



## Mısır Bitkisinde GD Analizi Teknolojisi

Ahmet OKUMUŞ<sup>1\*</sup>

Fatih ÖNER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup>Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ordu, Türkiye

\*Sorumlu yazar:

E-mail: aokumus@omu.edu.tr

Geliş Tarihi: 2 Ocak 2012

Kabul Tarihi: 22 Mayıs 2012

### Özet

Mısır, dünyada buğdaydan sonra insan ve hayvan gıdası olarak en yüksek miktarda üretilen bitkilerden birisidir. Hastalıklara dayanıklılık yönünden avantajlı olması düşüncesiyle, gen aktarımı yapılan mısır bitkisinin üretimi belirli ülkelerde yapılmakta, biyogüvenlik kapsamında izlenmesi de alınan kararlar doğrultusunda zorunlu kılınmıştır. Alınan örneklerde GD analizi, daha çok ticari amaçlı olarak tahıllarda, ihracat ve ithalat kapsamında izlemeyi kapsadığından yapılan analizlerde tohum üzerinde yapılmaktadır. Değişik tespit yöntemleri olsa da en hızlı ve güvenilir olanı PCR (PZR) analizi ile yapılan uygulamalardır. Bu uygulamalarda gen aktarımı var/yok, hangi gen ve kullanılan ürün miktarında GD li ürün oranı şeklinde testler yapılmaktadır. Kalitatif ve kantitatif olarak yapılan analizlerde gen aktarımında kullanılan primer olarak kullanılan gen yapıları önemli olmakta, bu gen bölgeleri farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilen teknolojilerle beraber değişikliğe uğramaktadır. Bugün var/yok analizinde ilgili gen bölgeleri 4 adet olup, NOS/S35/Bar ve CTP2 olarak ticari olarak mevcuttur. Bu testler, tekrarlamalı Ar-Ge laboratuvarından ziyade, tekrarlama maliyeti azaltılmış kontrollü şartları olan ISO 17025 kapsamında düzenlenmiş test laboratuvarlarında Avrupa GD protokollerine göre yapılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler : Mısır, GDO, Transgenik, Tespit teknolojisi**

## Technology of GD-Analysis in the Corn Plan

### Abstract

Maize is one of the plants produced at the largest amount as human food and animal feed after wheat in the world. By the intend of advantage of gen transfer in terms of disease resistance, the production of GM maize plant is limited some countries and the track of GM maize within the scope of biosecurity is obliged. GM maize samples, mostly, are done on seed within the scope of cereal export and import as commercial. The most used method is PCR based for fast and confidential results. In these applications, gen transfer is analyzing as exist/absent, which gene and amount of GD products. These analysis result qualitative and quantitative due to the gene used and, GM gene loci are becoming different due to used technology for GM detection. Today, four regions are used for GM detection as NOS/S35/Bar and CTP2 as commercial. These tests are applied under the ISO 17025 laboratory standarts using European GMO Protocols.

**Key Words: Maize, GMO, Transgenic, Detection technology**

## GİRİŞ

Mısır bitkisinde genetik mühendisliği çalışmaları, geleneksel ıslah çalışmalarında kalite ve ürün verimliliğini artırmak amacıyla yapılan uygulamalar arasında yer almaktadır. Genetik mühendisliği uygulamaları sonucunda canlıların genetik kompozisyonunda gen eklenmesinden dolayı değişiklik olmaktadır. İstenilen bir genin herhangi bir tür canlıdan alınarak başka tür canlı grubuna alınmasını içeren değişiklik, gıda olarak kullanılan ekonomik önemi olan ürün zincirine girmiş olacaktır. Bu uygulamada, transgenik teknoloji olarak ifade edilen uygulamada ilgili genin ürünlerinin tehlikeli olmadığı ancak aktarılan genin kontrolsüz ve test edilmemiş zararlı

ürünlerin üretimine neden olduğu konusu tartışılmaktadır. Islah çalışmalarında şüana kadar doku kültürü, embriyo kültürü gibi birçok metot uygulanmasına rağmen, gen aktarımı konusunda genetik kompozisyon değiştiğinden dolayı ortaya çıkması muhtemel olayların insan sağlığı üzerine ters etkilerine sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu etkilerin insan sağlığı için riskli olmaması için muhtemel istenmeyen değişikliklerinin gıdanın tüketilmesiyle ilgili olarak izlenmesi gerekmektedir.

