



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA ve HAYVAN YEMI OLARAK TÜKETİLEN ŞEKER
PANCARINDA (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) GENETİK
MODİFİKASYONUN BELİRLENMESİ

Havva KAYA

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

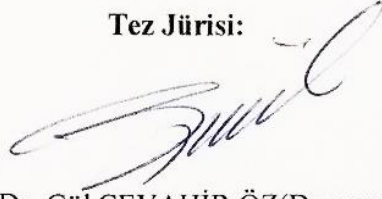
DANIŞMAN
Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Aralık, 2016

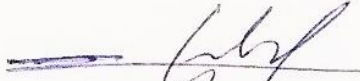
İSTANBUL

Bu çalışma 19.12.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

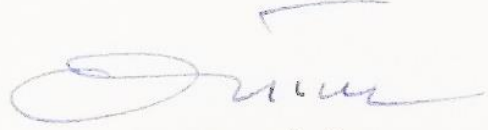
Tez Jürisi:



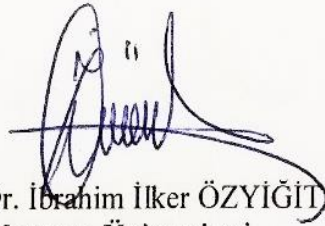
Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Orhan KÜÇÜKER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT
Marmara Üniversitesi
Fen- Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Gülriz BAYÇU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

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

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 49859 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimine her daim başvurduğum saygıdeğer danışmanım, hocam **Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ**'e teşekkürlerimle;

Tez çalışmamda büyük yardımlarını esirgemeyen sevgili **Hande MORGİL**'e, yine desteklerini eksik etmeyen kıymetli arkadaşlarım **Tuğçe ERÜRKER** ve **ILGIN AKPINAR** ve tüm botanik kadrosuna şükranlarımla;

Ayrıca İstanbul Üniversitesi Botanik ailesindeki huzur kaynağı eşsiz bitkilere ve Kedi Sibel başta olmak üzere tüm hayvan dostlarıma iyi dileklerle;

Son olarak sıradan kelimelerle anlatılamayacak kadar minnettar olduğum biricik ailem **Fatma, Mehmet, Sümeyye KAYA**'ya en samimi muhabbetlerimle...

Aralık 2016

Havva KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. ŞEKER PANCARI.....	4
2.1.1. Tarihi.....	4
2.1.2. Kullanım Alanı.....	4
2.1.3. Dünyada Şeker Pancarı Üretimi.....	5
2.1.4. Türkiye'de Şeker Pancarı Üretimi.....	5
2.2. TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ	8
2.2.1. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO).....	9
2.2.1.1. Niçin Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler Üretiriz?.....	10
2.2.1.2 GDO'dan gelebilecek tehlikeler.....	11
2.2.2. GDO Üretim Teknikleri.....	11

2.2.2.1 CRISPR/Cas9 Sistemi ve GDO.....	13
2.3.GENETİK MODİFİKASYON YOLUYLA BİTKİSEL ÜRETİM.....	14
2.3.1. GD Şeker Pancarı	15
2.3.2. Herbisite Dayanıklı Şeker Pancarı.....	17
2.4. GENETİK VARYASYON ANALİZ TEKNİKLERİ.....	19
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR).....	19
2.4.1.1. PZR'nin gelişimi ve çalışma sistemi.....	19
2.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1. ÖRNEK TOPLANMASI	22
3.2. DNA İZOLASYONU	24
3.2.1. CTAB Yöntemi İle DNA İzolasyonu.....	24
3.2.2. CTAB DNA İzolasyon Prosedürü	25
3.3. DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ	26
3.3.1. Spektrofotometrik Analiz.....	26
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)	26
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.3.4. GDO Analizi İçin Gerçek Zamanlı PZR.....	29
4. BULGULAR.....	32
4.1. DNA İZOLASYONU VE SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ.....	32
4.2. TÜR TAYİNİ.....	35

4.3. GENOMDA YABANCI GEN ANALİZİ.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR.....	47
EKLER.....	53
EK 1. Gerçek Zamanlı PZR CP Değerleri Listesi.....	53
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Dünyada yıllara göre şeker pancarı ekimi (ISO, 2015).....	5
Şekil 2.2: Türkiyede şeker pancar üremi (TÜİK 2016).....	6
Şekil 2.3: 1. yılında şeker pancarı (Küçükler, 2015; Biancardi, 2005).....	7
Şekil 2.3: Modern biyoteknolojiye geçiş basamakları (Özgen ve diğ., 2005).....	9
Şekil 2.4: Gen transferinin aşamaları (Glick ve diğ., 2010).....	12
Şekil 2.5: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile gen aktarımı (Vierstra, 2009).....	13
Şekil 2.6: Geleneksel ve Biyoteknolojik bitkilerin ekim alanları (James, 2014)	15
Şekil 2.8: 2014 Yılı Dünya Şeker Pancarı Üretimi (ISO, 2015).....	16
Şekil 4.1: Şeker pancarı örneklerinin (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12) elektroforez görüntüsü (M: marker).....	35
Şekil 4.2: Şeker pancarı örneklerinin (P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24) elektroforez görüntüsü (M: marker)	35
Şekil 4.3: Şeker pancarı örneklerinin (P25, P26, P27, P28, P29, P30, DİNARÇ, ÇELTEKÇ, SUHUTÇ, DİNARG, SUHUT, KON) elektroforez görüntüsü (M: marker).....	36
Şekil 4.4: Şeker pancarı örneklerinin KON, PMY, SUT, SUT1, SUT2, BES1, BES2, BES3, YUM, YM, KBY, TOKBES) elektroforez görüntüsü (M: marker).....	36
Şekil 4.5: Şeker pancarı örneklerinin (EPY, ABA, H.YEMİ) elektroforez görüntüsü (M: marker)	37
Şekil 4.6: Tüm tarla örneklerinin ve hayvan yemlerinin her iki kite göre CP'de anlamlı değerler verdiğini gösteren grafik.....	38

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Yıllara göre transgenik bitki ekimi alanları (James,2015).....	14
Tablo 2.2: Transgenik şeker pancarları.....	17
Tablo 3.1: Toplanan örnekler.....	22
Tablo 3.2: CTAB tampon içeriği.....	24
Tablo 3.3: CTAB Ekstraksiyon Solüsyonu içeriği.....	25
Tablo 3.4: Şeker pancarı tür belirleme primeri.....	26
Tablo 3.5: PZR’da her bir örnek için kullanılan malzemeler ve miktarları.....	27
Tablo 3.6: PZR sıcaklık döngüsü.....	28
Tablo 3.7: GDO görüntüleme kiti (35S/NOS/FMV) ve özellikleri	29
Tablo 3.8: GDO belirleme kiti (H7-1) ve özellikleri.....	30
Tablo 3.9: RT-PCR sıcaklık döngü prosedürü.....	31
Tablo 4.1: Örneklere ait NanoDrop ölçüm sonuçları.....	32
Tablo 4.2: Örneklerin şeker pancarı tür tayini PZR ve elektroforez sonrası şeker pancarı varlığı.....	37
Tablo 4.3: Gerçek zamanlı PZR işlemiyle kitlere göre pozitif sonuç veren örnekler.....	40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
MgCl_2	: Magnezyum klorür
SYBR Green I	: $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{S}$ + floresan boya
X'	: X dakika

Kısaltmalar	Açıklama
A	: Amper
a.a.	: Amino asit
$A_{260/280}$: 260/280 nm dalga boyundaki absorbans değeri
bp	: Baz çifti
cDNA	: Rekombinant DNA
CP	: Keşişme noktası
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTAB	: $(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ /Setrimonyum bromür
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	: Nükleozit trifosfat (adenin, guanin, sitozin, timin)
dsDNA	: Çift zincirli DNA
EDTA	: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ /Etilendiamin tetraasetik asit
EPSPS	: 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
g	: Gram
GD	: Genetiği değiştirilmiş
GDO	: Genetiği değiştirilmiş organizma
ISAAA	: Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamaları İçin Uluslararası Hizmetler Enstitüsü
ISO	: International Sugar Organization
L.	: Carl Linnaeus
ml	: Mililitre

Ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PANKOBİRLİK	: Pancar Ekicileri Kooperatifleri Birliği
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVP	: (C ₆ H ₉ NO) _n Polivinilpirolidon
PZR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
sn	: Saniye
ssDNA	: Tek zincirli DNA
ssp.	: Alt tür
Ş. Pancarı	: Şeker pancarı
TBE	: Tris/Borat/EDTA
Tris	: Tris klorür
TŞFAŞ	: Türkiye Şeker Fabrikaları Anonim Şirketi
TUİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
yy.	: Yüzyıl

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA ve HAYVAN YEMİ OLARAK TÜKETİLEN ŞEKER PANCARINDA (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) GENETİK MODİFİKASYONUN BELİRLENMESİ

Havva KAYA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Biyoteknolojik çalışmalarda gelinen son nokta olan gen transferi ile birçok bitkinin gen dizilimini değiştirmek suretiyle istenen özellikte canlıların oluşturulması sağlanmıştır. Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO) olarak adlandırılan transgenik bitkiler ve ticari ürünleri 20. yüzyıl sonlarında piyasaya sürülmeye başlanmıştır. Günümüzde yaklaşık 28 ülkede 181 milyon hektarlık alanda soya, mısır, kanola, pamuk, domates, kabak ve papaya üretimi yapılmakta ve ticari ürünleri kullanılmakta olup, tüm dünyada transgenik bitkilerin üretimi hızla artmaya devam etmektedir. Şeker pancarı da yaygın kullanımı ile biyoteknoloji alanında yapılan birçok çalışmaya konu olmuştur. 2000 yılından itibaren böcek ve virüslere dayanıklı, yabancı ot ilaçlarına dayanıklı ve düşük kalorili şeker oranına sahip şeker pancarı üretimine de başlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, ülkemizde yetiştirilen gıda ve hayvan yemi olarak kullanılan şeker pancarı ürünlerinde genetiği değiştirilmiş organizmaların kalitatif olarak PZR analizleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Deneylerde; Polimeraz Zincir reaksiyonları (PZR) ve Gerçek Zamanlı PZR yöntemleri kullanılarak toplam 51 adet (şeker pancarı ve ticari hayvan yemi) örnekte transgen taraması yapılmıştır. Bu kapsamda referans olarak herbisit direnç geni H7-1 ile 35S/NOS/FMV olarak adlandırılmış tütün mozaik virüsünden ve *Agrobacterium tumefaciens*'den elde edilmiş belli promotör ve terminatör gen dizileri taranmıştır. Sonuç olarak toplanan 51 örnekten 42 sinde genetik modifikasyon varlığı tespit edilmiştir.

Aralık 2016, 68 sayfa.

Anahtar kelimeler: Şeker Pancarı, *Beta vulgaris*, Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO), Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED SUGAR BEETS (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) CONSUMED AS FOOD AND PROVENDER

Havva KAYA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Through the gene transfer, which is the last point in biotechnological studies, it has been possible to create living beings as desired by changing the gene sequence of many plants. Transgenic plants and commercial crops, called Genetically Modified Organisms (GMOs), began to be released on the market in late 20th century. Production of soybean, corn, canola, cotton, tomato, pumpkin and papaya is being made in 28 countries in 181 million hectares of land and commercial products are being used and the production of transgenic plants all over the world continues to increase rapidly. Sugar beet has also been the subject of many studies in the field of biotechnology with its widespread use. Since 2000, sugar beet has also been started to be resistant to insects, viruses and weed medicines and has also been make low sugar calorie content.

In this thesis study, it has been aimed to determine genetically modified organisms qualitatively by PCR analyzes in sugar beet products used as food and animal feeds grown in our region. In the experiments; Polymerase Chain Reactions (PCR) and Real Time PCR methods were used to perform transgenic screening in a total of 51 samples (sugar beet and commercial animal feed). In this context, certain promoter and terminator gene sequences obtained from tobacco mosaic virus and *Agrobacterium tumefaciens*, designated herbicide resistance genes H7-1 and 35S / NOS / FMV, have been screened. As a result, 42 GMOs were detected in 51 collected samples.

December 2016, 68 pages.

Keywords: Sugar Beet, *Beta vulgaris*, Genetically Modified Organism (GMO), Real-Time PCR.

1. GİRİŞ

Canlının genetik kodu olan DNA'nın yapısının anlaşılması, bilim dünyasında devrim etkisi oluşturmuştur. Bilimsel teknoloji hızla gelişmiş, bilimkurgu denilen birçok bilimsel deneyim artık günlük hayatın parçası haline gelmiştir. Bu gelişme sağlık, beslenme gibi yaşamsal faaliyetlerimizin devamı ve sorunlarının çözümü için yeni alternatifler getirerek yaşamımızı kolaylaştırmıştır. Birçok tartışmayı da beraberinde getiren GDO faaliyetleri de bunlardan biridir.

GDO, bir canlının gen dizilimi değiştirilerek ya da bu canlıya çeşitli bakteri, virüs, hayvan ve bitkilerden gen aktarılarak kendi doğasında bulunmayan bir karakter kazandırılması ile elde edilir (Dünya Sağlık Örgütü, 2005). 1980'li yıllardan bu yana devam eden genetik mühendisliği alanında gen transferiyle birçok üretim yapılmıştır. Özellikle tıp ve tarım alanında canlı doğasındaki bir çok manipülasyon başarı ile sonuçlanmıştır.

Üretimi dünya çapında yaklaşık 234 milyon ton (5,9 milyon hektar alan) olarak belirlenen şeker pancarı dünyanın şeker ihtiyacının %16'sını karşılamaktadır. İlk çıkış yerinin Avrupa olduğu düşünülen şeker pancarı, 19. yüzyılın başlarında Orta Avrupa'dan dünyaya yayılmıştır. Türkiye'de ise 2015-2016 döneminde, 1.023.300 ton şeker pancarı 158.151,1 hektar alana ekilmiş ve 368.000 ton melas, 2.279.516 ton yaş küspe ve 5.480 bin litre alkol, yan ürün olarak elde edilmiştir (PANKOBİRLİK, 2016). Pancardan üretilen şekerde dünyanın önemli şeker üreticileri arasında olan Türkiye, dünya şeker üretiminin %8'i ile 4. sırada olup, Avrupa şeker üretiminde %10 ile 3. sıradadır. Orta Doğu pancar şekeri üretiminde de %65 paya sahiptir. Şeker pancarı, yaygın kullanımı ile biyoteknoloji alanında yapılan birçok çalışmaya konu olmuştur (İşler 2013).

