

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysun TURHAN

**SOYA VE MISIRDA GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ÜRÜNLERİN
BELİRLENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SOYA VE MISIRDA GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ÜRÜNLERİN
BELİRLENMESİ**

Aysun TURHAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Yıl: 2008, Sayfa: 52

Jüri : Prof. Dr. Salih KAFKAS

Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Doç. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Bu çalışmada, ithal olarak temin edilen ve bölgemizde yetiştirilen soya ve mısır tohumları ile değişik marketlerden toplanan gıda ürünlerinde genetiği değiştirilmiş organizmaların kalitatif olarak PCR analizleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. DNA izolasyonları 45'i ithal ve 17'si bölgemizde yetiştirilen mısır çeşitlerine ait tohumlar olmak üzere toplam 62 mısır tohumu örneği ile 30'u ithal, 8'i bölgemizde yetiştirilen soya çeşitlerine ait tohumlar olmak üzere toplam 38 soya örneğinde ve 7 çeşit gıda ürününde 3 farklı izolasyon metodu (Wizard-promega food kit, Nucleospin food kit ve CTAB metodu) kullanılarak, en iyi izolasyon yöntemini belirlemek için yapılmıştır. Yapılan DNA izolasyonu sonuçlarına göre, en iyi sonucu Nucleospin food kit vermiştir. DNA'sı elde edilen gıda örneklerinde lektin/zein geninin PCR amplifikasyonunda, bir örneğin zein geni, iki örneğin ise lektin geni içerdiği belirlenmiştir. Daha sonra tüm örneklerde 35S promotör ve Nos terminatör taraması yapılarak pozitif sonuç veren örneklerde nested PCR ile spesifik GDO belirleme yapılmıştır. Tarama sonucunda gıda ürünlerinin ve yerel mısır ve soya tohum örneklerinin GDO içermediği, ithal soya ve mısır örneklerinin hepsinin de transgenik olduğu belirlenmiştir. Nested-PCR sonuçlarına göre, ithal soya örneklerinde Roundup Ready soya belirlenirken, ithal mısır örneklerinin tümü Bt11 içermiştir. Ayrıca, ithal mısır örneklerinin 5 tanesinin Bt11 ile birlikte MON810 ve iki tanesinin de Bt176 da içerdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, ithal edilen soya örneklerinin genetiği değiştirilmiş olduğu ve mutlaka gümrüklerde kontrollerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Genetiği değiştirilmiş organizma (GDO), Roundup Ready soya, MON810, Bt11, Bt176.

ABSTRACT

MSc THESIS

DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN AND MAIZE

Aysun TURHAN

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA**

Supervisor: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Year: 2008, Page: 52

Jury : Prof. Dr. Salih KAFKAS

Assoc. Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

Assoc. Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

In this study, It was aimed to analyze genetically modified organisms qualitatively by PCR analysis in imported and local soy and maize seeds, and in foodstuffs collected from different markets. DNA extractions were performed in 45 imported and 17 local maize seeds (totally 62) with 30 imported and 8 local soy seeds (totally 38), and in 7 foodstuffs using three different methods (Wizard-promega food kit, Nucleospin food kit and CTAB method), to determine the best method for each product. According to the DNA isolation results, Nucleospin food kit gave the best results. In the PCR analysis of lectin/zein gene amplification in foodstuffs, one sample included zein gene, whereas two samples contained lectin gene. Further PCR analysis included 35S promotor and Nos terminator screening and then nested PCR analysis in positive samples. As a consequence of the screening, foodstuffs and local seeds did not contained genetically modified organisms, whereas all imported soy and maize seeds were transgenic. The nested PCR analysis resulted that all imported soy seed samples contained Roundup Ready, whereas all imported maize seed samples contained Bt11. Moreover, five maize samples amplified MON810 and two of them amplified Bt176 with Bt11 as well. As a result of this study, all the imported soy and maize seed samples were genetically modified, and there has to be controls in the customs of Turkey.

Key words: Genetically modified organisms (GMO), Roundup Ready soy, MON810, Bt11, Bt176.

TEŞEKKÜR

Tez konumu vererek beni araştırmaya teşvik eden, tez çalışmam süresince bilgisini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Salih KAFKAS'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Zir. Yük. Müh. ve Doktora öğrencisi Yıldız DOĞAN'a, Yüksek Lisans öğrencileri Serap GÜNAYDIN ve Burcu ÖZCAN'a yürekten teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman her konuda yanımda olan ve çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli ve çok sevdiğim babam Seyfettin TURHAN'a, annem Selma TURHAN'a, kardeşlerim Samet ve İsa TURHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR	X
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve METOD.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Metod.....	15
3.2.1. DNA İzolasyonu	15
3.2.1.1. Wizard -Promega Protokolüne Göre DNA İzolasyonu.....	15
3.2.1.2. Nucleospin Protokolüne Göre DNA İzolasyonu	16
3.2.1.3 CTAB Metodu	17
3.2.1.4 Standart Materyallerde DNA İzolasyonu	18
3.2.2. DNA Miktarı Belirlenmesi ve DNA Konsantrasyonunun PCR Reaksiyonu için Hazırlanması	18
3.2.3. DNA İzolasyonu Yapılan Örneklerde Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Belirlenmesi.....	19
3.2.3.1. Soya–Mısır DNA Taraması	19
3.2.3.2. GDO Tarama (screening) Aşaması	21
3.2.3.3. GDO- Spesifik Belirleme Aşaması	23
3.2.3.3.(1). Roundup Ready Soyanın Belirlenmesi.....	23
3.2.3.3.(2). MON810 Mısırın Belirlenmesi	25
3.2.3.3.(3). Bt176 Mısırın Belirlenmesi	27
3.2.3.3.(4). Bt11 Mısırın Belirlenmesi	28
3.2.4. PCR Aşamalarında Kullanılacak Kontrol DNA'ları	31

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	32
4.1 Soya, Mısır ve Gıda Ürünlerinde DNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması	32
4.1.1. Soya Örneklerinde DNA İzolasyonu	32
4.1.2. Mısır Örneklerinde DNA İzolasyonu	32
4.1.3. Gıda Ürünlerinde DNA İzolasyonu	33
4.2. DNA İzolasyonu Yapılan Örneklerde Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Belirlenmesi.....	35
4.2.1. Lektin ve Zein Geni Amplifikasyonu ile GDO Taraması.....	35
4.2.2. Örneklerin 35S Promotör ve Nos Terminatör ile Taranması.....	36
4.3. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalarda Spesifik Belirleme Aşaması.....	39
4.3.1. Soya Örneklerinde Roundup Ready Soyanın Belirlenmesi.....	39
4.3.2. Mısır Örneklerinde MON810 Mısırın Belirlenmesi	40
4.3.3. Mısır Örneklerinde Bt 176 Mısırın Belirlenmesi	41
4.3.4. Mısır Örneklerinde Bt11 Mısırın Belirlenmesi.....	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Eklenen özelliğe göre transgenik bitkilerin dünya genelinde ekiliş alanları, milyon hektar	3
Çizelge 3.1.	Soya DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları.....	19
Çizelge 3.2.	Soya DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları.....	20
Çizelge 3.3.	Mısır DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları.....	20
Çizelge 3.4.	Mısır DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları.....	20
Çizelge 3.5.	Soya ve Mısır taramasında kullanılan primerler	21
Çizelge 3.6.	35sPF/R promotörü amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları.....	21
Çizelge 3.7.	35sPF/R promotörü amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları	22
Çizelge 3.8.	Nos terminatörü amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları	22
Çizelge 3.9.	Nos terminatörü amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları	22
Çizelge 3.10.	35S promotor ve Nos terminatör taranmasında kullanılan primerler	23
Çizelge 3.11.	Roundup Ready soyanın (GMO5/GMO9) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR reaksiyon koşulları	24
Çizelge 3.12.	Roundup Ready soyanın (GMO5/GMO9) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR döngü koşulları	24
Çizelge 3.13.	Roundup Ready soyanın (GMO7/GMO8) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR reaksiyon koşulları	24
Çizelge 3.14.	Roundup Ready soyanın (GMO7/GMO8) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR döngü koşulları	25

Çizelge 3.15.	MON810 (mg1/mg2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR aşaması reaksiyon koşulları	25
Çizelge 3.16.	MON810 (mg1/mg2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR döngü koşulları	26
Çizelge 3.17.	MON810 (mg3/mg4) amplifikasyonu için kullanılan Nested 2 PCR aşaması reaksiyon koşulları	26
Çizelge 3.18.	MON810 (mg3/mg4) amplifikasyonu için kullanılan Nested 2 PCR döngü koşulları	26
Çizelge 3.19.	Bt176 (CRYIA1/CRYIA2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR reaksiyon koşulları	27
Çizelge 3.20.	Bt176 (CRYIA1/CRYIA2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR döngü koşulları	27
Çizelge 3.21.	Bt176 (CRYIA3/CRYIA4) amplifikasyonunda kullanılmış olan Nested 2 PCR reaksiyon koşulları	28
Çizelge 3.22.	Bt176 (CRYIA3/CRYIA4) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR döngü koşulları.....	28
Çizelge 3.23.	Bt11 (11Bt3/11Bt4) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR reaksiyon koşulları.....	29
Çizelge 3.24.	Bt11 (11Bt3/11Bt4) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR döngü koşulları.....	29
Çizelge 3.25.	Bt11 (11Bt1/11Bt2) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR reaksiyon koşulları	29
Çizelge 3.26.	Bt11 (11Bt1/11Bt2) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR döngü koşulları	30
Çizelge 3.27.	GDO spesifik belirleme aşamasında nested 1-2 PCR analizlerinde kullanılmış olan primer çiftleri	30
Çizelge 4.1.	Soya ve mısır içeren gıda ürünlerindeki DNA izolasyon sonuçları.....	33

Şekil 1.1.	GDO belirleme aşamaları	5
Şekil 4.1.	Bazı soya ve mısır tohumu örneklerinin DNA miktarları. Sırası ile; 1. lamda 25 ng, 2. lamda 50 ng, 3. lamda 100 ng, 4. lamda 200 ng, 5.,8.,9. farklı ithal soya tohumu örnekleri, 6-18 arası farklı ithal mısır tohumu örnekleri.....	32
Şekil 4.2.	Üç farklı yöntemle gıdalarda yapılan DNA izolasyonu. 1. lamda 25 ng, 2-9 arası örnekler Wizard metoduyla, 10-16 arası örnekler Nucleospin metoduyla 17-19 arası örnekler CTAB metoduyla yapılan örneklerdir. 2, 10, 17 nolu örnekler mısır unu, 3 ve 11 nolu örnekler nişasta, 4, 12 ve 18 nolu örnekler soya unu, 5, 6, 13 ve 14 nolu örnekler bisküvi, 7, 8, 15 ve 16 nolu örnekler mısır gevreği, 9 ve 19 nolu örnekler mısır tohumu.....	33
Şekil 4.3.	Gıda örneklerindeki 118 bç'lik lektin geni amplifikasyonunun jel görüntüsü MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. mısır unu, 2. soya unu, 3. bisküvi, 4. bisküvi, 5. kek, 6. soya unu.....	36
Şekil 4.4.	Gıda örneklerindeki 277 bç'lik zein geni amplifikasyonunun jel görüntüsü MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. mısır unu, 2. soya unu, 3. bisküvi, 4. bisküvi, 5. kek, 6. soya unu.....	36
Şekil 4.5.	İthal soya tohumu örneklerinde 35S promotör ile yapılmış olan 143 baz çiftlik PCR taramasının jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. Kontrol: saf su, 2. Negatif kontrol: %0 RR, 3. Pozitif kontrol: %0.5 RR, 4-13 arası ithal soya tohumu örnekleri.....	37
Şekil 4.6.	Mısır tohumu örneklerinde 35S promotör ile yapılmış olan 143 baz çiftlik PCR taramasının jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. Kontrol: saf su, 2. Negatif kontrol: %0 Bt11, 3. Pozitif kontrol: %0.5 Bt11, 4-19 arası ithal mısır tohumu örnekleri.....	37

Şekil 4.7.	İthal soya tohumu örneklerinde Nos terminatör ile yapılmış olan 180 baz çiftlik PCR taramasının jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. Kontrol saf su, 2. %0 RR Negatif kontrol, 3. %0.5 RR Pozitif kontrol, 4-11 arası ithal soya tohumu örnekleri.....	38
Şekil 4.8.	Soya tohumu örneklerinde RR soyanın belirlenmesi için yapılan 169 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. Kontrol: saf su, 2. Negatif kontrol: %0 RR, 3. Pozitif kontrol: %0.1 RR, 4-13 arası ithal soya tohumu örnekleri.....	39
Şekil 4.9.	Mısır tohumu örneklerinde MON810'un belirlenmesi için yapılmış olan 149 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık 1. Kontrol: saf su, 2. Pozitif kontrol: %0.1 MON810, 3. Negatif kontrol: %0 MON810, 4-19 arası ithal mısır tohumu örnekleri.....	41
Şekil 4.10.	Mısır tohumu örneklerinde Bt176'nın belirlenmesi için yapılmış olan 189 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. Kontrol: saf su, 2. Negatif kontrol: %0 Bt176, 3. Pozitif kontrol %0.1 Bt176, 4-23 arası ithal mısır tohumu örnekleri.....	41
Şekil 4.11.	Mısır tohumu örneklerinde Bt11'in belirlenmesi için yapılmış olan 199 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. MA: 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, 1. Kontrol: saf su, 2. Negatif kontrol: %0 Bt11, 3. Pozitif kontrol %0.1 Bt11, 4-19 arası ithal mısır tohumu örnekleri.....	42

SİMGELER ve KISALTMALAR

bç	:	Baz çifti
CTAB	:	Setil Trimetil Amonyum Bromit
dk	:	Dakika
dATP	:	Deoksi Adenozin Trifosfat
dCTP	:	Deoksi Sitidin Trifosfat
dGTP	:	Deoksi Guanozin Trifosfat
dTTP	:	Deoksi Timidin Trifosfat
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetikasit
GM	:	Genetically Modified
g	:	Santrifüj rotor hızı
IRMM	:	Inst. for Reference Materials and Measurements
HCl	:	Hidroklorik asit
M	:	Molar
MA	:	Moleküler ağırlık
mg	:	Miligram
MgCl ₂	:	Magnezyum Klorür
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
NaCl	:	Sodyum Klorür
ng	:	Nanogram
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNase A	:	Ribonuclease A
Taq	:	Thermus Aquaticus
TBE	:	Tris/ Borat/ EDTA (Tampon Çözeltisi)
TE	:	Tris-EDTA
Tris	:	Tris (Hidroksil Metil) Aminometan
Tris HCl	:	Tris Hidroklorür
UV	:	Ultraviolet
µM	:	Mikromolar

μl : Mikrolitre
 λDNA : Lambda Deoksiribonükleik Asit

1.GİRİŞ

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), biyoteknolojik yöntemlerle canlıların sahip olduğu gen dizilimleriyle oynanarak, mevcut özelliklerinin değiştirilmesi veya canlılara yeni özellikler kazandırılması ile elde edilen organizmalara verilen isimdir **(Kulaç ve ark., 2006)**.