Bitkilerde, ilaç kullanımı azaltmak amacıyla başlayan çalışmalar hızlı bir şekilde gelişme göstermiştir. Mısır bitkisinde başlayan ve başka

bitkilerde de uygulaması yapılan gen aktarımı üzerine yapılan çalışmalar soya, pamuk, domates, patates şeklinde yayılış göstermiştir. Özellikle hayvan yiyeceği olarak kullanılan ve beslemede vazgeçilmez enerji ve protein kaynağı olan mısır ve soya bu konuda uygulamalarda önemli bir yer tutmuştur(www.fao.org). Mısır bitkisine, Bacillus thuringiensis adı verilen toprak bakterisine ait Bt geni (CryA) geninin aktarılması sadece koçan kurdu adı verilen zararlıya karşılık koruma sağlamamış aynı zamanda fosfat kökenli yabancı ot ilaçlarına da dayanıklılık sağlayarak verimde artış gösterilmesine neden olmuştur(www.efsa.europa.eu). Bu uygulamalarda, transgenik ürün adı verilen GD organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar, GD bitkilerle beslenmesi sonucunda insan sağlığına muhtemel etkiler için tartışma ortamı doğmuştur (www.who.net; www.gmo-compass.org). Tartışmanın konuları aktarılan genlerin muhtemel toksin etkileri, antibiyotik geninin başka organizmalara transfer olabilme etkileri ve alerjik etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır(www.gmo-safety.eu).

GD organizmalar üzerinde birçok konuşma yapılmış, yararları ve zararları tartışılmıştır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki GD ürünler teknolojik bir yaklaşım olup, devamlı hataları düzeltmeye yönelebilen bir teknolojidir ([http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/index_en.htm)). Bu açıdan baktığımızda, bu teknolojiyi elinde bulunduran ülkeler tohum sanayine ve dünya gıda üretiminde söz sahibi olacakları aşıkardır. Bunun en basit göstergesi dünyada ekilen alanlardır. Clive James (2009) tarafından ifade edilen şekliyle 25 farklı ülkede 2008 yılında 2007 yılına göre % 15 daha artarak 180 milyon hektara ulaşmıştır (www.gmo-compass.org). Artan ticari faaliyetler bununla ilgili kontrol mekanizmalarının ortaya çıkmasına neden olmuş ve ülkelere bağlı olarak ortak kurallara konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla Avrupa Birliği tarafından 26 Mayıs 1998 de bir düzenleme yapılarak (Konsey Düzenlemesi 1139/98/EC) genetiği değiştirilmiş organizmalardan elde edilen ürünlerin etiketlenmesi gündeme gelmiştir. Bunu takiben Ocak 2000 yılında 49 nolu karar ile %1 eşiği uygulaması başlatılmıştır. Bu husus genetik değişimler sonucu, gıdaların DNA veya proteinlerin taşınma, üretim veya tüketim yerlerindeki kontaminasyonunu kontrol için, minimum eşik değeri hedeflenmiştir.

