

**YEM AMAÇLI KULLANILMAK İSTENEN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ
MIR604 MISIR ÇEŞİDİ VE ÜRÜNLERİ (MIR604 den oluşan, içeren veya üretilen ürünler)
İÇİN BİLİMSEL RİSK DEĞERLENDİRME RAPORU**

RAPORUN HAZIRLANIŞ GEREKÇESİ VE DAYANAKLARI

Bu rapor, genetik olarak değiştirilmiş MIR604 kodlu mısır çeşidi ve ürünlerinin (MIR604'den oluşan, içeren veya üretilen ürünler) yem amaçlı kullanımı için, 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanunu ve ilgili yönetmelik uyarınca Biyogüvenlik Kurulunun 03.03.2011 tarih ve 6 nolu toplantı kararı ile oluşturulan ve bu doğrultuda görevlendirilen Bilimsel Risk Değerlendirme Komitesi tarafından hazırlanmıştır. Raporun hazırlanmasında, Biyogüvenlik Kanunu ve kanunun uygulanması ile ilgili yönetmelikler, Rio Bildirgesi, Cartagena Biyogüvenlik Protokolü ve ilgili AB direktifleri gibi ulusal ve uluslararası düzenlemeler dikkate alınmıştır.

Rapor hazırlanırken MIR604 mısır çeşidi ile ilgili ithalatçı firma tarafından dosyada sunulan belgeler, risk değerlendirmesi yapan ilgili kuruluşların (EFSA, WHO, FAO, FDA, OECD) görüşleri ve bilimsel araştırmaların sonuçları ile farklı ülkelerde üretim ve tüketim durumları göz önünde bulundurulmuştur

İTHALATÇI KURULUŞLAR:

- Türkiye Yem Sanayicileri Birliği Derneği İktisadi İşletmesi
- Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçılar Birliği İktisadi İşletmesi (BESD-BİR)
- Yumurta Üreticileri Merkez Birliği İktisadi İşletmesi (YUM-BİR)

ÇEŞİDİ GELİŞTİREN ve ÜRETEN KURULUŞ:

Syngenta Seeds S.A.S, Syngenta Crop Protection AG, Basel

ÇEŞİDİN GELİŞTİRİLME AMACI VE ÜRETİMİ:

MIR604 mısır çeşidi, Syngenta firması tarafından Coleoptera takımından zararlı böceklere karşı dirençli olarak geliştirilmiş, genetiği değiştirilmiş bir mısır çeşitidir.

MIR604 mısır, mısır üretim sürecinde zarara neden olan, *mısır kök kurdu* [*Diabrotica vigifera*, *D. berberi*, *D. berberi* (Coleoptera : Chrysomelidae)]' na karşı bitkide koruma sağlamaktadır.

RİSK ANALİZİ VE DEĞERLENDİRMESİ:

MIR604 transgenik mısır çeşidi ve ürünlerine ait bilimsel risk analiz ve değerlendirmesi, bu çeşidin geliştirilmesinde kullanılan gen aktarım yöntemi, aktarılan genin moleküler karakterizasyonu ve ürettiği protein, besin değeri, olası alerjik, toksik ve çevreye kaçıışı ile oluşabilecek riskler dikkate alınarak yapılmıştır.

MIR604 mısır çeşidi ile ilgili bilimsel risk değerlendirmesi yapılırken, çeşitle ilgili ithalatçı firma tarafından dosyada sunulan belgeler, risk değerlendirmesi yapan kuruluşların (EFSA, WHO, FAO) raporları ve bilimsel araştırmaların sonuçları (alerjik ve toksik etki analizleri, genetik modifikasyonun kararlılığı, morfolojik ve agronomik özellikler, hedef dışı organizmalara etkisi vb.) göz önünde bulundurulmuştur. MIR604 transgenik çeşidi ile yapılan hayvan besleme çalışmaları da incelenmiş, yem olarak kullanım sonucu ortaya çıkabilecek olası riskler

değerlendirilmiştir. Ayrıca bu çeşide ait tohumların kaza ile doğaya yayılarak yetişmesi halinde ortaya çıkabilecek tarımsal ve çevresel riskler de dikkate alınmıştır.

1. Moleküler Genetik Yapı Karakterizasyonu

1.1. Aktarılan genleri taşıyan vektörlerin yapısı ve gen aktarım yöntemi

MIR604 mısır çeşidi, ticari ismi Syngenta Agrisure™ RW olan, ürettiği toksik proteinler ile Coleoptera takımından , mısır kök kurtlarına karşı koruma sağlayan transgenik bir mısır çeşididir. Transgenik MIR604 çeşidi, kendilenmiş iki mısır hattının (NP2500 ve NP2499) melezlenmesinden elde edilen tek melez mısır çeşidinin embriyolarına, pZM26 plazmidini içeren *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 aracılığıyla, toksik proteinlerin sentezinden sorumlu genlerin aktarılmasıyla geliştirilmiştir (EFSA 2009).

1.2. Aktarılan genlerin moleküler yapı, ekspresyonu ve kararlılık analizleri

1.2.1. Aktarılan genlerin moleküler yapıları

pZM26 plazmidi, mısır bitkisine gen aktarımı için yapılandırılırken T-DNA'sının sağ ve sol sınır bölgeleri arasına iki anlatım birimi yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu plazmid ile yapılan gen aktarımı sonucunda elde edilen, MIR604 transgenik mısır çeşidinde iki transgen ifade edilmektedir (Tablo 1)

Tablo 1. MIR604 çeşidine aktarılan genetik birimler

Gen	Kaynak	Tip	Promotör	Terminatör	Kopya sayısı
<i>mcry3A</i>	Cry3A delta-endotoksin (<i>Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis</i>)	IR	<i>Zea mays</i> metallothionein-benzeri gen	<i>A. tumefaciens</i> nopalin sentaz (nos) 3'-UTR bölgesi	1
<i>pmi</i>	mannoz-6-fosfat izomeraz (<i>Escherichia coli</i>)	SM	ZmUbilnt (<i>Zea mays</i> poly-ubiquitin geni promotörü ve 1. intron)	<i>A. tumefaciens</i> nopalin sentaz (nos) 3'-UTR bölgesi	1

- 1- Modifikasyonla elde edilen *Cry3A* (*mCry3A*) geni; MIR604 çeşidi tarafından üretilen yabancı proteinlerden biridir. Bu gen, *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis*'de bulunan *cry* geninin benzeri olup hedef böceklerde toksik etkinin artırılması için elde edilmiştir ve *mCry3A* olarak tanımlanmaktadır. *mCry3A*, mısır metallothionein-benzeri (*MTL*) genden alınan promotörün kontrolü altındadır ve kodon dizilimi, mısırdaki ifade edilecek şekilde düzenlenmiştir. Ayrıca, ilgili genin ifadesinin durdurulması için *Agrobacterium tumefaciens*'den alınan nopalin sentaz (NOS) geni kullanılmıştır.
- 2- *pmi* (*manA*) geni; *Escherichia coli*'de fosfo-mannoz izomerazı (PMI) kodlayan ve seçici markör özelliği ile transgenik hücrelerin seçimine yardımcı olan bir gendir. PMI, transforme olan mısır hücrelerinin karbon kaynağı olarak mannozu kullanmalarını sağlar, çünkü *pmi* geni içermeyen mısır hücreleri tek karbon kaynağı olan mannoz varlığında

büyüyemezler. *pmi* geni, mısır (*Zea mays*) poli-übikutin geninin birinci intron bölgesinin ve promotör bölgesinin kontrolü altında bulunmaktadır (Freeze 2002).