Genetiği değiştirilmiş organizmalar kısaca "GDO" olarak isimlendirilir ve kelime anlamı olarak gen aktarımlı ürünler demektir. Örneğin, bir bitki çeşidinin herhangi bir hastalık veya zararlıya karşı dayanıksızlığı söz konusuysa, gen aktarım teknolojisi ile istenen gene sahip bir mikroorganizma, bitki hatta hayvandan o geni alıp, üzerinde çalışılan bitkiye aktararak daha dayanıklı yeni çeşitler elde edilebilir. Zararlılarla mücadele dışında, ürünün tadını ve görünümünü değiştirmek, taşıma ve depolamaya uygunluğunu arttırmak, besin değerini arttırmak amacıyla da gen transferi işlemi uygulanmaktadır.

Biyoteknoloji alanında dünyada son yirmi yılda yapılan uygulama ve araştırma konularına göz atıldığında, özellikle sağlık, tarım, gıda sektörleri ile kimyasalların çevreye verdiği zararın giderilmesi için kullanıldığı görülmektedir **(Erzincanlı, 2006)**. Çeşitli araştırmacılar tarafından; ürünlerde verimliliği sağlama, böceklerle karşı dayanıklılık oluşturma veya pazarda raf ömrünü uzatma amacıyla bazı bitkilerde genetik değişiklikler yapılmaktadır.

Tarımda en çok üzerinde çalışılan özellikler, hastalıklara ve zararlılara karşı, yabancı ot ilaçlarına karşı dayanıklılık, meyve olgunlaşma sürecinin değiştirilmesi, raf ve depolama ömrünün uzatılması ve aromanın artırılmasıdır. Bu teknolojinin en fazla kullanıldığı bitkiler; mısır, soya fasulyesi, domates, patates, pamuk, tütün ve kolzadır.

2006 yılı verilerine göre, bu alanda en fazla üretim yapan ülkelerden ABD 54.6 milyon hektar ile ilk sırayı alırken, bunu Arjantin (18 milyon ha), Brezilya (11.5 milyon ha), Kanada (6.1 milyon ha), Hindistan (3.8 milyon ha), Çin (3.5 milyon ha), Paraguay (2 milyon ha) ve Kuzey Afrika (1.4 milyon ha) izlemiştir **(Anonim, 2006)**. 2008 yılı verilerine göre GDO'lu ürünlerin üretiminin yapıldığı tarım alanları toplam 114 milyon hektarı bulmuştur. Dünyada bu tarımı gerçekleştiren çiftçi sayısı ise 12 milyona ulaşmıştır **(Anonim, 2008a)**.

Son beş yılda bu tür ürünlerin yetiştirildiği alan 25 kat artmıştır. Dünyadaki tüm genetik ürünlerin yüzde 68'ini ABD üretmektedir. ABD'nin gıda ve ilaç denetiminden sorumlu FDA'nın (Food and Drug Administration) verilerine göre, 40'tan fazla ürünün genetik yapısı üzerinde yapılan deneyler tamamlanmış ve bu ürünlere patent alınmıştır. En çok patent alınan ürünler, soya fasulyesi, mısır, domates, şekerpancarı ve pamuktur. Dünyadaki genetiği değiştirilmiş ürünlerin toplam üretiminin yüzde 82'sini soya fasulyesi ve mısır oluşturmaktadır (**Anonim, 2008b**).

Ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki çeşitlerinin ekimi, dikimi, üretimi ve ithalatı kanunen yasaktır. Ancak bu konuyla ilgili kesin olarak bir yasa bulunmazken 26 Haziran 2007'de TBMM tarafından kabul edilen Biyoçeşitlilik Sözleşmesi ve eki niteliğindeki Cartagena Biyogüvenlik Protokolü mevcuttur. Özellikle mısır ve soyada ülkemizin yurt dışından bu ürünleri aldığı ülkelere bakacak olursak, soyanın %90 ve mısırın %80 oranında ABD ve Arjantin kaynaklı olduğunu görebiliriz. Bu nedenle ABD ve Arjantin'den ithal edilen soya ve mısırın genetiği değiştirilmiş olma ihtimali oldukça yüksektir. Nitekim Amerikan Soya Derneği Direktörü Kimball Nill 26 Nisan 2007 tarihinde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesinde vermiş olduğu seminerde ABD'nin 2006 yılında Türkiye'ye 1.3 milyon ton transgenik soya ihraç ettiğini, bunun büyük oranda tohum, 200.000 tonun ise küspe olduğunu ifade etmiştir. Aynı zamanda ABD'nin 2007 yılının ilk üç ayında Türkiye'ye transgenik mısır da ihraç ettiğini ifade etmişlerdir. Ancak Türkiye'de bu ürünlerin gümrüklerde testi yapılmadığından, ithal edilen bu ürünler kontrolsüz olarak ülkemize girebilmektedir. 2007 Nisan ayında Arjantin'den ithal edilen 40 bin ton mısır Bandırma limanına gelmiştir. Gelen mısırlar üzerinde yapılan analizler sonucunda ithal edilen mısırın GDO'lu olduğu anlaşılmıştır. Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürü gelen mısırın GDO'lu olduğu ve bu tür mısırın ülke içine girişini yasaklayan bir mevzuat olmadığını belirtmiştir (**Anonim, 2008c**).

Mısırın 700, soyanın ise 900 çeşit gıda maddesi içinde kullanıldığı (**Ölçü, 2005**) düşünüldüğünde, GDO içeren gıdaların dolaylı tüketim miktarının önemi daha da iyi anlaşılabacaktır. Mısır ve soyadan üretilen yağ, un, nişasta, glikoz şurubu, sakkaroz, fruktoz içeren gıdalar günlük tüketim maddeleri arasında yer almaktadır.

Örneğin, bisküvi, kraker, pudingler, bitkisel yağlar, bebek mamaları, şekerlemeler, çikolata ve gofretler, hazır çorbalar, mısır ve soya yem olarak tüketen tavuk ve benzeri hayvanlardan elde edilen gıdalar ve pamuk GDO'lu olma riski taşıyanların başında gelmektedir. Aşağıdaki **Çizelge 1.1**'de eklenen özelliğe göre transgenik bitkilerin dünya genelinde ekiliş alanları verilmiştir.

Çizelge 1.1. Eklenen özelliğe göre transgenik bitkilerin dünya genelinde ekiliş alanları (milyon hektar; James, 2005)

Yıllar	EKLENEN ÖZELLİK				
	Herbisit toleranslı	Böceğe dayanıklı	Böceğe dayanıklı ve herbisit toleranslı	Diğer	Toplam
1996	0.6	1.1	--	<0.1	1.7
1997	6.9	4.0	<0.1	<0.1	11.0
1998	19.8	7.7	0.3	<0.1	27.8
1999	28.1	8.9	2.9	<0.1	39.9
2000	32.7	8.3	3.2	<0.1	44.2
2001	40.6	7.8	4.2	<0.1	52.6
2002	44.2	10.1	4.4	<0.1	58.7
2003	49.7	12.2	5.8	<0.1	67.7
2004	58.6	15.6	6.8	<0.1	81.0
2005	63.7	16.2	10.1	<0.1	90.0
2005' de pay	% 70,8	% 18.0	% 11,2	-	-

Çizelge 1.1'de anlaşılabacağı gibi 1996 yılında transgenik bitkiler tam olarak yayılmamışken, 2005 yılı da dâhil olmak üzere her yıl giderek artan bir ekim alanına sahip olmuşlardır.

GDO ürünlerine aktarılan özellikleri 3 grup altında topladığımız zaman genel olarak en fazla aktarılan özelliğin herbisite toleranslılık (%59) olduğunu görmekteyiz. %28 oranında böcek ve virüse dayanıklılık özelliği kazandırılan ürünler olduğu halde kaliteye yönelik özelliklerin aktarılması %13 gibi düşük bir seviyede kalmıştır (**Erzincanlı, 2006**). Ülkemizde de bu alanda sınırlı da olsa önemli çalışmalar yapılmaktadır. Dünyada Aralık 2006 tarihine kadar 26 özel şirket ve kurumun, 21 bitki türünde, yoğun olarak mısır (39), pamuk (19) ve kanolada (15) olmak üzere 121 genetiği değiştirilmiş çeşit geliştirdiği saptanmıştır (**Erzincanlı, 2006**).

Bugün Türkiye'de özellikle ithal edilen genetiği değiştirilmiş soya ve mısır ürünleri tartışılırken, birkaç yıl sonra birçok türde (pamuk, kolza, domates, çilek v.b)

ortaya çıkarılacak genetiği değiştirilmiş çeşitler gündemde yerini alacaktır. Hatta yine birkaç yıl sonra genetiği değiştirilmiş hayvanlar söz konusu olacaktır. Bu nedenle ülkemizde daha büyük sorunlarla karşı karşıya kalmadan mutlaka gerekli yasal düzenlemelerin yapılması, ithal edilen ve GDO olma ihtimali olan ürünlerin belirlenmesi, belirlenen bu ürünlerin ülkemize girerken kontrolünün yapılması ve GDO'lu ürünlerin etiketlenmesi gerekir.

Günümüzde genetiği değiştirilmiş ürünlerin yetiştiricilikte, insan ve hayvan beslenmesinde kullanımları ile ilgili çok sayıda negatif ve pozitif bilimsel yaklaşımlar mevcuttur. Buna göre, GDO'ların bazı muhtemel yararları aşağıdaki gibi sıralanabilir **(Kulaç ve ark., 2006; Tunahoglu, 2004):**

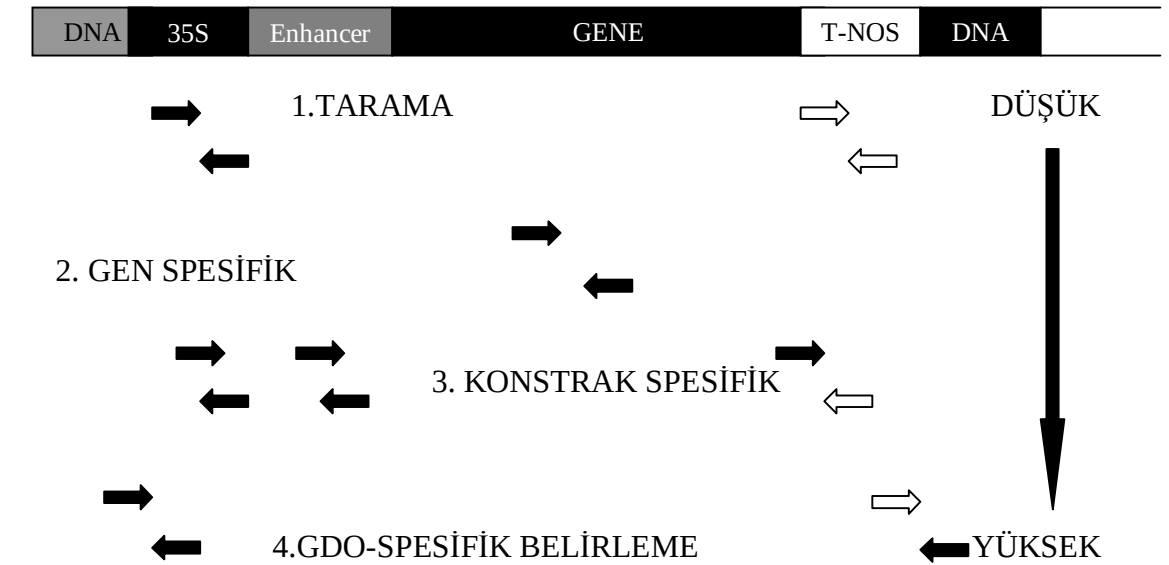
1. Besin miktarının arttırılması ve içeriğinin zenginleştirilmesi: besin içeriğini zenginleştirmeye yönelik çalışmalara örnek olarak A vitamini içeriğinden zengin pirinç (golden rice) verilebilir.
2. Besinlerin alerjik özelliklerinin azaltılması: Besinler içindeki alerjik proteinlerinin yapısının değiştirilmesi ya da çıkarılmasıyla alerjik özellikler önlenebilmektedir.
3. Besinlerin aşılama amacıyla kullanımı: Tüketilen sıradan bitkilere aktarılabacak genler aracılığıyla patojen mikroorganizmaların çeşitli proteinlerini sentezleyen bitkiler elde edilerek bu bitkilerin aşı olarak kullanılması düşünülmektedir.
4. Birim alandan daha fazla ürün elde edilmesi
5. Herbisit ve pestisit kullanımının azalması: Bu şekilde ilaç kalıntılarının canlılara ve çevreye zararı azaltılmaktadır.

GDO'ların muhtemel bazı zararları ise aşağıdaki gibi sıralanabilir **(Kulaç ve ark, 2006; Tunahoglu, 2004):**

1. Gen aktarımı ile birlikte diğer organizmalardan hastalık ve alerji yapacak özelliklerin taşınma olasılığı,
2. Antibiyotiğe dirençli gen içeren bitkilerin insan ya da hayvan bünyesine geçmesiyle dirençlilik geninin kazanılması,

3. Transgenik ürünlerin bulunduğu çevredeki doğal türlerin genetik çeşitliliğin kaybına, ekosistemdeki tür dağılımının ve dengenin bozularak yabancı türlerin doğal gelişimlerine neden olması,
4. Tohum sektöründe tekelleşmedir.

Genel olarak GDO'lu ürünlerin belirlenmesi 3 farklı aşamada yapılmaktadır. Birinci aşama DNA'sı izole edilen eldeki ürünün GDO'lu olup olmadığına yönelik tarama aşamasıdır. Bu aşamada özellikle en çok kullanılan 35S promotör ve NOS terminatör bölgelerinin amplifikasyonu standart PCR yöntemi ile yapılır. Eğer sonuç pozitif ise ikinci aşamada hangi çeşit GDO olduğunu belirlemeye yönelik spesifik PCR yöntemleri uygulanır. Üçüncü aşamada ise ikinci aşamada belirlenen GDO'nun Real-Time PCR kullanılarak kantitatif tayini yapılır. **Şekil 1.1**'de GDO belirleme aşamaları kısaca gösterilmiştir.



Şekil 1.1. GDO belirleme aşamaları (Jensen ve ark., 2003)

Bu çalışmanın amacı:

1. Mısır ve soya içeren değişik gıda ürünleri için en uygun DNA izolasyon yönteminin veya kitinin belirlenmesi
2. İthal edilen ve bölgemizde yetiştirilen mısır ve soyada GDO olup olmadığının PCR yöntemiyle belirlenmesi
3. Marketlerde bulunan değişik gıda ürünlerinde (un, nişasta, bisküvi vb.) GDO olup olmadığının PCR yöntemiyle belirlenmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lipp ve ark. (1999), farklı laboratuvarlarda genetiği değiştirilmiş organizmaları belirlemiş olup, PCR metoduna dayalı DNA amplifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Çoğaltılacak fragmentler 35S promotörden ve Nos terminatöründen elde edilmiştir. Test edilen 28 örnekten 26'sında GDO belirlenmiştir. Bu metot yiyeceklerde GDO taraması için önerilmiştir. Ancak örneklerde hangi çeşit GDO olduğu belirlenememiştir. 27 laboratuardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, soyada hata oranı %1 iken mısırdaki ise %5'ten az olmuştur.

