

Özgün Araştırma/Original Article

Gıda, yem ve tohumda multipleks GDO tarama testi geliştirilmesi ve validasyon çalışmaları

Development and validation studies of multiplex GMO screening test in food, feed, and seed

Nihal AKMAN^{1*}, Adnan Fatih DAĞDELEN^{1*}

¹Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA-TÜRKİYE

ORCID ID: 0000-0003-4611-9106, Gıda Yük. Müh,

²Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, BURSA-TÜRKİYE

ORCID ID: 0000-0002-6777-273X, Dr. Öğr. Üyesi

*Corresponding author/Sorumlu yazar: nihal.akman@tarimormman.gov.tr

Geliş Tarihi : 17.03.2023

Kabul Tarihi : 06.10.2023

Öz

Giriş: Genetik Modifiye Organizmaların (GDO) kontrol analizlerinin ilk aşamasında GDO tarama analizi yer almaktadır. GDO'lu ürünlerin %90'ından fazlasında genetik modifikasyonu gösteren bölgeler; 35S promotor, NOS terminator ve FMV promotor bölgeleridir. Ticari kitleler de genel olarak bu bölgeleri taramak için üretilmiştir. Bu bölgeler tarandığında daha az ileri analize ihtiyaç duyulmaktadır. Ticari kitleler kullanım kolaylığı sağlaması nedeni ile tercih edilmekte ancak analiz maliyetini artırmaktadır. Bu çalışmada multipleks test materyalinin laboratuvar içi metot olarak hazırlanması ile maliyetin düşürülmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve yöntem: Çalışmada ilk etapta bileşenler uygun oranlarda karıştırılarak GDO tarama testi hazırlanmıştır. Bu tarama testi ile daha sonra sertifikalı referans madde (CRM), gıda ve yem matrislerinde validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tartışma ve sonuç: Planlanan bu çalışma sonucunda LOD (tespit limiti) seviyesi 10 DNA kopyası olan hassas ve analiz maliyeti ticari kite oranla daha düşük multipleks GDO tarama testi geliştirilmiştir. Bu testin yanlış negatiflik ve yanlış pozitiflik oranları %0 bulunmuştur. Asimetrik LOD sonucu tüm bölgeler için 10 kopya/10000 kopya olmuştur. Şartlardaki küçük değişiklikler ile 30 DNA kopyasının pozitif sonuç vermesi bu tarama testinin sağlamlık kriterine uygun olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: GDO; 35S; NOS; FMV; multipleks; validasyon; PCR

Abstract

Introduction: Genetically Modified Organisms (GMO) screening analysis is the first step of the GMO control analysis. Regions showing genetic modification in more than 90% of GMO products are 35S promoter, NOS terminator and FMV promoter regions. Commercial kits are also generally produced to scan these regions. Less further analysis is needed when these regions are scanned. Commercial kits are preferred due to their ease of use, but they increase the cost of analysis. In this study, it was aimed to reduce the cost by preparing the multiplex test material as an in-laboratory method.

Materials and methods: In the study, the GMO screening test was prepared by mixing the components in appropriate proportions in the first stage. With this screening test, validation studies were carried out on certified reference material (CRM), food and feed matrices.

Discussion and conclusion: As a result of this study, a multiplex GMO screening test with a LOD (limit of detection) level of 10 DNA copies was developed. False negative and false positive rates of this test were found to be 0%. The result of asymmetric LOD was 10 copies/10000 copies for all regions. The positive result of 30 DNA copies with minor changes in the conditions showed that this screening test complied with the robustness criteria.

Keywords: GMO; 35S; NOS; FMV; multiplex; validation; PCR

1. Giriş

Bünyelerine yabancı genler dahil edilerek genetik yapıları değişikliğe uğratan, yabancı genleri genomlarına entegre eden ve bu özellikleri gösteren organizmalara “genetik modifiye organizma (GDO)” denir (Şen ve Altınkaynak, 2014). GDO’lar; doğada kendiliğinden polenleşme veya tozlaşma yoluyla gerçekleşmesi mümkün olmayan, laboratuvar şartlarında genetik zincirde değişiklikler gerçekleştirmek suretiyle oluşturulan yeni organizmalar şeklinde tanımlanabilir (Kağıt ve Aslan, 2022). Ya da başka bir tanımla GDO’lar, sahip oldukları gen dizilimleri biyoteknolojik yöntemlerle değiştirilerek yeni özellikler kazandırılmış organizmalardır (Güngör ve Demiryürek, 2021). Yeni bir özellik için organizma genomuna doğal canlı organizmalardan alınan bir parça DNA ya da birkaç küçük DNA parçasından oluşan sentetik bir kombinasyonun eklenmesi ile bu işlem gerçekleştirilir (Atsan ve Kaya, 2008).

Genetik modifiye (GD) bitkiler, doğal yapılarında olmayan bir veya birden fazla genin bir şekilde genoma eklenerek bitkinin bir parçası haline getirilmesi ile oluşturulur. Dünya çapında GD bitkilerin üretimi sürekli artmaktadır (Clive, 2009). Kullanım amaçları tarım ürünlerine virüs, mantar, bakteri, parazit, herbisit ve böceklerle karşı dayanıklılık kazandırılması; sıcaklık, kuraklık, rutubet ve tuzluluk gibi olumsuz faktörlere karşı tolerans kazandırılması; albenilerinin ve dayanıklılıklarının artırılması, tat, aroma ve kokularının değiştirilmesi, meyve oluşturma sürelerinin kısaltılması, besin değerlerinin iyileştirilmesi, sekonder metabolit (aşı, ilaç) üretiminin sağlanması ve verimliliklerinin artırılmasıdır. Geliştirilmelerinden bu yana; birçok alanda gündelik hayatımıza giren GDO’ların, en yaygın uygulama alanı bulduğu sektörler, tarım ve gıda sektörü olmuştur. Ancak, uzun süredir özellikle gıda olarak tükettiğimiz GDO’ların ve türevlerinin, insan sağlığı üzerinde; alerjik ve toksik etkiler oluşturma, antibiyotiklere direnç gelişimine neden olma, kanser oluşumunda rol oynama gibi olumsuzluklara yol açabileceğini savunan tartışmalar yapılmaktadır (Şen ve Altınkaynak, 2014).

