy, H. A., Khalafalla, M. M., Fujita, K., & Ishimoto, M. (2007). Improvement of protein quality in transgenic soybean plants. *Biologia plantarum*, 51(2), 277-284.
- Eriksson, D. (2019). The evolving EU regulatory framework for precision breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3): 569-573.
- EU, E. P. (2003a). On genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union*.
- EU, E. P. (2003b). Concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending. *Official Journal of the European Union*.
- European Commission. (2019). *European Customs Laboratories - Taxation and Customs Union*. https://ec.europa.eu/taxation_customs/business/customs-controls/eu-customs-laboratories_en#heading_1, [Ziyaret Tarihi: 10 Mayıs 2019].
- Fischer, R. A. (1936). Has Mendel's work been rediscovered? *Annals of science*, 115-137.
- Flachowsky, G., Schafft, H., & Meyer, U. (2012). Animal feeding studies for nutritional and safety assessments of feeds from genetically modified plants: A review. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 7(3), 179-194.
- Frewer, L. J., Scholderer, J., & Bredahl, L. (2003). Communicating about the risks and benefits of genetically modified foods: The mediating role of trust. *Risk Analysis: An International Journal*, 23(6), 1117-1133.

- Fuentes, M. S., Sineli, P. E., Pons, S., de LeBlanc, A. M., Benimeli, C. S., Hill, R. T., & Cuozzo, S. A. (2018). Study of the removal of a pesticides mixture by a *Streptomyces* strain and their effect on the cytotoxicity of treated systems. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(6), 6836-6843.
- Garcia-Alonso, M. (2013). Safety assessment of food and feed derived from GM crops: using problem formulation to ensure “fit for purpose” risk assessments. *Collect Biosafety Rev*, 8(2013), 72-101.
- Gartland, K., Magni, M. V., Gahan, P., & Deeni, Y. (2015). *Current Applications of Biotechnology*. M. Dündar, & F. Bruschi (Eds.). Erciyes University.
- Germana, M. A. (2011). Gametic Embryogenesis and Haploid Technology As Valuable Support To Plant Breeding. *Plant Cell Reports*, 839-857.
- Glimelius, K. (1988). Potentials of Protoplast Fusion in Plant Breeding Programmes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 163-172.
- Global Knowledge Center on Crop Biotechnology. (2017). Pocked of Knowledge No. 54 Plant Breeding Innovation: CRISPR-Cas9.
- Global Knowledge Center on Crop Biotechnology. (2017). Pockets of Knowledge No. 53 Anti-Allergy Biotech Crops.
- Goodman, R. E., Vieths, S., Sampson, H. A., Hill, D., Ebisawa, M., Taylor, S. L., & Van Ree, R. (2008). Allergenicity assessment of genetically modified crops—what makes sense? *Nature biotechnology*, 26(1), 73.
- Gray, A. (2012). Problem formulation in environmental risk assessment for genetically modified crops: a practitioner’s approach. *Collection of biosafety reviews*, 6, 10-65.
- Grohmann, L., Belter, A., Speck, B., Goerlich, O., Guertler, P., Angers-Loustau, A., & Patak, A. (2017). Screening for six genetically modified soybean lines by an event-specific multiplex PCR method: Collaborative trial validation of a novel approach for GMO detection. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12(1), 23-36.

- Guertler, P., Grohmann, L., Naumann, H., Pavlovic, M., & Busch, U. (2019). Development of event-specific qPCR detection methods for genetically modified alfalfa events J101, J163 and KK179. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17, 100076.
- Halvorson, H. O. (1977). DNA and the Law. *S. Cal. L. Rev*, 51, 1167.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., & Schell, J. (1983). Expression of Chimaeric Genes Transferred Into Plant Cells Using a Ti-plasmid-derived Vector. *Nature*, 209.
- Hershey, A. D., & Rotman, R. (1948). Linkage Among Genes Controlling Inhibition of Lysis in a Bacterial Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 34(3), 89.
- Ho, P. (1969). The Loess and The Origin of Chinese Agriculture. *The American Historical Review*, 1-36.
- Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Løvseth, A., & Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(8), 985-993.
- Hougs, L., Gatto, F., Goerlich, O., Grohmann, L., Lieske, K., Mazzara, M., . . . Žel, J. (2017). *Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods*. Ispra (VA) - Italy: ENGL working group on “Method Verification” of the joint research centre of the European Commission Luxembourg: JRC Scientific and Technical Reports Publications Office of the European Union.
- Hübner, P., Waiblinger, H. U., Pietsch, K., & Brodmann, P. (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International*, 84(6), 1855-1864.
- Hymowitz, T. (1970). On The Domestication of The Soybean. *Economic Botany*, 408-421.
- Hymowitz, T., & Harlan, J. R. (1983). Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765. *Economic Botany*, 371-379.