Vollenhofer ve ark. (1999), genetiği değiştirilmiş organizmaları belirlemek için PCR metodları geliştirmişlerdir. Bu metodları, gıdalardaki böceğe dayanıklı mısırın ve glifosat toleranslı soyanın spesifik olarak belirlenmesi için kullanmışlardır. Tarama yapılırken kullanılan primerler 35S promotörün (Cauliflower Mosaic Virüsünden izole edilen), Nos terminatörün (*Agrobacterium tumefaciens*'ten izole edilen) ve antibiyotik belirleyici geni olan NPTII (neomycin-phosphotransferase II)'nin çoğaltılmasıyla geliştirilmiştir. Oluşturulan metot, tohumda ve işlenmiş ürünlerdeki GDO'ları belirlemede yüksek duyarlılık göstermiştir.

Tozzini ve ark. (2000), GDO'lu örneklerin PCR bant yoğunlukları ile referans örneklerin bant yoğunluklarını karşılaştırarak semi-kantitatif olarak GDO belirleme metodu geliştirmişlerdir. Aynı zamanda reaksiyon, internal kontrol de içermiştir. Hata oranı da sıkıca gözden geçirilmiştir (Kalıp DNA'nın kantitatif tayininde ve DNA ürünlerinde yapılan pipetleme hataları). Araştırmacılar geliştirilen metot ile transgenik mısır ve soyanın belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Lipp ve ark. (2001), Bt176 mısırdaki ve Roundup Ready soyada %0, %2 ve %100 matriksler hazırlamışlardır. Bir tanesi genetiği değişmiş soyada ve mısırdaki bulunan 35S promotör fragmentine dayanan, diğeri ise sadece genetiği değişmiş soyada bulunan Nos terminatör sekansına dayanan iki farklı yöntem denemiştir. Bazı laboratuvarlar, laboratuvar ortamında oluşan kontaminasyondan dolayı yanlış pozitif sonuç vermiştir. İstatistiksel analizler kesin olarak %97 (%3 yanlış pozitif sonuç) oranında

GDO içermeyen örnekler ve %98 (%2'si yanlış negatif sonuç) oranında GDO içeren örneklerle sonuçlanmıştır. Geliştirilen yöntem GDO taraması için uygun bulunmuştur.

Chiueh ve ark. (2002), genetiği değiştirilmiş mısırdan 6 varyeteyi tayin ve saptamada PCR metodunu denemişlerdir. Genleri tayin ederken sıcaklığın etkisini araştırmak için de PCR metodunu kullanmışlardır. Mısır örneklerine farklı zaman aralıklarında 100°C- 121°C de muamele etmişlerdir. PCR testi için 2 spesifik primer (zein) kullanılmıştır. Araştırmacıların sonucuna göre, zein geninin 100°C de 120 dk. ve 121°C de 30 dk. sıcaklıktan sonra PCR ile saptanabileceği belirlenmiştir. Spesifik primer Event176 (Novartis), Bt11 (Novartis), MON810 (Monsanto), T25 (Agr Evo), CBH-351 (Agr Evo), GA21 (Monsanto) genlerini içeren genetiği değişmiş mısırlar PCR analizlerinde kullanılmıştır. Değişik gıda ürünlerinde yapılan GDO belirleme çalışmasında ürünlerde farklı genetiği değiştirilmiş mısırlara rastlanmıştır. Araştırmacılara göre geliştirilen yöntem, mısır ve mısırdan elde edilen ürünlerde farklı GDO'ların belirlenmesinde etkili olmuştur. Tayvan'da mısırdan üretilen ürünlerde farklı GDO'lar olduğu için bunların belirlenmesi geliştirilen yöntem ile uygun bulunmuş ve yapılan çalışmada Tayvan'da en fazla Mon810 genetiği değiştirilmiş mısır çeşidi belirlenmiştir.

Ovesna ve ark. (2002), Roundup Ready soyayı tayin etmede farklı PCR protokollerini karşılaştırmışlardır. Yeşil bitki dokusundan DNA izolasyonu için mevcut CTAB protokolünü uygulamışlardır. Leu-t RNA geni spesifik primerlerinden farklı olarak lektin kodlayan spesifik primerleri DNA tayini için kullanmışlardır. Sadece biri CaMV sekans spesifik primer çiftiyle test edildiğinde spesifik olmayan ürünlerde çoğalma görülmemiştir. Nos terminatör primer çifti rutin taramalar için kullanılabileceği belirlenmiştir. EPSPS geni tayininde 2 farklı yöntem kullanılmış ve aynı sonuçlar elde edilememiştir.

Permingeat ve ark. (2002), CryIA(b) ve Pat genlerini aynı anda event176, MON810, Bt11 ve T25 transgenik mısırlarda belirlemek için çoklu PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Araştırmacılar Roundup Ready soyayı bilinen primerler kullanarak çoklu PCR'la tam olarak tayin etmişler ve Nos ve EPSPS sekanslarının çoğalan fargmentlerini aynı anda saptamışlardır. Roundup Ready soyada ve GA21 mısır

çeşidinde, bir çift primer ve Nos bölgesinin sonuna yapışan prob kullanarak Real-Time PCR'la kantitatif tayin yapmışlardır.

Sanhoty ve ark. (2002), Mısır'da genetik olarak değişmiş soya ve mısırı belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada değişik marketlerden 40 soya ve 40 mısır ürününde kalitatif ve kantitatif analizler yapmışlardır. Analizler sonucunda soya ürünlerinin %20'si Roundup Ready içerdiği, mısır ürünlerinin %15'i Bt176 ve %12.5'i Bt11 içerdiği belirlenmiştir. StarLink mısır çeşidi ise Bt11 ve Bt176 içeren 4 örnekte karışık olarak bulunmuştur. Ayrıca araştırmacılar DNA izolasyonu sonrasında, yüksek sıcaklığa maruz kalan işlenmiş ürünlerden elde edilen DNA konsantrasyonunun, tohumlardan elde edilen DNA konsantrasyonuna oranla çok daha düşük bulduklarını belirtmişlerdir.

Höhne ve ark. (2002), genetiği değiştirilmiş mısır ürünlerinin kantitatif olarak belirlenmesi için çoklu Real-Time PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Real-Time PCR floresan etiketli TaqMan probolar kullanılarak yapılmıştır. Bu çoklu sistemde mısıra özgü gen DNA'sı ile 35S CaMV promotör DNA'sı aynı tüp içinde çoğaltılmıştır. Kantitatif standart eğrisi mısır unu referans materyali ile hazırlanmıştır. Her bir genetiği değiştirilmiş üründe bu yöntemin tekrarlanabildiği belirlenmiştir.

Tony ve ark. (2003), Mısır'da 2000–2001 yılı süresince Roundup Ready soyanın ve transgenik mısır olan Bt11, Bt176, T25, MON810 ve Starlink oranlarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Yem amaçlı kullanılan Starlink, yiyecek olarak kullanılan diğer çeşitlerden ayrı tutulmuştur. Mısır'dan değişik yerlerden 51 soya ve 61 mısır örnekleri toplanmıştır. PCR esaslı tayin yapılmıştır. Araştırmacılara göre, Arjantin'den ithal edilen tüm soya örnekleri ve Amerika'dan ithal edilen soyanın %50'si Roundup Ready soya içermiştir. Amerika'dan ithal edilen 20 mısır örneğinden 16'sı Bt176, 17'si Bt11, 12'si MON810, 19'u T25 ve 9'u Starlink içermiştir. Arjantin'den ithal edilen 7 mısır ürününden 4'ü Bt176 ve MON810, 5'i T25, 6'sı Bt11 ve 2'si Starlink içermiştir. Mısır'dan toplanan mısır ve soya ürünlerinin ise transgenik olmadığı belirlenmiştir.

Rudi ve ark. (2003), PCR metoduna dayalı kantitatif çoklu PCR metodu geliştirmişlerdir (MQDA-PCR). Yöntemin uygulanabilirliğini göstermek için

transgenik mısır yiyecekleri kullanmışlardır. Genetiği değiştirilmiş farklı yapılardan %0.1-%2 arasında kantitatif oran elde edilmiştir. 12 primerin karıştırılmasıyla 17 farklı yiyecek ürünlerinde tarama yapılmış ve aynı zamanda 7 farklı genetiği değiştirilmiş mısırdan (Bt176, Bt11, Mon810, T25, GA21, CBH351 ve DBT418) analiz yapılmıştır. Analiz edilen 10 örnekte çoğunlukla Mon810, Bt11 ve Bt176 DNA'sı bulunmuş ve bir örneğin fark edilebilir miktarda GA21 içerdiği belirlenmiştir. 8 primerin tek bir tüp içerisinde karıştırılmasıyla MQDA-PCR sisteminde Mon810, Bt11 ve Bt176 tayini yapılmıştır. Araştırmacılar GDO tayininde bu metodun çok etkili bir şekilde çalıştığını vurgulamışlardır.

Yamaguchi ve ark. (2003), iki farklı metotla genetiği değiştirilmiş mısır tayin etmeyi amaçlamışlardır. DNA ekstraksiyonunu CTAB yöntemini kullanarak yapmışlardır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde; zein'de 329 baz çifti, Bt11'de 437 ve 522 baz çiftleri, Event176'da 619 baz çifti, Mon810'da 194 baz çifti ve Liberty mısırdan ise 231 baz çifti uzunluğunda bant elde edilmiştir. Genetiği değiştirilmiş mısır ELISA testiyle de tayin edilmiş ve PCR metoduyla ELISA testi arasında uyumsuzluk görülmemiştir. Ancak PCR metodu hangi çeşit transgenik mısır olduğunu belirlediği için daha avantajlı bulunmuştur. Ayrıca Ocak-Mart 2000'e kadar Japonya'ya, en fazla Mon810 mısır içeren tohumların ithal edildiği belirlenmiştir.

Wang ve Fang (2005), genetiği değiştirilmiş soyları çoklu PCR yaparak kalitatif olarak belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar çalışmada 35SP (cauliflower mosaic virus 35S promotör), nosT (*Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase terminatör), 35SP/CTP (Petunia hybrida EPSPS chloroplast transit peptide) ve Lec (lektin) primerleri olmak üzere 4 primer kullanmışlardır. Marketlerden toplanan 21 soya örneğinin 14'ünün transgenik olduğu, çoklu PCR yapılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma çoklu PCR yönteminin soyada transgenik yiyeceklerin belirlenmesinde etkili ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Oraby ve ark. (2005), kalitatif PCR tekniğini genetiği değiştirilmiş ve genetiği değiştirilmemiş yiyecek ürünlerini belirlemek için kullanmışlardır. GDO saptamada en çok kullanılan 2 primer 35S promotör ve Nos terminatörünü marketlerden satın alınan 24 yiyecek örneklerinde test etmişlerdir. Araştırmacıların

sonucuna göre, test edilen 24 örneğin 3'ünde 35S promotörü belirlenirken, hiçbir örnekte Nos terminatörü belirlememiştir.

Liu ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, ikili DNA primer çiftiyle soyaya özgü lektin genini ve EPSPS genini amplifiye etmek için PCR gerçekleştirmişlerdir. Böylece soyada %1'den daha düşük oranda GD içeriği belirlenebilmiştir. Sonuç olarak bu PCR metodunun Roundup Ready soyayı belirlemek için güvenilir ve etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Cardelli ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, Brezilya'da marketlerden toplanan yiyecek ürünlerinden Roundup Ready soya, Bt176 ve MON810 mısırı tayin etmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacıların sonucuna göre, Brezilya'daki yiyecek ürünlerinde ilk defa genetiği değiştirilmiş soya tespit edilmiştir. Araştırmacılar bundan sonraki aşamada GDO'ların kantitatif olarak rutin bir şekilde belirlenmesi için yöntemin geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Greiner ve ark. (2005), kalitatif ve kantitatif PCR'a dayalı metodu, Brezilya'da satılan işlenmiş yiyeceklerdeki transgenik mısır ve soyayı belirlemede kullanmışlardır. 2000 yılında mısır içeren 100 yiyecek ve soya içeren 100 yiyecek analiz edilmiş ve 2001 yılında analizler tekrar edilmiştir. 2000 yılında soya içeren ürünlerin %13'ü ve mısır içeren ürünlerin %8'i genetiği değiştirilmiş organizma içerdiği belirlenmiştir. Ürünlerin 5'i %4'ten az genetiği değiştirilmiş soya içerirken, 8'i %4 ten fazla genetiği değiştirilmiş soya içermiştir. Mısır ürünlerinin 5 tanesinde GD'li mısır oranı %4 ten az, 3'ünde %4 ten fazla bulunmuştur. 2001 yılında ise soya içeren yiyeceklerde genetiği değiştirilmiş soya oranı %21, mısır içeren yiyeceklerde ise genetiği değiştirilmiş mısır %9 oranında bulunmuştur. Soya içeren 8 üründe GD'li soya %4 ten az, 13 üründe %4 ten fazla bulunmuştur.

Forte ve ark. (2005), genetiği değiştirilmiş mısır ve soyada çoklu PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. Genetiği değiştirilmiş soya ve mısır ürünlerinin birlikte belirlenebilmesi için çoklu PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde bitkiye özgü primerler ile 35S promotör ve Nos terminatör bölgelerini çoğaltan primerler birlikte kullanılmıştır. Araştırmacılara göre, çoklu PCR analizi; genetiği değiştirilmiş mısır ve soya ürünlerini hızlı, ucuz, tekrarlanabilir şekilde ve daha az zamanda ayırt etmiştir.

Onishi ve ark. (2005), tek reaksiyon içinde 8 GD'li mısırı çoklu PCR metoduyla aynı zamanda tayini için yöntem geliştirmişlerdir. 8 adet genetiği değiştirilmiş mısır için 8 primer çifti kullanılmıştır (Bt11, Event176, GA21, MON810, MON863, NK603, T25 ve TC1507). Agaroz jel ve kapiller elektroforezle, bant büyüklükleri belirlenmiştir. Araştırmacıların sonucuna göre, çoklu PCR metodu genetiği değiştirilmiş mısırın taranmasında kalitatif tayin için etkili olmuştur.

Lin ve ark. (2006), genetiği değiştirilmiş soyaı tayin etmek için Light-Cycler real time PCR sisteminde referans material (CRM) ve novel referans moleküller kullanmışlardır. Araştırmacılara göre, bu metodun genetiği değiştirilmiş soyada kantitatif tayin belirlemek için uygun bir yöntem olduğu görülmüştür. Soya sütü 70°C'nin altında kaynatıldığında, ELISA metoduyla OD₄₅₀ de saptanamamıştır. Ancak 100°C'nin üzerinde 1-3 dakika kaynatıldığında, PCR metoduyla tayin yapılabilmektedir. Araştırmacılara göre, geliştirilen yöntem pratik olarak genetiği değiştirilmiş soyanın belirlemesinde kullanışlı olmuştur.

Margarit ve ark. (2006), transgenik mısırdaki CryIA(b) genini tayin etmek ve CryIA(b) proteinin miktarını ölçmek için farklı yiyecek maddeleri analiz etmişlerdir. Transgenik mısırla hazırlanmış ve marketlerde satılan 32 yiyecek ürününden 8 tanesi Bt11 içermiştir. Yiyecek maddelerinde baskın olan Mon810 genini saptamak için spesifik primerler kullanılmıştır. Araştırmacılar az işlenmiş yiyecekte CryIA (b) proteinin kantitatif tayini için ticari olarak elde edilen ELISA testi uygulamışlar ve yiyeceğin her bir gramında bu proteini en fazla 0.1 ppm olarak bulmuşlardır.