1996 yılında 1,7 milyon hektar olan transgenik ürün ekim alanları, 2014 yılında Dünya çapında 181,5 milyon hektar alana ulaşmıştır. Yıllık büyüme % 3 ile 4 arasında olmakla beraber 6,3 milyon hektar ile 175,2 milyona bu rakamdan ulaşmıştır. 1996 ile 2014 yılları arasındaki 18 yılın her birinde dikkate değer bir şekilde biyoteknolojik tarım istikrarlı bir şekilde artmış hatta bu 18 yılın 12 sinde bu oranın bir önceki yıla nazaran iki katına çıktığı görülmüştür (ISAAA, 2016). Bu rakamın girerek artacağı ise açıkça

görülmektedir. Özellikle genetik mühendisliği alanında yapılan yenilikler bunu kanıtlar niteliktedir. Son olarak Conklin (2012) tarafından yayınlanan ve çok büyük bir yankı uyandıran yeni GDO yöntemi olan CRISPR; transgenik bir canlı üretmenin en hızlı ve bugüne kadar uygulanan yöntemlere göre en basit yöntemini gözler önüne sermiş, böylece önü alnamaz gelişmelerin yolunu açmıştır. Deney hayvanları, tıp ve eczacılık alanında ilaç yapımında kullanılmak üzere geliştirilen transgenik bakteriler dışında, özellikle besin zincirinin temelini oluşturan bitkilerdeki genetik modifikasyon fayda ve zararları açısından sürekli tartışma konusu olmuştur. Transgenik olarak yetiştirilen ve dünyada bu konuda hüküm süren pamuk, pirinç, mısır, soya, kolza gibi bitkilerin dışında şeker pancarı da hızla artan bir oranla rakipleriyle yarışmaktadır. Ülkemizde gıda ve hayvancılık alanında kullanılan şeker pancarı birçok sayıda devlete ait ve özel olarak işletilen fabrikalarda işlenmektedir. Ayrıca bu bitki, bu fabrikalarda besin ürünleri, hayvan yemleri, arı yemi gibi çeşitli ürünlerin ham maddesi olarak kullanılırken yan çıktıları başka birçok sanayiye de kaynak sağlamaktadır. Doğrudan gıda ve hayvan yemi olarak tüketilmesi nedeniyle şeker pancarının kalite ve biyogüvenliği büyük önem arz etmektedir. Ayrıca dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de genetiği değiştirilmiş tarım ürünlerinin yetiştirilmesini yasaklayan/ sınırlayan bazı yasalar mevcuttur. Ülkemizde ilk kez 26 Ekim 2009 tarihinde “GDO yönetmeliği” yürürlüğe girmiştir. Ancak bu yönetmeliğin 11. ve 20. maddeleri “gıda ve yem amaçlı genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerin ithalatı, işlenmesi, ihracatı, kontrol ve denetimi konularının çıkarılacak bir yasayla düzenlenmesi gerektiğine işaret edilerek durdurulmuştur. Daha sonra 26 Mart 2010 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan “Biyogüvenlik Yasası” gereğince GDO içeren gıdalarda GDO oranı binde dokuzun üzerindeyse etiketlenme şartı konulmuştur. Tüm bunlara rağmen bu iki tarih arasında ülkemize otuzun üzerinde GDO olan ürün girdiği bildirilmiştir. Bunun dışında bugün ISAAA veri tabanında ülkemizde bulunan ve ekimi yapılan onaylı GD bitkileri 25 adedi mısır ve 7 adedi soya bitkisine ait toplam sayısı 31 iken, şeker pancarına ait bir girdi görülmemektedir. Hali hazırdaki durumda ülkemizde genetik değişime uğratılmış şekerpancarı üretimi ve bunlardan hangilerinin hangi amaçla kullanıldığı, yasal düzenlemelerden önce üretime giren ürünlerdeki GDO miktarı ve halen bunlardan elde edilen tohumların kullanılıp kullanılmadığı tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada tüm bu soruların cevaplarına yönelik araştırmalara katkıda bulunma, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve ürünleri temel olarak tüketilen şeker pancarında GDO taraması ve incelenmesi yaparak bu konudaki temel bilgilerin topluma aktarılması ve gelecek çalışmalara bilgi sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ŞEKER PANCARI

2.1.1. Şeker Pancarının Tarihi

Şeker pancarın tarım bitkisi olarak yetiştirilmesi 2000 yıl önceye dayanmaktadır. Şeker pancarı antik Yunan ve Roma halkının önemli günlük diyetlerindendi. İlk ismi, antik Yunan kayıtlarında, yaprak sapı köşeli olduğu için “teutlon” olarak geçmektedir. Daha sonra Theophrastos (372–287 MÖ)’un eserinden öğrendiğimiz üzere kendisi tarafından Sicilya anlamındaki “sricula” terimi şeker pancarı ile alakalı olarak Yunancaya dahil edilmiştir. Bunun Arap (selg) ve Fars (silg) gibi diğer antik medeniyetlerdeki adlandırmadan geldiği düşünülmektedir. Bu bilgiye ise MÖ 800 yılına ait Babylon Kırallığı tarım kayıtlarında rastlanmıştır. Bu kelime şu an *Beta cicla* veya *B. vulgaris* ssp. *cicla* olarak yaşamaya devam etmektedir.

Bitki muhtemelen Akdeniz kıyılarında yetişen Beta türlerinden seçilimle günümüze gelmiştir. Orta çağdan beri Avrupa’da sebze olarak tüketildiği bilinen şeker pancarı atalarının, Birleşik Krallık’ın kıraç sahilleri, Avrupa’nın Akdeniz kıyıları ve Kuzey Afrika’nın deniz kıyılarında yetişen, halofik, çok seyrek yerleşme göstermiş, birkaç yıllık bitkiler olduğu düşünülmektedir. İlk kez 17. yy’de tarla ekimi yapılmıştır. Şeker pancarı türleri; depo kökleri, yaprakları ve kırmızı rengi için kullanılsalar da dünyanın herhangi bir yerinde kurutulup depolanabilmesi bitkinin en önemli özelliklerinden biri olmuştur. Silesian türü beyaz pancar 19 yy’in başlarından beri şeker üretimi için yaygın bir şekilde ekilmektedir (Francis, 2005).

2.1.2. Şeker Pancarının Kullanım Alanları

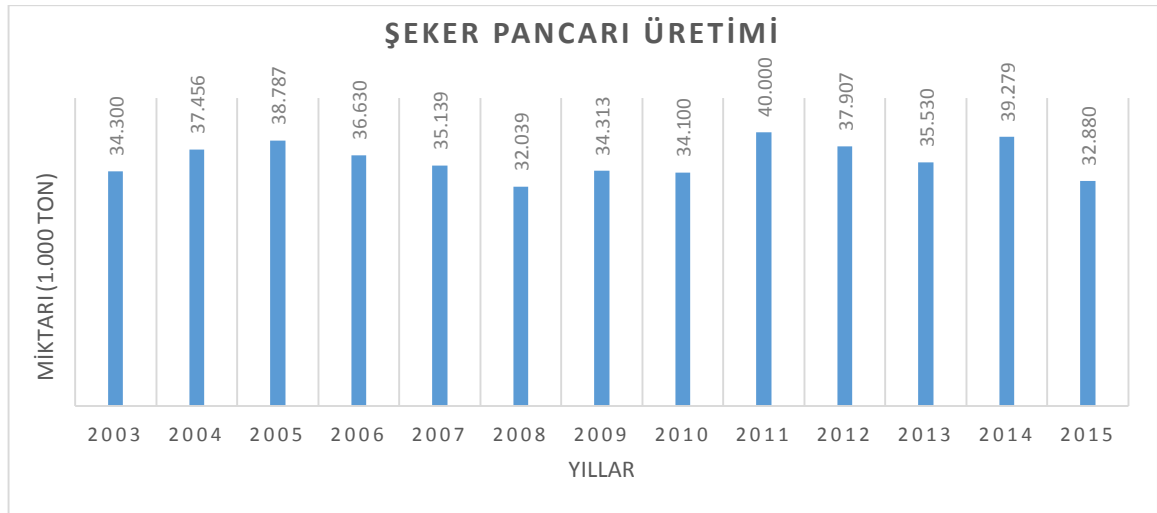
Şeker pancarı; şekerin ham maddesi olmasıyla şeker gıda sanayinde çokça kullanıldığı gibi, mutfakta da sebze olarak tüketilmektedir. Gerek yapraklarının pazı olarak kullanılması gerekse gövdesinin pişirilerek doğrudan tüketilmesi oldukça yaygındır. Ayrıca kırmızı renginden ötürü boyar madde olarak yün gibi ürünleri boyamak için

kullanılmıştır. Şekerpancarının kök ve gövdesinde %12-20 oranında şeker bulunmaktadır (Draycott, 2006).

Şekerpancarından ikincil ürün olarak ortaya çıkan melas, önemli bir alkol hammaddesi olup, ispiroto sanayinin temelini oluşturmaktadır. Melas ayrıca, küspe haline getirilerek hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır. Pancarın geri kalan kısmı olan baş ve yapraklar da değerli bir hayvan yemidir; yeşil haliyle, kurutularak veya silaj yapılarak değerlendirilmektedir (İşler, 2013).

2.1.3. Dünyada Şeker Pancarı Üretimi

Bugün dünya ülkelerinin şeker ihtiyacı % 20 oranında (endüstriye dayalı üretim yapan ülkelerde) şeker pancarından karşılanmaktadır. Diğer %80'lik kısmının (tropikal iklimli ve gelişmekte olan ülkeler) şeker ihtiyacı ise şeker kamışından karşılanmaktadır (FAO, 2009). Balkan ülkeleri ve geçiş ekonomisine sahip ülkelerde makinesiz şeker pancarı üretimi temel şeker pancarı üretim kaynağıdır. Şekil 2.1'de yıllara göre dünyada şeker pancarı ekim alanları verilmiştir.

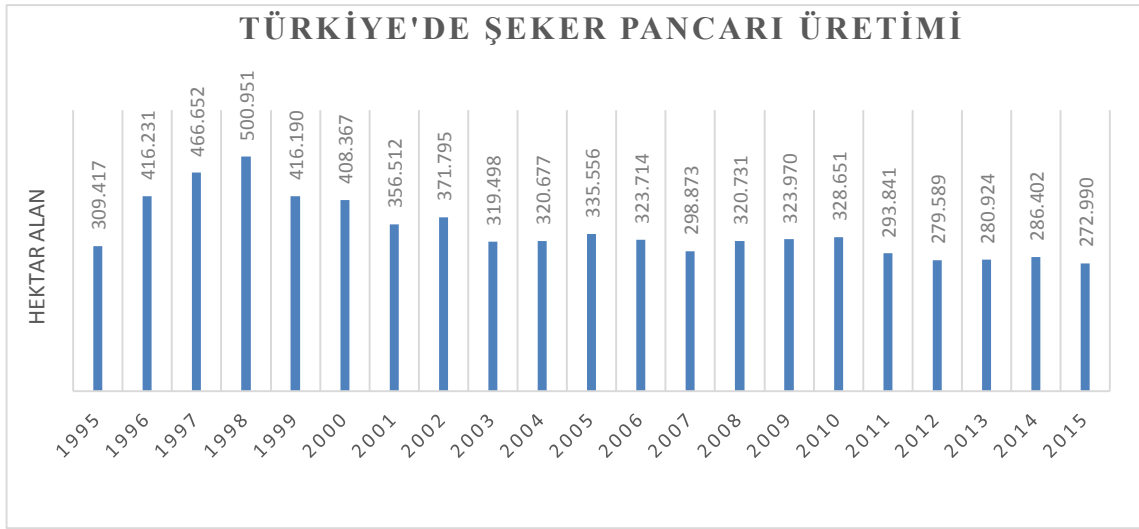


Şekil 2.1: Dünyada yıllara göre şeker pancarı ekimi (ISO, 2015).

2.1.4. Türkiye’de Şeker Pancarı Üretimi

Ülkemizde şeker pancarı sanayi; istihdam fazlalığı ve ihracat gereği kalmaması nedeniyle oldukça önemli bir yere sahiptir. Sektörün, şeker üretme yanında, pancar küsperi ve melas gibi yan çıktıları, hayvancılık sektöründeki faydaları ile Türkiye’de önemli bir yeri vardır.

Ülkemizdeki 33 adet şeker fabrikasından 25'i TŞFAŞ'e, 5'i PANKOBİRLİK'e aittir, kalanlar ise yarı özel veya özel fabrikalardır. Ülkemiz sınırları içinde şeker pancarının, 74 il ve yaklaşık 7000 yerleşim yerinde, Ege, Batı Karadeniz, Doğu Karadeniz, Akdeniz ve Güneydoğu bölgeleri haricinde kalan bütün sulanır alanlarında tarımı yapılabilmektedir (İşler 2013). Ülkemizde son yıllarda üretilen şeker pancarı verileri Şekil 2.2'de verilmiştir.

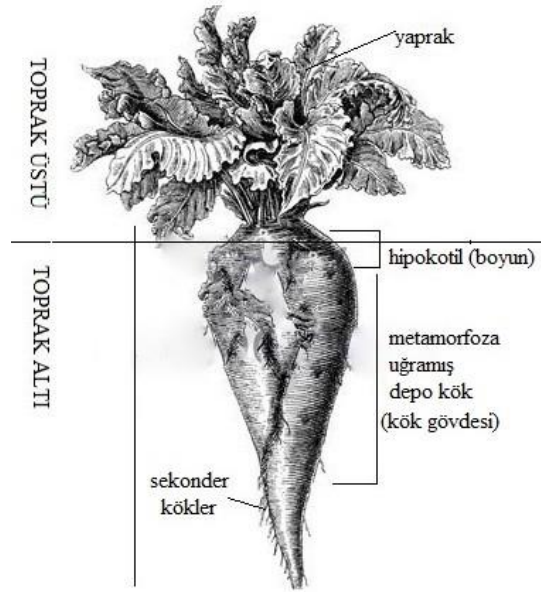


Şekil 2.2: Türkiye'de şeker pancarı üretimi (TÜİK 2016).

Şeker pancarının sınıflandırması günümüzde şu şekilde yapılmaktadır;

ÂLEM	: Plantae
ŞUBE	: Angiospermae
TAKIM	: Caryophyllales
FAMİLYA	: Amaranthaceae
CİNS	: <i>Beta</i>
TÜR	: <i>vulgaris</i>
VARYETE	: <i>saccharifera</i>

Şeker pancarının ıslah edilmiş formları iki yıllık bir bitki olarak bilinir. İlk yılında kök, gövde ve rozet şeklindeki ilk yaprakları, ikinci yılda çiçek ve tohum oluşumu görülür. Şekeri için üretimi yapılacak olan şeker pancarının 1. yıl içerisinde hasadı yapılması gerekmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: 1. yılında şeker pancarı (Küçüker, 2015; Biancardi, 2005).

Şeker pancarının tohumları kuru sert ve bir arada atılmış tohum topları şeklindedir. Ancak günümüzde ıslah edilmiş türlerinde monogerm yani tekli tohumlar şeklinde ıslah edilerek yetiştirilmektedir. Tohumlar ortamdaki nem miktarı %12' çıktığı zaman çimlenmesi görülür. 3-5 gün içerisinde tohum patlaması olur. Optimum çimlenme sıcaklığı 20-25°C ve en fazla üç derecelik değişimi olan yerde gerçekleşir. 35°C 'ye gelindiğinde ise çimlenme azalır. Şeker pancarı büyümesini ilk yılında yapraklar haftada 4/6 oranında gelişim gösterir.

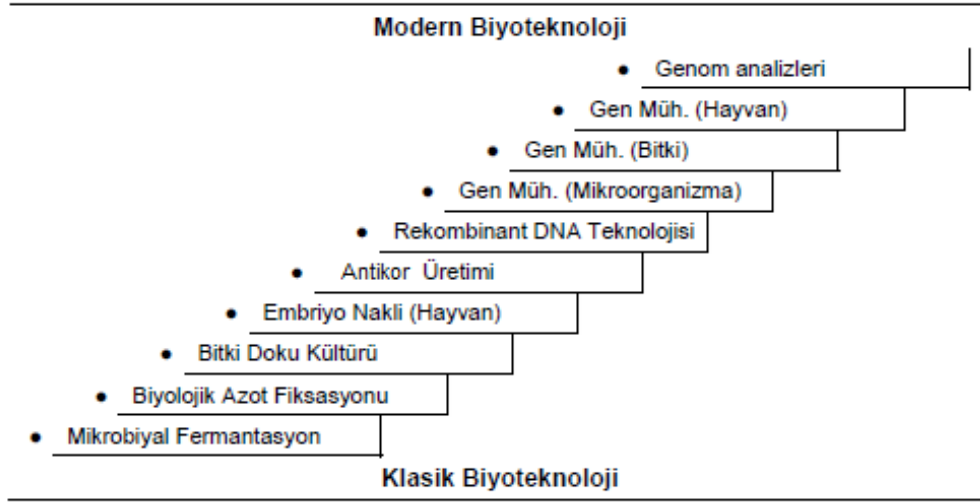
Kökleri oldukça uzun ve konik biçimindeki kazık kök şeklinde gelişir. Rozet şeklindeki yapraklarına altından çıkan taç kökler % 6 ile 17 arasında kütle oranını içerir. Toprağı hemen altındaki boyun kısmı lateral köklerden yoksun olarak gelişir. Depo kökü asıl büyük kısmı ise boynun altındaki kısımdır. Asıl kök toprağın altında 1,5 metreye kadar uzanabilir. Burada hücreye oranla yüzde 95 oranında sukroz depolanabilir. Büyümenin

ilk 6 haftasında primer kökler artar ve kuru ağırlık % 4.000 artış gösterir. Bu sırada depo kök gelişerek sukroz depo etmeye başlar. Kökte meydana gelen vasküler halkalar ise yaklaşık her ayda yeni bir vasküler halka oluşumu şeklinde gelişir. Daha sonra bir kış mevsimi gözlemlenir (vernalizasyon). Reprodüksiyon evresine girildiği zaman, meydana gelen primer dal sürgünü etrafında ve onlardan çıkan sekonder dallarda spiral şeklinde yapraklar ve çiçeklenme görülür. Çiçeklerin protandiri (polen ana hüvresi yumurta ana hücrelerinden önce gelişir) özelliğindedir. Kendine döllenme seyrekdir. 5'li Çiçek yapısındadır ve petal gelişimi görülmez sepal gelişerek tohumu kapatır (Biancardi, 2005).