Nüfus artışı nedeniyle meydana gelen beslenme yetersizliği sorununun giderilmesi amacıyla birim alandaki verimin artırılması, ekilebilir alanların artırılmasından daha fazla önem kazanmış ve çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. Yeşil devrim dönemi de denilen 1965-1985 yıllarında klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra gübre, hormon, tarım ilaçları ve yeni teknolojik makineler kullanılarak tarımsal ürünlerin kalite ile veriminde kayda değer

artış sağlanmıştır. Ancak zamanla tarım ilaçlarının toprakta birikmesi ile sağlığa zararlı olmaları, klasik ıslah yöntemlerinin uzun süreçte gerçekleşmesi, yüksek iş gücü maliyeti gibi dezavantajlardan dolayı yeşil devrim ihtiyaçları karşılayamaz hale gelmiştir. Artan ihtiyaçlardan dolayı yeni arayışlar sonucunda GDO’lar ortaya çıkmıştır (Arvas ve Kaya, 2019). Tarımda GDO kullanımını savunanların temel iddiası, insan nüfusunun artmasına bağlı olarak ihtiyaç duyulacak gıda maddesinin yetersiz kalacağından, gelecekte insanlığın GDO’lu tohumlara muhtaç olacağıdır (Kağıt ve Aslan, 2022).

Uluslararası Ziraat-Biyoteknoloji Uygulamaları Kuruluşu (ISAAA) verilerine göre biyoteknolojik ürünlerin ticarileştirilmesinin 24. yılı olan 2019’da, 29 ülkede 17 milyona yakın çiftçi tarafından 190,4 milyon hektar biyoteknolojik mahsul ekilmiştir. İlk biyoteknolojik mahsulün ticarileştirildiği 1996 yılında 1,7 milyon hektarlık ilk ekimden itibaren, 2019 yılı ekimi yaklaşık 112 katlık bir artışa işaret etmektedir. Bu nedenle, biyoteknolojik mahsuller, modern tarım tarihinde en hızlı benimsenen mahsul teknolojisi olarak kabul edilmektedir (ISAAA, 2023).

GDO’ların riski ilk olarak 1975’teki Asilomar Konferansı’nda tartışılmıştır. Araştırmacıların endişesi daha çok rekombinant DNA teknolojisi sonucu, toplum sağlığını tehdit edecek virüslerin yaratımı ve sızıntısı konusunda olmuştur. GDO’ları güvenlik ve beslenme açısından değerlendirmek üzere 1990, 1996 ve 2000 yıllarında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) görüşmeler düzenlemiştir. GD gıdalara yerleştirilen yeni proteinlerin allerjenitesinin değerlendirilmesi için 2000 yılında bir karar ağacı oluşturulmuştur. Buna göre allerjenite risk değerlendirme prosedürlerinin güvenilirliğinin artırılması gerektiği kararına varılmıştır (Öcal ve Işıklı, 2019).

Türkiye’de uygulamaya konan Biyogüvenlik Kanunu’nun ikinci bölümü madde 5’te Türkiye sınırları içerisinde GDO’lu bitki veya hayvan üretimi yasaklanmıştır. Ayrıca bir başka yasaklanan konu ise Türkiye’ye kurul kararı dahilinde ithal edilmiş olan GDO’lu ürünlerin amacı dışında kullanılmasıdır (Anonim, 2010). Böylece hayvan yemi olarak ithal edilen GDO’lu tarım ürünlerinin başka bir alanda kullanılması mevzuat ile yasaklanmıştır (Kağıt ve Aslan, 2022).

GDO oluşturulmasında en sık kullanılan promotor ve terminatör dizileri olarak; karnabahar mozaik virüsüne (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) ait

35S promotörü, figwort mozaik virüsüne ait FMV promotörü ve *Agrobacterium tumefaciens*'den alınan nopalın sentez NOS terminatörü kullanılır. GDO tarama işlemi sırasında bu spesifik gen bölgeleri hedef alınmaktadır. Bu şekilde ürün içerisinde GDO'nun varlığı tespit edilmiş olur. Bundan sonraki aşamada ise GDO'nun türü ve miktarının tespitine geçilir (Çetinkaya vd., 2019).

GDO'larda hedef dizilerin çeşitliliği nedeni ile tespit tekniklerinin çeşitleri de sürekli artmaktadır. Analitik çabayı en aza indirmek, ancak ileri analizlere geçmeden önce bir ön seçim yaparak gerçekleştirilebilir. Bunun için kullanılacak bir multipleks PCR Kit ile birden fazla bölge taranabilir. Karnabahar mozaik virüsünün (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) 35S geni, *Agrobacterium tumefaciens*'in sentez geni nopalinin sonlandırıcısı yani NOS geni, figwort mozaik virüsünün promotör geni FMV ve toprak bakterisi *Streptomyces hygroscopicus*'un bar geni GDO'larda en yaygın kullanılan dizilerdir (Dörries vd., 2010). Bu diziler gen aktarımını sağlayan dizilerdir. İstenilen gen dizisini eklemek için kullanılan bir nevi aracı gen dizileridir.