- Hymowitz, T., & Singh, R. J. (1987). Taxonomy and Speciation. *Soybean Monograph, Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 23-48.
- ISAAA. (2019). *GM Approval Database | GMO Database | GM Crop Approvals*. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>, [Ziyaret tarihi: 10 Mayıs 2019].
- ISAAA. (2017). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech. *ISAAA Brief No. 53*. ISAAA.
- Jacquin, N. J. (1781). *Icones plantarum rariorum*. Vindobonae :||Londini :||Lugduni Batavorum :||Argentorati : C.F. Wappler ;||B. White et filium ;||S. et J. Luchtman :||A. Ko?nig.
- James, C. (2007). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops*. New York, Ithaca: ISAAA.
- Kamle, S., & Ali, S. (2013). Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues. *Gene*, 522(2), 123-132.
- Köseoğlu, K. E. (2018). *Bornova İkinci Ürün Koşullarında Bazı Soya Genotiplerinin Verim, Agronomik ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi*. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kulaç, İ., Ağirdil, Y., & Yakın, M. (2006). Sofralarımızdaki Tatlı Dert, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31 (3): 151-155.
- Kurenbach, B., Hill, A. M., Godsoe, W., van Hamelsveld, S., & Heinemann, J. A. (2018). Agrichemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution. *PeerJ*, 6, e5801.
- Lievens, A., Petrillo, M., Querci, M., & Patak, A. (2015). Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 159-176.
- Lin, C. H., & Pan, T. M. (2016). Perspectives on genetically modified crops and food detection. *journal of food and drug analysis*, 24(1), 1-8.

- Louda, S. M. (1999). Insect Limitation of weedy plants and its ecological implications. *Faculty Publications in the Biological Sciences*, 91.
- Macdonald, P. (2012). Developing workable regulatory frameworks for the environmental release of transgenic plants. *Collection of biosafety reviews*, 6(33).
- Mallory-Smith, C., & Zapiola, M. (2008). Gene flow from glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(4), 428-440.
- Mazzara, M., Charles-Delobel, C., Pinski, G., Savini, C., & Van den Eede, G. (2012). Event-specific method for the quantification of soybean MON87769 using real-time PCR-validation report and validated method. *JRC Sci Tech Res Rep*.
- Meng, Y., Liu, X., Wang, S., Zhang, D., & Yang, L. (2011). Applicability of plasmid calibrant pTC1507 in quantification of TC1507 maize: an interlaboratory study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 23-28.
- Meselson, M. (1964). On the Mechanism of Genetic Recombination Between DNA Molecules. *Journal of Molecular Biology*, 734-745.
- Meselson, M., & Weigle, J. J. (1961). Chromosome Breakage Accompanying Genetic Recombination in Bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(6), 857.
- Moose, S. P., & Mumm, R. H. (2008). Molecular Plant Breeding As the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*, 969-977.
- Mutlu, Ş. (2016). *Piyasada Satışa Sunulan Cips ve Gevreklerde GDO Varlığının Araştırılması*. Tekirdağ: Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A., & Bush, R. K. (1996). Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New England Journal of Medicine*, 334(11), 688-692.
- OECD. (2000). Consensus Document on the Biology of Glycine max (L.) Merr. (Soybean). *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology EV/JM/MONO*, 1-20.