Şeker pancarı depo kökü yaklaşık % 21 oranında şeker içeriği ve % 4 diğer bileşenlerden oluşan bir öz suyu içerir (FAO, 1999).

2.2. TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

Yaşamsal faaliyetlerin bitkilere dayalı olması, tarımsal faaliyetlerde her dönem gelişmeye çalışmakla sonlanmıştır. İlk çağlardan beri insanlar, bitki yetiştirmek ve besinlerini elde etmek için birçok yöntem denemişlerdir. İlk olarak bitki ıslah teknikleri ile başlayan bitki biyoteknolojisi sürekli gelişmeye devam ederek özellikle Mendel'in bezelyelerle yaptığı deneyden sonra melez bitkilerin üretiminin sağlanması üzerine önemli bir adım atılmış ve modern biyoteknoloji bugünkü yerine evrilmiştir. Modern biyoteknoloji, birçok aşamadan geçerek günümüzdeki rekombinant DNA teknolojisine kadar ilerlemiştir (Şekil 2.4). Bu teknoloji DNA'nın manipüle edilerek canlının özelliklerinde değişme gidilmesini barındırır. Tarımsal faaliyetlerde ise transgenik bitkilerin kullanılması bugünkü ıslah çalışmalarının neredeyse tamamını içermektedir. Gelineen noktada birçok tarım ürünüde özellikle günlük diyetin en önemli parçaları olan pirinç, mısır, soya, kolza, buğday gibi tahıllar ile beraber domates, patates, şekerpancarı gibi sebze türlerinden de birçok rekombinant bitki geliştirilmiştir.



Şekil 2.4: Modern biyoteknolojiye geçiş basamakları (Özgen ve diğ., 2005).

Günümüzde bu teknoloji kullanılarak insanlığa hizmet etmesi için genetik bilgileri çeşitli yöntemlerle değiştirilen ve orijinalinden farklı özellikler göstermesi sağlanan canlıların tümüne “ Genetiği Değiştirilmiş Organizma” denilmektedir.

2.2.1. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)

Genetik materyalin bilim dünyasında anlaşılması son 70 yılda olmuştur. Canlının genetik kodu olduğu düşünülen DNA'nın yapısının anlaşılması, bilim dünyasında devrim etkisi oluşturmuştur. Bilimsel teknoloji hızla gelişmiş, bilimkurgu denilen birçok bilimsel deneyim artık günlük hayatın parçası haline gelmiştir. Biyoteknolojideki gelişmeler sağlık, beslenme gibi hayatsal faaliyetlerimizin devamı ve sorunlarının çözümü için yeni alternatifler getirerek yaşamımızı kolaylaştırmıştır. Birçok tartışmayı da beraberinde getiren GDO faaliyetleri de bunlardan biridir. GDO, bir canlının gen dizilimi değiştirilerek ya da bu canlıya çeşitli bakteri, virüs, hayvan ve bitkilerden gen aktararak kendi doğasında bulunmayan bir karakter kazandırılması ile elde edilir (WHO, 2005). 1980'li yıllardan bu yana devam eden genetik mühendisliği alanında gen transferiyle birçok üretim yapılmıştır. Özellikle tıp ve tarım alanında birçok başarılı sonuç elde edilmiştir. GDO üretimi için birden fazla yol vardır. GDO yani rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş olan bitkiler farklı taksonomik gruplar arasında gen alışverişine izin verdiği için hemen hemen her sorunda bitkilere DNA aktarımı yapılabilir. Bu şekilde in vitro ortamlarda yapılan bu çalışmalar sonucunda meydana gelen bitkiler

herbisitlere, böceklerle, hastalıklara dayanıklı olabileceği gibi aynı zamanda bitkilerin besin değerinde de artış sağlanabilmektedir (Haspolat, 2012). Sadece belli özellikteki metabolitlerin çokça salgılanmasını sağlayan özellikler getirilebilir. Bu şekilde özellikle tıp alanında (örneğin vitamin yapımının sağlanması) için birçok bitki geliştirilmiştir. (Dert, 2006). Bunun dışında açlıkla mücadele edilen toplumlarda az miktarda besin ile çok miktarda besleyicilik sağlanması hedeflenmektedir. Özellikle pirinç, patates, muz gibi sıkça tüketilecek ve yetiştirilmesi iklim şartlarına uygun bitkilerin besin değeri artırılarak halka sunulması özellikle açlık sorunu olan ülkeler de büyük önem arz etmektedir. Bunun için oldukça yoğun bir çalışma yapılmaktadır (ISAAA, 2016). Sadece besin için değil ayrıca bitkilerden elde edilecek olan sanayi hammaddesinin artması için de birçok uygulama yapılmıştır. Günümüzde popülaritesi gittikçe artmakta olan biyoyakıt bunlardan biridir. Biyoyakıt hammaddesi oluşturacak olan bitkiler yağ kalitesi artırılarak yakıt olarak kullanılmak için geliştirilmektedirler (Çıvgın, 2016). Bunun dışında küresel ısınmanın artması, toprağın kirlenmesi, içilecek su miktarının azalması gibi sebeplerden dolayı bitkilerin genetiği değiştirilip ortama uyum sağlaması amaçlanmaktadır. Özellikle toprağın temizlenmesi için üretilen transgenik bitkiler, topraktaki ağır metal gibi kirleticileri daha çok toplayarak daha olağan bir seyirde toprağın temizlenmesini sağlamaya elverişli hale getirilmektedirler (Kotrba ve diğ., 2009). Ancak bu yöntemlerin bu şekildeki hızlı gelişimi bitki gen kaynakları hakkında endişe edici seviyeye gelmesinin kapılarını çaldığı ise bir gerçektir. Özellikle ülkemizde endemik türlerin giderek yok olması gelecekte bu konuda geri dönüşü olmayan boyutlara gelinebileceğini göstermektedir (Haspolat, 2012).

2.2.1.1. Niçin Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler Üretiriz?

Klasik ıslah yöntemlerine göre daha kısa süre alması ve hemen hemen istenen her özelliğin aktarılabilmesi nedeniyle tercih edilen genetik modifikasyon yöntemleri ile üretilen bitkiler şu özellikleri taşıyabilir; özellikle açlıkla mücadele için besin miktarı ve besin değeri artırılmış bitkilerin üretilebilmesi çok büyük önem arz etmektedir. Bunun dışında besin içeriğindeki alerjen olabilecek metaloitlerin kaldırılması sağlanarak, yenilmesi daha güvenli besinler elde edilebilmektedir. Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi kirlenmiş toprak, hava veya su, bitkilerin genetik yapısı değiştirilip zararlı madde toplama ve depolama özelliği kazandırılarak, fitoremediasyon yöntemleriyle temizlenmektedir. İlave olarak ilaç sanayinde bitkilerden oldukça fazla yararlanıldığı için bitki içerikleri

zenginleştirilerek veya bitkilere bazı kimyasallar sentezlettirilerek bitkilerin bizzat kendilerinin aşı veya ilaç olması sağlanabilmektedir (Vardar-Kanlıtepe ve diğ., 2010).

2.2.1.2. GDO'dan gelebilecek tehlikeler.

GDO'lu besinlerin besin yapısı değişeceği için bazı tehditler oluşturmaktadır. Özellikle gen yapısı değişen bitkinin oluşturacağı içeriğin alerjen özelliği değişebileceği gibi genin tam olarak hangi fonksiyonlarda değişiklik yapacağı tam olarak bilinemeyeceğinden alerjen maddelerde artış veya yeni bilinmeyen alerjenler geliştirmesi olasıdır. Özellikle bildiğimiz bitkilerin, bilmediğimiz maddeler üretmesi alerjen konusunda oldukça büyük risk oluşturabilir. Bunun gibi bir nedenden dolayı bitkiler insanlarda kanserojen hale gelebilirler. Nitekim son zamanlarda artan kanser olaylarının vücudun alışık olmadığı maddeleri almasından kaynaklandığı bilinmektedir. Bunun dışında yine bu sebeplerden bitkiler toksik özellik sergileyebilirler.

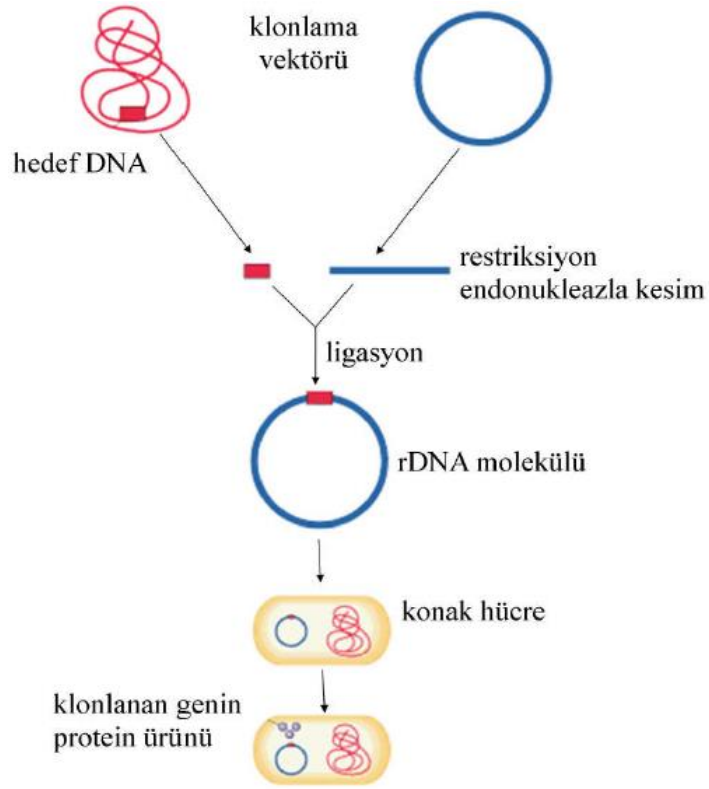
Özellikle bitkilerin ilaç dirençli olarak değiştirilmesi sebebiyle gen geçişi olan bakterilerde antibiyotiğe direnç geliştirmeye sebep olabilmektedir. Bu şekilde devam ederse bir gün en güçlü antibiyotiklerin tedavi edemeyeceği çok basit bakteriyel hastalıklara sahip olabileceğimiz belirtilmiştir.

Özellikle gen geçişi, gen kaynaklarının bozulması ve yok olması riski yanında bitkilerde besin değeri değişikliklerine de neden olabileceğinden önemlidir. Toplumsal olarak bakıldığında ise bu şekilde üretilmiş daha zengin içerikli bitkiler pahalıya satıldığı için klasik çiftçi fakirleşecek, bu teknolojiyi kullanacak kadar zengin olanlar daha da zenginleşecek ve gelir eşitsizliğinin toplumda büyük sosyolojik sorunların oluşabileceği belirtilmiştir (Vardar-Kanlıtepe ve diğ., 2010).

2.2.2. GDO Üretim Teknikleri

GDO üretimi genel olarak 4 aşamada yapılır (Şekil 2.5).

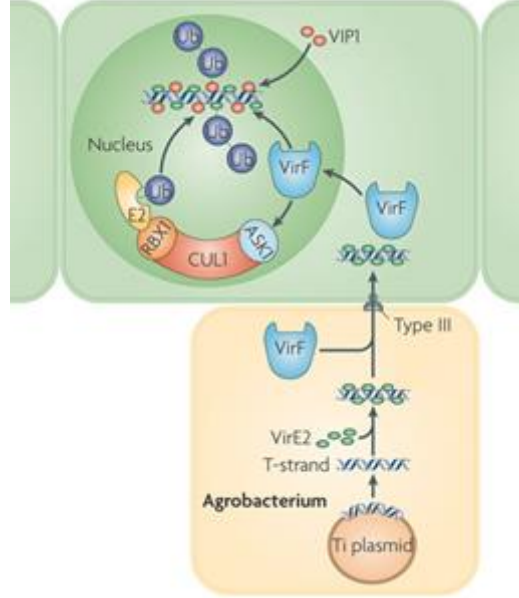
- Geliştirilecek olan gen dizisinin belirlenmesi,
- Bu gen dizisinin tanımlanması ve izole edilmesi,
- Gen aktarımı yönteminin belirlenmesi ve gen dizisinin tasarımı,
- Transgenin hücreye yerleştirilmesi şeklinde gerçekleşir.



Şekil 2.5: Gen transferinin aşamaları (Glick ve diğ., 2010).

1980’lerde ilk olarak bitkilerde taç tümörü hastalığına neden olan *Agrobacterium tumefaciens* adlı bakterinin çalışma sistemi kullanılarak, istenilen DNA’nın aktarımı yapılmıştır. Doğada hastalık olarak gerçekleşen bu olay bakteri içinde bulunan Ti plazmidini küçük bir bölümünü istenilen özellik dizisini taşıyan T-DNA ile değiştirilerek bunun özel proteinlerle bitki hücresi aktarılması şeklinde gerçekleşir (Şekil 2.6). Bu şekilde *Agrobacterium tumefaciens*’deki hastalık oluşturan bölge yerine istenilen özellikteki gen parçası eklenerek, bitkinin yeni özelliğe kavuşması sağlanmıştır (Tzfira ve Citovsky, 2006). Bugün için farklı yöntemlerle gen aktarımı sağlanmaktadır. Biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon gibi yöntemler bunlara örnektir (Arı, 2004). Transgenik bitki oluşturulurken ilgili gen bölgesinin doğrudan yerleştirilmesi sırasında aktarılan genin genomda istenilen yere bağlanamaması veya çeşitli şekillerde metabolize olması söz konusudur. Bu nedenle aktarılmak istenen gen dizilerinin başında ve sonunda belirli bölgeler bulunduran başlangıç ve sonuç noktalarında yer alan “promotor” (başlatıcı) ve “terminatör”(sonlandırıcı) düzenleyici gen dizileri ile birlikte aktarılırlar. Günümüzde promotor bölgesi olarak mozaik virüsüne ait 35S, terminatör bölgesi olarak

da *Agrobacterium tumefaciens*'e ait NOS terminatör bölgeleri sıkça kullanılmaktadır (Elenis ve diğ., 2008; Micheline ve diğ., 2008)



Şekil 2.6: *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı (Vierstra, 2009).