Foti ve ark. (2006), Roundup Raedy soyada, katkısız ve işlenmiş ürünleri saptamada real-time çoklu PCR metodunu ABI PRISM 7700 Sequence Detection System ve TaqMan prob kullanarak optimize etmişlerdir. Referans olarak %0.1-5 aralığında Roundup Raedy soya kullanılmıştır. Araştırmacılar metodu hem ham maddelerde hem de işlenmiş ürünlerde test etmişlerdir. Sonuç olarak geliştirilen yöntem soya ürünlerinde başarıyla uygulanmıştır.

Engel ve ark. (2006), işlenmiş yiyeceklerde GDO'nun kantitatif olarak belirlenmesinde, işlenme sırasında yüksek ısıda DNA'nın bozulması nedeniyle ligasyona bağlı prob amplifikasyonunu, GDO'nun kantitatif olarak belirlenebilmesi

için geliştirmişlerdir. Real-Time PCR kullanarak GDO analizleri sorunsuz bir şekilde yapılabilmektedir.

Ferrari ve ark. (2007), genetiği değiştirilmiş soyayı belirlemek için uygun DNA izolasyon protokolünü ve PCR metodunu bulmayı amaçlamışlardır. Soya tohumu, soya sütü, soya sütü tozu, bebek maması ve meşrubat içeren 26 örneğin DNA izolasyonu için 3 çeşit CTAB metodu kullanmışlardır. Örneklerin işleme aşamalarına göre farklı uzunluklarda fragment elde etmişlerdir. Soya sütü, bebek maması ve meşrubat örneklerinden DNA elde edememişlerdir. DNA elde edilen örneklerle değişik oranlarda RR içeren soya tohumlarından karışım oluşturulmuştur. Bu karışım da farklı primer çiftleri kullanılarak nested PCR yapılmıştır. Nested PCR sonucunda elde edilen bant yoğunluğu karışımın yoğunluğuna göre değişim göstermiştir.

Gryson ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada %2 oranında Roundup Ready ve değişik oranlarda soya içeren bisküviler hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar pişirmeden dolayı toplam DNA fragment uzunluğunun azaldığını ve böylece GDO analizinin zor olduğunu göstermiştir. Ayrıca Roundup Ready soyadaki spesifik soya dizisinin ve Real Time kantitatif PCR'ın, GDO tarayan PCR'lardan daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Brod ve ark. (2007) tarafından Brezilya'daki marketlerden soya unu, soya sütü tozu ve soyayla yapılan bebek mamaları toplanıp PCR metoduyla genetiği değiştirilmiş organizma tayini yapılmıştır. Nested PCR metoduyla 169 baz çiftlik amplikon veren soya örneklerinin karışımı %0.01-%10 ve %0 oranında genetiği değiştirilmiş soya içermiştir. Nested PCR sonucunda bebek mamalarının hiçbirinde genetiği değiştirilmiş soyaya rastlanmamıştır. 6 soya örneğinden 4'ü, 25 soya sütü tozundan 15'i Roundup Ready soya için pozitif sonuç vermiştir. Araştırmacıların sonucuna göre nested PCR metodu, hazır ürünlerde genetiği değiştirilmiş soya tayini için uygun bulunmuştur.

Moriuchi ve ark.'na (2007) göre, GDO tayini birçok ülkede geliştirilmesine rağmen, hala pratik bir kantitatif metot bulunamamıştır. Japonya'da kantitatif metot hala ham tahılda uygulanmakta olup, bu çalışmada da işlenmiş soya ürünlerinde uygulanması amaçlanmıştır. Araştırmacılar soya ürünlerindeki Roundup Ready

soyanın kantitatif analizi için Real-Time PCR metodunu kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre; tüm soya ürünlerinde yeterli derecede lektin geni ve eklenmiş gen kopyaları elde edilmiştir. Ayrıca Roundup Ready soya içeriğinde önemli farklılık olmadığı belirlenmiştir. Araştırmacılara göre, Japonya’da bazı soya ürünlerinde GDO belirlenmesinde bu yöntem kullanılabilir niteliktedir.

Pinto ve ark. (2007), değişik gıda ürünlerinde 2 farklı DNA ekstraksiyon ve pürifikasyon yöntemini karşılaştırmışlardır. Araştırmada Wizard Magnetic DNA pürifikasyon (promega) ve DNeasy Tissue Kitleri (QIAGEN) kullanılmıştır. Wizard Magnetic DNA pürifikasyon kiti bitki ürünlerinde etkili olurken, DNeasy Tissue kiti ise kompleks ve işlenmiş ürünlerde daha iyi sonuç vermiştir.

Yang ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada event-spesifik GDO belirleme metodunu TC 1507 ve CBH 351 mısırları için kullanmışlardır. Ayrıca event-spesifik TaqMan real time PCR saptama metodu 7 genetiği değiştirilmiş mısırdaki (Bt11, Bt176, GA21, MON810, MON863, NK603 ve T25) geliştirilmiştir. Referans materyallerin elde edilmesindeki güçlükler nedeniyle 9 mısır sekansını da içeren tek bir referans molekül elde edilmiş ve çalışmada kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, referans molekül kullanılarak event-spesifik Real-Time PCR ile tayin yapmak transgenik mısır saptamada uygun olmuştur.

3. MATERİYAL VE METOD**3.1. Materyal**

Değişik firma ve marketlerden soya ve mısır tohumları ile soya veya mısır içeren un, bisküvi, çikolata, cips, mısır gevreği, nişasta ve bebek sütü gibi ürünler toplanmıştır. Ayrıca negatif ve pozitif kontrol için kullanılan standart materyaller IRMM'den (Inst. for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium) temin edilmiştir. Materyal olarak; 45'i ithal, 17'si bölgemizde yetiştirilen olmak üzere toplam 62 adet mısır tohumu ile 30'u ithal, 8'i bölgemizde yetiştirilen olmak üzere toplam 38 adet soya tohumu kullanılmıştır. Ayrıca marketlerden toplanan 7 farklı çeşit gıda ürünü olmak üzere toplam 13 tane gıda ürünü (mısır unu, soya unu, mısır gevreği (2), bisküvi (2), kek (2), çikolata (2), cips (2), bebek sütü) materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Metot**3.2.1. DNA İzolasyonu**

Toplanan ürünlerden DNA izolasyonu için ticari olarak satılan 2 farklı DNA izolasyon kiti (Wizard -promega food kit ve Nucleospin food kit) ve CTAB (Pietsch ve ark., 1997) metodu kullanılmıştır.

3.2.1.1. Wizard -Promega Protokolüne Göre DNA İzolasyonu

İlk olarak 200 mg yiyecek materyali tartılıp 2 ml'lik mikrosanrifüj tüplere alınmıştır. Lizis A tampon çözeltisinden 500 µl ve RNase A'dan 5 µl eklenip kuvvetlice karıştırılmıştır. Ardından 250 µl lizis B tampon çözeltisi eklenmiş ve 10-15 sn vorteksle karıştırılmıştır. Daha sonra tüp, materyalin bulunduğu tarafa doğru eğilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir (22-25°C). Tüplere 750 µl çökelti solüsyonu eklenip vorteksle karıştırılmıştır. Yüksek hızda 10 dk santrifüj yapılmıştır (13.000x g) Üst faz (sıvı faz) yeni 2 ml'lik tüpe transfer edilmiştir. Sıvı faz, pipet ucuyla dikkatlice alınmıştır. MagneSil PMPs şişesi 15-30 sn kuvvetle

çalkalanıp üst faza 50 µl MagneSil PMPs eklenmiştir. Daha sonra kuvvetli bir şekilde vorteksle karıştırılmıştır. Tüp içindeki sıvı hacim not alınmıştır. MagneSil PMPs şişeden dağıtılmadan önce tamamen eritilmiştir. 0.8 hacim kadar isopropanol konmuş, 10-15 kez tersyüz edilerek karıştırılmıştır. İç kısımdaki partiküllerin yıkanması için ara sıra karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Tüpler MagneSphere ayırma standına alınıp 1 dk bırakılmıştır. Sıvı faz pipetle ya da dikkatli bir şekilde şişeden boşaltılarak atılmıştır. Tüpler standtan kaldırılıp partiküllerin üzerine 250 µl lizis B tampon çözeltisi konmuştur. Ardından 2-3 defa tersyüz edilmiştir. Tüpler tekrar manyetik ayırma standına yerleştirilmiştir. Partiküllerin toplanması için standta 1 dk bekletilmiş olup sıvı faz bir önceki aşamadaki gibi uzaklaştırılmıştır. Partiküller 1 ml %70 lik ethanol yıkama solüsyonunda dağıtılmıştır. 1 dk manyetik standta bekletilip sıvı faz bir önceki aşamadaki gibi uzaklaştırılmıştır. Bu aşama 3 defa tekrar edilmiştir. Son aşamada sıvı faz uzaklaştırılırken pipet kullanılmıştır. Çökelti oda sıcaklığında 15-30 dk kurutulup üzerine 100 µl saf su eklenmiştir. Karışım vorteksle karıştırılmış 65°C de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Tüp, 1 dk süresince manyetik ayırma standına yerleştirilmiştir. Daha sonra toplanan DNA (temiz sıvı faz) yeni bir tüpe dikkatlice aktarılmıştır.

3.2.1.2. Nucleospin Protokolüne Göre DNA İzolasyonu

Homojenize edilmek üzere 200 mg materyal tartılmıştır. Kullanılmadan önce lizis tampon çözeltisine 65°C'de ön ısıtma uygulanmıştır. Materyal 2 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Üzerine 550 µl CF lizis tampon çözeltisi eklenip (65°C de önceden ısıtılmış) dikkatlice 15 sn karıştırılmıştır. Daha sonra 10 µl proteinaz K eklenmiştir. Tekrar 2-3 sn karıştırılmıştır. 65°C de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 dk santrifüj edilmiştir (>10.000 x g). Üst faz, en az 3 örnek hacmini alabilen santrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Bir hacim C4 ve 1 hacim ethanol eklenmiştir. Karışım 30 sn vorteksle karıştırılmıştır. Her bir preparat için NucleoSpin Food kolon alınmış, 2 ml'lik tüplerin üzerine yerleştirilmiştir. Kolonun içine pipetle 750 µl karışım konulmuş olup 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra iç kısımdaki sıvı

atılmıştır. Kolon içine 400 µl CQW tampon çözeltisi konulmuştur. Ardından 1 dk 11.000 x g'de santrifüj edilmiştir. İç kısımdaki sıvı atılmıştır **(1. yıkama aşaması)**. Kolon içine 700 µl C5 tampon çözeltisi konulmuştur. Tüpler 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiş olup içindeki sıvı atılmıştır **(2. yıkama)**. Kolon içine 200 µl C5 tampon çözeltisi eklenmiştir. Çözeltinin tamamen uzaklaşması için 2 dk 11.000 x g'de santrifüj edilmiştir **(3. yıkama)**. Kolon 1.5 ml'lik yeni tüpe yerleştirilmiştir. Üzerine 100 µl elution CE tampon çözeltisi eklenmiştir (70°C de önceden ısıtılmış). Oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. DNA'nın toplanması için 11.000 x g de 1 dk santrifüj edilmiştir.

3.2.1.3. CTAB Metodu

Un halindeki 100 mg örnek tartılıp 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır. Üzerine 500 µl önceden ısıtılmış (65°C) CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisi (20g/l CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris/HCl, 20mM EDTA) eklenip iyice karıştırılmıştır. Daha sonra 65°C'de 30-45 dk inkübasyona bırakılmıştır. 5 dk'da bir alt üst edilmiştir. Ardından 12.000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz 1.5 ml'lik yeni tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde kloroform eklenip 30 sn alt üst edilmiştir. Daha sonra 12.000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz 1.5 ml'lik yeni tüpe aktarılıp 2 kat hacimde CTAB çöktürme tampon çözeltisi (5g/l CTAB, 0.04 M NaCl) eklenmiştir. Akabinde 60 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 12.000 x g'de 5 dk santrifüj edilip üst faz atılmıştır. Üst faz atıldıktan sonra çökelti 350 µl 1.2 M NaCl ile dağıtılmıştır. Ardından 350 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler alt üst edilerek 30 sn karıştırılmış, 10 dk 12.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde isopropanol eklenmiştir. Tüpler alt üst edilerek 30 sn karıştırılmıştır. Daha sonra 10 dk 11.500 x g'de santrifüj edilmiştir. Üst faz atılmıştır. Kalan çökelti üzerine 500 µl %70'lik ethanol eklenmiştir. Tüpler dikkatlice karıştırılıp 10 dk 12.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Ardından üst faz atılmıştır. Geriye kalan pellet kurutulmuştur. Kuruduktan sonra 100 µl saf su ile ya da TE (Tris-EDTA) tampon çözelti ile eritilmiştir.

3.2.1.4. Standart Materyallerde DNA İzolasyonu

IRMM tarafından temin edilen standart materyallerin (Bt11, Bt176, MON810 ve Roundup Ready) DNA izolasyonu her 3 çeşit izolasyon yöntemine göre yapılmıştır.

3.2.2. DNA Miktarının Belirlenmesi ve DNA Konsantrasyonunun PCR Reaksiyonu için Hazırlanması

İzole edilen standart materyallerin, soya ve mısır örneklerinin DNA miktarının belirlenmesi için %0.8'lik agaroz jel konsantrasyonu kullanılmıştır. %0.8'lik agaroz jelin yuvalarına, konsantrasyonu belirlenecek örneklerle beraber, konsantrasyonu bilinen λ DNA'lar (25ng-50ng-100ng-200ng) yüklenmiştir. Yükleme yapılırken; her bir örnek için stok DNA'dan 2 μ l, yükleme boyasından 4 μ l ve saf sudan 14 μ l alınarak toplam 20 μ l'lik bir karışım hazırlanmış olup bu karışımın 10 μ l'si kullanılmıştır. Elektroforezde 45 dakika 90 voltta koşturma işleminden sonra, UV transilluminatör yardımıyla jelin görüntüsü alınmıştır ve her bir stok DNA'nın konsantrasyon tahmini λ DNA'lar ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Ayrıca DNA'ların, standart PCR analizlerinde ve nested PCR analizlerinde kullanılması için tahmin edilen stok DNA'lardaki miktar baz alınarak DNA'lar 5 ng/ μ l'ye ayarlanmıştır. 5 ng'a ayarlama yapılırken her bir örnek için 10 μ l stok DNA, 4 μ l yükleme boyası, 6 μ l saf su kullanılarak toplam 20 μ l'lik karışım hazırlanmış olup 10 μ l'si %0.8'lik jelin yuvalarına yüklenmiştir. Tekrar elektroforezde 45 dakika 90 voltta koşturularak UV altında resimleri çekilmiştir. 5 ng/ μ l'ye ayarlanmaya çalışılan örnekler λ DNA'lar (25ng-50ng) ile karşılaştırılarak 5 ng'dan fazla olanlara saf su, az olanlara ise stok DNA'dan eklenerek tüm örneklerin konsantrasyonu 5 ng/ μ l'ye ayarlanmıştır.