1.2.2. Aktarılan genlerin ekspresyonu

T-DNA kopyasının, transgenik bitkilere entegrasyonunun doğrulanması DNA dizi analizi, nesillerde kalıtım çalışmaları ve Southern blot analizi ile gerçekleştirilmiştir. Vektör DNA'sının 5309 baz çiftlik dizisine özgü problemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen Southern blot analizinde, pZM26 plazmit dizisine ait DNA parçalarının MIR604 bitki çeşidinde bulunmadığı belirlenmiştir. Southern blot analizleri ve DNA dizi analizi çalışmaları MIR604 çeşidinde *mcry3A* ve *pmi* genlerinin tek kopya olarak bulunduğunu göstermiştir. Yabancı genlerin bitki genomu ile birleşim yerlerinin tanımlanması kapsamında yapılan biyoinformatik analizlerde, bilinen toksin ve alerjenleri kodlayan okuma çerçevelerine (ORF) rastlanmamıştır.

Bitkiye aktarılan T-DNA bölgesi ile yapılan analizler ilgili DNA bölgelerinde bazı değişimlerin varlığını ortaya çıkarmıştır; T-DNA'nın sağ sınır bölge ucunda 43 bp'lik ve sol sınırı ucunda ise 44 bp'lik bölgelerin kesilmiş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, DNA dizisinde 3 nükleotidlik bir değişimin olduğu da belirlenmiştir. *pmi* kodlama bölgesinde de iki değişim ortaya çıkmıştır; *pmi* proteininin 61. pozisyonundaki valin amino asidi alanin amino asidine, 210. pozisyonundaki glutamin amino asidi ise histidin amino asidine dönüşmüştür (CERA 2011; GMO Compass).

Değiştirilmiş *mcry3A* geni, 598 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. mCry3A proteini, polen hariç tüm MIR604 bitki dokularında belirlenmiştir. Bitkilerin farklı büyüme evrelerinde yaprak (3 - 23 µg/g taze ağırlık), kök (2 - 14 µg/g taze ağırlık) ve tüm bitkide (0.9 - 11 µg/g taze ağırlık) mCry3A protein seviyesi ölçülmüştür. Hasata yakın bir dönemde MIR604 hibrit tohumlarında yapılan analizlerde ise mCry3A miktarı ortalama 0.7 µg/g taze ağırlık olarak belirlenmiştir.

MIR604 hibrit tohumlarında hasata yakın bir dönemde ölçülen PMI protein miktarı taze ağırlıkta 0.14 µg/g'den daha az bulunmuş, polendeki PMI miktarı ise taze ağırlıkta ortalama 1.9 - 2.6 µg/g olarak belirlenmiştir. 15, 29 ve 75 günlük silajlarda PMI proteini belirlenmemiştir (EFSA 2009).

1.2.3. Aktarılan genlerin kararlılık analizleri

Bitkilere yapılan gen aktarımında, yabancı genin bitki genomuna girişi rastgele olmaktadır ve aktif halde bulunan genlerin değişmesi, sessizleşmesi veya sessiz halde bulunan genlerin aktif hale gelmesi gibi değişimler meydana gelebilmektedir. Beklenmeyen etkiler olarak tanımlanan bu değişimler, yeni metabolitlerin oluşmasına veya mevcut metabolitlerin değişmesine neden olabilmektedir (Ren ve ark., 2009; Kuiper ve ark., 2004). Ancak çeşit elde edilirken, gen aktarılan mısır bitkileri ticari varyeteye 4-6 generasyon boyunca geriye melezlenerek genetik kararlılık sağlanmıştır.

MIR604 mısır çeşidinde bulunan yabancı genlerin varlığı, NPH8431 kendilenmiş hattı ile MIR604 çeşidinin 4-6 nesli boyunca geriye melezlenerek Southern, PCR ve ELISA analizleri ile genetik stabilitesi araştırılmıştır. Analizlerde mCry3A'yi kodlayan genin birçok nesilde tek kopya olarak bulunması, kalıcı kalıtımın bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. PMI ve mCry3A'nın kalıtım oranının 3:1 olarak görülmesi, sabit tek Mendel lokusunun varlığını göstermektedir. Transgenik bitkilerdeki yabancı gen girişi DNA dizi analizi ve biyoinformatik çalışmalar ile kontrol edilmiştir. MIR604 çeşidinin 3 nesil boyunca (4, 5 ve 6)

yapılan hibritleme çalışmaları bu çeşitlerin benzer olduğunu, pZM26 plazmidinin T-DNA'sı ile aktarılan DNA bölgelerinin, mCry3A ve PMI proteinlerinin döllerdeki kararlılığı birçok nesilde moleküler analizler ile test edilmiştir. MIR604 mısır çeşidine aktarılan, böceklerle karşı bitkide koruma sağlayan özelliğın, kararlılığı birçok nesilde izlenmiştir.

2. Kimyasal Bileşim ve Tarımsal Özelliklerin Risk Analizi

2.1. Kimyasal bileşim analizi

Amerika Birleşik Devletlerinde 2002 ve 2003 yıllarında farklı bölgelerden alınan MIR604 mısır ve GD olmayan mısırın, tanesinde ve hasıl örneklerinde nem, ham protein, ham yağ, karbonhidratlar, nişasta, ham selüloz, NDF, ADF, ham kül, bazı vitaminler (provitamin A, vitamin E, B1, B2, B6, niasin, folik asit) mineral maddeler (Ca, Mg, P, K, Na, Cu, Fe, Zn, Cr, Mn, Se), amino asitler ve yağ asitleri analizleri yapılmıştır.