GDO bölgelerini tespit etmek amacıyla yapılmış tarama testleri ile ilgili literatürde yeralan bazı çalışmalar şu şekildedir; Dörries vd. (2010) GDO'larda yaygın kullanılan bölgelere yönelik (35S/NOS/FMV/bar/plant) yaptıkları bir çalışmada multipleks tarama testi geliştirip ticari kit olarak (foodproof GMO Screening Kiti, BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam, Germany) piyasaya sunmuşlardır. Hançerlioğulları ve Yılmaz (2023) da foodproof GMO Screening Kiti kullanarak yaptıkları çalışmada bu kalitatif tarama testlerinin güvenilir sonuçlar verdiğini, dolayısıyla kontrol laboratuvarlarında izleme için başarıyla kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Cottenet vd. (2019) daha geniş bir aralığı kapsamak için, iki tane real-time PCR reaktif tasarlamıştır. Bunların ilki altı GD bölgesini (p-35S, t-NOS, p-FMV, t-E9, Pat ve Cry1Ab/c), ikincisi bunları içermeyen GD tiplerinden olan 6 GD tipini (DAS-40278-9, VCO-1981-5, 305423, CV127, GHB614 ve 73496) kapsayan PCR reaktifleridir. Bu yöntemde fast PCR kullanılmış ve sonuç alma süresinde daha fazla azalma sağlanmıştır. Bahrdt vd. (2010) yılında yaptıkları çalışma ile GDO hedeflerinden en az birini içeren ve 100'den fazla onaylı GDO'nun taranmasını sağlayan bir heksapleks real-time PCR tarama testi geliştirmiş ve validasyon çalışmaları ile doğrulamışlardır. Guo vd. (2012), yaptıkları çalışma ile 90'dan fazla onaylı GDO tipinin içerdiği 8 bölgeyi (CP4-EPSPS, bar, pat, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A (b/c), mCry3A ve Cry3Bb1) bir arada tarayan

quadrepleks PCR testi geliştirmiş ve hassasiyetini (LOD) 80 kopya olarak tespit etmişlerdir. Waiblinger vd. (2008), gıda ürünlerinde GDO'ları tespit etmek için bir P35S ve t-NOS dupleks real-time PCR tarama yönteminin validasyonunu laboratuvarlar arası ortak çalışma ile gerçekleştirmişlerdir. Tespit limitini 10 DNA kopyası olarak bulmuşlardır. Sistemin doğruluk ve hassasiyetini ölçmek için 35S/NOS pozitif olan Bt11, sadece NOS pozitif olan GA21 ve sadece 35S pozitif olan MON810 CRM'leri kullanılmıştır. Doğrulama verilerinin çoğu Avrupa GDO Laboratuvarları Ağı (ENGL) minimum performans gereksinimlerini karşılamıştır. Grohmann vd. (2017), 6 GD soya fasulyesi tipinin (MON 87701, MON 87708, MON 87769, DP-305423, CV-127 ve DAS-68416) 6'lı olarak tarama testini geliştirmişler ve laboratuvarlar arası ortak çalışma ile validasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Debode vd. (2017), GDO tespiti için iki singlepleks (tE9 ve pea lektin) ve bir dupleks (pat/bar) gerçek zamanlı PCR yönteminin validasyonu için laboratuvarlar arası çalışmalar yapmışlardır. Bu yöntemin amaca uygun olduğunu ve GDO tarama tespiti için kullanılabilirliğini ifade etmişlerdir. Huber vd. (2013), pentapleks metot ile 5 GDO bölgesinin (P-35S, t-NOS, ctp2-cp4-epsps) laboratuvarlar arası çalışma ile validasyonunu gerçekleştirmişler ve hedeflenen diziler için 20 kopyanın altında tespit limitine ulaşmışlardır. Bu tarama testi ile dünya çapında uygulanan en yaygın GDO bölgelerinin tespit edilebileceğini, bu metodun rutin GDO analizinde uygulanması ile GDO taraması için maliyet ve zaman açısından tasarruf sağlanacağını söylemişlerdir. Eugster vd. (2014), tetrapleks (P-35S, t-NOS, T-35S and P-FMV) real-time PCR metodu geliştirmiş ve doğrulamışlardır. Ayrıca sistemin sağlamlığını laboratuvarlar arası testlerle de göstermişlerdir. Bu yöntemin, GDO bölgelerini tespitinde hassas ve güvenilir bir tarama prosedürü sağladığı sonucuna varmışlardır.

Bu çalışma ile gıda, yem ve tohumlarda multipleks GDO tarama testi geliştirilmesi ve validasyon yapılması planlanmıştır. Literatürde yer alan çalışmalardan farklı olan yanı Türkiye'deki kamu ve özel laboratuvarlarında metot birlikteliği kapsamında çalışılması gereken bölgelerin hedeflenmiş olmasıdır. Bunlar; 35S, NOS, FMV, plant gen bölgeleri olup aynı zamanda ticari kitlerin de hedeflediği bölgelerdir. Bu kapsamda her bir gen bölgesi için gerekli primerler ve farklı boyalar ile boyanmış probalar temin edilmiştir. Dupleks ve single iki metot birleştirilerek tripleks şeklinde bir multipleks metot oluşturmak amaçlanmıştır. Farklı bölgelere ait primer-

probların aynı miks içerisinde birleştirilip karıştırılması ile multipleks tarama miksi elde edilmiştir. Daha sonra bu kitin metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Biyogüvenlik Kanunu çerçevesinde Türkiye’de GDO analizleri kamu ve özel gıda kontrol laboratuvarlarında yapılmaktadır. GDO tarama analizlerinde çoğunlukla ticari kit metodu kullanılmaktadır. Kit metodu, kullanım kolaylığı ve hassasiyeti nedeni ile tercih edilmektedir. Ancak oldukça pahalı olan GDO analizlerinde maliyetin önemli kısmını kit maliyeti oluşturmaktadır. Tanımlama (var/yok) analizleri için kit fiyatları değişken olmakla birlikte 6-46 €/test şeklindedir (Gruden vd., 2012). Bu durum analiz yaptırmak

durumunda olan sanayici, çiftçi ve üreticide memnuniyetsizlik yaratmaktadır. Kit metodu yerine, laboratuvar ortamında kit benzeri metot oluşturulması maliyet açısından avantaj sağlayacaktır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Materyal