3.2.3. DNA İzolasyonu Yapılan Örneklerde Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan materyallerdeki genetiği değiştirilmiş organizmaların belirlenmesi genel olarak 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Ancak gıda ürünlerinde ayrıca soya ve mısır DNA tarama işlemi de yapılmıştır.

3.2.3.1. Soya – Mısır DNA Taraması

Soya – mısır DNA taraması, DNA'sı izole edilen hazır gıdaların içeriğinde soya mı yoksa mısır mı olduğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır. İzolasyonu yapılan DNA'larda soya DNA'sının amplifikasyonunda soya-lektin geni için **Greiner ve ark.'nın (2005)** geliştirdiği GMO3/GMO4 primer çiftleri kullanılarak yapılmıştır (**Çizelge 3.7**). Örneklerde soya DNA'sının olup olmadığının belirlenmesi için yapılan DNA amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve uygulanan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.1**'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Soya DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTP	0.2 mM
GMO3 primer	0.5 µM
GMO4 primer	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Uygulanan PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.2**'de verilmiştir. PCR işlemleri sonucunda jelde beklenen bant büyüklüğü 118 baz çiftidir.

Çizelge 3.2. Soya DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	30 sn	30
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	63	30 sn	
2.3	Uzama safhası	72	30 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Örneklerde mısır DNA'sının olup olmadığı ise zein geni için geliştirilen ZEIN3/ZEIN4 primer çiftleri (Studer ve ark., 1997) kullanılarak belirlenmiştir. Zein geninin amplifikasyonu için yapılan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.3'**te PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.4'**te verilmiştir. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri ise **Çizelge 3.5'**te verilmiştir. Yapılan PCR işlemleri sonucunda jelde beklenen bant büyüklüğü 277 baz çiftidir.

Çizelge 3.3. Mısır DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTP	0.2 mM
ZEIN3 primer	0.5 μM
ZEIN4 primer	0.5 μM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.4. Mısır DNA'sının amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	1 dk	40
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	1 dk	
2.3	Uzama safhası	72	1 dk	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Çizelge 3.5. Soya ve Mısır taramasında kullanılan primerler

Primer Adı	Baz dizilimi 5'-3'
GMO3	GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C
GMO4	GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG
ZEIN3	AGT GCG ACC CAT ATT CCA G
ZEIN4	GAC ATT GTG GCA TCA TCA TTT

3.2.3.2. GDO Tarama (screening) Aşaması

Önceki aşamada ekstrakte edilen DNA'nın hangi türe özgü olduğu belirlendikten sonra bu aşamada 35S promotörü ve T-nos terminatör bölgelerinin amplifikasyonu yapılmıştır. **Wang ve Fang (2005)** tarafından geliştirilen 35sPF ve 35sPR primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.6'**da, PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.7'**de verilmiştir. Araştırmacılar tarafından daha önceden yapılmış olan çalışmalarda pozitif kontrol sonucunda jelde 143 baz çiftlik bantların görülmesi gerektiği bildirilmiştir.

Çizelge 3.6. 35sPF/R promotörü amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	12 mM
KCl	12 mM
NH ₄ SO ₄	3 mM
MgCl ₂	1 mM
dNTPs	0.2 mM
35sPF primeri	0.5 µM
35sPR primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.7. 35sPF/R promotörü amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4dk	1
2.1	Denatürasyon	95	30 sn	40
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	30 sn	
2.3	Uzama safhası	72	45 sn	
3.	Son uzama safhası	72	7 dk	1

Oraby ve ark. (2005) tarafından geliştirilen NOS1 ve NOS3 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.8'**de, PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.9'**da verilmiştir. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri ise **Çizelge 3.10'**da verilmiştir. Pozitif kontrol sonucunda görülmesi beklenen bant büyüklüğü 180 baz çiftidir.

Çizelge 3.8. Nos terminatörü amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
NOS 1 primeri	0.5 µM
NOS 3 primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.9. Nos terminatörü amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	30 sn	50
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	62	30 sn	
2.3	Uzama safhası	72	45 sn	
3.	Son uzama safhası	72	7 dk	1

Elde edilen PCR ürünleri 0.5 x TBE tampon çözeltisinde (89 mM Tris-Cl, 89 mM borik asit, 20 mM EDTA) %2.lik agaroz jel konsantrasyonunda elektroforez edilmiş olup etidyum bromit ile boyanmıştır. Ardından UV altında fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 3.10. 35S promotör ve Nos terminatör taranmasında kullanılan primerler

Primer Adı	Baz dizilimi 5'-3'
35sPF	AAA GAT GGA CCC CCA CCC AC
35sPR	GAG GAA GGG TCT TGC GAA GG
NOS1	GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG
NOS3	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA

3.2.3.3. GDO- Spesifik Belirleme Aşaması

35S promotör ve Nos terminatör tarama sonucunda amplifike olan örneklerde beklenen bant büyüklüğünün görülmesi sonucunda, örneklerin hangi çeşit GDO olduğu bu aşamada belirlenmiştir. Bu aşamada iki kademeli olarak gerçekleştirilen nested PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3.3.(1). Roundup Ready Soyanın Belirlenmesi

Roundup Ready soyanın belirlenmesi için GMO5, GMO9, GMO7 ve GMO8 primerleri (**Meyer ve Jaccaud, 1997**) kullanılarak yapılan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.11**'de ve **Çizelge 3.13**'te, reaksiyon döngü koşulları ise **Çizelge 3.12**'de ve **Çizelge 3.14**'te verilmiştir. Roundup Ready'de yapılan nested PCR sonunda beklenen bant büyüklüğü 169 baz çiftidir.

Çizelge 3.11. Roundup Ready soyanın (GMO5/GMO9) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
GMO5 primeri	0.5 µM
GMO9 primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.12. Roundup Ready soyanın (GMO5/GMO9) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	30 sn	25
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	30 sn	
2.3	Uzama safhası	72	40 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Çizelge 3.13. Roundup Ready soyanın (GMO7/GMO8) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
GMO7 primeri	0.5 µM
GMO8 primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.14. Roundup Ready soyanın (GMO7/GMO8) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	30 sn	35
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	30 sn	
2.3	Uzama safhası	72	40 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

3.2.3.3.(2). MON810 Mısırın Belirlenmesi

Bu aşamada, **Zimmermann ve ark. (1998)** tarafından geliştirilen mg1, mg2, mg3 ve mg4 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.15**'te ve **Çizelge 3.17**'de, PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.16**'da ve **Çizelge 3.18**'de verilmiştir. Pozitif kontrol sonucunda beklenen bant büyüklüğü 149 baz çiftidir.

Çizelge 3.15. MON810 (mg1/mg2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR aşaması reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
mg1 primeri	0.5 μM
mg2 primeri	0.5 μM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.16. MON810 (mg1/mg2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	45 sn	35
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	50 sn	
2.3	Uzama safhası	72	50 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Çizelge 3.17. MON810 (mg3/mg4) amplifikasyonu için kullanılan Nested 2 PCR aşaması reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
mg3 primeri	0.5 μM
mg4 primeri	0.5 μM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.18. MON810 (mg3/mg4) amplifikasyonu için kullanılan Nested 2 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	45 sn	40
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	50 sn	
2.3	Uzama safhası	72	50 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

3.2.3.3.(3). Bt176 Mısırın Belirlenmesi

Mısırdaki Bt176 belirlenmesi için yapılan nested PCR analizlerinde **Studer ve ark.'nın (1997)** geliştirdiği CRYIA1, CRYIA2, CRYIA3 ve CRYIA4 primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.19**'da ve **Çizelge 3.21**'de PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.20**'de ve **Çizelge 3.22**'de verilmiştir. Pozitif kontrol sonucunda görülmesi beklenen bant büyüklüğü 189 baz çiftidir.

Çizelge 3.19. Bt176 (CRYIA1/CRYIA2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
CRYIA1 primeri	0.5 µM
CRYIA2 primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.20. Bt176 (CRYIA1/CRYIA2) amplifikasyonu için kullanılan Nested 1 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	40 sn	25
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	40 sn	
2.3	Uzama safhası	72	40 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Çizelge 3.21. Bt176 (CRYIA3/CRYIA4) amplifikasyonunda kullanılmış olan Nested 2 PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
CRYIA3 primeri	0.5 µM
CRYIA4 primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.22. Bt176 (CRYIA3/CRYIA4) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	40 sn	35
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	40 sn	
2.3	Uzama safhası	72	40 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

3.2.3.3.(4). Bt11 Mısırın Belirlenmesi

Mısırdaki Bt11 belirlenmesi için 11Bt1, 11Bt2, 11Bt3 ve 11Bt4 primerleri (Studer ve ark, 1997) kullanılarak yapılmış olan PCR reaksiyon koşulları **Çizelge 3.23**'te ve **Çizelge 3.25**'te, PCR döngü koşulları ise **Çizelge 3.24**'te ve **Çizelge 3.26**'da verilmiştir. Pozitif kontrol sonucunda görülmesi beklenen bant büyüklüğü 199 baz çiftidir.

Çizelge 3.23. Bt11 (11Bt3/11Bt4) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM
11Bt3 primeri	0.25 µM
11Bt4 primeri	0.25 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.24. Bt11 (11Bt3/11Bt4) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 1 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	15 sn	25
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	50	10 sn	
2.3	Uzama safhası	72	40 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Çizelge 3.25. Bt11 (11Bt1/11Bt2) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR reaksiyon koşulları

Kimyasallar	Konsantrasyon
Tris – HCl	10 mM
KCl	10 mM
NH ₄ SO ₄	2.5 mM
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM
11Bt1 primeri	0.5 µM
11Bt2 primeri	0.5 µM
Taq DNA polimeraz	1.0 ünite
DNA	5 ng

Çizelge 3.26. Bt11 (11Bt1/11Bt2) amplifikasyonu için kullanılmış olan Nested 2 PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	4 dk	1
2.1	Denatürasyon	95	15 sn	35
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	45 sn	
2.3	Uzama safhası	72	40 sn	
3.	Son uzama safhası	72	3 dk	1

Soya ve mısırdaki nested PCR aşamalarında kullanılan primerlerin baz dizilimleri **Çizelge 3.27'**de verilmiştir.

Çizelge 3.27. GDO spesifik belirleme aşamasında nested 1-2 PCR analizlerinde kullanılmış olan primer çiftleri

Primer Adı	Baz dizilimi 5'-3'
GMO5	CCA CTG ACG TAA GGG ATG ACG
GMO9	CAT GAA GGA CCG GTG GGA GAT
GMO7	ATC CCA CTA TCC TTC GCA AGA
GMO8	TGG GGT TTA TGG AAA TTG GAA
mg1	TAT CTC CAC TGA CGT AAG GGA TGA C
mg2	TGC CCT ATA ACA CCA ACA TGT GCT T
mg3	ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C
mg4	GCA TTC AGA GAA ACG TGG CAG TAA C
CRYIA1	CGG CCC CGA GTT CAC CTT
CRYIA2	CTG CTG GGG ATG ATG TTG TTG
CRYIA3	CCG CAC CCT GAG CAG CAC
CRYIA4	GGT GGC ACG TTG TTG TTC TGA
11Bt1	CAG GCA AGG ATT CTC CCA CA
11Bt2	CGA CAG AAG TTC CAG ATC CA
11Bt3	TCT TCT AAC TTG CCA TCC
11Bt4	AGA AGT TCT TCT AAG AAT ATC

3.2.4. PCR Aşamalarında Kullanılacak Kontrol DNA'ları

IRMM tarafından temin edilmiş olan ve konsantrasyonları; RR %0, %0.1, %0.5, MON810 %0, %0.1, %0.5, Bt11 %0, %0.1, %0.5, Bt176 %0, %0.1, %0.5 oranlarında değişen standart materyaller, PCR analizlerinde pozitif ve negatif kontroller için kullanılmıştır. Pozitif kontrol içerisinde GDO olan DNA içerir. Negatif kontrol, içerisinde GDO olmayan DNA içerir. Bitkiye özgü DNA taraması aşamasında analizi yapılan örnek DNA'sı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak analizi yapılan örnek DNA'sı dışında seçilen ceviz DNA'sı kullanılmıştır. Roundup Ready soya için yapılan 35S promotor ve Nos terminatörü tarama aşamasında pozitif kontrol olarak RR %0.5 GM, negatif kontrol olarak RR %0 GM kullanılmıştır. Mısır için yapılan 35S promotor ve Nos terminatörü tarama aşamasında pozitif kontrol olarak Bt11 %0.5 GM, negatif kontrol olarak Bt11 %0 GM kullanılmıştır. GDO spesifik belirleme aşamasında nested PCR analizlerinde RR için pozitif kontrol olarak RR %0.1 GM, negatif kontrol olarak RR %0 GM kullanılmıştır. MON810 için pozitif kontrolde MON810 %0.1 GM, negatif kontrolde MON810 %0 GM, Bt11 için pozitif kontrolde Bt11 %0.1 GM, negatif kontrolde Bt11 %0 GM, Bt176 için pozitif kontrolde Bt176 %0.1 GM, negatif kontrolde Bt176 %0 GM kullanılmıştır. Ayrıca tüm PCR analizlerinde pozitif ve negatif kontrol dışında DNA içermeyen, içeriğinde sadece saf su bulunan DNA'sız kontrol uygulanmıştır.

Yapılan her bir PCR analizi ürününden 8 µl, yükleme boyasından 2 µl kullanılarak toplam 10 µl'lik karışım %2 konsantrasyonunda hazırlanan agaroz jel yuvalarına yüklenmiştir. 0.5 x TBE tampon çözeltisinde (89 mM Tris-Cl, 89 mM borik asit, 20 mM EDTA) 100 voltta 2 saat koşularak etidiyum bromit ile boyanmış ve UV altında fotoğrafı çekilmiştir. Bant büyüklüklerini belirlemek için 50 baz çiftlik DNA bandı büyüklüğü belirleyicisi kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

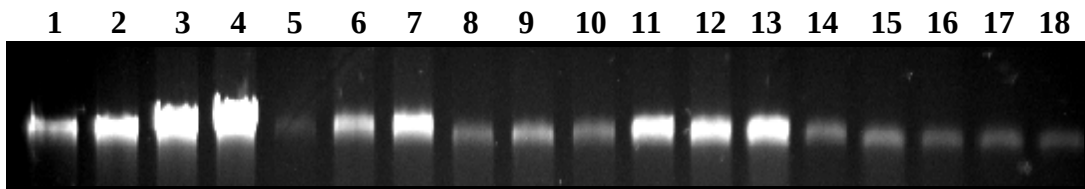
4.1. Soya, Mısır ve Gıda Ürünlerinde DNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

4.1.1. Soya Örneklerinde DNA İzolasyonu

İthal ve bölgemizde yetiştirilenlerden temin edilen soya tohumu örneklerinde yapılan DNA izolasyonu; Wizard-promega food kit, Nucleospin food kit ve CTAB (Pietsch ve ark., 1997) metodu kullanılarak yapılmıştır. Soya tohumu örneklerinin DNA izolasyonu sonunda, DNA kalitesi bakımından Wizard-promega food kiti ve Nucleospin food kiti, CTAB metoduna göre daha başarılı bir sonuç göstermiştir. Elde edilen DNA miktarları 5 ng'dan daha yüksek bulunmadığı için PCR analizlerinde direk olarak kullanılmıştır.