Avrupa birliğinin 2002/66/EC sayılı GD tanı ve miktar analizi, harmonizasyon ve standardizasyonunu takiben Aralık 2002 den itibaren ENGL adı verilen Avrupa GD Laboratuvarları Birliği-European Network of GMO Laboratories ve Birleştirilmiş Araştırma Merkezleri (DG Joint Research Center- JRC) kurulmuştur. Bu laboratuvarlarda 50 laboratuvar ve 2500 bilim insanı GD analizleri için çalışmaya başlamıştır. Daha sonraki yıllarda Avrupa birliğinin 2003 yılında; 1829/2003 ve 1830/2003 sayılı kuralları ile genetiği değiştirilmiş organizmalardan üretilen gıda ve yemin izlenebilirliği ve etiketlenmesine ilişkin hüküm getirilmiştir (www.efsa.europa.eu).

Ülkemizde, transgenik kültür bitkilerinin “alan denemeleri“ hakkında talimat, Tarım Bakanlığı makamının 14.5.1998 gün ve TGD/TOH-032 sayılı olur’ları ile yürürlüğe konulmuştur. Tarım Bakanlığı tarafından tohumluklar dışındaki genetiği değiştirilmiş organizma ve ürünleri ile genetiği değiştirilmiş organizma ve ürünlerini içeren gıda ve yem maddeleri hakkında karar verme, işleme, ithalat, ihracat, izleme, tescil, etiketleme, kontrol ve denetim ile ilgili usul ve esasları kapsayan “Gıda Ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar Ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol Ve Denetimine Dair Yönetmelik” 26.10.2009 tarih ve 27388 sayılı Resmi Gazete ’de yayımlanarak yürürlüğe girmiştir. Biyogüvenlik kanunu, 18.03.2010 tarihinde Bakanlar kurulu kararı ile yürürlüğe girmiş olup, Resmi gazetede yayınlanan kanunun amacı;

1. Bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esasları belirlemektir.

2. Bu Kanun; genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünleri ile ilgili olarak araştırma, geliştirme, işleme, piyasaya sürme, izleme, kullanma, ithalat, ihracat, nakil, taşıma, saklama, paketleme, etiketleme, depolama ve benzeri faaliyetlere dair hükümleri kapsamaktadır.

3. Veteriner tıbbi ürünler ile Sağlık Bakanlığınca ruhsat veya izin verilen beşeri tıbbi ürünler ve kozmetik ürünleri bu Kanun kapsamı dışındadır.” şeklinde belirtilmiştir (www.tarim.gov.tr).

Ülkemizde biyogüvenlik kanununa göre oluşturulan biyogüvenlik komisyon kararları, Avrupa uygulamalarından daha sıkı ve hassas olarak uygulanmaktadır. Ürünlerdeki etiketleme ülkelere göre farklılık göstermektedir. Bazı ülkelerde zorunlu iken bazı ülkelerde gönüllülük esasına göre yapılmaktadır. Avustralya, Yeni Zelanda, Brezilya, Çin, AB ülkeleri, Kore ve Rusya’da zorunlu olup, Japonya, Amerika ve Kanada da gönüllülük esasına göre etiketleme yapılmaktadır. Etiketleme tolerans sınırı da ülkelere göre değişmektedir. Japonya, Amerika ve Kanada etiketleme tolerans sınırı % 5 iken,, Kore de %3, Çin de % 0, AB ülkelerinde % 0,9 diğer ülkelerde ise % 1 seviyesinden sonra etiketleme sınırı vardır.

İthal olarak gelen ürünlerden alınan örneklerde GD analizi, daha çok ticari amaçlı olarak tahıllarda ihracat ve ithalat kapsamında izlemeyi kapsadığından tohum veya yarı işlenmiş tohum üzerinden yapılmaktadır. Bakanlık tarafından yapılan veya ISO 17025 kapsamında düzenlenmiş test laboratuvarlarında Avrupa GD protokollerine göre yapılmakta olan mısır tohumunda GD organizma analizinde üç soruya yanıt aranmaktadır. Mısır tohumunun gen taşıyıp taşımadığı, taşıyorsa hangi gen taşıdığı ve ne kadar miktarda