2.1.1. Master miks ve oligonükleotit primerler

Çalışmada PCR master miksi olarak TaqMan™ Universal PCR Master Miks (Cat no: 4304437) kullanılmıştır. Tarama test materyali için kullanılan primer-prob gen dizilimleri ise Çizelge 1’de listelenmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan primer-problar ve gen dizilimleri

| Adı | Oligonükleotidler | DNA dizilimi (5' to 3') | Referans |
|----------------|-------------------|--|--|
| 35S promotor | Forward primer | GCC TCT GCC GAC AGT GGT | European Commission (2011); Waiblinger vd. |
| | Reverse primer | AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C | |
| | Probe | FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G- BHQ1 | |
| NOS terminatör | Forward primer | CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G | European Commission (2011); Waiblinger vd. |
| | Reverse primer | TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T | |
| | Probe | YY-ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A-BHQ1 | |
| FMV promotor | Forward primer | CAA AAT AAC GTG GAA AAG AGC T | European Commission (2017). |
| | Reverse primer | TCT TTT GTG GTC GTC ACT GC | |
| | Probe | CY5-CTG ACA GCC CAC TCA CTA ATG C-BHQ2 | |
| Plant | Forward primer | ATT GAG CCT TGG TAT GGA AAC CT | Taberlet vd. (1991) |
| | Reverse primer | GGA TTT GGC TCA GGA TTG CC | |
| | Probe | FAM-TTA ATT CCA GGG TTT CTC TGA ATT TGA AAG TT - TAMRA | |

2.1.2. Sertifikalı referans malzemeler (CRM) ve numuneler

Asimetrik LOD çalışmaları için 35S içeren A5547 (AOCS 0707-C8), NOS içeren FG72 (AOCS 0610-A5), FMV içeren 87705 (AOCS 0210-A2) soya CRM’leri; LOD, yanlış negatiflik ve sağlamlık çalışmalarında 35S-NOS-FMV’yi içeren MON89034 (AOCS 906-E2) mısır CRM’i kullanılmıştır. Yanlış pozitiflik (YP) ve yanlış negatiflik (YN) çalışmalarında işlenmiş gıda olarak bisküvi, işlenmemiş gıda olarak mısır özü, yem olarak damıtık mısır + çözünür madde (DDGS) ve tohum olarak da mısır tohumu çalışılmıştır. Çalışma negatif kontrolü olarak sterilize su kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

Çalışma öncesinde CRM’ler ve numunelerin DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanacak GDO tarama testinin validasyonu için yapılacak çalışmalar Çizelge 2’deki gibi planlanmıştır. Çalışma parametreleri ve sayıları rehber

dokümanlara göre belirlenmiştir (Broeders vd., 2014; ENGL, 2015; ENGL, 2017; Anonim, 2018; ENGL 2021).

Çizelge 2. Validasyon çalışmasında yapılan analizler ve tekerrür sayıları

| Materyal | LOD | Asimetrik | Sağlamlık | YP | YN |
|-----------------|-----|-----------|-----------|----|----|
| CRM | 40 | 30 | 30 | | |
| İşlenmiş Gıda | | | | 10 | 10 |
| İşlenmemiş Gıda | | | | 10 | 10 |
| Yem | | | | 10 | 10 |
| Tohum | | | | 10 | 10 |
| Toplam | 40 | 30 | 30 | 40 | 40 |
| Genel Toplam | | | 180 | | |

Çizelge 3 ve 4’te PCR master miks karışım oranları verilmiştir. GDO tarama analizinde 35S, NOS, FMV birleştirilerek üçlü metot şeklinde, plant geni (bitki DNA’sı) analizi ise tek başına çalışılmıştır.

Çizelge 3. Plant tarama analizi PCR master miks çözeltisindeki bileşenlerin oranları

| Bileşen türü | Bileşen adı | Konsantrasyon | Hacim (µL) |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|------------|
| Reaktif çözeltisi | TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) | 1x | 12,5 |
| | Forward primer (10 µM) | 300 nM | 0,75 |
| Plant primer-prob | Reverse primer (10 µM) | 300 nM | 0,75 |
| | Prob (10 µM) | 200 nM | 0,5 |
| Su | Nuclease free water | | 5,5 |
| Numune | DNA | | 5 |

Plant geni çalışması ile hem bitkisel DNA elde edilip edilmediği yani izolasyon kontrolü hem de inhibisyon

kontrolü sağlanmıştır. Numune miktarı maksimum 40 ng/µL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 4. GDO tarama analizi PCR master miks çözeltisindeki bileşenlerin oranları.

| Bileşen türü | Bileşen adı | Konsantrasyon | Hacim (µL) |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|------------|
| Reaktif çözeltisi | TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) | 1x | 12,5 |
| | Forward primer (10 µM) | 100 nM | 0,25 |
| 35S primer-prob | Reverse primer (10 µM) | 100 nM | 0,25 |
| | Prob (10 µM) | 100 nM | 0,25 |
| | Forward primer (100 µM) | 1000 nM | 0,25 |
| NOS primer-prob | Reverse primer (100 µM) | 1000 nM | 0,25 |
| | Prob (10 µM) | 200 nM | 0,5 |
| | Forward primer (10 µM) | 340 nM | 0,85 |
| FMV primer-prob | Reverse primer (10 µM) | 340 nM | 0,85 |
| | Prob (10 µM) | 120 nM | 0,3 |
| | Forward primer (10 µM) | 340 nM | 0,85 |
| Su | Nuclease free water | | 3,75 |
| Numune | DNA | | 5 |

2.2.1. DNA izolasyonu ve spektrofotometre ölçümleri

CRM ve numunelerin DNA izolasyonunda ticari kit GENESpin DNA Ekstraksiyon Kiti (Eurofins GENESpin, 2016) protokolü uygulanmıştır. DNA izolatlarının spektrofotometrik ölçümleri Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Real-time PCR ve amplifikasyon koşulları

Tüm validasyon çalışmaları Qiagen Rotor Gene Q cihazında yapılmıştır. Sağlık çalışması için farklı marka PCR cihazı olarak Applied Biosystems 7500 Fast kullanılmıştır. PCR şartları; UNG 50°C'de 120 sn, başlangıç denatürasyonu 95°C'de 600 sn, 45 döngü amplifikasyon (denatürasyon 95°C'de 15 sn, annealing ve uzama aşaması 60°C'de 60 sn) şeklinde ayarlanmıştır. Okumanın yapıldığı son aşama için FAM, YY ve CY5 boyları seçilmiştir.