4.1.2. Mısır Örneklerinde DNA İzolasyonu

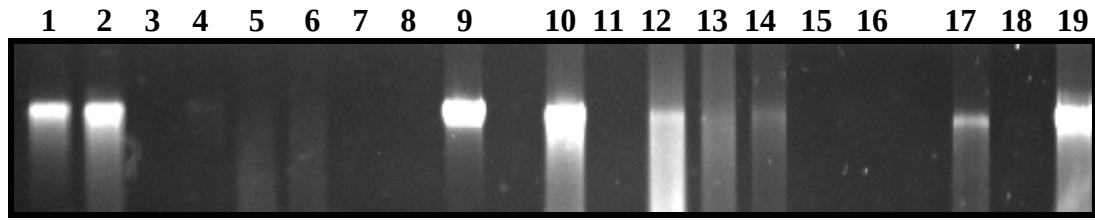
İthal olarak temin edilen ve bölgemizde yetiştirilen mısır tohumu örneklerinin DNA izolasyonu için, soya örneklerinde olduğu gibi Wizard -promega food kit, Nucleospin food kit ve CTAB (Pietsch ve ark., 1997) metodu kullanılmıştır. Mısır tohumu örneklerinden elde edilen DNA miktarı konsantrasyonunun soya tohumu örneklerinden elde edilen DNA konsantrasyonundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Mısır tohumu örneklerinin DNA izolasyonunda kullanılan her üç metot da başarılı olmuştur.



Şekil 4.1. Bazı soya ve mısır tohumu örneklerinin DNA miktarları. Sırası ile; 1. lamda 25 ng, 2. lamda 50 ng, 3. lamda 100 ng, 4. lamda 200 ng, 5.,8.,9. farklı ithal soya tohumu örnekleri, 6-18 arası farklı ithal mısır tohumu örnekleri

4.1.3. Gıda Ürünlerinde DNA İzolasyonu

Çeşitli marketlerden toplanan gıda örneklerinin DNA izolasyonu Wizard - promega food kit, Nucleospin food kit ve CTAB (Pietsch ve ark., 1997) metodu kullanılarak yapılmıştır. Çeşitli gıda ürünlerinde yapılmış olan DNA izolasyonunun jel görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Üç farklı yöntemle gıdalarda yapılan DNA izolasyonu. 1. lamda 25 ng, 2-9 arası örnekler Wizard metoduyla, 10-16 arası örnekler Nucleospin metoduyla 17-19 arası örnekler CTAB metoduyla yapılan örneklerdir. 2, 10, 17 nolu örnekler mısır unu, 3 ve 11 nolu örnekler nişasta, 4, 12 ve 18 nolu örnekler soya unu, 5, 6, 13 ve 14 nolu örnekler bisküvi, 7, 8, 15 ve 16 nolu örnekler mısır gevreği, 9 ve 19 nolu örnekler mısır tohumu

Soya ve mısır içeren gıda ürünlerindeki DNA izolasyon sonuçları Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Soya ve mısır içeren gıda ürünlerindeki DNA izolasyon sonuçları

	Wizard -promega food kit	Nucleospin food kit	CTAB
Bisküvi	+	+	-
Çikolata	-	-	-
Kek	-	-	-
Bebek sütü	-	-	-
Cips	-	-	-
Mısır unu	+	+	+
Soya unu	-	+	-
Mısır nişastası	-	-	-
Mısır gevreği	-	-	-

Ticari olarak temin edilen kitler CTAB metoduna göre DNA izolasyonunda daha başarılı olmuştur İzolasyon kitleri içinde de Nucleospin food kit gıda materyallerinin DNA izolasyonunda daha başarılı olmuştur. Wizard -promega food kit, Nucleospin food kit ile yapılan DNA izolasyonunda, numune olarak kullanılan

bisküvi, kek, nişasta ve soya unundan çok az miktarda DNA elde edilmiş olup, CTAB metodu ile bu örneklerden olumlu sonuç alınamamıştır. Ayrıca cips, bebek sütü, çikolata ve mısır gevreği ürünlerinden degrade olmuş DNA elde edilmiş ya da DNA elde edilememiştir.

Pinto ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; Wizard promega food kiti ile çikolata ve mısır yağı dışındaki bitkisel kökenli yiyeceklerde yaptıkları DNA izolasyonundan pozitif sonuç almışlardır. **Wang ve Fang'in (2005)** soya ve mısır ürünlerinde yapmış oldukları DNA izolasyonunda CTAB (**Fred ve ark., 1994**) metodunu kullanmış olup soya ve mısırdaki bulunan protein ve polisakkaritleri kloroform ve fenolle uzaklaştırabildiklerini belirtmişlerdir. **Sanhoty ve ark. (2002)**, Mısır'da değişik marketlerden topladıkları gıda ürünlerinde genetiği değiştirilmiş mısır ve soyanın belirlenmesi için yapmış oldukları çalışmada, DNA izolasyonu sonrasında işlenmiş ürünlerden elde edilen DNA konsantrasyonunu, tohumlardan elde edilen DNA konsantrasyonuna oranla çok daha düşük bulmuşlardır. İşlenmiş ürünlerdeki DNA konsantrasyonunun yok denecek kadar az bulunmasının nedenini bu ürünlerin pişirilme esnasında yüksek sıcaklığa maruz kalmalarına ve dolayısıyla DNA'ların yüksek sıcaklıkta degrade (bozulma) olmalarına bağlamışlardır. **Ferrari ve ark. (2007)**, genetiği değiştirilmiş soyayı belirlemek için uygun DNA izolasyon protokolünü ve PCR metodunu bulmayı amaçlamışlardır. Soya tohumu, soya sütü, soya sütü tozu, bebek maması ve meşrubat içeren 26 örneğin DNA izolasyonu için 3 çeşit CTAB metodu kullanmışlardır. Örneklerin işlenme aşamalarına göre farklı uzunluklarda fragment elde etmişlerdir. Soya sütü, bebek maması ve meşrubat örneklerinden DNA elde edememişlerdir. **Gryson ve ark. (2007)**, kurabiyede ve kurabiye hamurunda genetiği değiştirilmiş soyayı belirlemeyi amaçlamışlardır. Sıcaklığın DNA üzerindeki etkisini incelemek için pişirilmeden önce ve sonra kurabiye hamurundan DNA izolasyonu yapmışlar ve DNA miktarını karşılaştırmışlardır. Hamurdan izole edilen DNA konsantrasyonunun yüksek olduğunu ve pişirilmiş ürünün konsantrasyonunun sıcaklıktan dolayı oldukça azaldığını belirtmişlerdir.

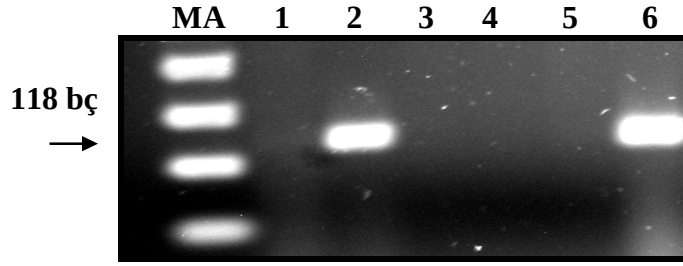
Bu çalışmada gıda materyallerinde yapılan DNA izolasyonu aşamasında Nucleospin food kit diğer metotlara göre daha iyi sonuç vermiştir. CTAB metoduyla

yapılan DNA izolasyonundan iyi sonuç alınamamıştır. Tohum örneklerinde yapılan DNA izolasyonunda ise her üç metot başarılı bulunmuştur. Soya tohumu örneklerine oranla mısır tohumu örneklerinden daha iyi sonuç alınmıştır. Gıda materyallerinde yeteri kadar DNA elde edilememesinin nedeni gıdaların pişirilme esnasında yüksek sıcaklığa maruz kalmaları ve dolayısıyla DNA'nın yüksek sıcaklıktan dolayı degrede olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılmış olan birçok çalışmanın verilerine göre ve bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre ham materyalin işlenme aşamaları arttıkça DNA konsantrasyonunun da giderek azaldığı görülmüştür. Ayrıca diğer araştırmacıların gıda materyallerinde yapmış oldukları DNA izolasyonunun pozitif sonuç vermesi farklı izolasyon kiti ve farklı gıda materyallerinin kullanılmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

4.2. DNA İzolasyonu Yapılan Örneklerde Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Belirlenmesi

4.2.1. Lektin ve Zein Geni Amplifikasyonu ile GDO Taraması

Çalışmada kullanılmak üzere temin edilen gıda materyallerinde DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, bu gıda örneklerinin içeriğinde hangi türe ait gen bulunduğunun belirlenmesi için soya – mısır DNA taraması yapılmıştır. Soya geninin belirlenmesi için GMO3/GMO4 primer çiftleri kullanılmıştır. Amplifikasyon sonrasında yapılmış olan jel görüntüsünde bazı örneklerde lektin geni için beklenen bant büyüklüğü elde edilmiştir. Dolayısıyla lektin geni bulunan gıda örneklerinin içeriğinde soya bulunduğu belirlenmiştir. Amplifikasyondan sonra yapılan jelin görüntüsü **Şekil 4.3'**te verilmiştir.



Şekil 4.3. Gıda örneklerindeki 118 bç'lik lektin geni amplifikasyonunun jel görüntüsü **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.** mısır unu, **2.** soya unu, **3.** bisküvi, **4.** bisküvi, **5.** kek, **6.** soya unu

Analizi yapılan gıda materyallerinde zein geninin belirlenmesi için ZEIN3/ZEIN4 primer çiftleriyle amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası koşulan jelde, ZEIN geni için beklenen bant sadece bir örnekte belirlenmiştir (**Şekil 4.4**). Dolayısıyla yapısında zein geni bulunduran bu örneğin mısır içerdiği belirlenmiştir.

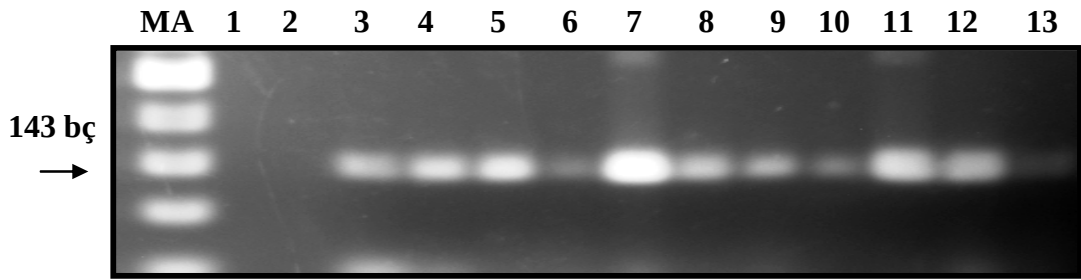


Şekil 4.4. Gıda örneklerindeki 277 bç'lik zein geni amplifikasyonunun jel görüntüsü **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.** mısır unu, **2.** soya unu, **3.** bisküvi, **4.** bisküvi, **5.** kek, **6.** soya unu

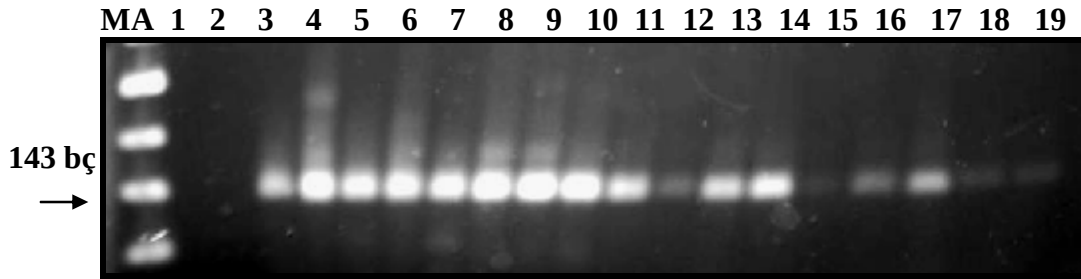
4.2.2. Örneklerin 35S Promotör ve Nos Terminatör ile Taranması

DNA'ları izole edilen ithal soya ve mısır tohumu ile bölgemizde yetiştirilen soya ve mısır tohumu örneklerinde GDO varlığının belirlenmesi için GDO belirlemede ilk adımı oluşturan 35S promotör ve Nos terminatör taraması yapılmıştır. İlk aşamada, ithal örneklerde Cauliflower Mosaic Virüsü'nden elde edilen 35S promotörünün varlığı belirlenmiştir. 35sPF ve 35sPR primerleri (**Wang ve Fang, 2005**) kullanılarak yapılan PCR taraması sonucunda PCR amplifikasyonu yapılan 30

ithal soya tohum örneği ile 45 ithal mısır tohumu örnekleri pozitif sonuç vermiş olup, ithal edilen tüm soya ve mısır örneklerinin genetiği değiştirilmiş ürün içerdikleri belirlenmiştir. Ülkemizde yetiştirilen soya ve mısır tohum örnekleri ile gıda ürünlerinde genetiği değiştirilmiş ürüne rastlanmamıştır. Yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda ithal soya ve ithal mısır örneklerinden elde edilen agaroz jellerden görünüm sırasıyla **Şekil 4.5** ve **Şekil 4.6**'da verilmiştir.

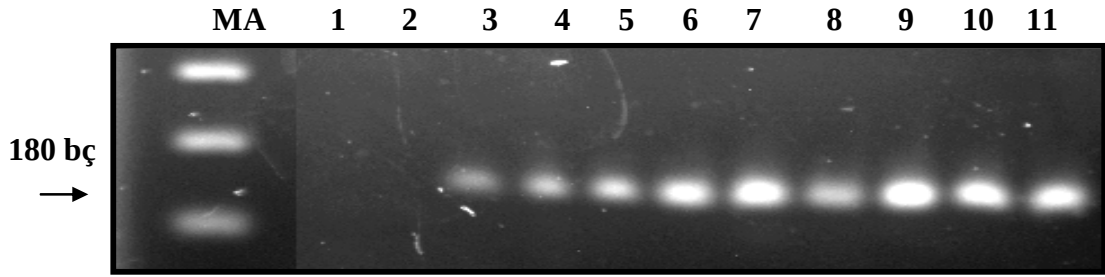


Şekil 4.5. İthal soya tohumu örneklerinde 35S promotör ile yapılmış olan 143 baz çiftlik PCR taramasının jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.** Kontrol: saf su, **2.** Negatif kontrol: %0 RR, **3.** Pozitif kontrol: %0.5 RR, **4-13 arası** ithal soya tohumu örnekleri



Şekil 4.6. Mısır tohumu örneklerinde 35S promotör ile yapılmış olan 143 baz çiftlik PCR taramasının jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.** Kontrol: saf su, **2.** Negatif kontrol: %0 Bt11, **3.** Pozitif kontrol: %0.5 Bt11, **4-19 arası** ithal mısır tohumu örnekleri

Soya ve mısır tohumu örneklerindeki ikinci PCR taramasında, tuz bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens*'ten izole edilen ve GDO'lara aktarılmış olan genin varlığı Nos terminatör geninin amplifikasyonu ile belirlenmiştir. Soya ve mısır örneklerinden sadece ithal olan tohum örneklerinde 180 baz çiftlik amplifikasyon elde edilmiştir (**Şekil 4.7**).