2.2.2.1. CRISPR/Cas9 Sistemi ve GDO

Transgenik canlı üretimi için son dönemde geliştirilen bir yöntem olan CRISPR bu konudaki büyük bir adımı oluşturmaktadır. CRISPR tekniği PZR'dan sonra bilim dünyasının bu alandaki en önemli gelişme olarak görülmekte ve genetik mühendislerinin bir devrimi olarak anılmaktadır. Bu yeni yöntem uygulamasının kolaylığı ve ekonomik olması dolayısıyla çok güçlü bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

CRISPR'ın çalışma tekniği "cas9" adı verilen bir enzime dayanmaktadır. Bu enzim bir RNA molekülünün, DNA'ya gönderip DNA üzerinde istenilen değişiklikleri yapılmasını sağlamaktadır. Asıl önemli olan ise, bu yöntemde kullanılacak özel sipariş RNA dışındaki diğer malzemelerin kolay ulaşılabilir ve laboratuvarlarda daima bulunan malzemeler olmasıdır. Bunun dışında çok çeşitli canlılar üzerinde gen değişikliği yapılmasının, özellikle tıp alanında, hastalıkların ortadan kaldırılması gibi faydalarının olması umut verici iken, endişe verici olan ise CRISPR teknolojisinde kullanılan yöntemin çok kolay bir şekilde gen manipülasyonu sağlaması sebebiyle, ufak bir yanlışlığın büyük sonuçlara

yol açabilmesidir. Özellikle kanser olasılığı oldukça fazladır. Tarımsal olarak bakıldığında ise çok daha etik gibi görünse de işlem embriyonik aşamada uygulanacağından, sorunun nereden kaynaklandığının bulunması çok güç olacağı için tekniğin güvenilirliği kafalarda soru işaretleri oluşturmaktadır (Ledford, 2015). Ayrıca bu teknik ile meydana gelecek olan genetik karmaşanın nasıl bir sonuç oluşturacağı ise hala tam olarak bilinmemektedir. Bugüne kadar oluşturulan rekombinant organizmalar yüzünden birçok sorunla karşılaşmıştır (örneğin antibiyotik direnci gibi). Bahsi geçen uygulamanın kolaylığı açısından, gelecekteki bu kötü senaryonun umduğumuzdan yakın olacağı düşünülebilir (Korkutata, 2015; Lozano-Juste ve Butler 2015; Wilson, 2015).

2.3. GENETİK MODİFİKASYON YOLUYLA BİTKİSEL ÜRETİM

1996 yılında 1,7 milyon hektar olan transgenik ürün ekim alanları, 2014 yılında Dünya çapında 181,5 milyon hektar alana ulaşmıştır. Yıllık büyüme % 3 ile 4 arasında olup 6.3 milyon hektar ile 175.2 milyon hektardan bu rakama ulaşmıştır. 1996 ile 2014 yılları arasındaki 18 yılın her birinde dikkate değer bir şekilde biyoteknolojik tarım istikrarlı bir şekilde artmış hatta bu 18 yılın 12 sinde bu oranın bir önceki yıla nazaran iki katına çıktığı görülmüştür (ISAAA, 2014). Bitkilerin ıslah çalışmaları modern biyoteknoloji ile birlikte hiç olmadığı kadar ileri duruma gelmiştir. 2015 yılsonu verilerine göre toplam 179,7 milyon hektar alanda transgenik bitki ekimi yapılmaktadır. Bu rakam 1996'dan beri toplamda 2 milyar hektara ulaşmıştır (ISAAA,2016). Dünya çapında en çok üretilen transgenik bitkiler yıllara göre dağılımı Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Yıllara göre transgenik bitki ekimi alanları (James,2015).

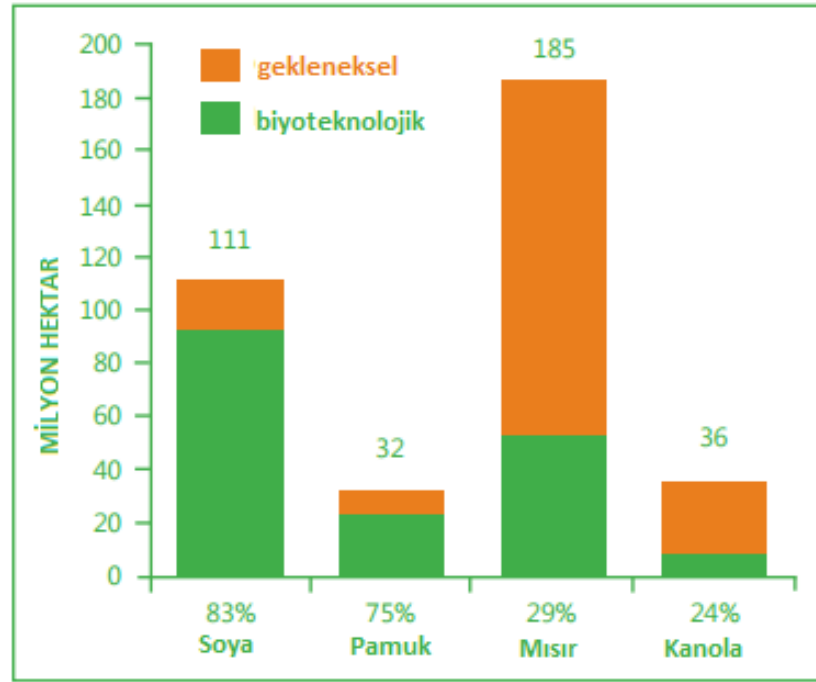
YIL	ALAN*
1996	1,7
1997	11,0
1998	27,8
1999	39,9
2000	44,2
2001	52,6
2002	58,7
2003	67,7
2004	84,0
2005	90,0
2006	102,0
2007	114,0
2008	125,0
2009	134,0

Tablo 2.1 (devam): Yıllara göre transgenik bitki ekimi alanları (James,2015).

2010	148
2011	160
2012	170,3
2013	175,2
2014	181,5
2015	179,7
TOPLAM	1.964,60

*: milyon hektar

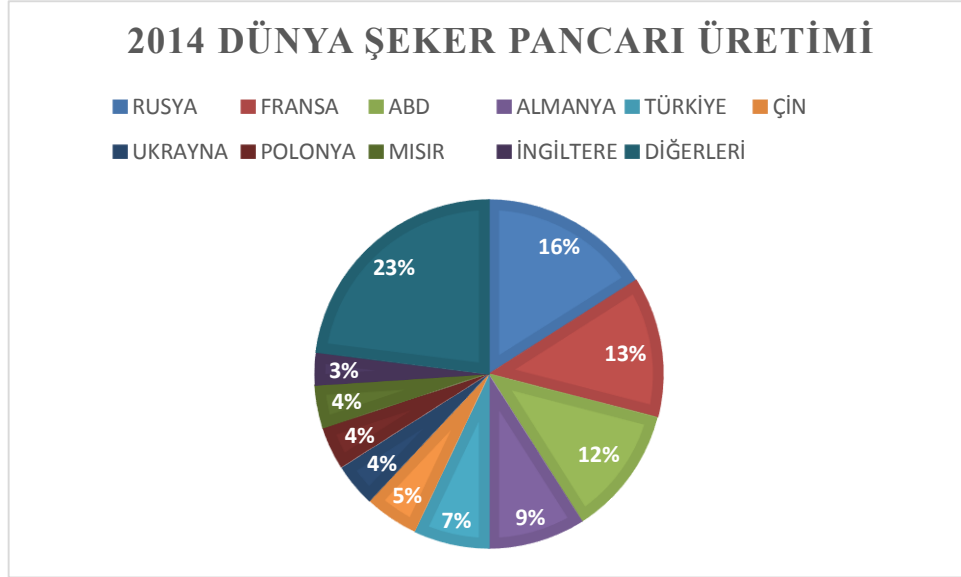
En çok üretimi yapılan transgenik bitkiler; 2015 yılı itibariyle mısır 53 milyon hektar, soya 92,1 milyon hektar, pamuk 24 milyon hektar, kanola ise 8,5 milyon hektar alanda yetiştirilmiştir (Şekil 2.7).

**Şekil 2.7:** Geleneksel ve Biyoteknolojik bitkilerin ekim alanları (James, 2014).

2.3.1. GD Şeker Pancarı Üretimi

Transgen işlemi, her seferinde farklı şekilde yapılır, bu yüzden özgündür. Organizma ve aktarılan gen aynı olsa da, aktarılan genin hedef gen ile birleşmesi değiştirilen her hücre için farklılık arz etmektedir. Böylece genetik modifikasyon ile oluşmuş her ürüne çeşit

veya event denir (Çetiner ve Budak, 2007). Günümüzde toplam 29 bitki türünde 148 mısır, 58 pamuk, 45 patates, 38 kanola, 34 soya, 11'i domates olmak üzere toplam 404 çeşit 14 ülkede yetiştirilip ticareti yapılmaktadır (James, 2016).



Şekil 2.8: 2014 Yılı Dünya Şeker Pancarı Üretimi (ISO, 2015).

Şeker pancarı dünyada yağın olarak üretilmektedir (Şekil 2.8). Şeker pancarı gelişmekte olan ülkelerde genel olarak geleneksel tarım yöntemleri ile yetiştirilirler. Ancak şeker pancarı verimini artırmak ve bitkinin yetişmesinde kolaylık sağlamak amacı ile çeşitli transgenik bitkiler üretilmiştir (ISAAA, 2016).

Özellikle herbisit dirençli gen oluşturmak için *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile üretilmiş olan Glifosat herbisitine toleranslı şeker pancarı tohumu, *A.tumefaciens*-PPT herbisitine toleranslı şeker pancarı ve H7-1 gen bölgesi ile Glifosat herbisitine toleranslı şeker pancarı üretilmiştir (Özgen ve diğ., 2005). Bununla ilgili bilgiler Tablo 2.2' de ayrıntılı olarak verilmiştir. En etkili herbisitlerden biri olan Glifosat, RoundUp™ adı ile onaylanmış herbisitinin etken maddesini oluşturur.

Tablo 2.2: Transgenik şeker pancarları (ISAAA, 2016).

Ticari Adı	GTSB77	T120-7	H7-1
Geliştiren Şirket	Novartis Seeds and Monsanto Company	Bayer CropScience	Monsanto Company
Gen Aktarma Yöntemi - Kazandırılan Özellik	GLİFOSAT TOLERANSI	GLİFOSAT TOLERANSI	GLİFOSİNAT TOLERANSI
Aktarılan Genin Adı - Kaynağı	cp4-epsps-(aroA:CP4) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /CP4 goxv247- <i>Ochrobactrum anthropi</i> strain LBAA uidA- <i>Escherichia coli</i>	PAT - <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / nptII <i>Escherichia coli</i> -Tn5 transposon	cp4-epsps (aroA:CP4)/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain-CP4

2.3.2. Herbisite Dayanıklı Şeker Pancarı

Herbisitler tarım alanlarında yetiştirilen bitkileri gerek allelopatik gerekse besin rekabeti açısından tehdit eden yabancı otları temizlemek için kullanılan kimyasallardır. Çalışma mekanizması genel olarak bitkinin hayati kimyasal yollarını hedef alır. Bu sebepten seçiciliği ve toksisitesi çok önemlidir (Öktem, 2004).

Herbisite dirençli transgen ise EPSPS enzimine bağlanıp enzimi durdurma yolu ile çalışır. (Hermann, 1995). EPSPS inhibitörü amino asit üretimini bloke ederek hücre ölümünü gerçekleştirir. Glifosata dirençli transgenik bitkide, kendi mekanizmasındaki EPSPS enzimi EPSS inhibitörü olan glifosattan etkilenmeyecek şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde tarlada glifosat kullanıldığında dirençli bitki haricindeki bitkiler ölmektedir. EPSPS bitkilerin yanı sıra bakterilerde de bulunabilmektedir (Korth, 2008).

Bir diğer herbisit olan “glifosinat” Liberty™ adlı ürünün etken maddesidir. Bu ise, GS (glutamin sentaz) enzimini bloke ederek çalışır. GS, bitkilerde aminoasit yapımında kullanılacak azotu uygun forma dönüştüren enzimdir (Tan ve diğ., 2006). Glifosinat

uygulanmış bitki GS döngüsünden geçemez ve azotu uygun forma dönüştüremez bu şekilde serbest kalan azot atomları bitkiyi zehirler ve ölümüne neden olur. Transgen üretim tekniği bakteri ile gen iletimi şeklindedir. Gluifosinat, bazı Streptomyces bakterilerinde doğal olarak üretilmektedir. Streptomyces türü bu bakterinin glifosinat üretim ve aktarım yolunda gen değişikliği yapılarak bitkiye aktarılması sonucu direnç geliştirilmiş bitkiler elde edilmiştir (Korth, 2008).

2.4. GENETİK VARYASYON ANALİZ TEKNİKLERİ

Genetik varyasyon analiz teknikleri protein kaynaklı ve DNA kaynaklı yöntemlerdir. Proteine dayalı yaklaşımda, ilgili proteine karşı geliştirilmiş özel antikorlar kullanılır. ELISA yöntemi genel olarak antikor -antijen ilişkisinden yararlanarak çalışır. Hayvan kan hücrelerinde yabancı maddelere (antijen) karşı üretilen tanıma ve yakalama proteinlerine antikor denilmektedir. Serumdan izole edilmiş antikorlar sayesinde bu işlem sürdürülmektedir. Genel olarak antikora yapışan antijen proteinleri varlığı tespit edilir ancak bu bağlanma miktarı çok az olacağı ve ölçülemeyeceği için antijene bağlı proteini artırmak için başka bir antikor kullanır. Bu şekilde yabancı gen tarafından ifade edilmiş protein ile karşılaştırılarak, bu proteine ait antikora bağlı bir enzim kullanılır. Reaksiyon sonucu ise bir renk ürünü olarak ölçülür.

Bunun yanında yine antikor protein esasına dayalı kullanımı taşınabilirliği kolay olan LFS (Lateral Flow Strips) de kullanılabilecek yöntemler arasındadır (Holst-Jensen, 2009). Protein temelli ve yine enzim bağlantılı İmmüno Manyetik Elektrokimyasal sensör analizleri de mevcuttur.

Bir diğeri de 2-boyutlu jel elektroforezi ve manyetik ve spektrofotomerik bir yöntem olan kütle spektrofotometresidir. Ayrıca proteine dayalı analiz yöntemleridir. Ancak yöntemlerle proteinin yüksek ısılarda bozulması ve gen anlatımının düşük yoğunlukta olduğu ürünlerde GDO veya herhangi bir DNA analiz işlemi çok zordur (Elenis ve diğ., 2008).

Yukarıda bahsi geçen yöntemlerin dışında günümüzde GDO analizlerinde sıklıkla kullanılan yöntem olan DNA temelli GDO analizi ayrı bir başlık altında daha detaylı anlatılmaya çalışılmıştır.

GDO analizi eğer DNA üzerinde yapılıyorsa genel olarak üç aşamadan geçilir:

- GDO tarama
- GDO'ların kimlik tespiti yani "tanımlama"
- Genetik modifikasyon miktarını tespit etme (Laura ve diğ., 2001).

Analiz yapılırken öncelikle iyi kalite ve miktarda DNA izolasyonu yapılır. DNA öncelikle ayrıştırılır sonra proteinler ve diğer metabolitlerden temizlenerek saflaştırılır. Bunun için enzimatik ve kimyasal yöntemler kullanılır (Terry ve diğ., 2002).

2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)

Deoksiribonükleik asit (DNA); yapısal olarak uzayan ve sağa doğru kıvrılan iki iplikli bir molekül olan DNA; şimdiye kadar keşfedilmiş olan tüm canlıların ve bazı virüslerin biyolojik faaliyetlerini yerine getirilmesini sağlayan şifreleri içiren kompleks bir yapıdır. PZR ise bu eşsiz molekülün in-vitro ortamda kendini eşleme yasasından yararlanarak, çoğaltılması işlemidir.

2.4.1.1. PZR'nin gelişimi ve çalışma sistemi

PZR işlemi sırasında basitçe; DNA parçası, DNA bazları ve Taq DNA Polimeraz enzimi kullanılarak, belirlenen ısı döngüleri ile 1 adet DNA parçasından 2^n - $2n$ adet (n =döngü sayısı) DNA parçası oluşturulmasıdır (Sambrook ve diğ., 1989).

Arthur Cornberg' in *E. coli*'den DNA polimerazı izole etmesi ile (1956) DNA'nın laboratuvarında üretilme aşamaları başlamıştır. 1970 de genleri yapay olarak sentezleyen ilk kişi H. Gobind Kharana olmuştur. 1983 de Mullis oliogonükleotid sentezi üzerinde çalışırken, hücredeki DNA sentezini laboratuvar ortamında erime, bağlama, sentez aşamalarını uyumlu sıcaklıkların almasıyla gerçekleştirebileceği bulmuştur ve bunu yöntem olarak sunmuştur (Kabasakal, 2016).