2.2.3. Tespit limiti (LOD)

Tespit limiti, bir test numunesinde güvenilir bir şekilde tespit edilebilen minimum analit miktarı

olarak tanımlanır. 35S, NOS ve FMV bölgelerini içeren %100 MON 89034 mısır CRM'inden 20, 10, 5 ve 1 kopya zorunlu olmak üzere en az 3 farklı seviyede (beklenen LOD üstü ve altı olacak şekilde) seyreltmeler yapılmış ve her biri 10 tekrar şeklinde GDO tarama analizine tabi tutulmuştur. Bu parametrede yanlış negatif oranının %5'den az olması gereklidir. Bu durum 10 PCR tekrarının pozitif olması ile sağlanabilmektedir. Bu nedenle her üç bölgenin de 10 tekrar ölçüm sonucunun pozitif olduğu en düşük seviye LOD değeri olarak kabul edilmiştir.

2.2.4. Asimetrik LOD (LODasym)

Asimetrik LOD (LODasym) multipleks kalitatif PCR testleri için validasyon parametrelerinden biridir. LODasym için hedeflenen bölgenin düşük miktardaki analitin, diğer bölgelerdeki yüksek konsantrasyondaki analit varlığı karşılığında tespit edilebilirliği ölçülmüştür. %95'lik güven seviyesinde yanlış negatif sonuçların %5'i geçmemesi gerekmektedir.

GDO tarama testi ile yapılan LODasym çalışması için sadece 35S bölgesini içeren %100'lük A5547, sadece NOS bölgesini içeren %100'lük FG72 ve

sadece FMV bölgesini içeren %100'lük MON87705 Soya CRM'leri kullanılmıştır. Metot, hedef bölgenin 10 kopya, diğer bölgelerin 10000 kopya analit varlığında (1:1000 oranında), 10'ar paralel şekilde teste tabi tutulmuştur.

2.2.5. Sağlık

Bu yöntemin sağlık testi, deney koşullarındaki kasıtlı sapmalar ile test edilmiştir. Sağlık çalışmaları 35S, NOS ve FMV'yi içeren MON 89034 ile LOD'nin 3 katı olarak 3'er tekerrür olarak çalışılmıştır. Prosedüre uygun faktörlere karşı değiştirilmiş faktörler çalışılarak test edilmiştir. Sağlık çalışmasında kullanılan faktörler şu şekildedir:

- Termal döngüleyicideki değişiklik için; iki farklı marka PCR cihazı kullanılmıştır (Applied Biosystems 7500 Fast ve Qiagen Rotor Gene Q 5'plex).
- Master miks konsantrasyonundaki değişiklik için konsantrasyon %10 azaltılıp %10 artırılmıştır.
- Reaksiyon hacmindeki değişiklik için; reaksiyon hacmi 1 µl azaltılıp 1 µl artırılmıştır.
- Primer ve prob konsantrasyonlarındaki değişiklik için konsantrasyon %30 azaltılmıştır.
- Tavlama (annealing) sıcaklığındaki değişiklik için sıcaklık 1°C azaltılıp 1°C artırılmıştır.

2.2.6. Yanlış pozitiflik

Yanlış pozitiflik oranı, bilinen negatif bir örneğin kullanılan metotla pozitif olarak tanımlanması olasılığı olup yüzdesel olarak ifade edilmektedir. Yem, tohum ve gıdalarda (işlenmiş ve işlenmemiş) her bir ürün için 2 ekstrakta 5 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Çalışmada %95 güven aralığında aşağıda belirtilen formüle göre yanlış pozitif oranı hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yanlış Pozitif Sonuç} = (\text{Pozitif tespit edilen negatif örnek sayısı} / \text{Bilinen tüm negatif örneklerin sayısı}) \times 100$$

2.2.7. Yanlış negatiflik

Yanlış negatiflik oranı, bilinen pozitif bir örneğin kullanılan metotla negatif olarak tanımlanması olasılığı olup yüzdesel olarak ifade edilmektedir. Yem, tohum ve gıdalarda (işlenmiş ve işlenmemiş) her bir ürün için 2 ekstrakta 5 tekrarlı çalışma yapılmıştır. Verifikasyonu yapılan gen bölgelerini içerecek şekilde maksimum eşik değeri seviyesinde CRM ile spike yapılarak elde edilen pozitif numuneler teste tabi tutulmuştur. Çalışmada %95 güven aralığında aşağıda belirtilen formüle göre yanlış negatif oranı hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yanlış Negatif Sonuç} = (\text{Negatif tespit edilen pozitif örnek sayısı} / \text{Bilinen tüm pozitif örneklerin sayısı}) \times 100$$

Çizelge 5. Çalışmada kullanılan CRM ve numunelerin DNA miktar ve saflıkları

| Numune adı | İçeriği | Nükleik asit | Saflık |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------|
| | | konsantrasyonu (ng/µl) | (260 nm / 280 nm) |
| CRM MON89034 | FMV, NOS ve 35S içeren %100 Mısır | 65,5 | 1,84 |
| CRM MON87705 | FMV içeren %100 Soya | 110,9 | 1,84 |
| CRM FG72 | NOS içeren %100 Soya | 119,4 | 1,78 |
| CRM A5547 | 35S içeren %100 Soya | 111,8 | 1,81 |
| İşlenmiş gıda | Bisküvi A | 36,6 | 1,68 |
| İşlenmiş gıda | Bisküvi B | 34,2 | 1,9 |
| İşlenmemiş gıda | Mısır özü A | 104,6 | 1,8 |
| İşlenmemiş gıda | Mısır özü B | 121,5 | 1,52 |
| Tohum | Mısır tohumu A | 70,5 | 1,71 |
| Tohum | Mısır tohumu B | 89,5 | 1,63 |
| Yem | DDGS A | 23,7 | 1,38 |
| Yem | DDGS B | 36,4 | 1,34 |

3. Tartışma ve sonuç

3.1. DNA izolasyonu

DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen izolatların DNA miktarı (nükleik asit konsantrasyonu) ve saflıkları nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüştür. CRM'ler tek, numuneler ise iki paralel şekilde izole edilmiştir. Çizelge 5'te gösterilen CRM'lerin DNA miktarları daha sonraki aşamalarda kopya sayısı ayarlamalarında kullanılmıştır. Numuneler ise maksimum 40 ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır.