ve/veya oranda ürünün içerisinde yer aldığı belirlenmektedir. Bu nedenle, yöntemlerin geçerliliği, ilgili yönetmeliklere göre yapılan uygulamalarda ortaya çıkmaktadır. Bunun için örnek toplama, sertifikasyonlu referans materyali ve örneğin homojenizasyonu çok önemlidir. Kalitatif ve Kantitatif olarak yapılan analizlerde gen aktarımı için kullanılan primer olarak ifade edilen gen yapıları önemli olmakta, bu gen bölgeleri farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilen teknolojilerle beraber değişikliğe uğramaktadır. Bugün var/yok analizinde ilgili gen bölgeleri 4 adet olup, NOS/S35/Bar ve CTP2 olarak ticari olarak mevcuttur.

Mısır tohumunda analizler değişik şekillerde yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemler hızlı yöntemler, doğruluk payı yüksek olan yöntemler şeklinde ifade edilebilir. Mısır tohumunda kullanılan yöntemler polimeraz zincir reaksiyonu, immunoassay yöntemler en sık kullanılan yöntemlerdir. Uygulamada, başvuruda GD mısır tohumu olduğu belirlendikten sonra örnek toplama sonrasında bu test edilir. Test sonucu negatif çıkarsa test çıkıncaya kadar tekrarlanır. Daha sonra hangi gen olduğunu tespit için ikinci uygulamaya geçilir. Buradan gen tespiti yapıldıktan sonra başvuruda belirtilen gen olup olmadığı kontrol edilir. Bu işlem sonucunda negatif çıkarsa gen yasal değildir şeklinde değerlendirilir. İlgili gen ise doğrudan miktar (oran) testine geçilir. Bu testte oranlar, ülkemizde uygulanan % 0,9 eşliğine göredir. Bunun altındakiler bulaşma kabul edildiği için, eşik bulunmaktadır. Bu eşik üzerindekielerde etiketleme zorunluluğu bulunmaktadır.

#### **Mısır Tohumunda GD Ürünler Tespit Yöntemleri**

Mısır bitkisinde genetiği değiştirilmiş ürünlerin tespitinde protein ve DNA olmak üzere iki yöntem ile yapılabilmektedir. DNA esaslı yöntemde PZR teknolojisini kullanırken, protein esaslı yöntemlerde immunoassay yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları ucuz ve hızlı bir tespit etme yapılabilirken diğerleri ise biraz daha zaman alıcı ancak daha güvenilirlerdir. Kullanılan yöntemler, strip yöntemi, bioassay yöntemi, ELISA, PZR, RT-PZR ve NIR yöntemi olarak belirtilmektedir. Son teknolojilerden olan Mikroarray (DNA chip) yönteminde ise DNA test işaretlerinin pahalı ve az miktarda olmasından dolayı günümüzde sınırlı miktarda kullanılmaktadır.

**a) Kağıt Şerit yöntemi:** Mısır bitkisinde uygulanan yöntem, zar (membran) temelli olup, iki korumalı bölge içerecek şekilde tasarlanmıştır. Birinci aktarılan gen bölgesindeki proteini bağlamakta, diğeri ise standart olarak renk maddesini tutmaktadır. Kullanılan kağıt şerit, korumalı bölgelerde antibodiyi tutmak için kullanılmaktadır. Birçok test, kit formunda bu şekilde hazırlanmakta ve uygulamada test şeriti, suyu çıkartılan (özütlenen) bir solusyona daldırılarak test edilecek örnek kapılar yolla hareket ettirilir. Test edilecek örnek antibodiye doğru gider ve orada toplanır ancak bu yöntemde miktar kontrol yapılamaz. Bu testlerle yapılan

analizler kalitatif veya yarı kantitatif sonuçlar vermektedir.