DNA'nın bir parçasıyla çok sayıda kopya oluşturma tekniği 1985'te bulunmuştur. PZR makina parçaları ilk olarak 1987 yılında yapılmıştır. 1988'de *Thermus acusticus* bakterisinden izole edilen ısıya dayanıklı DNA Polimeraz enzimi keşfedilmiştir. Bu şekilde 85°C'de denatürasyon sağlanabileceği ortaya çıkmıştır (Saiki ve diğ., 1988). Böylece PZR cihazları geliştirilmeye başlanmıştır.

PZR'nin çalışma prensibi aşamaları "denatürasyon" DNA'nın çözülmesi, "bağlanma" primerlerin DNA'nın belli bölgelerine bağlanması ve "DNA'nın uzaması" olarak bilinen Taq polimeraz enzimi ile kopyalama işleminin gerçekleşmesi şeklindedir. Bu işlem döngüleri sayıları PZR cihazlarıyla ayarlanabilmektedir. Genel olarak istenilen sayıdaki kopya ulaşmak için 20 ile 50 kez arasında tekrar yapılır. (Sonma ve Querci, 2010).

DNA Temelli PZR yöntemleri üç başlık altında incelenebilir.

- Özel promotor, terminatör gen bölgeleri ile belirlenmiş aralıktaki DNA parçalarının PZR ürünü olarak çoğaltılması,
- Bu uç noktaları belirleyen gen bölgelerinin bizzat kendisinin çoğaltılması,
- Primerin bitki genom bölgesi ile birleştiği bölümün PZR ile çoğaltılmasıdır (Marmiroli ve diğ., 2008).

PZR ürünlerinin analizi elektroforez görüntüsüyle yapılır. Agaroz jel elektroforezinde, moleküller elektrik akımı sırasında, büyüklüklerine göre ayrılarak işaretleyici boyalar sayesinde sıraları UV ışık altında görülebilir (Elenis ve diğ.,2008).

2.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1997'de Kinetik Revers Transkriptaz-PCR ilk kez yapılmıştır. Bu sayede tek iplikli olan RNA'dan istenen uzunluktaki DNA ve RNA ve mRNA parçasının sentezletilmesinin yolu bulunmuştur. Ayrıca klasik PZR'den farklı olarak geliştirilen tekniklerle PZR sırasında floresan işaretçilerle boyanan genetik materyaller görülebilmeye başlanmıştır (Kabasakal, 2016). PZR'nin eş zamanlı olarak izlenebileceği yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntem "Real Time PCR (RT-PCR)" veya qPCR adı verilmiştir. Çift zincirli DNA molekülüne (dsDNA) bağlanan etidyum bromür ile bağlanan prob. çiftlerinin görüntülenmesi üzerine kurulu bir sistem olarak Higuchi ve Arkadaşları (1993) tarafından geliştirilen yöntem, daha sonra etidyum bromür'ün toksik özellikleri sebebiyle dsDNA'ya bağlanan bir başka floresan DNA boyası olan "SYBR Green I" ile özelleştirilmiştir (Gasparic ve diğ., 2010). GDO analizlerinde ise FRET (fluorescence resonance energy transfer) problemleri, moleküler beaconlar ve scorpion problemleri tercih edilir. En yaygın kullanılan ise TaqMan yöntemidir. Bu yöntem şöyle çalışır; özellikle GDO üretmek için

kullanılan promotor 5' ucunda (FAM, VIC, TET, JOE) gidi floresan boyalar, terminatör 3' ucunda ise TAMRA boyası bulunmaktadır. Ancak 3' ucunda bitirme kodonundan sonra uzamayacağı için prob bozulur, bu sebepten bundan sonraki başlangıçtaki 5' ucundaki floresan boya boyanmasına ket vurduğu için ışımaya görülmez. Ancak, eğer bu prob sonradan eklenmiş ise polimerazın endonükleaz aktivitesi probu ayırır, bu ise ışımaya baskılanmasını engeller. Bu şekilde 5' ucundaki floresan boya ışımaya olmasının gerekenden fazla olması transgen varlığını işaret eder (Holst Jensen, 2003).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEK TOPLANMASI

Bu tez kapsamında, Türkiye Şeker Enstitüsünden temin edilen 30 adet şeker pancarı tohumu, Batı İç Anadolu Bölgesindeki üç şeker fabrikası bölgesine ait ekimi yapılmış dört çeşit şeker pancarı ve aynı Şeker İdaresi Müdürlüklerinden elde edilen aynı yıla ait üç çeşit şeker pancarı tohumu ile piyasadan toplanan 15 adet ticari hayvan yemi kullanılmıştır. Kullanılan örnekler Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Toplanan örnekler.

NU:	ÖRNEK	KULLANILAN KISMI	ÖZELLİĞİ	KODU
1	EMU 13	Yaprak	Multigerm familya	P1
2	EMU 39	Yaprak	Multigerm familya	P2
3	EMU 53	Yaprak	Multigerm familya	P3
4	EMU 92	Yaprak	Multigerm familya	P4
5	EMU 105	Yaprak	Multigerm familya	P5
6	EMU 107	Yaprak	Multigerm familya	P6
7	EMU 110	Yaprak	Multigerm familya	P7
8	EMU 111	Yaprak	Multigerm familya	P8
9	EMU 112	Yaprak	Multigerm familya	P9
10	EMU 117	Yaprak	Multigerm familya	P10
11	EMU 119	Yaprak	Multigerm familya	P11
12	EMU122	Yaprak	Multigerm familya	P12
13	M 14	Yaprak	Monogerm familya	P13
14	M 15	Yaprak	Monogerm familya	P14
15	M 16	Yaprak	Monogerm familya	P15
16	M 17	Yaprak	Monogerm familya	P16
17	M 18	Yaprak	Monogerm familya	P17
18	M 19	Yaprak	Monogerm familya	P18
19	M 20	Yaprak	Monogerm familya	P19

Tablo 3.1 (devam): Toplanan örnekler.

20	M 21	Yaprak	Monogerm familya	P20
21	ARANKA (KWS)	Yaprak	Ticari çeşit	P21
22	SERENADA (KWS)	Yaprak	Ticari çeşit	P22
23	ISABELLA (KWS)	Yaprak	Ticari çeşit	P23
24	SANDRINA (KWS)	Yaprak	Ticari çeşit	P24
25	TURBATA (SYNGENTA)	Yaprak	Ticari çeşit	P25
26	SENTİNEL (SYNGENTA)	Yaprak	Ticari çeşit	P26
27	DOZER (SYNGENTA)	Yaprak	Ticari çeşit	P27
28	KARIZMA (SESVENDERHAVE)	Yaprak	Ticari çeşit	P28
29	VEXİL (KWS)	Yaprak	Ticari çeşit	P29
30	ELVARADO (SESVENDERHAVE)	Yaprak	Ticari çeşit	P30
31	BESİ YEMİ		Ticari çeşit	BES1
32	BESİ YEMİ		Ticari çeşit	BES2
33	BESİ YEMİ		Ticari çeşit	BES3
34	YEM 5		Ticari çeşit	ABA
35	PANCAR MELASLI YEM		Ticari çeşit	PMY
36	YUMURTA YEMİ		Ticari çeşit	YUM
37	HİNDİ YEMİ		Ticari çeşit	HİN
38	KUZU BESLEME YEMİ		Ticari çeşit	KBY
39	YEM 10		Ticari çeşit	TOKBES
40	SÜT YEMİ		Ticari çeşit	SUT
41	SÜT YEMİ 2		Ticari çeşit	SUT1
42	SÜT YEMİ 3		Ticari çeşit	SUT2
43	YEM 14		Ticari çeşit	EPY
44	YEM 15		Ticari çeşit	YM
45	DİNAR	Gövde	Tarladan	DİNARG
46	KONYA	Gövde	Tarladan	KON
47	BURDUR	Gövde	Tarladan	SUHUT
48	HAYVAN PANCARI (AFYON)	Gövde	Tarladan	H.YEMİ
49	DİNAR	Yaprak	Tarladan	DİNARÇ
50	ÇELTEK	Yaprak	Tarladan	CELTEKÇ
51	ŞUHUT	Yaprak	Tarladan	SUHUTÇ

3.2. DNA İZOLASYONU

Örneklerden, CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 CTAB Yöntemi ile DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, tohum örnekleri iklim odası koşullarında 15 saat gece, 9 saat gündüz periyotlarında ve 25° C'de çimlendirilen 2 haftalık bitkilerin yapraklarından, tarladan alınan örneklerin gövdelerinden ve ticari hayvan yemi örneklerinden numune alınması ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak Thompson ve Murray'ın (1980) uyguladığı CTAB DNA izolasyon yönteminin modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. Sözü edilen CTAB'lı solüsyonlar Tablo 3.2 ve Tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3.2: CTAB tampon içeriği.

MADDE	MİKTAR	KONSANTRASYON (%)
(CTAB)-% 10H ₂ O	3 ml	3
5M NaCL	2,8 ml	28
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0,4 ml	4
1 M Tris-Cl (pH 8.0)	1 ml	10
PVP (MW 40 kDa)	0,3 gr	3
β-Mercaptoethanol	0,02 ml	0,2
H ₂ O	2,48 ml	24,8

Tablo 3.3: CTAB Ekstraksiyon Solüsyonu içeriği.

Madde	Miktar
CTAB	% 2.0 (w/v)
Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA pH 8.0	20 mM
NaCl, (steril solüsyon)	1.4 M

3.2.2. CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu

300 mg yaprak ve gövde, 150 mg hayvan yemi örnekleri ezilerek homejenat haline getirilmiştir. Homejenatlar, kapaklı 10 ml'lik plastik steril santrifüj tüplerine alınıp üzerine 400 µl CTAB tampon eklenerek 30 sn vorteks ile karıştırılmıştır. Üzerine 40 µl merkaptotanol (Sigma Aldrich) eklenerek ters yüz edilmiş, 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma Aldrich) eklenip vortex yapılarak 60 dk 55 °C'de inkübe edilmiştir.

Tüpte oluşan üst faz 600 µl olacak şekilde 1,5 ml 'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Bunu üzerine 600 µl fenolkloroform izoamil alkol (25:24:1) (BM labosis) eklenmiştir. 4 °C de 10 dk. Santrifüj yapılmıştır (13000 rpm). Bu sırada 2 ml'lik santrifüj tüpüne 1200 µl %96'lık etanol hazırlanmıştır. Santrifüjden çıkan tüplerin üst fazları 600 µl'ye kadar bunların üzerine eklenerek ters yüz edilmiştir. 5 dk. - 80 °C de bekletilerek, 4 °C de 20 dk. santrifüj yapılmıştır (14000 rpm).

Santrifüjden sonra üst faz atılmış, pellete 1 ml % 70 lik etanol eklenmiştir. 10 dk. Santrifüj yapıp (13000 rpm) ve supernatant atılmıştır. Pelletler kurumaya bırakılmıştır.

Pelletler kurduktan sonra 100 µl TE (%2lik) çözeltisinde pipetaj yapılarak DNA'lar çözülmüştür. Daha sonra, 2 µl (5 mg/ml) RNaz ile 37 °C de 25 dk. inkübe edilmiştir.

3.3. DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ

İzole edilen DNA'lar spektrofotometrik yöntem kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.1. Spektrofotometrik Analiz

Örneklerden elde edilen DNA'ların saflıklarının ve 1 μ L'deki konsantrasyonların belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu verilere göre, UV absorbe etme değeri; $A_{260/280}$ (nm) göz önüne alınmıştır. 260 nm boyundaki ışığı absorbe etme değeri ile 280 nm boyundaki ışığı absorbe etme değerinin birbirine bölümü ancak 1,8 ile 2,0 arasında olursa DNA saf kabul edilmektedir. Spektrofotometrik ölçümler için "NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer" adlı cihaz kullanılmıştır.

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Örneklerden elde edilen DNA'lardan, varsa, şeker pancarına özgü "Glutamin Sentaz (GS)" gen bölgesi, PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Bu şekilde örneklerden elde edilen DNA'ların şeker pancarına ait olduğu kanıtlanmıştır. PZR yöntemi ile; şeker pancarına özgü GS genine ait GluD1 isimli prob kullanılarak yapılmış, 118bp boyutunda primerler kullanılmıştır. PZR sırasında kullanılan primere ait bilgiler Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4: Şeker pancarı tür belirleme primeri.

İleri Primer	5'-GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG-3'
Hedef bölge	GS
Geri Primer	5'-GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA-3'
Hedef bölge	GS
Gen uzunluğu	118 bp
Prob	5'-FAM-CTACGAAGTTTAAAGTATGTGCCGCTC-TAMRA-3'
Prob ismi	GluD1

PZR işlemleri her örnek için üçer kez tekrarlanarak sonuçların güvenilirliği test edilmiştir. PZR işleminde PZR makinesi olarak “Thermo Fisher /Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler” kullanılmıştır. PZR işleminde kullanılan malzeme miktarları Tablo 3.5 de verilmiştir. PZR döngüsü Tablo 3.6 da verilmiştir.

Tablo 3.5: PZR’da her bir örnek için kullanılan malzemeler ve miktarları

MALZEME	MİKTAR (25 µL)
H ₂ O (distile edilmiş ve otoklavlanmış)	17 µL
PCR Buffer (1X)	2,5 µL
MgCl ₂	2,0 µL
dNTP(% 10)	0,5 µL
Primer F (% 10)	1,0 µL
Primer R (% 10)	1,0 µL
DNA	1,0 µL
Taq DNA polimeraz (10X)	0,2 µL

Örneklerden izole edilen DNA’lardan, belirtilen primer ile PZR ile çoğaltılma yapılmıştır. Daha sonra elde edilen PZR ürünlerinin görüntülenmesi işlemleri için Agaroz Jel Elektroforezi uygulanmıştır.

Tablo 3.6: PZR sıcaklık döngüsü.

Sıcaklık	Süre (dk)	Döngü
95 °C	5'	İlk Denatürasyon
95°C	0,5'	İkinci Denatürasyon
65°C	0,5'	Primer bağlanma sıcaklığı
	35 DÖNGÜ	
72°C	1'	İlk uzama
72°C	5'	Son uzama
+4°C	(∞)	Son sıcaklık

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

İzle edilen DNA parçalarının ilgili kısımları PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra elde edilen ürünlerin analizi % 1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. DNA'nın yürütülmesi için 1X TBE tamponu kullanılmıştır.

% 1'lik jel için 0.5 g., stok 50X TBE sulandırılarak kullanılmıştır. 50 ml 1X TBE tamponuna eklenmiştir. 2 dakika mikrodalga fırında çözünmesi beklenmiş, daha sonra 0.5 ng/ µL olacak şekilde 3µL etidium bromür eklenerek tarakların yerleştirildiği jel kasetine dökülerek soğuması ve katılaşması beklenmiştir.

Katılaştıran jel 1X TBE dolu olan elektforez küvetine yerleştirilmiştir. 7 µL PZR ürünü 3 µL yükleme boyası ile karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiş, 80V ve 1,5A gerilimle yürütme işlemi yapılmıştır. Ayrıca ilk kuyucuklara markör yüklenerek sonuçlar gözlemlenmiştir. Daha sonra UV transillüminatör altında DNA'lar görüntülenmiştir.

3.3.4. GDO Analizi için Gerçek Zamanlı PZR

Şeker pancarında özellikle pestisit direnç geni (H7-1) eklenmiş GD ürünler ve bu ürünlerde bulunabilecek diğer GD parçaların belirlenmesi amacıyla 35S Promotor NOS Terminator ve FMV'lu ticari GDO tespit kiti (Europhins Gene Scan) kullanılmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: GDO görüntüleme kiti (35S/NOS/FMV) ve özellikleri.