DNA ve RNA çözeltileri ışığı kısmen 280 nm'de ve protein çözeltileri 260 nm'de soğurduğundan 260 ve 280 nm (A260/A280) ölçüm aralığındaki bir oran, nükleik asitlerin saflık değerini verir. DNA ve RNA yaklaşık olarak 1,8 ve 2,0 değerlerinde A260/A280'e sahiptir. Saf DNA yaklaşık 1,8 saf RNA ise yaklaşık 2,0 değerini vermelidir. Eğer proteinden kaynaklanan bir kontaminasyon varsa A260/A280 yukarıda verilen değerlerden daha az olacaktır (Somma, 2006). Saflık 2,0'ın üstü bir değerde ise RNA'se ile muamele veya saflaştırma kolonu gibi uygulamalar ile bu değer düşürülebilir. Ancak düşük değerlerde yükseltilmez, olduğu gibi analize alınır. DNA izolasyonu sonucunda CRM ve numunelerin saflıkları ve miktarları bu çalışma için yeterli olarak elde edilmiştir.

3.2. Tespit limiti (LOD) çalışması

%100'lük MON89034 mısır CRM'i ile hazırlanan 20, 10, 5, 1 DNA kopyası ve 10'ar tekerrürlü yapılan LOD çalışması sonucu Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. LOD çalışması analiz sonuçları

| Kopya sayısı | Pozitif sonuç sayısı | | | |
|--------------|----------------------|-------|-------|-------|
| | 35S | NOS | FMV | Plant |
| 20 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 5 | 6/10 | 8/10 | 6/10 | 6/10 |
| 1 | 4/10 | 3/10 | 1/10 | 4/10 |

Mevcut çalışmada LOD değeri bütün bölgelerde tekrarların tümünün tespit edildiği en düşük değer olan 10 kopya olarak bulunmuştur. Dörries vd. (2010) geliştirdikleri foodproof GMO Screening Kiti (BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam, Germany) ile belirlenen bölgelere (35S/NOS/FMV/bar/plant) yönelik yaptıkları çalışmada da tespit limitini 10 hedef kopya/reaksiyon olarak belirlemişlerdir. İki gerçek zamanlı PCR reaktifinin tasarlandığı bir diğer çalışmada ise FAST PCR kullanılmış ve sonuç

alma süresinde daha fazla azalma olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada yöntem geniş bir tarama kapasitesi göstermiş ve LOD değerinin 20 kopyanın altında olduğu rapor edilmiştir (Cottenet vd., 2019). Taranan bölge sayısı arttıkça hassasiyetin azalması söz konusu olabilir. Nitekim Guo vd. (2012), yaptıkları çalışma ile quadrupleks PCR testi ile hassasiyeti (LOD) 80 kopya olarak tespit etmişlerdir. Bunun tersi olarak eş zamanlı daha az bölgenin taranması ise hassasiyeti arttırabilir. Örneğin iki singlepleks (tE9 ve pea lektin) ve bir dubleks (pat/bar) real-time PCR yönteminin laboratuvarlar arası çalışmalar ile validasyonu sonucunda LOD değeri 5 kopya olarak bulunmuştur (Debode vd., 2017).

3.3. Asimetrik LOD (LODasym) çalışması

CRM'lerin seviyesini 10/10000 DNA kopyası şeklinde ayarlayarak yapılan LODasym sonuçları Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7. Asimetrik LOD çalışması analiz sonuçları

| Kopya sayısı ayarlanmış CRM karışımı | Pozitif sonuç sayısı | | |
|--------------------------------------|----------------------|-------|-------|
| | 35S | NOS | FMV |
| 10 kopya 35S | | | |
| 10000 kopya NOS | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 10000 kopya FMV | | | |
| 10000 kopya 35S | | | |
| 10 kopya NOS | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 10000 kopya FMV | | | |
| 10000 kopya 35S | | | |
| 10000 kopya NOS | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 10 kopya FMV | | | |

LODasym çalışması ile multipleks GDO tarama testinde hedeflenen bölge için düşük miktardaki analitin, diğer bölgelerin yüksek konsantrasyondaki analit varlığı karşılığında tespit edilebilirliği ölçülmüştür.

Çalışma sonucunda diğer bölgelerin 10000 kopya varlığında hedef bölgenin 10 kopyası tespit edilmiştir. Tüm paralellerde pozitif sonuç vermesi nedeniyle (%95'lik güven seviyesinde, yanlış negatif sonuçların %5'i geçmemesi ile) elde edilen sonuçlar kabul kriterini karşılamaktadır. Bahrtd vd. (2010) yaptıkları çalışma ile GDO hedeflerinden en az birini içeren 100'den fazla onaylı GDO'yu kapsayan bir heksapleks, real-time PCR tarama testi geliştirmişler ve LODasym çalışması ile diğer tüm GDO hedeflerinin 1000 kopyasının varlığında her bir GDO sisteminin hassasiyetini ≤ 10 hedef

kopyası olarak tespit etmişlerdir. Huber vd. (2013), geliştirdikleri pentapleks metodun LODasym değerini diğer hedeflerin 20000 kopyasında P-35S, pat ve ctp2-cp4-epsps hedefleri için 20 kopya, T-NOS için 1040 kopya bulmuşlardır. T-NOS en düşük duyarlılığa sahip bölge olmuştur. Debody vd. (2017), pat/bar dupleks metodunun LODasym analizi için Bt11 ve Bt176 CRM'leri her iki hedef için 1:1000 asimetric hedef seviyesinde

karıştırılmıştır. Diğer hedefin 20000 kopyasında bir hedefin 20 kopyası analiz edilmiştir. Altı tekrarlı analiz ile beklenen elde edilmiş ve 20 kopya tespit edilmiştir.