Şekil 4.7. İthal soya tohumu örneklerinde Nos terminatör ile yapılmış olan 180 baz çiftlik PCR taramasının jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.**Kontrol saf su, **2.** %0 RR Negatif kontrol, **3.** %0.5 RR Pozitif kontrol, **4-11** arası ithal soya tohumu örnekleri

Değişik marketlerden toplanan farklı gıda materyallerinde yapılan analiz sonucu, bu materyallerin bazılarının yapılarında lektin- zein geni belirlenmiştir. İkinci aşama olarak lektin-zein geni belirlenmiş olan gıda materyallerinde 35S promotör için 35sPF/35sPR primer çifti (**Wang ve Fang, 2005**), Nos terminatör için NOS1-NOS3 primer çifti kullanılarak PCR taraması yapılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda beklenen bant büyüklüğü görülmemiştir. 35S promotörün ve Nos terminatörün varlığı tespit edilmediğinden dolayı analizi yapılan gıda materyallerinin GDO'lu olmadığı sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla bu aşamadan sonra gıda materyallerinde yapılan GDO analizlerine devam edilmemiştir.

Oraby ve ark. (2005), hazır gıdalarda 35S promotör ve Nos terminatör varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada; yerel marketlerden topladıkları ve analiz ettikleri 24 gıda örneği içersinden 3 tanesinin 35S promotör taramasında pozitif sonuç verdiğini, Nos terminatör taramasında ise tüm ürünlerin negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. **Lipp ve ark. (2001)**, birçok işlenmiş yiyecek materyallerinde genetiği değiştirilmiş organizmaları belirlemek için geçerli PCR metodunu bulmak amacıyla yapmış oldukları çalışmada, CTAB metodu ve Wizard food kiti ile DNA izolasyonları yapılan gıda materyallerinde 35S promotörün ve Nos terminatörün belirlenmesi için yapmış oldukları PCR taramalarında iyi sonuç verecek çeşitli primer çiftlerini denemişlerdir. 35S promotörü için tüm materyallerde 35S1/35S2 primer çifti en zayıf sonucu verirken 35S-cf3/35S-cr4 primer çifti en iyi sonucu vermiştir. Nos terminatörü için tüm materyallerde denenmiş olan tüm primer

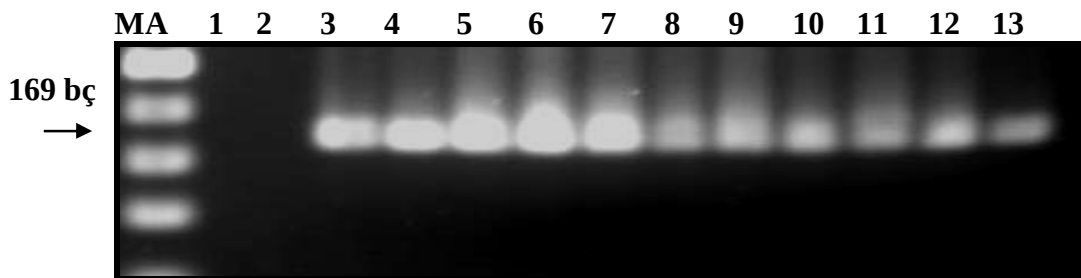
çiftlerinin içinden en küçük ampikonu verdiği için HA-nos-118f/HA-nos-118r primer çifti uygun bulunmuştur.

Araştırmacıların gıda materyallerinde 35S promotör ve Nos terminatör varlığını belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmalarda PCR taraması sonucunda pozitif sonuç elde etmelerinin nedeni farklı gıda materyallerinin kullanmış olduklarından kaynaklanmaktadır.

4.3. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalarda Spesifik Belirleme Aşaması

4.3.1. Soya Örneklerinde Roundup Ready Soyanın Belirlenmesi

Önceki aşamada, herbisite toleranslılık geni içeren Roundup Ready soyanın belirlenmesi için 35S promotör ve Nos terminatör primerleriyle yapılan PCR taramasında pozitif sonuç veren soya tohumu örnekleri kullanılmıştır. GMO5/GMO9 ve GMO7/GMO8 primer çiftleri (**Meyer ve Jaccaud, 1997**) kullanılarak RR soyaya özgü 2 aşamalı nested PCR yapılmıştır. Yapılan iki aşamalı PCR analizi sonucunda tüm ithal soya örneklerinde RR soya için beklenen amplifikasyon elde edilmiştir. Dolayısıyla ithal gelen tüm soya örneklerinin GDO'lu olduğu belirlenmiştir. Bölgemizde yetiştirilen soya örneklerinde beklenen amplifikasyon elde edilmemiştir. Dolayısıyla bölgemizde yetiştirilen soya örneklerinde, herbisite toleranslılık geni içeren Roundup Ready'e rastlanmamıştır. Agaroz jel elektroforez yapılan PCR ürünlerinin görünümü **Şekil 4.8'**de verilmiştir.



Şekil 4.8. Soya tohumu örneklerinde RR soyanın belirlenmesi için yapılan 169 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.** Kontrol: saf su, **2.** Negatif kontrol: %0 RR, **3.** Pozitif kontrol: %0.1 RR, **4-13** arası ithal soya tohumu örnekleri

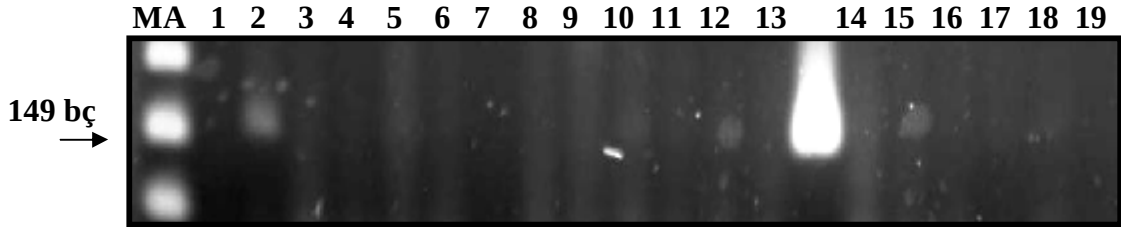
Ferrari ve ark. (2007) genetiği değiştirilmiş soyayı belirlemek için uygun DNA izolasyon protokolünü ve PCR metodunu bulmak için yapmış oldukları çalışmada kullanmış oldukları 3 çeşit CTAB protokolüyle DNA'sı izole edilen soya tohumu ve soya içeren 26 işlenmiş yiyecekte GMO5/GMO9, GMO7/GMO8 primer çiftleriyle RR1/RR2, RR4/RR5 primer çiftlerini kullanarak nested PCR yapmışlardır. Nested PCR sonucunda 1. protokolle izole edilen DNA'lar kullanıldığında %1 ve %10 oranında RR soya içeren örnekler, 2. ve 3. protokolle izole edilen DNA'lar kullanıldığında ise %0.1 ve %0.01 oranında RR soya içeren örnekler beklenen bant büyüklüğünü vermiştir. RR primer çiftleri ile yapılan nested PCR'da zayıf olarak ekstra bantlar görülmüştür. Araştırmacılar, GMO5/GMO9, GMO7/GMO8 primer çiftlerinin daha spesifik ve tekrarlanabilir olduğunu belirtmişlerdir. **Brod ve ark. (2007)**, Brezilya'daki marketlerden toplamış oldukları soya unu, bebek maması ve soya sütü örneklerinde genetiği değiştirilmiş soya olan Roundup Ready'yi belirlemeyi amaçlamışlardır. GMO5/GMO9 ve GMO7/GMO8 primer çiftlerini kullanarak yapmış oldukları nested PCR sonucunda bebek mamalarının hiçbirinde genetiği değiştirilmiş soyaya rastlanmamıştır. 6 soya örneğinden 4'ü, 25 soya sütü tozundan 15'i Roundup Ready soya için pozitif sonuç vermiştir.

Bu çalışmada, RR soyanın belirlenmesi için yapılan nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsünde görüldüğü gibi 4, 5, 6, 7 no'lu soya örnekleri diğer örneklerle göre daha fazla amplifikasyon göstererek daha güçlü bant vermişlerdir. Buna göre bu örneklerin pozitif kontrol olarak kullanılan %0.5'lik RR'den daha fazla GDO içerdiği düşünülmektedir. Diğer örneklerin GDO oranının %0-%0.5 arasında olduğu düşünülmektedir.

4.3.2. Mısır Örneklerinde MON810 Mısırın Belirlenmesi

Tarama analizlerinde pozitif sonuç veren mısır tohumu örneklerinde, mısır kurduna dirençlilik geni olan ve *B. thuringiensis*'ten izole edilen CryIAb genini içeren genetiği değiştirilmiş mısır çeşitlerinden bir tanesi olan MON810'nun varlığını belirlemek amacıyla mg1/mg2 ve mg3/mg4 primer çiftleri kullanılarak 2 aşamalı nested PCR yapılmıştır. Uygun döngü koşulları ve reaksiyon koşulları

sağlandıktan sonra yapılan PCR sonucunda toplam 5 örnekte beklenen amplifikasyon görülmüştür (Şekil.4.9).



Şekil.4.9. Mısır tohumu örneklerinde MON810'un belirlenmesi için yapılmış olan 149 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık **1.** Kontrol: saf su, **2.** Pozitif kontrol: %0.1 MON810, **3.** Negatif kontrol: %0 MON810, **4-19** arası ithal mısır tohumu örnekleri

4.3.3. Mısır Örneklerinde Bt176 Mısırın Belirlenmesi

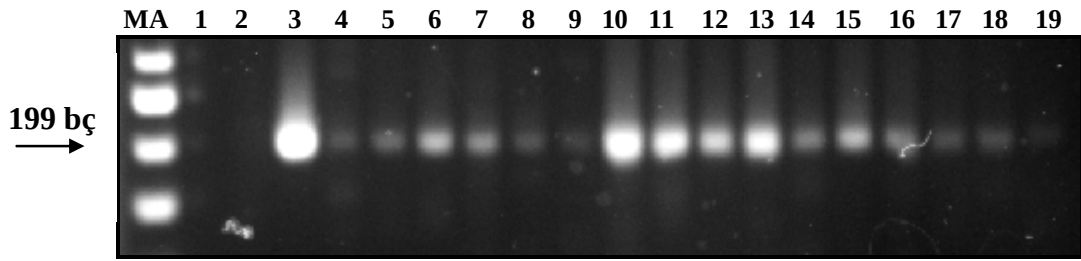
Zararlılara karşı dirençlilik geni olan cry1A (b) genini içeren genetiği değiştirilmiş mısır çeşidi olan Bt176' yı belirlemek amacıyla türe özgü nested PCR yapılmıştır. Bt176 mısır için yapılmış olan nested PCR reaksiyonunda CRYIA1/CRYIA2, CRYIA3/CRYIA4 primerleri (Studer ve ark., 1997) kullanılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jelde koşturulmasıyla bölgemizde yetiştirilen mısır tohumlarında Bt176'ya rastlanmazken, ithal mısır tohumlarının 2 tanesinde Bt176 için beklenen bant büyüklüğü elde edilmiştir (Şekil.4.10).



Şekil.4.10. Mısır tohumu örneklerinde Bt176'nın belirlenmesi için yapılmış olan 189 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık **1.** Kontrol: saf su, **2.** Negatif kontrol: %0 Bt176, **3.** Pozitif kontrol %0.1 Bt176, **4-23** arası ithal mısır tohumu örnekleri

4.3.4. Mısır Örneklerinde Bt11 Mısırın Belirlenmesi

Hem zararlılara karşı dayanıklılık hem de herbisite toleranslılık özelliği gösteren Bt11 mısırın belirlenmesi için diğer mısır çeşitlerinde olduğu gibi türe özgü olan 11Bt3/11Bt4 ve 11Bt1/11Bt2 primer çiftleri (**Studer ve ark, 1997**) kullanılarak iki aşamalı nested PCR yapılmıştır. PCR ürünlerinin negatif ve pozitif kontrolü sonucunda bölgemizde yetiştirilen tohumlarda Bt11 için beklenen bant büyüklüğüne rastlanmazken, tüm ithal tohumlarda Bt11'e ait bant büyüklüğü elde edilmiştir (**Şekil.4.11**).



Şekil.4.11. Mısır tohumu örneklerinde Bt11'in belirlenmesi için yapılmış olan 199 baz çiftlik nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsü. **MA:** 50 baz çifti aralıklı moleküler ağırlık, **1.** Kontrol: saf su, **2.** Negatif kontrol: %0 Bt11, **3.** Pozitif kontrol %0.1 Bt11, **4–19** arası ithal mısır tohumu örnekleri

Cardarelli ve ark. (2005), Brezilya'da değişik marketlerden topladıkları 89 tane işlenmiş gıda örneğinde GDO belirlemek amacıyla, soya ve mısır içeren gıda örneklerinde yapmış oldukları analiz sonucu soya içeren 22 gıda örneğinden 16'sının RR içerdiği, mısır içeren 8 gıda örneğinin ise Bt176 ve MON810 içermediğini saptamışlardır. **Sanhoty ve ark. (2002)**, Mısır'da genetik olarak değişmiş soya ve mısıra belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada değişik marketlerden 40 soya ve 40 mısır ürününde kalitatif ve kantitatif analizler yapmışlardır. Analizler sonucunda soya ürünlerinin %20'si Roundup Ready içerdiği, mısır ürünlerinin %15'i Bt176 ve %12.5'i Bt11 içerdiği belirlenmiştir. StarLink mısır çeşidi ise Bt11 ve Bt176 içeren 4 örnekte karışık olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, MON810'un belirlenmesi için yapılan nested PCR reaksiyonunun jel görüntüsünde görüldüğü gibi 14 no'lu örnek pozitif kontrol olarak kullanılan %0.5 MON810'dan daha yoğun bant vermiştir. Dolayısıyla bu örneğin

%0.5 oranından daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bt176'ya ait jel görüntüsünde ise 16 ve 18 no'lu mısır örneklerinin pozitif kontrol olarak kullanılan %0.5 Bt176 ile aynı yoğunlukta bant vermesi bu örneklerin de %0.5 oranında GDO'lu olduğunu göstermektedir. Diğer örneklerin 16 ve 18 no'lu örnekler gibi bant vermemesinden dolayı Bt176 içermedikleri görülmüştür. Bt11'e ait jel görüntüsünde görüldüğü gibi tüm örnekler birbirinden farklı yoğunlukta bant vermişlerdir. Dolayısıyla her bir örnek için Bt11 oranının da farklı olduğu düşünülmektedir. Böylece tüm ithal mısır tohumu örneklerinin Bt11 içerdiği, 5 tanesinin MON810 ve 2 tanesinin de Bt176 içerdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak Arjantin'den ithal edildiği belirlenen tüm soya ve mısır tohumlarının transgenik olduğu bu çalışma ile ortaya çıkmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, ithal olarak temin edilen ve bölgemizde yetiştirilen soya ve mısır tohumu örnekleriyle değişik marketlerden toplanan gıda materyallerinde genetiği değiştirilmiş organizmaların belirlenmesi için kalitatif olarak analiz yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu gıda materyalleri ile bölgemizde yetişen soya ve mısır örnekleri dışında tüm ithal tohumların genetiği değiştirilmiş olduğu belirlenmiştir. Analizin ilk aşaması olarak tohum örneklerinde ve gıda materyallerinde, 3 farklı metot (Wizard -promega food kit, Nucleospin food kit ve CTAB metodu) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu üç metot, DNA miktarı ve kalitesine göre karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucuna göre;

1. Gıda materyallerinde istenilen şekilde DNA elde edilememiştir. Buna rağmen gıda materyallerin DNA izolasyonunda Nucleospin food kit diğer metotlara göre daha başarılı olmuştur. Yeterli derecede DNA elde edilememesinin nedeni gıdaların pişirilme sırasında yüksek sıcaklığa maruz kalmalarından dolayı DNA'ların yapılarının bozulmuş olduğu düşünülmektedir.
2. Tohum örneklerinde her üç metotla yapılan DNA izolasyonundan pozitif sonuç alınmıştır. Ancak ticari olarak temin edilen kitler CTAB metoduna göre daha başarılı bulunmuştur. Ayrıca soya tohumuna oranla mısır tohumundan daha kolay ve daha fazla DNA elde edilmiştir.