	GMOScreen 35S/NOS/FMV
Inhibisyon kontrolü	IPC (internal pozitif kontrol)
Promotor boyası	FAM TM / JOE TM / FY5 TM / SYBR GREEN I TM
Terminator boyası	TAMRA TM

Gerçek zamanlı PZR analizleri “LightCycler® 480 Instrument II” Real time PCR makinesi kullanılarak yapılmıştır. Yapılan işlem; PZR sonucunda şeker pancarı olduğu tespit edilen örneklerin DNA'ların tümü; 1 adet genetik modifikasyon görüntüleme kiti (Europhins- GMO Screen RT- 35S/NOS/FMV-IPC(NR)) bir adet de transgen miktarı belirleme kiti (Europhins- GMO Ident RT (IPC) Event H7-1 Sugarbeet) kullanılarak, RT-PZR işlemi yapıldı (Tablo 3.8). Ayrıca her reaksiyon için pozitif ve negatif kontrol kullanılarak ve deneylerin ikişer kez tekrarı ile sonuçların güvenilirliği tespit edilmiştir.

Tablo 3.8: GDO belirleme kiti (H7-1) ve özellikleri.

	GMOIdent RT (IPC) Event H7-1 Sugarbeet
Inhibisyon kontrolü	IPC (internal pozitif kontrol)
Promotor boyası	FAM TM / SYBR GREEN I TM /ROX TM /HEX TM
Terminatör boyası	TAMRA TM

Örneklerden elde edilen DNA'ların RT-PCR işlemi yapılırken aşağıdaki aşamalar izlenmiştir.

- a. Ticari kitlerle birlikte gelen ve kullanılan malzemeler şunlardır.
 1. Oligo mix: Bir DNA parçasını, başka bir DNA parçasına bağlamak için kullanılan kısa tek iplikli DNA iplikçiklerinin bulunduğu karışım.
 2. Basic mix: Aranılan temel DNA dizisini içeren tek iplikli DNA parçalarının bulunduğu karışım
 3. Pozitif kontrol DNA
- b. Tüm süreç için kullanılan malzemeler şunlardır.
 1. DNase-free saf su
 2. 1-1000 µl mikro pipetler
 3. 2 ml'lik santrifüj tüpü
 4. RT-PCR analiz kalıp kapları
 5. Kaplara ait kapatma filmleri
 6. Vorteks cihazı
 7. RT-PCR thermocycler cihazı
- c. RT-PCR işlemi yapılırken şu aşamalar izlenmiştir.
 1. Öncelikle işlemler steril olan bir ortamda yapılması gerektiği için filtreli biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir.

2. Kitten çıkan Oligo mix 750 µl, Basic mix 1250 µl olarak santrifüj tüpüne alınmıştır.
 3. Vorteks yapılarak Master Mix (asıl DNA kiti karışımı) hazırlanmıştır.
 4. RT-PCR reaksiyon kalıbının her bir gözüne 20 µl Master mix, 5µl örnek DNA'sı eklenmiştir.
 5. Reaksiyon kalıbının üzerine film dikkatlice yapıştırılmıştır
 6. Tüm bu işlemler enzim reaksiyon güvenilirliği açısından olabildiğince dikkatli ve hızlı bir şekilde tamamlanmıştır.
 7. Reaksiyon kalıbı RT-PCR thermocycler cihazına yerleştirilerek işlem başlatılmıştır.
- d. Kullanılan RT-PCR thermocycler cihazı; LightCycler® 480 Instrument II 'dir. Kullanılan döngü prosedürü ise Tablo 3.9'daki gibidir.

Tablo 3.9: RT-PCR sıcaklık döngü prosedürü.

Sıcaklık	Süre (dk)	Döngü
95 °C	10'	İlk Denatürasyon
95°C	15 sn.	Denatürasyon
60°C	45 DÖNGÜ 1,5'	Bağlanma ve Uzama

4. BULGULAR

4.1 DNA İZOLASYONU VE SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ

Türkiye şeker enstitüsünden alınan tohumlardan, sahadan toplanan tohum ve bitkilerden, ticari olarak satılan hayvan yemi numunelerinden başarıyla DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. CTAB yöntemi ile yapılan izolasyonlar için tohumlar öncelikle çimlendirilerek bitki yaprakları elde edilmiştir. Uygulanan CTAB DNA izolasyonu yöntemi tüm örneklerde aynı olmakla birlikte gövde ve yem numunelerinden elde edilen DNA'lara ayrıca RNaz ile işlem yapılmıştır. CTAB yönteminde DNA çöktürme işleminde kullanılan orijinal makaledeki İzoproponol yerine çöken kısmın DNA olup olmadığının kesinlik kazanması için saflığı %100'e yakın olan alkol kullanılmıştır. Bu şekilde çift zincirli genetik materyalin tutulması amaçlanmıştır. Elde edilen DNA'ların NanoDrop Analiz sonuçları Tablo 4.1 de verilmiştir. Ölçüm sonuçları incelendiğinde 260/280 nm'deki tüm örneklerin saflık aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1: Örneklere ait NanoDrop ölçüm sonuçları.

ÖRNEK ADI	KONSANTRASYON (1µL)	280/260 nm
P1	566,2	1,9
P2	518,6	1,93
P3	250,8	1,70
P4	132,1	1,84
P5	133,9	1,86
P6	131,9	1,81
P7	243,6	1,88
P8	428,8	1,88
P9	567,8	1,9

Tablo 4.1 (devam): Örneklere ait NanoDrop ölçüm sonuçları.

P10	174,9	1,85
P11	65,8	1,85
P12	121,1	1,85
P13	209,3	1,87
P14	233,3	1,87
P15	150,9	1,85
P16	262,3	1,9
P17	179,2	1,89
P18	206,4	1,89
P19	134	1,92
P20	136,6	1,89
P21	505,7	1,9
P22	407	1,89
P23	494,6	1,9
P24	314	1,87
P25	224,5	1,9
P26	513,3	1,9
P27	248,9	2,06
P28	314,8	1,91
P29	71	1,99
P30	471,4	1,86
DİNARÇ	130,2	1,9

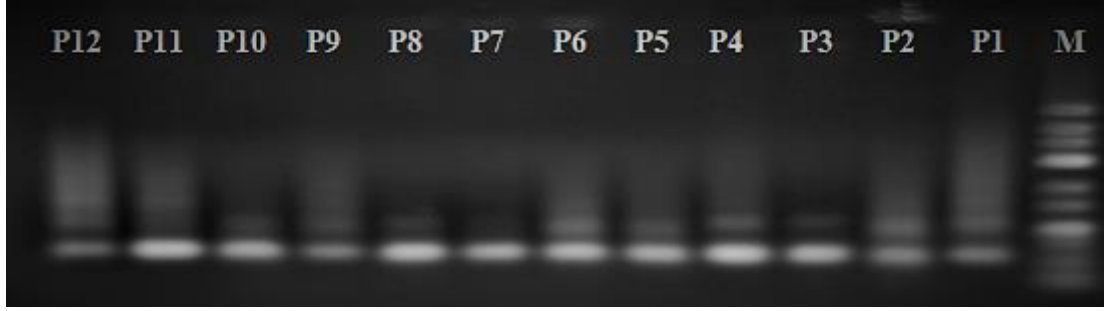
Tablo 4.1 (devam): Örneklere ait NanoDrop ölçüm sonuçları.

ÇELTEKÇ	103,9	1,88
SUHUTÇ	151,9	1,95
DİNARG	280,6	1,97
SUHUT	95	1,86
KON	69,6	1,82
PMY	185,5	1,84
SUT	985,9	1,86
SUT1	423,6	2,01
SUT2	495,9	1,83
BES1	674	1,91
BES2	868,6	1,83
BES3	427,4	1,86
YUM	591,8	1,91
YM	956,3	1,97
KBY	591,9	1,89
TOKBES	213,4	1,79
HIN	704,2	1,99
EPY	423,6	2,01
ABA	465,9	1,83
H.YEMİ	130,3	1,78

4.2 TÜR TAYİNİ

Elde edilen DNA'ların saflıkları tespit edildikten sonra DNA'ların şeker pancarına ait olup olmadığının kanıtlanması amacıyla şeker pancarına özgü gen dizisini içeren 118 bp'lik primer ile PZR yöntemi kullanılarak DNA çoğaltılma işlemi yapılmıştır. Elde edilen gen dizileri agaroz jel elektoroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir.

Şekil 4.1'de Türkiye Şeker Enstitüsünden alınan örneklerden P harfi ile kodlanmış ilk 12 örneğe ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir. M harfi DNA Markırını simgelemektedir. Buradan anlaşılacağı üzere tüm şeker örnek DNA'lar aynı değerdeki baz çifti sayısında çoğalmıştır. Bu değer 118 bp olduğu düşünülmektedir.



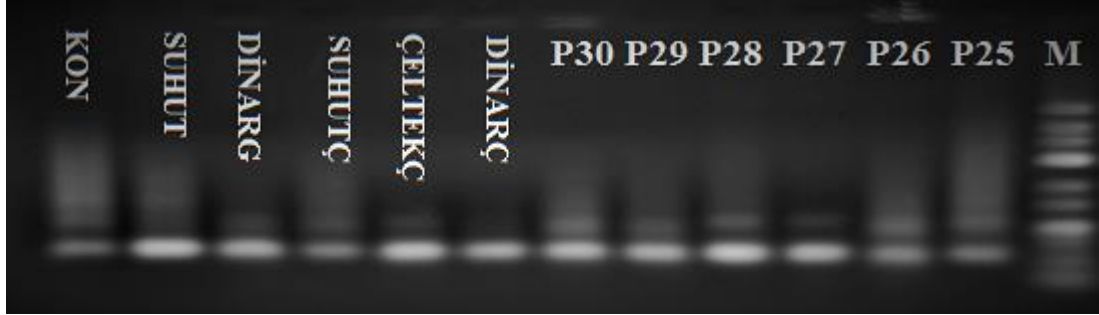
Şekil 4.1: Şeker pancarı örneklerinin (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12) elektroferez görüntüsü (M: marker).

Şekil 4.2'de Türkiye Şeker Enstitüsünden alınan örneklerden P harfi ile kodlanmış 13 ile 24 numaralı örneklere ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir. Yukardaki ile aynı şekilde tüm DNA'lar aynı değerdeki baz çifti sayısında çoğalmıştır.



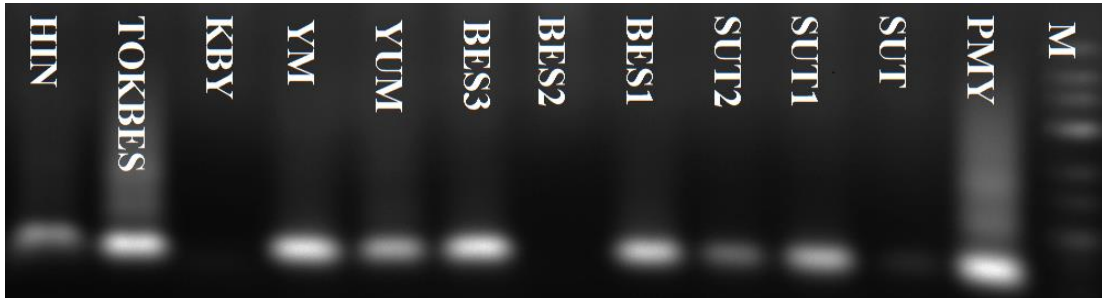
Şekil 4.2: Şeker pancarı örneklerinin (P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24) elektroferez görüntüsü (M: marker).

Şekil 4.3’de Türkiye Şeker Enstitüsünden alınan örneklerden P harfi ile kodlanmış 25 ile 30 numaralı örnekler, ve sahadan toplanan 6 örneğe ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir. Yukardakiler ile aynı şekilde tüm DNA’lar aynı değerdeki baz çifti sayısında çoğalmıştır. Bu da bunların şeker pancarına ait olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3: Şeker pancarı örneklerinin (P25, P26, P27, P28, P29, P30, DİNARÇ, ÇELTEKÇ, SUHUTÇ, DİNARG, SUHUT, KON) elektroforez görüntüsü (M: marker).

Şekil 4.4’de piyasadan toplanan hayvan yemi örneklerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir. PMY, BES1 VE YM ile kodlanmış olan ürünlerde DNA çoğalması olmadığı görülmüştür. Bu sebeple bu örneklerin şeker pancarına ait olmadığı kanısına varılmıştır.



Şekil 4.4: Şeker pancarı örneklerinin (KON, PMY, SUT, SUT1, SUT2, BES1, BES2, BES3, YUM, YM, KBY, TOKBES) elektroforez görüntüsü (M: marker).

Şekil 4.5’de EPY ve ABA olarak kodlanmış hayvan yemi örnekleri ve sahadan alınan yem pancarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri verilmiştir. Görüldüğü gibi tüm DNA’lar aynı değerdeki baz çifti sayısında çoğalmıştır.



Şekil 4.5: Şeker pancarı örneklerinin (EPY, ABA, H.YEMİ) elektroforez görüntüsü (M: marker).

Tablo 4.2’de şeker pancarı geni varlığı tesbit edilen örneklerin listesi verilmiştir. SUT, BES2 ve KBY haricindeki tüm örneklerde şeker pancarı içeriği saptanmıştır.

Tablo 4.2: Örneklerin şeker pancarı tür tayini PZR ve elektroforez sonrası şeker pancarı varlığı.

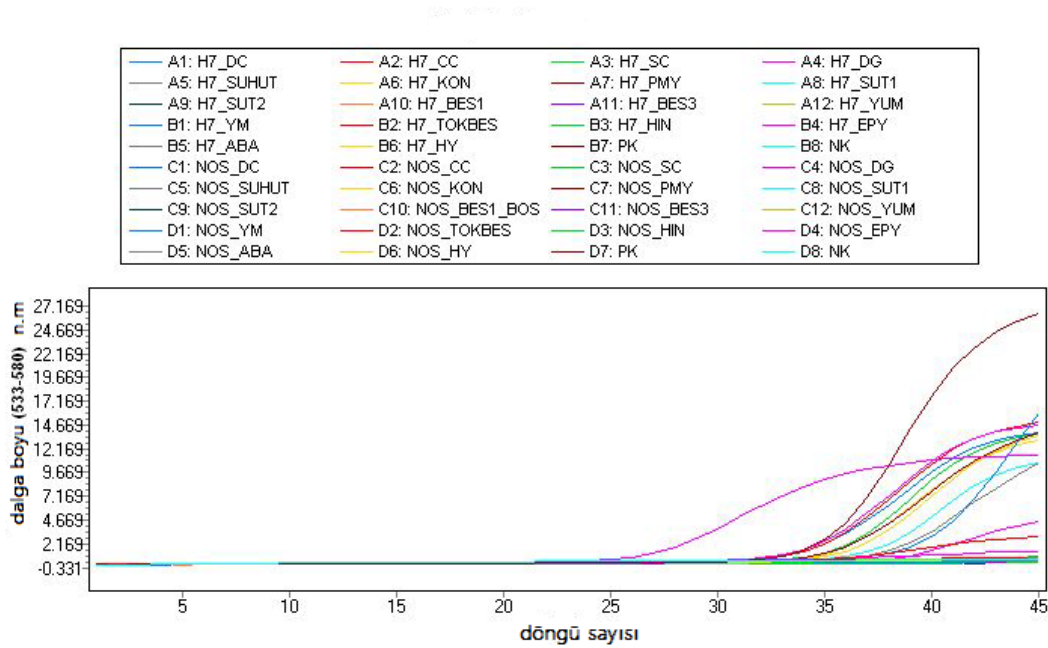
Örnek	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
DNA durumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Örnek	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22
DNA durumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Örnek	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	DİNARÇ	ÇELTEKÇ	ŞUHUTÇ
DNA durumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Örnek	DİNARG	ŞUHUT	KON	PMY	SUT	SUT1	SUT2	BES1	BES2	BES3	YUM
DNA durumu	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Örnek	YM	KBY	TOKBES	HIN	EPY	ABA	H.YEMİ				
DNA durumu	+	-	+	+	+	+	+				

4.3 GENOMDA YABANCI GEN ANALİZİ

DNA izolasyonu, PZR ve elektroforez aşamaları ile yapılan analizler sonucunda toplamda 51 adet örneğin 48’inde şeker pancarı olduğu tespit edilmiştir.