3.4. Sağlık çalışması

Analiz prosedüründe küçük değişiklikler uygulanarak yapılan sağlık analizinin sonuçları Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8. Sağlık çalışması analiz sonuçları

| Faktörler | | Pozitif sonuç sayısı | | | |
|----------------------------|------------------|----------------------|-----|-----|-------|
| | | 35S | NOS | FMV | Plant |
| Kontrol | Normal şartlarda | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Farklı marka PCR cihazı | ABI | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Master miks konsantrasyonu | %10 azaltılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | %10 artırılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Reaksiyon hacmi | 1 µl azaltılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 1 µl artırılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Primer konsantrasyonu | %30 azaltılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Prob konsantrasyonu | %30 azaltılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Tavlama sıcaklığı | 1 °C azaltılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 1 °C artırılınca | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |

Tüm şartlarda 30 DNA kopyasının pozitif sonuç vermesi GDO tarama testinin sağlık kriterine uygun olduğunu göstermiştir. Grohman vd. (2017), sağlık çalışmasını 6 farklı real-time PCR cihazında çalışarak yapmışlardır. Analiz sonuçlarında olağandışı bir duruma rastlanmadığı bildirilmiştir. Debody vd. (2017) geliştirdikleri metodun sağlık çalışması için, master miks bileşenlerinde (%30 daha az primer, %30 daha az prob, master miksin 1 µl az veya çok kullanılması), cihaz kullanımında (2 farklı cihaz) ve tavlama sıcaklıklarında (standart koşullara kıyasla 1 °C'den az/fazla) değişiklikler yaparak kontrol etmişlerdir. Bu çalışma 20 kopya üzerinde test edilmiştir. Olumsuz bir durum ile karşılaşmadığı bildirilmiştir. Huber vd. (2013), mpPCR testlerinin sağlık çalışmasını tavlama sıcaklığında değişiklik ($\pm 1^\circ\text{C}$), toplam primer-prob karışımında %20 varyasyon ve farklı cihazda çalışma şeklinde uygulamışlardır. Uygun sonuçlar alındığı bildirilmiştir.

3.5. Yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik çalışması

Yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik çalışmalarında işlenmiş gıda olarak bisküvi, işlenmemiş gıda olarak mısır özü, yem olarak DDGS ve tohum olarak da mısır tohumu olmak üzere 4 ürün grubu

kullanılmıştır. Her bir ürün için 2 ekstrakta 5 tekrarlı toplam 40 çalışma yapılmıştır. Yanlış negatiflikte ise numuneler MON89034 CRM'i ile kirletilerek hazırlanmış ve aynı şekilde 2 ekstrakta 5 tekrarlı toplam 40 çalışma yapılmıştır.

Yanlış pozitiflik çalışmasında negatif olduğu bilinen örneklerden 10'ar reaksiyon sonucunda toplam çalışılan 40 negatif örneğin hiçbirinde yanlış pozitif sonuç alınmamıştır. Yanlış negatiflik çalışmasında ise, negatif matrikslerin MON89034 ile kirletilmesi ile oluşturulan 35S/NOS/FMV bölgelerini içeren kirli örneklerden 10'ar reaksiyon sonucunda, toplam çalışılan 40 pozitif örneğin hepsinden pozitif sonuç alınmıştır.

Buna göre bu çalışmanın sonucunda %YP ve %YN oranı %0 olarak bulunmuştur. %95 güven aralığı temel alınarak sonuçlar uygun bulunmuştur. Grohmann vd. (2017), 6'lı mpPCR yöntemlerinde 720 PCR analizinin verileri değerlendirmiş ve %0,3 yanlış pozitif oranı ve %3,9 yanlış negatif oranı gözlemişlerdir. Huber vd. (2013), geliştirdikleri test materyali ile 54 farklı CRM test etmişler daha sonra bu CRM'leri gıda, yem ve tohum numunelerine karıştırarak çalışmışlar, bu çalışmanın sonucunda YN ve YP oranlarını %0 olarak belirtmişlerdir.

4. Sonuç

Bu çalışma ile laboratuvar içi metot olarak elde edilen GDO ve bitki (plant) geni tarama testlerinin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Metodunun laboratuvar şartları altında geçerliliğini, uygunluğunu, tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini ispatlamak amacıyla yapılan bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle bahsi geçen bu metodun uygun ve güvenilir olduğu ve bu yöntemin tüm gıdalar, tohumlar ve yemlerde GDO tarama analizleri için kullanılabilceği görülmüştür.

Tarama testinin LOD değeri 10 DNA kopyası olarak tespit edilmiştir. Bu değer aynı zamanda birçok ticari kitin de LOD değeri olup Türkiye'deki GDO laboratuvarlarında metot birlikteliği açısından da tavsiye edilen LOD değeridir. Çalışma ile laboratuvarlarda kullanılacak, ticari kit hassasiyetinde ve daha ekonomik bir GDO tarama testi elde edilmiştir. Laboratuvarlarda kullanılan ticari tarama kitleri genel olarak ithal edilmekte olup yüksek ücretler ile temin edilmektedir. Kit giderleri analiz maliyetindeki en önemli kalemi oluşturmaktadır. Ancak bu çalışmadaki gibi primer-problar bir kez sentezletilip temin edildiğinde seyreltilerek çok fazla reaksiyonda kullanılabilir. Bu çalışmanın asıl maliyet kalemini PCR master miksi oluşturmaktadır. Ancak bu da ticari kit maliyetine nazaran daha ekonomiktir. Bu çalışmada PCR master miksi olarak kullanıma hazır ticari bir ürün kullanılmıştır. Analiz maliyetini daha fazla düşürmek için PCR master miksi bileşenleri (Taq DNA Polimeraz, dNTP'ler, Mg²⁺, vs.) ayrı ayrı temin edilerek laboratuvar ortamında da PCR master miksi hazırlanabilir.

Metot ekonomik avantaj sağlamasına rağmen daha fazla işgücü ve hassasiyet gerektirmektedir. Primer problemlerin tek tek hazırlanıp, hesaplanması ve birleştirilmesi esnasındaki hata ve bulaşmalardan kaynaklanabilecek yanlış sonuçlara karşı azami dikkat göstermek gerekmektedir.