2003 yılında elde edilen hasıl mısırlarda daha önce yapılan analizlere ek olarak toplam karbonhidrat, bazı mineraller, bazı vitaminler (pantotenik asit, vitamin C), kriptoksantin, anti besinsel faktörler (tripsin inhibitörü), fitosteroller (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol), mısır tanesinde ise fitik asit, inositol, rafinoz, ferulik asit, p-kumarik asit, furfural ve tripsin inhibitörü analizleri de yapılmıştır.

Tarla çalışmalarına ek olarak 2006 yılında yapılan denemelerde, MIR604 mısır ve normal mısırdan elde edilen unlarda monosakkarit, disakkarit ve fosforil form analizleri yapılmıştır. Bu analizlerden sonra, MIR604 mısır ile genetiği değiştirilmemiş eşdeğeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ($p < 0.05$) gözlenmiştir. Ancak bu farklılıklar, doğal biyolojik değişim sınırları içinde kalmıştır. Sonuçlara bütün olarak bakıldığında, MIR604 mısırın diğer ticari mısır çeşitlerinin bileşimine eşdeğer olduğu kanısına varılmıştır. (OECD 2002; Kramer 2004; Reynolds ve ark., 2005; Australia-New Zealand Food Standart 2006; EFSA, 2009; Anonim 2011a)

2.2. Tarımsal özelliklerin analizi

Genetiği değiştirilmiş (GD) ve genetiği değiştirilmemiş mısır çeşitleri arasındaki farkları, tüm özellikler bakımından ortaya koyabilmek için son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır. GD mısır çeşitleri biyoteknolojik yöntemlerle elde edildiği için, bu yeni çeşitlerde sadece amaca, yani hastalığa/ böceklerle/ yabancı otlara dayanıklılık bakımından değişiklik meydana gelmektedir. Dolayısıyla yapılan araştırmaların sonucu; önemli tarımsal özellikler (tohum ve çiçek morfolojisi, bitki boyu, vejetasyon süresi vb.) bakımından böceklerle dayanıklılık geni aktarılmış olan MIR604 ile geleneksel hibrit mısır çeşitleri arasında bilinen tarımsal ve biyolojik karakterler ile yabancı ot rekabeti bakımından farklılığın olduğuna dair kesin bir bulgu rapor edilmemiştir (EFSA 2007).

3. Çevresel Risk Değerlendirmesi

Ülkemizde GD bitkilerin yetiştirilmesi kanunen yasak olduğundan çevresel risk değerlendirmeleri; MIR604 mısır çeşidinin kullanımı dikkate alınarak hayvan yemi şeklinde tüketimi sonrası sindirim sisteminden başlayıp dışkı ve gübre şeklinde indirekt şekilde maruz kalma, GD ürününü taşıma, depolama ve işleme esnasında kazayla çevreye yayılma riskleri ile sınırlı tutulmuştur.

Mısır, yazlık bir sıcak iklim bitkisi olup Türkiye koşullarında kışın tarımının yapılma şansı yoktur (Kırtok 1998; OECD 2003). Koçan üzerinden dökülen mısır tanelerinin toprağa karışarak kış koşullarını atlatıp, ilkbaharda çimlenip neslini devam ettirme şansı da bulunmamaktadır.

Doğada bulunan bitkiler arasında en yüksek enerji stoğuna sahip olan mısır bitkisi Dünya'da 159 milyon hektar alanda ekilmekte ve yaklaşık 817 milyon ton tane üretimi yapılmaktadır. Ülkemizde ise 592 bin hektar ekim alanında yaklaşık 4.2 milyon ton tane üretilmiştir (FAO 2009). Dünya ortalaması olarak, üretilen mısırın yaklaşık % 27'si insan beslenmesinde, % 73'ü hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır.

Mısır bitkisi Amerika orijinli bir bitki olup, Amerika kıtasının keşfinden sonra Kuzey Afrika üzerinden Türkiye'ye getirilmiştir. Dolayısıyla Türkiye mısır bitkisinin orijin merkezi değildir ve Türkiye'de endemik bir mısır türü de bulunmamaktadır. Bununla birlikte mısır bitkisinin asırlardan beri Türkiye'de yetiştiriliyor olması sebebiyle sayısız lokal populasyon ve ıslah edilen çok sayıda yerli çeşit mevcuttur. Her ne kadar ıslah edilen çeşitlerin ve lokal populasyonların ihtiva ettikleri ekstrem derecede özel karakterler, literatürlere yansımamış olmakla birlikte bu çeşit ve populasyonlar biyolojik çeşitlilik açısından önem taşımaktadır.

MIR604 mısır çeşidi yetiştirildiğinde, Coleoptera takımı zararlılarına karşı böcek dayanıklılık geni içermesi zararlı popülasyonunun yoğun olduğu ülkelerde mısır yetiştiriciliği için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ancak adı geçen zararlılar ülkemizde bulunmamaktadır. Söz konusu mısır çeşidi böcek dayanıklılık geni dışında hastalıklara dayanıklılık, diğer kültür bitkileri ile rekabet, soğuk koşullarda yaşamını sürdürme, dormansi fazına sahip olmama gibi klasik mısır çeşitlerine göre farklı bir özellik içermemektedir. Bu durumda da mısır üretim alanları dışında kendiliğinden yetişerek doğada yaşamını sürdürme şansı bulunmamaktadır.

Mevcut literatür incelendiğinde söz konusu çeşitin aşırı bir yayılma, doğada kalabilme ve kışı geçirebilme gibi farklı bir özellik taşımasına yönelik herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (EFSA 2008).

3.1. Gen transfer potansiyeli

Herhangi bir genin transfer olabilmesi; DNA'nın doğrudan horizontal olarak transferi veya ilgili geni taşıyan tohumlardan oluşan bitkilerin tozlaşması ile vertikal gen transferi ile mümkün olmaktadır.

3.2. Bitkiden bakteriye gen transferi

EFSA (2009) verilerine göre doğal koşullarda GD bitkilerden mikroorganizmalara horizontal gen transferi hemen hemen imkansız görünmektedir. MIR604 mısır çeşidinde ifade edilen *Cry3A* ve *manA* genleri bakteri orijinli olup, gen transferi mikroorganizmalar arasında homolog rekombinasyonlar varsa mümkün olabilmektedir. Bu genler doğada mikroorganizmalarda mevcuttur ve homolog rekombinasyonların varlığı durumunda bu fonksiyonel genler aktarılsa bile doğadaki mevcut mikrobiyal komünitenin gen havuzunda bir değişiklik yaratmayacaktır. Ayrıca MIR604 mısır çeşidindeki değişik *cry3A* ve *manA* geni prokaryotik mikroorganizmalarda sınırlı bir aktiviteye sahip ökaryotik promotör tarafından kontrol edilmektedir.