**b) Canlı ortamda test yöntemi (Bioassay) :** Bu teknik özellikle çimlendirilen tohumlara uygulanan bir yöntemdir. Test edilecek tohumlar çimlendirilerek yabancı ot ilacı püskürtülür ve kimyasala reaksiyonları canlılıklarıyla kontrol edilir. Bu uygulamada fosfat kökenli ilaçlara dayanıklılık uygulama sonrasında gen aktarıldığını ortaya koymaktadır. Yöntem her gen testi için uygulanmamakta, sınırlı uygulaması bulunmaktadır.

**c) Immunoassay (ELISA) yöntemi:** Mısır ürününde uygulanan bu yöntem antijen ve antipodi arasındaki özel bağlanmaya göre çalışmaktadır. Test sırasında antipodilerin varlığında çekim özelliği ve aktarılan gen proteinine özel oluşu bu yöntemin önemli bir özelliğidir. Bu teknoloji, kalitatif ve kantitatif teşhis için birçok protein tiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde ürün çok fazla işlem görmüşse sonuç etkilenebileceğinden tercih edilmemektedir. Yöntemde antipodi kendine özel proteine bağlanmaktadır. Şerit yöntemine göre farklılığı özel bir zar yerine plastik 96 kuyucuklu yüzeyde bu işlem tamamlanmaktadır. Yöntemde antijen ve antipadi birbirine bağlanarak sabit bir yapı oluşturur ve sonuç ikinci antipadiye bağlanan enzim ile görüntülenir. Yöntemin avantajı, standart olduğu zaman kantitatif veri verebilmesidir. Mısır da GD ürünlerin ELISA ile tespitinde genin ekspresyonundan ileri gelen hatalar ortaya çıkabilmektedir. Bu yöntemde, kuyucuklu yüzeye önce antipodi eklenmekte, daha sonra örneğimiz olan antijen eklenmektedir. Aynı yüzeye enzim işaretli antipodi eklenip, son olarak enzimin varlığında renk veren madde eklenir ve okuma yapılmaktadır.

**d) DNA temelli çoğaltma (PZR) yöntemi:** Bu yöntemde aktarılan gen bölgesindeki DNA parçalarının PZR tekniğiyle çoğaltılmasıyla ilgilidir. PZR reaksiyonu, kısa sürede milyonlarda defa ilgili DNA parçasının çoğaltılmasını sağlamaktadır. Bu amaçla iki farklı primer adı verilen DNA parçaları, tek bir geni işaret ettiği gibi birden fazla geni de içerebilmektedir. PZR reaksiyonu için Taq enzimi ve dNTP içeren solusyon yardımıyla ısıtma ve soğutma uygulaması yapılması sonucunda, belirli DNA alanının ifade eden ilgili gen bölgesi çoğaltılmaktadır. Bu yöntem ile farklı oranlarda standart kullanılarak yapılan işlemlerde ise kantitatif sonuç alınabilmektedir. Ancak bu yöntemde özellikle karışım halinde bulunan ürünlerde DNA ekstraksiyonu önemli bir yer tutmaktadır.

**e) RT-PZR yöntemi:** Oran tahmininde kullanılan yöntemin en büyük avantajı, reaksiyon sırasında hedef DNA dizilişinin çoğalma miktarının doğrudan ölçülmesini sağlamasıdır. Bu reaksiyon sırasında florometrik sinyal veren boya eklenerek yapılan ölçümle gerçekleştirilmekte, iki boyadan oluşan reporter (reporter dyr) ve tamamlayıcı (quencher dye) boyalar birbirine sıkı sıkıya bağlanmasından faydalanılmaktadır. DNA dizilişi transfer edilen gene

göre hazırlandıktan sonra PCR yardımıyla çoğaltılmaktadır. Kullanılan polimeraz primer probuyla, boyanın çoğalma sırasında keserek floresans özelliği kazanması sağlanmaktadır.