Bu çalışmada plant taraması analizi çoğalabilir bitki DNA'sı kontrolü olmasının yanı sıra inhibisyon kontrolü olarak da kullanılmıştır. Ancak bitkisel DNA'nın tespit edilmediği durumlarda DNA izolatu pozitif kontrol içeren bir master miks ile çalışılarak inhibisyon olup olmadığı tespit edilmelidir. Sonucun negatif bulunması numunede inhibisyon olduğu anlamına gelir. Bu durumda analizin devamı için inhibisyonun giderilmesi gerekecektir. Şayet bu metotta inhibisyon kontrolü dördüncü bir boya ile farklı bir kanalda, multipleks metodun içinde yapılacak olsa idi sarf ve işgücü açısından avantaj sağlayacaktı. Multipleks

kanalların artmasının yanlış pozitiflik ya da negatiflik ihtimalini arttırabileceği endişesi ile bu çalışmada dördüncü kanal kullanılmamıştır. Başka bir çalışmada metot geliştirilerek inhibisyon kontrolünü de içerecek şekilde tasarlanabilir. Böylece bitki geni kolay elde edilebilen ürünlerde plant taraması yapılmadan iki yerine tek PCR kuyucuğunda işlemin tamamlanması avantaj sağlayabilir.

5. Kaynaklar

Anonim (2010). 5977 Sayılı Biyogüvenlik Kanunu. T. C. Resmi Gazete, 27533, 26 Mart 2010.

Anonim (2018). GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi. T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Nisan 2018.

Arvas, Y. E., ve Kaya, Y. (2019). Genetiği değiştirilmiş bitkilerin biyolojik çeşitliliğe potansiyel etkileri. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29 (1), 168-177.

Atsan, T. ve Kaya, T. E. (2008). Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Tarım ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (2), 1-6.

Bahrtdt, C., Krech, A. B., Wurzb, A., and Wulff, D. (2010). Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (6), 2103-2112.

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M.,... and Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science and Technology*, 37 (2), 115-126.

Clive, J. (2009). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. ISAAA brief,41.

Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V., and Chuah, P. F. (2019). Two FAST multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food. *Food chemistry*, 274, 760-765.

Çetinkaya, N., Erdem, F. Çelik, C. (2019). Resmi metotlarla GDO'lu yem/ürün analiz yöntemleri. GDO'lu Yem Maddeleri ve Hayvan Beslemede Kullanımı. *Türkiye Klinikleri*; p.7-1

Debode, F., Huber, I., Macarthur, R., Rischitor, P. E., Mazzara, M., Herau, V.,... and Zel, J. (2017). Inter-laboratory studies for the validation of two singleplex (tE9 and pea lectin) and one duplex (pat/bar) real-time PCR methods for GMO detection. *Food Control*, 73, 452-461.

- Dörries, H. H., Remus, I., Grönewald, A., Grönewald, C., and Berghof-Jäger, K. (2010). Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (6), 2043-2054.
- ENGL (2015). European Network of GMO Laboratories, 'Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing'.
- ENGL (2017). European Network of GMO Laboratories, 'Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods'.
- ENGL (2021). European Network of GMO Laboratories, 'Guidance document on multiplex real-time PCR methods'.
- Eugster, A., Murmann, P., Kaenzig, A., and Breitenmoser, A. (2014). Development and validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV tetraplex real-time PCR screening method to detect regulatory genes of genetically modified organisms in food. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 68 (10), 701-704.
- Eurofins Genespin (2016). Kit for isolation of high-quality DNA from food and feed samples.
- European Commission (2011). JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis (SC/ELE/013).
- European Commission (2017). Qualitative PCR method for detection of Figwort Mosaic Virus 35S promoter (QL-ELE-00-015).
- Grohmann, L., Belter, A., Speck, B., Goerlich, O., Guertler, P., Angers-Loustau, A., and Patak, A. (2017). Screening for six genetically modified soybean lines by an event-specific multiplex PCR method: Collaborative trial validation of a novel approach for GMO detection. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12 (1), 23-36.
- Guo, J., Chen, L., Liu, X., Gao, Y., Zhang, D., and Yang, L. (2012). A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs. *Food chemistry*, 132 (3), 1566-1573.
- Gruden, K., Allnutt, T. R., Ayadi, M., Baeumler, S., Bahrtdt, C., Berben, G., ... and Žel, J. (2012). Reliability and cost of GMO detection. Genetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability, 307-332.
- Güngör, E., ve Demiryürek, K. (2021). Türkiye'de Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar. *Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi*, 7 (2), 140-154.
- Hançerlioğulları, B. Z., ve Yılmaz, R. (2023). Screening of P-35S, P-FMV, and T-NOS genetic elements in microwave-treated genetically modified cereal flours. *Molecular Biology Reports*, 1-10.
- Huber, I., Block, A., Sebah, D., Debode, F., Morisset, D., Grohmann, L.,... and Busch, U. (2013). Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 61 (43), 10293-10301.
- ISAA (2023), Pocket K No. 16: Biotech Crop Highlights in 2019, <https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/>, (erişim tarihi 08.03.2023)
- Kağıt, Y., ve Aslan, N. (2022). Tarımda Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sorunsalları ve Türkiye'nin Durumu. *Lectio Socialis*, 6 (1), 23-38.
- Öcal, E. E., ve Işıklı, B. (2019). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Yararlı Mı, Zararlı Mı?-Genetically Modified Organisms: Useful Or Harmful? *Estüdam Halk Sağlığı Dergisi*, 4(1), 71-79.
- Şen, S. ve Altınkaynak, S. (2014). Genetiği değiştirilmiş gıdalar ve potansiyel sağlık riskleri. *Sakarya University Journal of Science*, 18 (1) , 31-38.
- Somma, M. (2006) The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, Training Course On, Session 4.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*, 17 (5), 1105-1109.
- Waiblinger, H. U., Ernst, B., Anderson, A., and Pietsch, K. (2008). Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. *European Food Research and Technology*, 226 (5), 1221-1228.
- Şen, S. ve Altınkaynak, S. (2014). Genetiği değiştirilmiş gıdalar ve potansiyel sağlık riskleri. *Sakarya University Journal of Science*, 18 (1) , 31-38.