MIR604 mısır çeşidi tohumlarının çevreye kazara dağılması durumunda bitkisel materyalin veya doğaya dağılan polenlerin toprakta çürümesi sonucu mikroorganizmalar transgenik DNA ile karşılaşabilecektir. Ayrıca GD mısırdan yapılmış gıda ve yemler de transgenik DNA içermektedir. Bu şekilde insan ve hayvanların sindirim sistemindeki mikroorganizmalar

transgenik DNA ile karşılaşabilir. Mannoz toprak ve suda yaşayan mikroorganizmalar için yaygın olarak kullanılan bir karbon kaynağı değildir ancak birkaç mikroorganizma türü mannozdan yararlanabilmektedir. Fosfomannoz izomeraz kodlayan *manA* geninin varlığı doğadaki mikroorganizmalar için doğaya uyumu arttıracak bir özellik kazandırmamaktadır.

Değiştirilmiş *Cry3A* geninin yapısı ve orijini dikkate alındığında çevre ve sindirim sistemindeki seleksiyon baskısının eksikliği, bu genlerin diğer mikroorganizmalara farklı bir özellik katacak yada uyumunu arttıracak şekilde horizontal olarak gen transferini son derece sınırlandırmaktadır. Bu nedenle söz konusu genlerin insan ve hayvan sindirim sistemindeki mikroorganizmalara transferi mümkün görülmemektedir. Çok az bir olasılıkla bu transfer gerçekleşmiş olsa bile insan ve hayvan sağlığı açısından olumsuz bir etki söz konusu olmayacaktır. Çünkü doğal mikrobiyal komüniteye yeni bir özellik katmayacağı gibi mevcut mikroorganizmalara uyumu da son derece sınırlıdır.

3.3. Bitkiden bitkiye gen transfer potansiyeli

Mısır yabancı döllenmiş bir bitkidir. Çiçeklenme periyodu boyunca bir mısır bitkisi 5 milyondan fazla polen üretebilmektedir (Kurt 2010). Buna bağlı olarak bir bitkiden diğer bir bitkiye polen geçişi, dolayısıyla gen akışı doğal bir süreçtir.

Türkiye’de GD mısırdan gen kaçışı olasılığını sınırlandıran faktörler:

- 1) GD ürün tarımının Türkiye’de kanunlarla yasaklanmış olması,
- 2) Türkiye’nin mısır bitkisinin gen merkezi olmaması,
- 3) Türkiye’de mısır tarımının sınırlı alanlarda yapılması,
- 4) Mısır tohumlarının dormansi göstermemesi,
- 5) Uygun koşullar altında mevsime bağlı olmaksızın çimlenip gelişebilmeleri,
- 6) Tohumların yenmesi ve yüksek nem içeriğinden dolayı özel muhafaza koşulları dışında kolayca çürümesidir.

Mısır, uygun koşullarda tarımsal ekosistem içerisinde canlılığını sürdürebilen bir bitkidir. İthal talep edilen MIR604 mısır çeşidi sadece yem amaçlı olarak kullanılacaktır. Bununla birlikte kontrol edilemeyen faktörler (kaza, dikkatsizlik, kasıt vb.) ile çok az da olsa çevreye yayılma olasılığı vardır. GD mısır kültüre alındığında belirli böceklerle karşı dayanıklılık geni içermesi, bu böceklerle mücadele açısından mısır yetiştiriciliğinde önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ancak GD mısır, böceklerle dayanıklılık geni dışında hastalıklara dayanıklılık, diğer kültür bitkileri ile rekabette üstünlük, ekstrem koşullarda yaşamını sürdürme, dormansiye sahip olmama gibi özellikler bakımından geleneksel mısır çeşitlerine göre farklılık içermemektedir. Bu nedenle, mısır üretim alanları dışındaki farklı ekolojilerde kendiliğinden yetişerek, yaşamını sürdürme şansı bulunmamaktadır. Ayrıca tarla denemeleri, MIR604 mısır çeşidinin geleneksel mısır çeşidine göre aşırı bir yayılma, farklı bir gelişme ya da doğaya uyum sağlama özelliğinin bulunmadığını göstermiştir. Ayrıca mevcut literatür incelendiğinde söz konusu çeşidin doğada kalabilme, kışı geçirebilme gibi farklı bir özellik taşımasına yönelik herhangi bir bulguya da rastlanmamıştır.

3.4. Hedef organizmalar ile etkileşim potansiyeli

MIR604 mısır çeşidi *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* bakterisinden değiştirilmiş *cry3A* proteini ifade etmek üzere geliştirilmiştir. İnsektisit özelliği taşıyan bu protein kın kanatlılardan *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica berberi* gibi mısırdaki zararlı kök kurtlarına etkilidir.

MIR604 mısır çeşidi ülkemizde yetiştirilmediği sürece, taşınma, depolama ve işleme sırasında tohumların kazara dökülmesi veya GD mısırla beslenen hayvanların dışkı ve gübreleri yoluyla çevreye dağılması sonucu ülkemizdeki hedef organizmalar bu genlerle karşılaşabilir. Cry3A proteini mısır tanelerinde çok düşük oranda ifade edilmektedir. Ayrıca cry proteinleri sindirim sisteminde enzimatik aktivite sonucu süratle parçalanmakta ve çok az bir miktar dışkıya geçmektedir (Einspanier ve ark., 2004; Lutz ve ark., 2006; Wiedemann ve ark., 2006; Guertler ve ark., 2008).

Sonuç olarak MIR604 mısır çeşidindeki Cry3A proteini ülkemizde hedef organizmalarla karşılaşma riski çok düşük görülmüştür.

3.5. Hedef olmayan organizmalar ile etkileşim potansiyeli

MIR604 mısır çeşidindeki Cry3A proteinleriyle çevreye kazara dağılan tohumlardan oluşan bitkilerden veya hayvan dışkı ve gübreleri ile hedef olmayan organizmalarla karşılaşması olasıdır. Ancak Cry3A proteininin mısır tanelerinde çok düşük oranda ifade edilmesi, sindirim sisteminde enzimatik aktivite sonucu parçalanması nedeni ile hedef olmayan organizmaların ilgili proteinlerle karşılaşması çok düşük ihtimaldir. Ayrıca çok düşük oranda doğaya dağılan Cry proteinleri mikrobiyal aktivite sonucu da parçalanmaktadır. Cry proteinleri toprakta kil minerallerine ve hüyük asite bağlanmaktadır. Bu nedenle düşük oranda da olsa toprağa karışan cry proteinleri toprakta mikrobiyal parçalanmaya maruz kalmayabilir. Ancak yapılan çalışmalar toprakta GD ürünlerinden toprağa karışan Cry proteinlerinin toprakta birikmediği ve parçalandığını göstermiştir (Icoz ve Stotzky, 2007; 2008).