Sonuç olarak DNA izolasyonu için gıda materyallerinde ticari kitler uygun bulunmuşken, tohum örnekleri için her üç metot da uygun bulunmuştur.

GDO analizlerinin 2. aşamasında gıda materyallerine özgü olan lektin – zein geni taraması yapılmıştır. Yapılan PCR analizlerinin sonunda 2 gıda örneği, lektin genine ait bant büyüklüğünü vermiştir. Dolayısıyla bu örneğin soya içerdiği belirlenmiştir. Bir gıda örneğinde ise zein genine ait bant büyüklüğü görülmüştür. Dolayısıyla bu iki örneğin de mısır içerdiği belirlenmiştir. Üçüncü aşama olarak tohum örneklerinde ve lektin – zein geni içeren gıda materyallerinde 35S promotörün

ve Nos terminatörün belirlenmesi için PCR taraması yapılmıştır. İthal soya örneklerinin tümünde 35S promotöre ait ve Nos terminatöre ait bant belirlenmiştir. Bölgemizde yetişen soya örneklerinde bu bantlara rastlanmamıştır. İthal mısır tohumu örneklerinin tümünde, 35S promotöre ve Nos terminatöre ait bant belirlenmiştir. Bölgemizde yetişen mısır örneklerinde bu bantlara rastlanmamıştır. Lektin ve zein geni içeren gıda materyallerinde yapılan tarama sonucunda 35S promotör ve Nos terminatör için beklenen bant büyüklüğü elde edilmemiştir. Dolayısıyla gıda materyallerinde GDO belirlenmemiş olup analizlere devam edilmemiştir. 35S promotör ve Nos terminatör için bant gösteren soya ve mısır tohumu örneklerinde son aşama olarak GDO – spesifik analizi yapılmıştır. Bu aşamada, soya tohumu örneklerinde Roundup Ready'nin, mısır tohumu örneklerinde MON810, Bt176 ve Bt11 çeşitlerinin belirlenmesi için nested PCR yapılmıştır. Yapılan nested PCR reaksiyonları sonrasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Tüm ithal soya tohumu örneklerinde RR (Roundup Ready) için beklenen bant büyüklüğü görülmüştür. Dolayısıyla bu soya tohumu örneklerinin herbisite karşı toleranslılık geni içerdiği belirlenmiştir. Bölgemizde yetişen soya örneklerinde Roundup Ready'e rastlanmamıştır.
2. Mısır tohumu örneklerinde MON810'un belirlenmesi için yapılan nested PCR sonucunda sadece ithal tohum örneklerinin 5 tanesinde bu mısır çeşidine ait bant büyüklüğüne rastlanmıştır. Dolayısıyla bu beş örneğin mısır kurduna karşı dirençlilik geni içerdiği belirlenmiştir.
3. Bt176'nın belirlenmesi için yapılan nested PCR sonucunda ithal mısır tohumlarının 2 tanesinde Bt176'ya ait bant büyüklüğü belirlenmişken bölgemizde yetişen mısır tohumu örneklerinde Bt176'nın varlığına rastlanmamıştır.
4. Bt11'in belirlenmesi için yapılan nested PCR sonucunda tüm ithal mısır tohumlarında Bt11'e ait bant büyüklüğü belirlenmişken, bölgemizde yetişen mısır tohumu örneklerinde Bt11'e rastlanmamıştır.

Ülkemizde bugün genetiği değiştirilmiş organizmalı bitki çeşitlerinin ekimi, dikimi, ithalatı yasaktır. Ancak bu konuyla ilgili kesin olarak bir yasa bulunmazken 26 Haziran 2007’de TBMM tarafından kabul edilen Biyoçeşitlilik Sözleşmesi ve eki niteliğindeki Cartagena Biyogüvenlik Protokolü mevcuttur. Avrupa Birliği yasalarına göre yüzde 0.9’u geçen GDO içeren gıdaların etiketlenme zorunluluğu vardır. Ülkemizdeki gerek biyoçeşitliliğin korunması gerekse bilinçli tüketimin gerçekleştirilmesi için genetiği değiştirilmiş organizmaların ve bunları ham madde olarak bulunduran işlenmiş gıdaların kantitatif analizleri yapılmalı ve bu gıdalar etiketlenmelidir. Limanlarda, gümrük kapılarında kontrol laboratuvarları kurulmalı ve ithal olarak ülkemize gelen tohumlar GDO testinden geçirilmelidir. Bu önerilerin uygulanabilmesi için Biyogüvenlik yasası mutlaka hayata geçirilmelidir.

KAYNAKLAR

ANONİM, 2006. Web page. <http://www.tarimsal.com/makaleler>.

ANONİM, 2008a. Web page. <http://www.tarimmerkezi.com>.

ANONİM, 2008b. COMPASS web page. www.gmo-compass.org.

ANONİM, 2008c. Web page. <http://www.bilgibeykoz.net>.

BROD, F.C.A., FERRARI, C. S., VALENTE, L. L., and ARISI, A.C.M., 2007. Nested PCR Detection of Genetically Modified Soybean in Soybean Flour, Infant Formula and Soymilk. LWT., 40: 748-751.

CARDARELLI, P., BRANQUINHO, M.R., FERREIRA, R.T.B. DA CRUZ, F.P., and GEMAL, A.L., 2005. Detection of GMO in Food Products in Brazil: The INCQS Experience. Food Control, 16: 859–866.

CHIUEH, L. C., CHEN Y.L., and SHIH, D.Y.C., 2002. Study on The Detection Method of Six Varieties of Genetically Modified Maize and Processed Foods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 25-33.

ENGEL, K. H., MOREANO, F., EHLERT A., and BUSCH, U., 2006. Quantification of DNA From Genetically Modified Organisms in Composite and Processed Foods. Trends in Food Science& Technology, 17: 490-497.

ERZİNCANLI, H. O., 2006. Tarımda Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Bunların Belgelendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Bölümü Aralık 2006, 119 sayfa.

FERRARI, C. D. S., VALENTE, L. L., BROD, F. C. A., TAGLIARI, C., SANT'ANNA, E. S., and ARISI, A. C. M., 2007. Evaluation of Polymerase Chain Reaction and DAN Isolation Protocols for Detection of Genetically Modified Soybean. International Journal of Food Science and Technology, 42: 1249-1255.

FORTE, V. T., DI PINTO, A., MARTINO, C., TANTILLO, G.M., GRASSO, G., and SCHENA, F.P., 2005. A General Multiplex –PCR Assay for The General Detection of Genetically Modified Soya and Maize. Food Control, 16: 535-539.

- FOTI, N., ONORI, R., DONNARUMMA, E., DE SANTIS, B., and MIRAGLIA, M., 2006.** Real-time PCR Multiplex Method for The Quantification of Roundup Ready Soybean in Raw Material and Processed Food. *Eur Food Res Technol.*, 222: 209-216.
- FRED, M. A., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., and STRUHL, K., 1994.** *Current Protocols in Molecular Biology*. 2.3.3-2.3.5. Virginia Benson Chanda ed. JohnWiley and Sons, Inc. Canada.
- GREINER, R., KONETZNY, U., and VILLAVICENCIO, A. L. C. H., 2005.** Qualitative and Quantitative Detection of Genetically Modified Maize and Soy in Processed Foods Sold Commercially in Brazil by PCR-based Methods. *Food Control*, 16: 753-759.
- GRYSON, N., DEWETTINCK, K. and MESSENS, K., 2007.** Detection of Genetically Modified Soy in Doughs and Cooking. *Cereal Chem.*, 84: 109-115.
- HOHNE, M., SANTISI, C. R., and MEYER, R., 2002.** Real-time Multiplex PCR: an Accurate Method for the Detection and Quantification of 35S-CaMV Promoter in Genetically Modified Maize-Containing Food. *Eur Food Res Technol.*, 215: 59-64.
- JAMES, C., 2005.** Global Status of Commercialized Biotech/GM crops: ISAAA Briefs. The International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications, Ithaca, New York.
- JENSEN, A. H., RONNING, S. B., LOVSETH, A. and BERDAL, K. G., 2003.** PCR Tecnology for Screening and Quantification of Genetically Modified Organisms (GMO). *Anal Bional Chem* 375: 985-993.
- KULAÇ, İ., AĞIRDİL, Y., YAKIN, M., 2006.** Sofralarımızdaki Tatlı Dert, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*; 31 (3): 151–155.

- LIN, H., WEI, H., LIN, F., and SHIH, D., 2006.** Study of PCR Detection Methods for Genetically Modified Soybeans with Reference Molecules. *Journal of Food and Drug analysis*, 14: 194-202.
- LIPP, M., ANKLAM, E., BRODMANN, P., PIETSCH, K., and PAUWELS, J., 1999.** Results of an Interlaboratory Assessment of a Screening Method of Genetically Modified Organisms in Soybeans and Maize. *Food Control*, 10: 379-383.
- LIPP, M., BLUTH, A., EYQUEM, F., KRUSE, L., SCHIMMEL, H., and EEDE, G. V., 2001.** Validation of a Method Based on Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genetically Modified Organisms in Various Processed Foodstuffs. *Eur Food Res Technol.*, 212: 497-504.
- LIU, Y. C., LIN, S. H., and LAI, H. M. 2005.** Detection of Genetically Modified Soybean and Its Product Tou-kan by Polymerase Chain Reaction with Dual Pairs of DNA Primers. *Eur Food Res Technol.*, 221: 725-730.
- MARGARIT, E., REGGIARDO, M. I., VALLEJOS, R. H., and PERMINGEAT, H. R., 2006.** Detection of BT Transgenic Maize in Foodstuffs. *Food Research International*, 39: 250-255.
- MEYER, R., and JACCAUD, E., 1997.** Detection of Genetically Modified Soya in Processed Food Products: Development and Validation of a PCR Assay for the Specific Detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. *Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference*, Interlaken, Switzerland, Event No. 220 1, 23-28.
- MORIUCHI, R., MONMA, K., SAGI, N., UNO, N., and KAMATA K., 2007.** Applicability of Quantitative PCR to Soy Processed Foods Containing Roundup Ready Soy. *Food Control*, 18: 191-195.
- ONISHI, M., MATSUOKA, T., KODAMA, T., KASHIWABA, K., FUTO, S., AKIYAMA, H., MAITANI, T., FURUL, S., OGUCHI, T., and HINO, A., 2005.** Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for Simultaneous Detection of Eight Events of Genetically Modified Maize. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9713-9721.

- ORABY, H. AS, HASSAN, A. A., and MOSSALLAM, A. A., 2005.** Screening Food Products for the Presence of CaMv 35S Promoter and NOS 3' Terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1974–1980.
- OVESNA, J., DEDIKOVA, L., HORACEK, J., SADILOVA, E., KUCERA, L., and MESKOVA, L., 2002.** Comparison of Different PCR –based Protocols for Detection of Roundup Ready Soybean. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 1: 55-63.
- ÖLÇÜ, Nisan 2005.** TMMOB Yayın Organı.
- PERMINGEAT, H. R., REGGIARDO, M. I., and VALLEJOS, R. H., 2002.** Detection and Quantification of Transgenes in Grains by Multiplex and Real-Time PCR. *J. Agric.Food Chem.*, 50: 4431-4436.
- PIETSCH, K., WAIBLINGER, U., BRODMANN, P., and WURZ, A., 1997.** Screeningverfahren zur Identifizierung Gentechnisch Veranderter Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel Rundschau Heft*, 2, 35-38.
- PINTO, A. D., FORTE, V. T., GUASTADISEGNI, M. C., MARTINO, C., SCHENA, F. P., and TANTILLO, G., 2007.** A Comparison of DNA Extraction Methods for Food Analysis. *Food Control*, 18:76-80.
- RUDI, K., RUD I., and HOLCK, A., 2003.** A Novel Multiplex Quantitative DNA Array Based PCR (MQDA-PCR) for Quantification of Transgenic Maize in Food and Feed. *Nucleic Acids Research*, Vol.31, No. 11 e62.
- SANHOTY, R. EL., BROLL, H., GROHMANN, L., LINKE, B., SPIEGELBERG, A., BOGL, K. W., and ZAGON, J., 2002.** Genetically Modified Maize and Soybean on the Egyptian Food Market. *Nahrung/Food*, 46:5, 360-363.
- STUDER, E., DAHINDEN, I., LUTHY, J., and HUBNER, P., 1997.** Nachweis des Gentechnisch Veränderten 'Maximizer'-Mais Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene* 88, 515-524.

- TONY, MA., BUTSCHKE, A., ZAGON, J., BROLL, H., SCHAUZU, M., AWADALLA, SA., HAFEZ, H. M., and FLACHOWSKY, G., 2003.** Incidence of Genetically Modified Soybean and Maize as Animal Feed in Egypt. *Journal Of Animal And Feed Sciences*, 12: 325-339.
- TOZZINI, A. C., MARTINEZ, M. C., LUCCA, M. F., ROVERE, C. V., DISTEFANO, A. J., VAS, M., and HOPP, H. E., 2000.** Semi-quantitative Detection of Genetically Modified Grains Based on CaMV 35S Promoter Amplification. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3(2).
- TUNALIOĞLU, R., 2004.** Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü - Aralık 2004, yayın no: 7-2. Ankara.
- YAMAGUCHI, H., SASAKI, K, UMETSU, H., and KAMADA, H., 2003.** Two Detection Methods of Genetically Modified Maize and the State of Its Import into Japan. *Food Control*, 14: 201-206.
- YANG, L., GUO, J., PAN A., ZHANG, H., ZHANG, K., WANG, Z., and ZHANG, D., 2007.** Event-Specific Quantitative Detection of Nine Genetically Modified Maizes Using One Novel Standard Reference Molecule. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 15-24.
- WANG, W.Y., and FANG, T., 2005.** Development of Multiplex and Quantitative PCR Assay to Detect Genetically Modified Roundup Ready Soybean in Foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13:132-138.
- VOLLENHOFER, S., BURG, K., SCHMIDT, J., and KROATH, H., 1999.** Genetically Modified Organisms in Food-Screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5038-5043.
- ZIMMERMANN, A., HEMMER, W., LINIGER, M., LUTHY, J., and PAULI, U., 1998.** A Sensitive Detection Method For Genetically Modified MaisGard Corn Using a Nested PCR-system. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, 31: 664-667.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Hatay'ın Antakya ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Antakya'da tamamladım. Lisans eğitimime, 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladım. 2006 yılında aynı bölümden Biyolog olarak mezun oldum. 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.