- OECD/FAO. (2018). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027*. OECD Agriculture Statistics (Database).
- Özbağ, N. (2018). *Turkey Agricultural Biotechnology Annual Report 2018*. USDA Foreign Agricultural Service - Global Agricultural Information Network.
- Papadopoulou, N., & Ramon, M. (2018). Risk assessment of new sequencing information for genetically modified soybean BPS-CV 127-9. *EFSA Journal*, 16(9), e05425.
- Parsley, G. J. (1990). *Beyond Mendel's Garden: Biotechnology in the Service of World Agriculture*. CAB International.
- Rapes, C. D., Kramer, P. J., & Wilcox, J. R. (1987). Soybeans: Improvement, Production and Uses. *Stress Physiology, 2nd Edition, Agron. Monogr*, 16, 589-641.
- Rhonda, M., & Mannion, B. S. (2010). *Petition for the Determination of Nonregulated Status for Dicamba-Tolerant Soybean*. St. Louis, Missouri: Monsanto Company.
- Richter, L. J., Thanavala, Y., Arntzen, C. J., & Mason, H. S. (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature biotechnology*, 18(11), 1167.
- Rood, T. A. (2006). *Petition for the Determination of Nonregulated Status for Herbicide Tolerant 356043 Soybean*.
- Ruffell, D. (2018). The EU Court of Justice Extends The GMO Directive to Gene-edited Organisms. *FEBS letters*, 592(22), 3653-3657.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The Polyploidy and Its Key Role in Plant Breeding. *Planta*, 281-296.
- Savini, C., Mazzara, M., Pinski, G., & Van den Eede, G. (2011). Event-specific method for the quantification of soybean CV127 using real-time PCR—validation report and protocol. *JRC Sci Tech Res Rep*.
- Schauzu, M. (2000). The concept of substantial equivalence in safety assessment of foods derived from genetically modified organisms. *AgBiotechNet*, 2(044), 1-4.

- Singer, M., & Soll, D. (1973). Guidelines for DNA Hybrid Molecules. *Science*, 181(4105), 1114.
- Smith, K. J., & Huyser, W. (1987). World Distribution and Significance of Soybean. *Agronomy*.
- Smýkal, P., Varshney, R. K., Singh, V. K., Coyne, C. J., Domoney, C., Kejnovský, E., & Warkentin, T. (2016). From Mendel's Discovery on Pea to Today's Plant Genetics and Breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 2267-2280.
- Snow, A. A., & Palma, P. M. (1997). Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience*, 47(2), 86-96.
- Stein, A. J., & Rodríguez-Cerezo, E. (2010). International trade and the global pipeline of new GM crops. *Nature Biotechnology*, 28(1), 23.
- Steinbrecher, R. A. (1996). From green to gene revolution. The environmental risks of genetically engineered crops. *Ecologist*.
- T.C. Ticaret Bakanlığı. (2019). *GTB - Laboratuvar Raporlama. Beyanname Sorgulama ve Belge Yükleme Ekranı*.
<https://uygulama.gtb.gov.tr/LaraTahsilSorgulama/Ekranlar/Index.aspx>, [Ziyaret tarihi: 10 Mayıs 2019].
- T.C. Ticaret Bakanlığı. (2019). *İthalatta Denetimi Gerçekleştirilen Ürün Grupları*.
<https://www.ticaret.gov.tr/urun-guvenligi/ithalatta-urun-guvenligi-denetimleri-ve-tareks/ithalatta-denetimi-gerceklestirilen-urun-gruplari>, [Ziyaret tarihi: 10 Mayıs 2019].
- TeKrony, D. M., Egli, D. B., & White, G. M. (1987). Seed Production and Technology. *Soybeans: improvement, production and uses*, 295-353.
- Tengs, T., Kristoffersen, A. B., Berdal, K. G., Thorstensen, T., Butenko, M. A., Nesvold, H., & Holst-Jensen, A. (2007). Microarray-based method for detection of unknown genetic modifications. *BMC biotechnology*, 7(1), 91.
- TIME. (1982). Artificial Genes: Biotech Comes to the Drugstore. *TIME*.

- Tuğrul, T. C. (2016). *Using PLasmid Reference Materials for Genetically Modified Organisms Analysis and Their Verification with Inter-laboratory Comparison Test*. Ankara: Yüksek Lisans, Middle East Technical University.
- TÜİK. (2019). *Yağlı Tohumlar, 1988-2018*. Türkiye İstatistik Kurumu.
- Uzogara, S. G. (2000). The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. *Biotechnology advances*, 18(3), 179-206.
- Worldometers. (2019). *Worldometers - Real Time World Statistic*. <http://www.worldometers.info>, [Ziyaret tarihi: 27 Mart 2019].
- Zhu, Q. (2009). *Petition for the Determination of Non-Regulated Status for MON 87701*. St. Louis, Missouri: Monsanto Company.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Barbaros Mülayim
Doğum Yeri	Bakırköy
Doğum Tarihi	16.03.1991
Uyruğu	⑨ T.C. ⑨ Diğer:
Telefon	+905067797122
E-Posta Adresi	barbarosmulayim@yandex.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	20.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Program Adı	

Makale ve Bildiriler	