Sonuç olarak, MIR604 mısır çeşidi, hayatta kalabilme, çoğalma ve yayılma açısından bir değişiklik içermediği, söz konusu mısırdan gen kaçışının son derece düşük bir ihtimal dahilinde olduğu bu nedenlerden dolayı da beklenmedik bir çevresel etki yaratmayacağı kanısına varılmıştır.

4. Yem Güvenliğinin Değerlendirilmesi

4.1. İşlemenin etkisi

MIR604 mısır hasılından yapılan silajda mCry3A protein düzeyi silolamadan önce (0. gün) ve siloladıktan 15, 29 ve 75 gün sonra alınan örneklerde ELISA ile analiz edilmiştir. mCry3A proteini, silaj yapılmadan önceki düzeyden daha düşük oranda olmasına rağmen, 75 gün saklamadan sonra bile rastlanmıştır. Aynı çalışmada silaj örneklerinde PMI (fosfo-mannoz isomeraz) miktarı ELISA yöntemi ile ölçülmüş ancak yöntemin hassasiyetinin yeterli olmaması nedeniyle güvenilir sonuç alınamamıştır. Kuru ve yaş öğütülmüş mısırdaki PMI varlığı ve enzim etkinliği ELISA ile analiz edilmiştir.

Başlangıç materyali olarak kullanılan tanelerde ve kuru öğütülmüş mısırın embriyosunda ve unlarında yabancı protein bulunmasına rağmen, yaş olarak öğütülmüş mısırın gluten, nişasta ve kuru embriyolarında PMI proteinine rastlanmamıştır. Ayrıca yaş embriyoların yağ ekstraksiyonu sırasındaki işleme koşullarına benzer biçimde 30 dk 100 °C ısıtıldıktan sonra embriyo kısımlarında yapılan ELISA testinde PMI belirlenmemiştir. MIR604 çeşidi, yeni ifade edilen proteinler dışında kontrol mısır ile eşdeğer bileşime sahip olduğu belirlenmiştir (EFSA 2009; Anonim 2011b).

4.2. Toksikolojik değerlendirmeler

4.2.1. MIR604 mısır çeşidinde sentezlenen yeni proteinlerin toksikolojik yönden değerlendirilmesi

MIR604 mısırdaki sentezlenen mCry3A ve PMI protein miktarının düşük olması bu mısırdan saflaştırılacak olan proteinlerin yeterli miktarda izole edilmesinin zorluğu göz önüne alınarak, güvenlik değerlendirmesi çalışmaları EFSA tarafından rekombinant *E.coli* suşundan üretilen proteinler kullanılarak yapılmıştır.

*E.coli*den üretilen mCry3A proteininin 2 farklı formu bulunmaktadır; birincisi mCry3A proteini, diğeri ise N-ucunda bakteride kullanılan klonlayıcı vektörden gelen 16 amino asitlik bir eklentidir. Bitkide ifade edilen bakteriyel proteinler, böceklerdeki biyolojik etkinlik testlerinde benzer etkinlik göstermiştir. Ayrıca bakteriyel ve bitki kökenli mCry3A proteininin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi (SDS PAGE), immunoblot ve kütle spektrofotometresi ile karşılaştırılması yapılmış ve benzerlikleri doğrulanmıştır. Ayrıca ilgili protein yapılarının glikozillenmediği görülmüştür. mCry3A proteini üzerinde sıcaklık etkisi 30 dk boyunca 4, 25, 37, 65 ve 95 derecede enzim inkübasyonundan sonra böcek larvaları üzerine insektisidal etkinliğini belirleyerek biyolojik olarak da araştırılmıştır. pH 7.5'ta 30 dk 95 derecede inkübasyondan sonra etkinlik belirlenmemiştir. Tohum üreticisi firma, *E.coli*den üretilmiş PMI proteini (2 amino asit eklentisi içeren PMI-0105) ve bitkiden üretilmiş proteini akut toksisite, *in vitro* sindirilebilirlik ve ısıya dayanıklılık testlerinde kullanmıştır. PMI-0105 proteini Western blot, kütle spektrofotometresi ile moleküler ağırlık belirlenmesi, N-ucundaki amino asit dizilimi ve enzimatik analiz ile doğrulanmıştır. EFSA'nın isteği üzerine, MIR604 mısırdaki bulunan ve yeni ifade edilen PMI ile PMI-0105'in eşdeğer olduğuna dair özgün veriler başvuru sahibi tarafından sağlanmıştır. PMI-0105'in ve MIR604'teki PMI'nin benzer enzimatik etkinliğe sahip oldukları, immunoblot ile belirlendiği gibi her ikisinin de benzer elektroforetik hareketlilik temelinde aynı molekül büyüklüğüne sahip olduğu belirtilmiştir. PMI-0105'in immunoblot analiz sonuçları, PMI-0105'in dimerik şekline hemen hemen uygun belirsiz bir band varlığını da göstermiştir. Mikrobiyal kaynaklı PMI-0105'in enzimatik etkinliği pH 7.0'de 65°C'de 30 dk inkübasyondan sonra neredeyse tamamen kaybolurken (%97 oranında düşme), ELISA ile ölçülen PMI-0105'in immünoreaktivliği bu şartlar altında tamamen kaybolmaktadır. Ayrıca PMI-0198 adlı diğer PMI proteini *E.coli* üretilmiş ve bu protein bitkisel PMI proteinle karşılaştırıldığında *E.coli*'de onu ifade etmek için kullanılan teknik nedeniyle N-ucunda T7-tag eklentisi varlığı belirlenmiştir. PMI-0198 proteini, bitkide ifade edilen PMI proteininde bulunan 2 amino asit eklentisinden yoksundur, 61 nolu pozisyonda alanin, valin ve 210 nolu pozisyonda histidin ve glutamin taşımaktadır. N-ucundaki eklentiler hariç tutulursa, bakteriyel *manA* geni tarafından kodlanan doğal proteinle eşdeğer olduğu kabul edilebilir. PMI-0198, akut toksisite testlerinde, *in vitro* sindirilebilirlik ve ısıya dayanıklılık testlerinde kullanılmıştır. Bu proteinle yapılan testlerden elde edilen veriler EFSA tarafından tamamlayıcı nitelikte değerlendirilmiş ve güvenlik testlerinde bakteriyel mCry3A ve PMI proteinlerinin kullanılması kabul edilmiştir.