Real time PZR’de pozitif reaksiyon tanısı floresan sinyallerle tespit edilir. Eş zamanlı PZR görüntülenirken logaritmik tabanlı bir grafik oluşmaktadır ve yorumlama bu grafiğe göre yapılmaktadır. Bu değere CP (döngü eşiği) denilmekte ve floresan sinyalinin belirli

eşğin üzerine çıkması için gerekli döngülerin sayısı olarak tanımlanmaktadır. Gerçek zamanlı PZR'de, CP değeri döngüler sırasındaki 10 standart sapma değerine ulaşan döngüler ve 3. ve 15. döngü arasındaki floresan sinyallerinin ortalamasının ölçülmesi ile belli olur. CP seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit miktarıyla ters orantılıdır (yani, CP seviyesinin düşük olması, numunedeki hedef nükleik asit miktarının daha fazla olması anlamına gelmektedir). CP değeri yorumlaması yapılırken bir eşik değer ve limit değer belirlenmektedir. Bu eşik değer her örnek için tekrarlanan sıcaklık döngülerinde (bu çalışmada 45 döngü yapılmıştır) oluşan paralel grafiklerin kesişmeye başladığı seviyelere yerleştirilmektedir (Weighardth, 2006). Yapılan deneyler sonucunda kullanılan kitlerdeki döngü sayısına ulaşımın zaman alması ve 35S/NOS/FMV ile H7-1 genlerindeki ışımının yeteri kadar artması için, bahsi geçen eşik değer ancak 25. döngüye rast geldiği görülmüştür (Şekil 4.6). Buradan yola çıkarak 25. döngüden sonra artış gösteren floresan ışımaya sayısı genetik modifikasyon varlığını göstermekte olduğu sonucuna varılmıştır. CP değeri sayısal olarak 25'den büyük ve 40'a yakın olanların GDO pozitif sonuç verdiği kanısına varılmış, yorumlama buna dayanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6: Tüm tarla örneklerinin ve hayvan yemlerinin her iki kite göre CP'de anlamlı değerler verdiği gösteren grafik.

Tablo 4.2’de gösterilen PZR verilerinin real-time PZR’de CP değerlendirmesi yapılarak elde edile değerler “+” ile işaretlenmiş olan 48 örnek DNA için gerçek zamanlı PZR yöntemi ile transgen analizi işlemi yapılmıştır. Yabancı gen analizi için esas alınan gen parçalarına ait iki adet genetik modifikasyon görüntüleme ve tespit kiti ile DNA’lar işleme tabi tutulmuştur. RT-PCR aşaması simgeleyen hayvan yemleri ve tarla örneklerine ait reaksiyon döngüsü grafiğine yapılan deneylerden biri örnek olarak gösterilmiştir. Görüldüğü üzere yaklaşık 25 döngüden sonra floresan ışımaların dalga boyunda artışlar başlamıştır (Şekil 4.6). Bu da floresan bazlı boyaların bağlandığı DNA miktarının arttığını yani örneklerin reaksiyon verdiğini göstermektedir. Buradan deneyin güvenilir olduğu kanısına varılmıştır.

Bu bilgilere göre örneklerin iki kite göre hangi sonuçları verdiğini Ek 1’de verilmiştir. Tablo 4.3 de ise transgen pozitif sonuç veren değerler gösterilmiştir. Buna göre eşik değeri geçen grafiklerin CP değerinin anlamlı olduğu ve tüm reaksiyonların yürüdüğü kabul edilmiştir.

Tez kapsamında çalışılan tüm tohum ve şeker pancarı örnekleri dışında şeker pancarı içerdiği varsayılan toplam 15 adet hayvan yemi örneğinden; 3’ü hariç 12’sinde şeker pancarı varlığına rastlanmıştır. Bu 48 örneğin 30 u Türkiye Şeker Enstitüsünden temin edilmiş tohumlardan alınmıştır. Bu tohumlarda 29’unda genetik modifikasyon tespit edilmiş olup, bunların tamamı pestisit dirençli modifiye şeker pancarıdır. Her iki kitede pozitif sonuç veren GD 29 şeker pancarı tohumundan elde edilen örneğin 21’i hem glifosat hem de glifosinat dirençli olarak geliştirilmiş olduğu saptanmıştır. Diğer 8’inde reaksiyon gözlenmemiştir. Bu 8 örneğin transgen içerip içermediğinin saptanabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Piyasadan toplanan ve şeker pancarı içerdiği tespit edilen 11 hayvan yeminin 4’ünün GD olduğu ve bunların 2’sinin H7-1 pestisit dirençli, diğer 2’sinin ise yukarıda belirtildiği gibi tütün mozaik virüsünden ve *Agrobacterium tumefaciens* adlı bakteriden elde edilmiş belli promotör ve terminatör gen dizilerini içerdiği saptanmıştır.

Sahadan toplanan 7 örneğin ise 6’sında genetik değişiklik tespit edilmiştir. Bunlardan 5’i tütün mozaik virüsünden ve *Agrobacterium tumefaciens* adlı bakteriden elde edilmiş belli promotör ve terminatör gen dizilerini, ayrıca tamamı H7-1 modifiye şeker pancarı geni

ihiva etmektedir. Dolayısıyla saha örneklerinden her iki kite pozitif sonuç veren 5 örneğin glifosat ve glifosinat dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tablo 4.2'de pozitif sonuçlar gösterilmiştir. Örneklere ait tüm CP değerleri de *Ek 1.*'de verilmiştir.

Tablo 4.3: Gerçek zamanlı PZR işlemiyle kitlere göre pozitif sonuç veren örnekler

Örnek adı	35S/NOS/FMV GDO görüntüleme kiti	H7-1 GDO belirleme kiti
P1	+	
P2	+	+
P3	+	+
P4	+	+
P5	+	+
P6	+	+
P7	+	+
P8	+	+
P9	+	+
P10	+	+
P11	+	+
P12	+	+
P13	+	+
P14	+	+

Tablo 4.3 (devam): Gerçek zamanlı PZR işlemiyle kitlere göre pozitif sonuç veren örnekler

P15	+	
P16	+	+
P17	+	
P18	+	+
P19	+	
P20	+	+
P21	+	+
P22	+	
P23	+	
P24	+	+
P25	+	
P26	+	+
P27		
P28	+	
P29	+	
P30	+	+
DİNARÇ	+	+
ÇELTEKÇ	+	+
SUHUTÇ	+	+

Tablo 4.3 (devam): Gerçek zamanlı PZR işlemiyle kitlere göre pozitif sonuç veren örnekler

DİNARG	+	+
SUHUT		
KON		
PMY		
SUT1		+
SUT2		
BES1		
BES3		
YUM		
YM		
TOKBES		+
HIN	+	
EPY	+	+
ABA		
H.YEMİ	+	+

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye Şeker AŞ.'nin Mayıs 2016'da yayınladığı rapora göre dünyada şeker üretimi 164 milyon tona ulaşmış durumdadır. Türkiye'de şeker üretiminin tamamı şeker pancarından yapılmaktadır. Şeker pancarından elde edilecek verim ve kalitenin artırılması amacı ile birçok çalışma sürdürülmektedir.

Son 30 yılda geliştirilen bir biyoteknolojik teknik olan Genetiği Değiştirilmiş Organizma üretim çalışmaları bunlardan biridir. Ülger ve arkadaşları (2015), şeker pancarından şeker ayrıldıktan sonra kalan posa kısmı hakkında; ekonomik olması, pektin açısından zengin olması ve yüksek oranda selüloz içeriği nedeniyle, hayvanlarda tahıl ağırlıklı besleme düzeninden kaynaklı metabolik bozuklukların önlenmesinde ciddi bir fayda sağladığını belirtmişlerdir. Türkiye'de ekimi yapılan şeker pancarından, şeker ve gıda kısmı çıkarıldıktan sonra pancardan, üretilebilecek biyoetanolün Türkiye'nin benzin ihtiyacının tamamını karşılayabileceği belirtilmiştir (Üstün ve Genç, 2015).

Hazır gıda endüstrisinin gelişmesi ile fruktoz ihtiyacı artmıştır. Buna bağlı olarak şeker pancarına rağbetin kayda değer şekilde artması şeker pancarında transgen yöntemine gidilmesine neden olmuştur. Kayıtlı olarak ekimi yapılan transgenik şeker pancarı türü (event) bugün 3 adettir ve bu transgenik bitkiler endüstri amaçlı ekimlerin çoğunluğunu karşılamaktadır. Ancak yasalar GDO'ya bir düzenleme getirerek bunun önüne bir set çekmiştir. Bu tezatlık bizi şeker pancarında genetik modifasyon araması yapmaya itmiştir.

GDO çalışmaları dünden bugüne birçok soruyu ve sorunu da beraberinde getirmiştir. Bunlar insan sağlığı, ekolojik sorunlar, biyoçeşitlilik, besi hayvancılığının geleceği gibi birçok kategoriye içermektedir.

Bu gibi endişeler sebebiyle sürekli yapılmakta olan GDO tanı ve miktar tayini analizleri büyük önem arz etmektedir. Ülkemizde yasalar çerçevesinde düzenlenmiş olan Mart 2010 tarihli 27553 sayılı resmi gazetede yayınlanmış "Biyogüvenlik Kanunu" ile transgenik bitki üretimi ve ihracatı sınırlandırılmıştır. Resmen ülkemizde bitkiler üzerinde genetik olarak değiştirilmiş, rekombinant gen aktarımı yasal olmasa bile, ithal edilecek olan tohumlar için GDO tür ve miktarı belirlenmiş ve % 0,9 ile sınırlanmıştır.

Bu oran işlenmiş besin maddelerinde de geçerlidir. GDO belirleme yöntemlerinden biri olan PZR, bugün GDO tayininde en çok kullanılan yöntemlerdendir. PZR tekniğine, GDO tayini dışında birçok alanda da kullanıldığı için laboratuvarlarda sıklıkla başvurulmaktadır. Dolayısıyla laboratuvarın çoğunda mevcut bir sistemdir. Bu sebeple bu çalışmada PCR tekniği ile transgen araması yapılmıştır.

GDO yapım aşamasında en çok kullanılan yöntem bakteri aracılığı ile gen transferidir. Birçok araştırmada GDO tayini için PZR yöntemi ile, en çok kullanılan belirteçler olan 35S, NOS, FMV dizilerinden faydalanılmaktadır. Bu belirteç diziler GDO yapım aşamasında kullanılan bakterilere ait kesim kodanları içermektedirler. Aynı şekilde Berdal ve Holst-Jensen, (2001) Carderelli ve diğ., (2005); Ujhelyi ve diğ., (2008); Randhawa ve diğ., (2010) Artık ve diğ., (2016), Bhoge ve diğ. (2016) ; Peng ve diğ.,(2016) gibi isimler de çalışmalarında bu gen dizilerini kullanmışlardır. Paralel olarak bu çalışmada da 35S, NOS, FMV dizilerine ek olarak, ayrıca H7-1 şeker pancarı transjeni aranmıştır.

Yılmaz (2012) yaptığı çalışmada ülkemiz marketlerinden topladığı tüm soya ticari ürünlerinde RoundUp™ Ready çeşidi transgenik ürüne rastlamıştır. Uçkun (2007), Türkiye'den topladığı 40 domates çeşidinin 14'ünde 35S ve NOS promotor genleri saptayarak genetik modifikasyon varlığını tespit etmiştir. Şeker pancarında gen değişikliği araması yapılan bu çalışmada da modifiye edilmiş gen varlığı Türkiye'de yetiştirilen ve hayvan yemlerinde bulunan şeker pancarı örneklerinde tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ülkemizde yetiştirilen ve Türkiye Şeker Enstitüsü'nden elde edilen 30 adet şeker pancarı ve 15 adet hayvan yemi dışında 6 adet tarladan toplanan şeker pancarı üzerinde DNA'ya dayalı transgen tayini yapılmıştır. Örneklerden yabancı gen analizi için DNA izolasyonu, günümüzde sıklıkla tercih edilen CTAB yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Afsharzadeh ve Abbasi (2016), Irfan ve diğ. (2013), Niu ve diğ. (2008) de çalışmalarında CTAB yönteminin bitkilerde DNA izolasyonu yapmak için kullanılan en iyi yöntemlerden biri olduğunu belirtmişlerdir.

Sonuç olarak toplamda 42/51 örnekte transgen saptanmıştır. Bunlar hakkında; piyasadan toplanan ve şeker pancarı içerdiği tespit edilen 11 hayvan yemimden 5'inin, genetik olarak değişmiş olduğu ve bunların 3'ünün H7-1 diğer 2'sinin ise diğer pestisit dirençli yabancı gen taşıdığı düşünülmektedir. Sahadan toplanan 7 örneğin ise 6'sında yabancı

gen tespit edilmiştir. Bunlardan tamamı H7-1, pestisite dirençli modifiye şeker pancarı geni de ihtiva etmektedir.

Ancak yemlerdeki şeker pancarı türünün zaten analizi yapılan 40 şeker pancarı türlerinden biri olup olmadığı konusu kesin değildir. Bununla birlikte bunlardan bazıları ithal edilmiş hayvan yemleri olabileceğinden ülkemizde yetiştirilen şeker pancarından elde edilmiş oldukları da kesin olarak söylenemez.

Son yıllarda üzerinde yapılan tartışmalarla birlikte her geçen gün GDO üretim yöntemleri kolaylaşmakta ve yaygınlaşmaktadır. 2012 yılında Nature Dergisi'nde yayınlanan bir yayından sonra geliştirilen CRISPR tekniği, Cas9 adı verilen enzime dayanmakta ve RNA molekülünün hedeflenen DNA bölgesine yönlendirilip, hedeflenen genlerin silinmesi veya eklenmesi sağlamaktadır. CRISPR tekniği herhangi bir organizmaya, herhangi bir özelliğin eklenip organizmadan herhangi bir özelliğin çıkarılmasını içermektedir. İşlem oldukça basit ve ucuz bir gen mühendisliği yöntemidir. Bu yöntemle hastalığa sebebiyet veren genlerin ortadan kaldırılması mümkün olduğu gibi, en ufak bir hatada hücrenin kontrolsüz çoğalıp kansere sebebiyet verdiği de görülmüştür (Korkutata, 2015; Lozano-Juste ve Butler 2015). Bu tekniğin önemi ve oluşturabileceği etkiler hakkındaki düşünceler GDO konusundaki umulan gelişmelerin çok daha kısa süre içinde gerçekleşeceği yönündedir.

CRISPR gibi tekniklerin gelişmeye devam edeceği ve önümüzdeki günlerde genetiği değiştirilmiş herhangi bir organizmayla yaşamın her alanında karşılaşılacağı görülmektedir. Bu tip organizmaların fayda ve zararlarının belirlenmesi için GDO tespitinin önem arz ettiği açıktır.

Tutun ve Baydan'a göre (2015), üretimi gittikçe artan ve toksikolojik yönden incelenmeden sofralarımıza daha çok giren GD ürünlerin sağlığımıza ne gibi etkileri olacağı belirsizdir. GDO'nun alerjik tepkimelere yol açabilmesi, besin zinciri içinde birikebilmesi, toksik etkiler yapabilmesi ve antibiyotik direnci oluşturabilmesi gibi birçok önemli yan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bunun aksine GD bitkilerdeki verim ve besin değerini artması sağlayarak günümüzün en büyük sorunu açlığa çözüm getirebilmektedir. Ayrıca susuzluk olan yerlerde su ihtiyacı az olan besin bitkileri yetiştirilmesi de sağlanabilmektedir.