**f) DNA çip tekniği (mikroarray):** Bu yöntem birçok farklı bölgenin tek bir seferde tanımlanmasına izin veren bir yöntemdir. Özellikle örnek sayısı fazla olduğu durumlarda uygulanması zorunlu olacak yöntemler arasındadır. Kısa sürede birçok gen ile tarama yapılabilmesi, çok örnekle çalışılabilmesi ve yüksek doğrulukta sonuç vermesi bakımından çok önemlidir. Ürünlerin floresans problemlerinin pahalı olması kullanımını sınırlandırmaktadır.

**g) Near Infrared Imaging- Yakın Kızılaltı Resimleme (NIR) yöntemi:** Bu yöntemin esası gen aktarılan ürünlerdeki C-H, O-H & N-H moleküllerindeki farklılığa bağlı olarak ortaya çıkan değişime dayanmaktadır. Yöntem yeni geliştirilmekte ancak çok fazla standart referans materyali ile çalışılması gerektirmesi hassasiyetinin yüksek olması açısından kritik rol oynamaktadır.

## SONUÇ

Son yıllarda ülkemizde GDO'lu ürünlerin tüketimi ile ilgili çeşitli kaygıların söz konusu olduğu ve tartışıldığı toplumsal hassasiyetimizin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Genetiği değiştirilen mısır, çok kullanılan yem ve gıda hammaddelerden birisi olarak ve gen aktarımı yapıldığı için önemli bitkiler arasındadır. Biyogüvenlik yasasına göre GD mısırı bitkisi risk analizi yapılan ürünler arasındadır. Toplumun hassasiyetlerini dikkate alarak teknolojinin geliştirilmesi ve zararlı etkileri varsa durumunun ortaya konulması gerekmektedir.

Transgenik bitkilerle beslenen hayvanlardan elde edilen çeşitli ürünlerde GDolu ürünlerin kalıntılarında AB birliği raporlarına göre rastlanmamış ve insan sağlığına zararının olmadığı WHO, FAO, EFSA ve AB raporlarında belirtilmiştir. Gelişmiş ülkelerde bu tip ürünlerin etiketlenmesi zorunluluğu ve hayvan beslemede yemlerde, gıdalarda ve hayvansal ürünlerde bulunup bulunmadığının tespit edilmesi gen sayısının artacağı düşünülerek giderek daha çok önem kazanacaktır.

## KAYNAKLAR

[1] Petit L, Baraige F, Bertheau Y, Brunschwig P, Dioloz A, Duhem K, Duplan MN, Fach P, Kobilinsky A, Lamart S, Schattner A, Martin P. 2005. Detection of genetically modified corn (Bt176) in spiked cow blood samples by polymerase chain reaction and immunoassay methods. *J AOAC Int.* 2005 Mar-Apr;88(2):654-64.

[2] A. R. Castillo, M. R. Gallardo, M. Maciel, J. M. Giordano, G. A. Conti, M. C. Gaggiotti, O. Quaino, C. Gianni and G. F. Hartnell. 2004. Effects of Feeding

Rations with Genetically Modified Whole Cottonseed to Lactating Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 87:1778-1785.

[3] Flachowsky, G., Chesson, A., Aulrich, K. 2007. Animal nutrition with feeds genetically modified plants. "Achieves of animal nutrition" 59:1, 1-40.

[4] Aulrich, K., Böhne, H., Daenicke, R., Halle, I. Ve Flachowsky, G. 2001. Genetically modified feeds (GMO) in animal nutrition 1st Com. *Bacillus thuringiensis (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition.* *ARCh Anim. Nutr.* 54:183-195.

[5] Amaitre, L.A., Aulrich, K., Chesson, A., Flachowsky, G. And Piva, G. 2002. New feeds from genetically modified plants. The European approach of substantial equivalence, digestibility nutritional value and safety for animals and the food chain. *Livestock Prod. Sci.* 74:223-238.

[6] Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK. 'Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans'. *New Engl J Med* 1996; 14: 688-728.

[7] Melo, V.M.M, J. Xavier-Filho, M.S. Lima, A. Prouvost-Dannon. 1994. Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) *Food and Agricultural Immunology* 6(2):185-195.