EFSA'nın Cry3Bb1, Cry1Ab ve Cry1Ac gibi Cry proteinlerinin güvenliği ile ilgili değerlendirmeleri konusunda daha önceden önemli deneyimi olduğu, fakat PMI enziminin EFSA tarafından daha önce değerlendirilmediği bildirilmiştir. PMI enzimi, mannoz-6-fosfatı, fruktoz-6-fosfata veya tam tersine katalizleyen bir enzimdir ve bu 2 bileşiğin yalnız PMI enziminin substratı olduğu bilinmektedir (Freeze 2002). Bu durum tohum üreticisi tarafından yapılan değişik sakkaritlerde MIR604 mısırdaki yeni ifade edilen PMI'nin analogu olarak bakteri tarafından üretilen PMI-0105 ile yapılan bir çalışma ile de doğrulanmıştır. PMI, pH 7.5'ta fruktoz-6-fosfat ve mannoz-6-fosfat arasındaki ara çevirimi katalizlerken, fruktoz-1,6-difosfat,

mannoz-1-fosfat, glikoz-6-fosfat, fruktoz veya mannoz substrata eklendiğinde reaksiyon oluşmamıştır. PMI enzimleri bakteri, maya, hayvan, insan ve bitki gibi prokaryot ve ökaryotları içeren çok sayıda organizmada oluşur ve glikoprotein sentezinde görev alır. MIR604 mısırdaki ifade edilen PMI'nın glikoprotein profilinde değişiklik gözlenmemiştir ve bu durum konakçı bitkinin protein glikolizlenmesine katılan PMI'nın etkisinin olmadığını göstermektedir (Reed ve ark., 2001). EFSA'nın isteği üzerine tohum üreticisi firma, MIR604 mısırdaki yeni ifade edilen PMI enziminin bakteriyel analogu olan PMI-0105'in pH etkinlik profilinin verilerini de sağlamıştır. PMI-0105 test edilen pH sınırlarında (pH 5-10) enzimatik etkinlik göstermiştir (optimum pH 7.5) (EFSA 2009). Ancak, bitkiye yabancı gen girişi rastlantısal olduğundan, bitki genomu ile etkileşimi ile ilgili incelemeler yapılmadan *E. coli*'de üretilen proteinler ile yapılan risk değerlendirilmesi uzun vadede ortaya çıkabilecek toksikolojik risklerin belirlenmesinde yeterli olmayabilir.

4.2.2. Akut toksisite testleri

mCry3A ve PMI-0105 proteinleri, farelerde yapılan akut oral toksisite çalışmalarında tek dozda sırasıyla 2377 mg/kg ve 2072 mg/kg dozunda verildiklerinde ters bir etki göstermemiştir.

4.2.3. Yapay sindirim sıvılarında bozulma

mCry3A ve PMI proteinlerinin *in vitro* sindirilebilirliği, yapay mide sıvısı olarak (SGF) da bilinen seyreltik hidroklorik asitte proteaz pepsin çözeltisinin kullanıldığı model sistemde çalışılmıştır. Mikrobiyal ve bitki kaynaklı mCry3A, pepsin/mCry3A oranı yaklaşık 2.7/1 (ağırlık/ağırlık) olan SGF'de (pH 1.2) inkübe edilmiştir. Her iki protein de SDS-PAGE ve immunoblot ile yapılan ölçümlerde 2 dk içinde parçalanmıştır. Ayrıca aynı işlem pepsin/PMI-0105 oranı 2.9/1 olan SGF'de (pH 1.2) çalışılmış ve PMI-105, immunoblot ve bunu takiben elektroforetik ayırımla bir dakika içinde pepsin varlığında tam olarak parçalanmıştır. Pankreatin/PMI oranı 38/1 (ağırlık/ağırlık) olan "yapay bağırsak sıvısında" (SIF; pH 7.5) PMI-0105'in inkubasyonu immunoblot ile yapılan analizlerde PMI'nın tam olarak parçalandığını göstermiştir. Ayrıca, SIF'te yapılan çalışmalarda PMI-0105, 10 kat seyreltmede 30 dk içinde tam olarak parçalanırken, 100 kat seyreltmede sağlam bir PMI bandının bozulmadan kaldığı immunoblot analizi ile belirlenmiştir.

4.2.4. Biyoinformatik çalışmalar

MIR604 mısır çeşidinde ifade edilen mCry3A ile PMI proteinlerinin aminoasit dizilimleri ile veri tabanında bulunan genel proteinlerin dizilimleri arasında EFSA tarafından yapılan karşılaştırmada bilinen toksik proteinler ile bir benzerlik görülmediği belirtilmiştir (EFSA 2009).

4.2.5. Proteinler dışında yeni bileşiklerin toksikolojik değerlendirmesi

EFSA (2009) tarafından yapılan çalışmalarda, MIR604 mısır çeşidinde, mCry3A ve PMI proteinlerden başka ifade edilmiş yeni bir protein bulunmadığı ve MIR604 mısırın bileşiminin transgenik olmayan benzeri ile adı geçen proteinler dışında farklı olmadığı rapor edildiğinden, toksikolojik testlere gerek duyulmamıştır. Ancak, ilgili veri tabanlarında yapılan

taramalarda bulunmayan ve transgenik bitkilerde ortaya çıkması olasılığı olan yabancı proteinlerin aranması ile ilgili çalışmaların, yeni nesil araştırma yöntemleri ile araştırılmasının gerekli olduğu bilinmektedir.

4.2.6. MIR604 mısır çeşidinin toksikolojik açıdan değerlendirmesi

Subkronik oral toksisite

EFSA (2009) raporunda açıklanan denemelerde, MIR604 mısır taneleri ile yapılan 90 günlük sıçan besleme çalışması Wistar ırkı sıçanlarla (Alpk:APfSD) yapılmıştır. Her iki cinsten her grupta 12 hayvanın bulunduğu 4 sıçan grubu oluşturulmuş, 2 gruba %10 veya %41.5 (ağırlık/ağırlık) MIR604 mısır taneleri içeren yemler verilirken, diğer 2 gruba aynı içerikte transgenik olmayan mısır içeren kontrol yemleri verilmiştir. Deney süresince hayvanlar klinik belirtiler yönünden günlük olarak kontrol edilmiş, yem tüketimi, canlı ağırlıkları haftalık olarak kaydedilmiş ve uygulama periyodunun sonunda fonksiyonel kapasite ve motor etkinlik testleri yapılmıştır. Çalışma kapsamında klinik patolojik ölçümler, hematolojik, biyokimyasal, organ ağırlıkları, makroskobik ve mikroskobik muayeneler gerçekleştirilmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında çok fazla istatistiksel farklılık görülmemiştir. Bunların bazıları %10 oranında MIR604 mısır içeren yemleri yiyen grupta görülürken, %41.5 MIR604 mısır içeren grupta görülmemiştir. Özellikle, %10 içerikli transgenik mısır yiyen erkeklerin ortalama vücut ağırlığı devamlı olarak deneyin büyük bir bölümünde kontrollerin arkasından gecikmeli bir şekilde gelmiştir. EFSA bu farklılıkların yalnızca %10'luk grup arasında oluştuğunu ve doza bağlı olmadığını ve bu yüzden MIR604 verilmesiyle ilişkisi olmadığını şeklinde değerlendirmiştir.