Şeker pancarında ise yapılan GD şeker pancarı çeşitleri herbisite dayanıklı olmakla birlikte besin açısından zenginleştirilmiş türleri de bulunmaktadır. Beyaz şeker ve fruktoz üretiminin açısından bakıldığında ise durum şöyle açıklanabilir: Beyaz şeker ve fruktoz besin maddesi olması dışında yalnızca kimyasal organik bileşiklerdir. Herhangi bir gen veya protein içermezler. Bu sebeple beslenme aşamasında basit şeker kısmı hariç besin maddesi olarak kullanımı söz konusu değildir. Ancak kimyasal şeker dışında kalan kısmı hayvan yemi olarak tüketildiğinde; et, süt, yumurta gibi gıdalarla bu genler tarafından etkilenebiliriz. Yani şeker pancarındaki transgen bizi, bildiğimiz şekerle değil başka bir şekilde dolaylı yolla etkileyebilir. Ayrıca ülkemizde pazı ve pancar olarak tüketildiğinden dolaysız olarak da insan diyetine girmektedir. Sonuç olarak direkt veya diğer yollarla şeker pancarındaki modifikasyondan sadece biz insanlar değil, besin zinciri dolayısı ile hayvanlar ve doğa da etkilenmektedir. Çalışmanın sonucu olarak şeker pancarlarının genetik değişiklik olup olmadığı belirlenmiş fakat genetik modifikasyon miktarı ölçülmemiştir. Tespit edilen GDO'ların ve ülkemize tohum ve ürün ihracatı yolu ile girdiği tahmin edilmektedir. Buradaki sınır ise daha önce bahsedildiği gibi % 0,9'dur.

Bu tez çalışmasında ülkemizde üretilen şeker pancarın transgenik olup olmadığı sorusuna cevap aranmış ve % 82'sinde genetik değişiklik yapıldığı tespit edilmiştir. Çalışmanın devamı olarak bu GD bitkilerin miktar tayini ile transgen oranlarının tespiti planlanmaktadır. Ayrıca Türkiye'de bu kapsamda GDO olan şeker pancarı belirleme çalışması henüz yapılmamış olduğundan bu sonuçların gerek yasal düzenlemelere gerekse sosyolojik incelemelere veri kaynağı olabileceği düşünülmekte ve gelecek bilimsel çalışmalara ışık tutacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Afsharzadeh, S. and Abbasi, S., 2016, An efficient and simple CTAB based method for total genomic DNA isolation from low amounts of aquatic plants leaves with a high level of secondary metabolites. *Progress in Biological Sciences*, 6(1), 95-106.
- Agribusiness Handbooks, 1999, Sugar Beets / White Sugar, Agribusiness Handbooks vol. 4: 1999.
- Agribusiness Handbooks, vol. 4: Sugar Beets/White Sugar
<http://www.responsibleagroinvestment.org/> [Ziyaret tarihi: Kasım 2016].
- Akbulut, U., 2009, *Dna Nedir? Nasıl Keşfedildi*, <http://www.uralakbulut.com.tr>, [Ziyaret tarihi: 17 Kasım 2016].
- Arı, S., 2004, *Doğrudan Gen Anlatım Teknikleri*, Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed.), Bitki Biyoteknolojisi, Bölüm 16, S.Ü. Basımevi, Konya, Türkiye, 160-189.
- Artık, N., Konar, N., Özkan, M., Çakmakçı, M.L., 2016 *Aflatoxin and Genetically Modified Organisms Analysis in Turkish Corn. Food and Nutrition Sciences*, 7, 138-148.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. D., 1991, Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter*, 9(3), 208-218.
- Aydın, S. ve Köçkar F., 2008, Farklı genomik DNA izolasyon yöntemlerinin Satureja (labiatae) türlerinde uygulanması. *BAÜ FBE Dergisi*, 10(1), 52-60.
- Bhoge, R. K., Chhabra, R., Singh, M., Sathiyabama, M., Randhawa, G., 2016, Multiplex real-time PCR-based detection and quantification of genetically modified maize events employing SYBR® Green I and TaqMan® chemistries, *CURRENT SCIENCE*, 110(8), 1446-1451.
- Biancardi, E., 2005, *Genetics and breeding of sugar beet*. Science Publishers INC. Post Office Box 699 Enfield, New Hampshire 03748 United States of America, ISBN:1-57808-366-4.
- Bortesi, L. and Fischer, R., 2015, The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Bostan, A. and Gün, S., 2013, Türkiye’de genetiği değiştirilmiş gıda ve yem konusunda mevzuat uygulamaları ve denetimler, *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(1).
- Cantor, C. R. and Smith, C. L., 2004, *Genomics: the science and technology behind the human genome project* (Vol. 12), John Wiley and Sons.
- Cardarelli, P., Branquinho, M., Ferreira, R., Cruz, F, Gemal,A.L., 2005, Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience, *Food Control*, 859-866.

- Chaouachi, M., Alaya, A., Ali, I. B. H., Hafsa, A. B., Nabi, N., Bérard, A., Saïd, K., 2013, Development of real-time PCR method for the detection and the quantification of a new endogenous reference gene in sugar beet “Beta vulgaris L.”: GMO application. *Plant cell reports*, 32(1), 117-128.
- Çıvgın, H., 2016, Uluslararası Sözleşmeler Ve Türkiye’deki GDO Düzenlemeleri Işığında Biyogüvenlik Kurulu Kararları, *Eğitim Bilim Toplum*, 14(53), 112-139.
- Dert, S. T. 2006, Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri, *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, 31(3), 151-155.
- Draycott, A. P. (Ed.), 2008, *Sugar beet*. John Wiley and Sons.
- Elenis, D.S., Kalogianni, D.P., Glynou, K., Ioannou, P.C.,Christopoulos, T.K., 2008, Advance in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 347-354.
- Esmer, E.B., 2009, *Şeker pancarlarında yaprak lekesine neden olan Cercospora beticola'nın klasik ve moleküler yöntemlerle patotiplerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- FAO, 2014, *Sugarbeet White Sugar Agri Busines Hand Book*, Director Investment Centre Division FAO Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy Richard D. Vierstra
- Gasparic, M.B., Tengs, T., La Paz, J.L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Zel, J., Gruden, K., 2010, Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2023-2029.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L., 2010, *Recombinant DNA technology, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, Chapter 3, ASM Pres, USA, 49-92.
- Günel, T., 2007, Quantitative analysis of gene expression; real-time PCR: scientific letter. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical sciences*, 27(5), 763.
- Haspolat, I., 2012, Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 75-80.
- Hermann, K.M., 1995, The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds, *The Plant Cell*, 7, 907-919.
- Holst-Jensen, A., 2009, *Testing for genetically modified organisms: Past, present and future perspectives*, *Biotechnology Advances*, 27, 1071-1082.
- Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A., Berdal, K.G., 2003, PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 985-993.

- Irfan, M., Ting, Z. T., Yang, W., Chunyu, Z., Qing, M., Lijun, Z., Feng, L. (2013). Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. *Research Journal of Biotechnology*, 8(1), 41-45.
- ISAAA, 2016, *New ISAAA Video Presents Impact Of Gm Crops On Adopting And Importing Countries*, <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article>, [Ziyaret tarihi: Kasım 2016]
- ISAAA, 2016, ISAAA Annual Report 2015 https://www.isaaa.org/resources/publications/annualreport/2015/pdf/ISAAA-Aannual_Report-2015.pdf, [Ziyaret tarihi: Eylül 2016]
- İşler N., 2013, *Şeker pancarı* <http://www.mku.edu.tr/>, [Ziyaret tarihi: Aralık 2015]
- İşler N., 2013, *Şeker pancarı ıslahı ders notu* <http://www.mku.edu.tr/>, [Ziyaret tarihi: Kasım 2015]
- James, C., 2015, 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. *ISAAA Brief*, (51).
- Korkutata, M., 2015, *21. Yüzyılın Genetik Mucizesi: CRISPR*, <http://www.bilim.org/21-yuzyilin-genetik-mucizesi-crispr/>, [Ziyaret tarihi: Haziran 2016]
- Kornberg, A. (1960). Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*, 131(3412), 1503-1508.
- Korth, K.L., 2008, Genes and traits of interest for transgenic plants. In: C. Neal Stewart, Jr., (ed.), *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications*, Chapter 8, Wiley and Sons, New York, 193-215.
- Kotrba, P., Najmanova, J., Macek, T., Ruml, T., Mackova, M., 2009, Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnology advances*, 27(6), 799-810.
- Küçüker, O., 2015, *Bitki Morfolojisi Sporlu ve Tohumlu Bitkilerin Evrimi ile Temel Morfolojik Konular*, Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, ISBN: 9786053351214.
- Laura, B., Petra, H., Simon, K., Guy V.E., 2001, Review of GMO detection and quantification techniques, European Commission Joint Research Centre, Ispra.
- Ledford, H., 2015, CRISPR, the disruptor. *Nature*, 522(7554), 20-24.
- Lozano-Juste, J. and Cutler, S. R., 2014, Plant genome engineering in full bloom. *Trends in plant science*, 19(5), 284-287.
- Marmiroli, N., Maestri, E., Gulli, M., Malcevski, A., Peano, C., Bordoni, R., De Bellis G., 2008, Methods for detection of GMOs in food and feed, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 369-384.

- McGrath, J. M. and Townsend, B. J., 2015, Sugar beet, energy beet, and industrial beet. *In Industrial Crops* (pp. 81-99). Springer New York.
- Michelini, E., Patrizia, S., Cevenini, L., Mezzanotte L., Roda, A., 2008, New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 355- 367.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.
- Niu, C., Kebede, H., Auld, D. L., Woodward, J. E., Burow, G., Wright, R. J., 2008, A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*, 7(16).
- Oğraş, T.T., 2008, *Bitiklere Gen Aktarımı* Bilim ve Teknik Dergisi Ocak 2008 ek sayısı.
- Öktem, H.A., 2004, *Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi*, Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed.), Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Bölüm 17, S.Ü. Basımevi, Konya, Türkiye, 190- 202.
- Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı, G., Yıldız, M., Birsin, M., Ulukan, H., Sancak, C., 2005, Tarım Teknolojilerinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar: Bitki Biyoteknolojisi. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 1*, 315-346.
- PANKOBİRLİK, 2016, *Dünya, AB ve Türkiye Şeker İstatistikleri*, <http://pankobirlik.com.tr/ISTATISTIKLER.pdf>, [Ziyaret Tarihi: Ekim 2016].
- Peng, C., Wang, P., Xu, X., Wang, X., Wei, W., Chen, X., Xu, J., 2016, Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *SpringerPlus*, 5(1), 1-6.
- Randhawa, G.J., Chhabra, R., Singh, M., 2010, Decaplex and Real-Time PCR Based Detection of MON531 and MON15985 Bt Cotton Events, *Journal of AOAC International*, 58, 9875-9881
- Resmi Gazete, 2009, *Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Degistirilmis Organizmalar ve Ürünlerin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair yönetmelik*.
- Resmi Gazete, 2010, *Biyogüvenlik Kanunu*, Kanun no: 5977.
- Resmi Gazete, 2010, *Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Degistirilmis Organizmalar ve Ürünlerin ithalatı, işlenmesi, ihracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik*.
- Saikia, D.P. Kalita, D.J., Borah, P., Sarma, S., Nagendra, N.B., Dutta, R. 2015. Differentiation of sheep and goat species by PCR-RFLP of mitochondrial 16S rRNA gene, *Journal of Animal Research*, 5: 213-217.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning* (Vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press.

- Sander, J. D. and Joung, J. K., 2014, CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Sonma, M., 2006, Extraction and Purification of DNA, Querci M. (ed.), *Training course on: The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms User Manual*, Session 4, European Communities, Luxemburg.
- Sonma, M. and Querci, M., 2010, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Querci M. ve diğ. (ed.), *Gıda Örneklerinde Genetigi Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs El Kitabı*, Bölüm 6, Avrupa Birliği, Luxemburg.
- Şen, S. ve Altınkaynak, S., 2014, Genetiği değiştirilmiş gıdalar ve potansiyel sağlık riskleri. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18 (1), 31-38.
- Tan, S., Evans, R., Singh, B., 2006, Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops, *Amino acids*, 30, 195-204.
- Terry, C.F., Harris, N., Parkers, H. C., 2002, Detection of genetically modified crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction, *Journal of AOAC International*, 85, 768–774.
- Tutun, H. ve Baydan, E., 2015, Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Toksikolojik Değerlendirmesi.
- Uçkun, E., 2007, *Screening for genetically modified tomatoes and tomato seeds and identification of CRYIAC and SAM-K specific modifications using gene and construct specific PCR*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü.
- Ujhelyi, G., Vajda, B., Béki, E., Neszlényi, K., Jakab, J., Jánosi, A., Gelencsér, É. (2008). Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary. *Food Control*, 19(10), 967-973.
- Ülger, İ., Kaliber, M., Beyzi, S. B., Konca, Y., 2015, Yaş Şeker Pancarı Posasının Bazı Meyve Posaları ile Silolanmasının Silaj Kalite Özellikleri, Enerji Değerleri ve Organik Madde Sindirilebilirlikleri Üzerine Etkisi/The Effects of Ensiling Wet Sugar Beet Pulp with Some Fruit Pomace on Silage Quality, *Ener. Alınları Ziraat Bilimler Dergisi*, 29(2), 19-25.
- Üstün G.E. ve Genç B., 2015, Dünya’da ve Türkiye’de Biyoyakıtların Durumu, *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*; 2015, Cilt 29, Sayı 2, 157-164
- Vardar-Kanlıtepe Ç., Aras, S., Cansaran-Duman, D., Bitki ıslahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2010; 67 (1): 33-43.
- Vierstra, R.D., 2009, The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 385-397

- Watson, J.D. and Crick, F.H., 1953, Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Weighardt, F., 2006, *GDO'ların Saptanması İçin Nicel PCR*, Gıda örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs El Kitabı, In: Querchi M., Jermini, M., ve Eede G., V., (ed.), 10, JRC European Commision, ISBN:978-92-79-13-574-3.
- Yılmaz, M.M., 2012, *Türkiye'deki islenmiş soya ürünlerinde kalitatif ve kantitatif GDO tanısı ve transgen analizi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

EKLER**EK 1. Gerçek Zamanlı PZR CP Değerleri Listesi**

ÖRNEK ADI	H7-1 CP DEĞERLERİ	35S/NOSFMV CP DEĞERLERİ
P1	34,085	18,425
P2	34,485	35,53
P3	33,905	17,125
P4	37,53	30,825
P5	36,25	37,33
P6	34,345	39
P7	36,085	35,39
P8	34,34	34,555
P9	35,465	21,49
P10	36,88	36,41
P11	35,57	35,05
P12	34,275	18,215
P13	36,14	38,28
P14	37,51	37,335
P15	34,965	39
P16	35,395	34,51
P17	34,445	0
P18	35,015	23,615
P19	34,935	0
P20	35,385	33,94
P21	34,795	37,455
P22	36,34	0
P23	34,575	0
P24	38,72	36,84
P25	34,605	19,5
P26	35,525	36,42
P27	0	0
P28	36,73	0
P29	34,635	16,185
P30	34,615	38
DİNARÇ	34,275	37,15

ÇELTEKÇ	34,27	33,485
SUHUTÇ	35,035	35,61
DİNARG	34,14	0
SUHUT	0	0
KON	35,605	0
PMY	39	18,39
SUT1	0	0
SUT2	0	10,685
BES1	0	0
BES3	0	0
YUM	0	39
YM	39	0
TOKBES	0	35,67
HIN	0	0
EPY	38,6	28,185
ABA	0	0
H.YEMİ	35,74	39

*CP değerleri iki kez tekrarlanan deney sonuçlarının ortalamasıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	HAVVA KAYA
Doğum Yeri	ISPARTA
Doğum Tarihi	14.11.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	kaya_havva@yahoo.com.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	FEN FAKÜLTESİ
Bölümü	BİYOLOJİ
Mezuniyet Yılı	08.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Programı
Mezuniyet Tarihi	19.12.2016