Kontroller ile karşılaştırıldığında %41.5 oranında transgenik mısır tüketen grupta görülen farklılıklar, deneyin 2., 5., 6. ve 10. haftalarında dişi sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olmuştur. Aynı içerikte transgenik mısır tüketen sıçanlarda yem tüketimi, bir hafta boyunca transgenik mısır tüketen dişilerde azalmıştır. Vücut ağırlıklarındaki farklılıklar düşük olup, deneme sonu vücut ağırlığı farklı olmadığından, EFSA bu sonuçları toksikolojik yönden önemli olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Hematoloji verileri ile ilgili olarak, %41.5 MIR604 mısır içeren yem ile beslenen erkek sıçanlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında platelet miktarında düşme görülmüştür. Özellikle kontrollerde ama ayrıca MIR604 ile beslenen gruplarda ortalama platelet miktarı değerleri EFSA'nın isteği üzerine sağlanan diğer çalışmaların kontrolleriyle karşılaştırıldığında, ortalama değerlerin üstünde çıkmıştır. Bununla beraber MIR604 ile beslenen sıçanların tüm bireysel değerleri diğer çalışmaların sınırları içinde kalmıştır, özellikle kontrol mısırı tüketen sıçanların değerleri ise diğer çalışmalardan elde edilen değerler arasında kalmıştır. Ayrıca ilgili hematolojik parametrelerde (protrombin zamanı, etkin kısmi tromboplastin zamanı) farklılık görülmemiştir. Bu yüzden bu farklılık önemsiz olarak değerlendirilmiş ve yüksek kontrol değerlerinden oluşabileceğine değinilmiştir. Serumdaki biyokimyasal analizlerde, %41.5 transgenik mısır tüketen erkek sıçanlarda ortalama plazma kolesterol düzeylerinde yükselme görülmüştür. Bu gruptaki bireysel değerlerin sınırında nispeten geniş bir değişkenlik vardır ve ortalama değer diğer çalışmaların sınırından daha yüksektir. İlgili kan parametrelerinin incelenmesinde ve mikroskobik karaciğer muayenelerinde herhangi bir farklılık bulunmadığından ve kontrol grubu erkek sıçanlarda yüksek kolesterol düzeyi gözlemlendiğinden, bu farklılık toksikolojik açıdan önemli görülmemiş ve MIR604 mısır çeşidinin tüketimi ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. %41.5 MIR604 mısır tüketen dişilerde ortalama plazma kreatinin kinaz etkinliği düşük görülmüş, ama bu durumun kontrol grubunda çok yüksek değer gösteren 2 hayvandan

kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu aşırı sapan değerler çıkarıldıktan sonra istatistiksel farklılık görülmemiştir.

Organ ağırlıkları konusunda kontrollerle karşılaştırıldığında %41.5 transgenik mısır içeren yem ile beslenen dişi sıçanlarda kalp ağırlıkları (vücut ağırlığına uygun hesaplanmıştır) ve erkek sıçanlarda testis ağırlıkları daha yüksek bulunmuştur. Dişilerdeki kalp ağırlıkları için ortalama ve bireysel değerler diğer kontrollerin sınır verileri ile benzer bulunmuştur. Ortalama kısmi testis ağırlıkları diğer kontrol gruplarından bir miktar fazla, %10 transgenik olmayan kontrol mısırla beslenen gruptan daha düşük olarak belirlenmiştir. İlgili farklılıklar toksikolojik olarak önemli görülmemiştir. Kalp ve testislerin histopatolojik muayenelerinde bulgu verilmemiştir (EFSA 2009).

4.3. Alerji ile ilgili değerlendirmeler

4.3.1. Yeni ifade edilen proteinlerin alerjenitesinin değerlendirilmesi

mCry3A ve PMI proteinleri, alerji etkisi bulunmayan kaynaklardan köken almaktadır. Ayrıca bu proteinler yapay mide sıvısında hızla parçalanmaktadır. Proteinlerin dizileri ile ilgili yapılan biyoinformatik analizlerde bilinen alerjik proteinler ile benzer olmadığı bildirilmektedir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalar da bunların alerjen olmadığını göstermiştir (EFSA 2009).

4.3.2. GD mısır çeşidinin alerjenitesinin değerlendirilmesi

Mısırın alerjenik bir gıda olmaması nedeniyle EFSA, MIR604 mısırın alerjenik özellik taşıyacağını düşünmemektedir. Mısır alerjisi çok düşük sıklıkta olmaktadır ve başlıca özel coğrafik bölge halkında görülmektedir. Mısır tozu ve poleni ile yakın temasta bulunan kişilerde nadiren de olsa alerjik vakalar bildirilmektedir. Mısıra bağlı gıda alerjisi nadir olarak görülmektedir (Moneret-Vautrin ve ark, 2000).

4.3.3. MIR604 mısırın hayvan besleme ile ilgili değerlendirilmesi

Etlik piliçler, 75 erkek ve 75 dişi bulunan 3 gruba ayrılarak, MIR604 mısır çeşidi (1), aynı genetik bileşime sahip genetiği değiştirilmemiş mısır (2) ve geleneksel mısır (3) içeren rasyonla beslenmişlerdir., Rasyonlar %55-60 arasında değişen oranlarda mısır içerecek şekilde hazırlanarak hayvanlara 49 gün boyunca verilmiştir. Canlı ağırlıkları ve yem tüketimi 0., 16., 31. ve 49. günlerde ölçülmüştür. Her gruptan 6 erkek ve 6 dişi hayvanda karkas özelliklerinden iç yağ, gövde, but, kanat ve göğüs kasları ağırlıkları ölçülmüştür. İstatistik yönden önemli bir farklılık dişi hayvanlardaki but ağırlıklarında elde edilmiştir; transgenik olmayan mısır tüketen hayvanlarla karşılaştırıldığında MIR604 mısır tüketen hayvanlarda but ağırlığı daha fazla bulunmuş, fakat bu farklılık referans yem yiyenlerde görülmemiştir. EFSA bu farklılığın çok düşük olduğu ve biyolojik yönden önemli olmadığı ve MIR604 mısırın geleneksel mısır kadar besleyici önemi olduğu sonucuna varmıştır (EFSA 2009; Brake 2004).

GENEL SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu raporda, genetiği değiştirilmiş MIR604 çeşidinin yem olarak kullanımının güvenlik açısından değerlendirmesi, ilgili çeşidin geliştirilmesinde kullanılan gen aktarım yöntemi, aktarılan genin moleküler karakterizasyonu ve ürettiği protein, besin değer, olası alerjik, toksik ve çevreye gen kaçışı ile oluşabilecek riskler dikkate alınmıştır.

MIR604 mısır çeşidinin elde edilmesinde kullanılan gen aktarım yöntemi ve aktarılan genin moleküler karakterizasyonu ile ilgili literatür incelendiğinde bilinen herhangi bir olumsuz sonuca rastlanmamıştır. MIR604 mısırın ürettiği proteinler ile yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, ilgili proteinlerin bilinen bir alerjen ve toksik proteinle benzerliğine rastlanmamıştır.

Genetiği değiştirilmiş bitkilerin ülkemizde yetiştirilmesi 5977 sayılı kanun kapsamında yasak olmakla birlikte ithal edilmesi düşünülen MIR 604 mısır çeşidi tanelerinin amaç dışı çevreye dağılması ve olası kaçak ekimler nedeniyle gen kaçışı riskinin olabileceği bu nedenle ithaline izin verilmesi durumunda yetkili kuruluşlar tarafından izlenmelidir.

Bu çeşit oldukça yeni bir çeşit olup, Syngenta firmasının müracaatı üzerine 2006 yılında Avustralya'da, 2007 yılında Japonya, Kanada ve ABD'de, 2009 yılında AB'de, ilgili yetkili kuruluşlar tarafından gıda ve yem olarak kullanılması onaylanmıştır. Ancak, bu çeşit ile ilgili, yem olarak kullanılması halinde ortaya çıkabilecek riskler konusunda yeterli veri bulunamadığı için, komitemiz oyçokluğuyla MIR604 mısır çeşidinin ülkemizde yem amaçlı kullanımının uygun olmayacağı görüş ve kanaatine varmıştır.

KAYNAKLAR

Anonim (2011a). AgriSureRW™ Insect-Protected Corn Event MIR604
<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/nf-an134decdoc-eng.php>

Anonim (2011b). Application for import and use of Event MIR604 maize derived products
http://www.gmo-compass.org/pdf/regulation/maize/MIR604_maize_application_food_feed.pdf

Australia-New Zealand Food Standart (2006). Final Assessment Report Application A564
Food Derived From Insect-Protected Corn Line MIR604.

Brake, J.T. (2004). Evaluation of transgenic corn (maize) MIR604 in broiler chickens.
Unpublished. U.S. EPA MRID No. 46265615. (Appendix 2-Section 39)

CERA (2011).

http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit&evidcode=MIR604

EFSA (2007). Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants adopted on 22-23 March 2007. http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/gmo/statements/npt2.Par.0001.File.dat/gmo_statement_%20nptII.pdf

EFSA (2008). Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms on application (Reference EFSA-GMO-UK-2005-20) for the placing on the market of the insect-resistant and herbicide-tolerant genetically modified maize 59122 x NK603, for food and feed uses, and import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International. *The EFSA Journal*, 874:1-34.

EFSA (2009). Application (Reference EFSA-GMO-UK-2005-11) for the placing on the market of insect-resistant genetically modified maize MIR604 event, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds S.A.S on behalf of Syngenta Crop Protection AG. *The EFSA Journal*, 1193, 1-2.

Europabio (2009). MIR604 Maize Syngenta Agrisure™ RW Maize for Corn Rootworm Control

http://www.europabio.org/InfoOperators/MIR604/Syngenta_brochure_20091203_v2.pdf

Einspanier, R., Lutz, B., Rief, S., Berezina, O., Zverlov, V., Schwarz, W., Mayer, J., (2004). Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgenic maize. *European Food Research and Technology*, 218: 269-273.

FAO (2009). FAO Statistical Yearbook. <http://faostat.fao.org/site/567>

Freeze, H.H. (2002). Phosphomannose isomerase. In: N. Takiguchi, K. Honke, M. Fukuda (Eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (1st Ed.). Springer, Tokyo and New York.

GMO compass,

http://www.gmo-compass.org/pdf/regulation/maize/MIR604_maize_opinion_efsa.pdf

- Guertler, P., Lutz, B., Kuehn, R., Meyer, H.H.D., Einspanier, R., Killermann, B., Albrecht, C.** (2008). Fate of recombinant DNA and Cry1Ab protein after ingestion and dispersal of genetically modified maize in comparison to rapeseed by fallow deer (*Dama dama*). *European Journal of Wildlife Research*, 54: 36-43.
- Icoz, I., Stotzky, G.** (2007). Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 559-586.
- Icoz, I., Stotzky, G.** (2008). Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 559-586.
- Kırtok, Y.** (1998). Mısır Üretimi ve Kullanımı. Ç.Ü. Zir. Fak. Tarla Bitkileri Bölümü. Kocaelik Basım ve Yayınevi, Tarsus.
- Kramer, C.** (2004). Compositional Analysis of Grain and Whole Plants from Transgenic Maize (Corn) Event MIR604. Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-111-04. Unpublished. (Appendix 2-Section 5)
- Kuiper, H.A.** (2004). Food and chemical toxicology - Introduction. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1044-1045.
- Kurt, O.,**(2008) Bitki Islahı. OMU Ziraat Fakültesi Yayın No: 43 (3. Basım).
- Lutz, B., Wiedemann, S., and Albrecht, C.** (2006). Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in *Bt*-176 maize during the ensiling process. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 90, 116-123.
- Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., Beaudouin, E.** (1998). L'allergie alimentaire au maïs existe -t-elle? *Allerg. Immunol* 30, (7), 230.
- OECD** (2002). Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 6, Document ENV/JM/MONO(2002)25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. [http://www.ois.oecd.org/ois/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2002\)25](http://www.ois.oecd.org/ois/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)25).
- OECD** (2003). Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology.
- Reed, J., Privalle, L., Powell, M.L., Meghji, M., Dawson, J., Dunder, E., Suttie, J., Wenck, A., Launis, K., Kramer, C., Chang, Y.-F., Hansen, G., Wright, M.** (2001). Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 37, 127-132.
- Ren, Y., Jun, Lv., Hua, Wang., Linchuan, Li., Yufa, Peng., Li-Jia, Qu.** (2009). A comparative proteomics approach to detect unintended effects in transgenic *Arabidopsis*. *J. Genet. Genomics* 36 629-639.
- Reynolds, T.L., Nemeth, M.A., Glenn, K.C., Ridley, W.P., Astwood, J.D.** (2005). Natural variability of metabolites in maize grain: differences due to genetic background. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10061-10067.
- Wiedemann, S., Lutz, B., Kurtz, H., Schwarz F.J., Albrecht, C.** (2006). In situ studies on the time- dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. *Journal of Animal Science*, 84:135-144.