

GEÇİCİ KAPAK

*Kapak tasarımı
devam ediyor.*

BİDGE Yayınları

Moleküler Biyoloji Eksenindeki Sorunlara Yeni ve Stratejik Yaklaşımlar

Editör: İDRİS ARSLAN

ISBN: 978-625-8567-29-8

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 2025-12-25

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



ÖNSÖZ

Moleküler biyoloji, canlı sistemlerin en temel yapı taşlarını anlamaya yönelik arayışında, son birkaç on yılda olağanüstü bir dönüşüm geçirmiştir. Genom dizileme teknolojilerindeki baş döndürücü ilerlemeler, tek hücre düzeyinde analiz olanakları, yapay zekâ destekli veri yorumlama yaklaşımları ve disiplinlerarası araştırma kültürünün güçlenmesi, alanın sınırlarını sürekli olarak yeniden tanımlamaktadır. Bu hızlı gelişim, beraberinde yalnızca yeni bilgiler değil, aynı zamanda yeni sorular, yöntemsel zorluklar ve kavramsal tartışmalar da getirmektedir.

“Moleküler Biyoloji Eksenindeki Güncel Sorunlara Yeni Yaklaşımlar” başlıklı bu kitap, moleküler biyolojinin güncel problemlerini klasik çerçevelerin ötesinde ele almayı amaçlamaktadır. Kitapta yer alan bölümler, gen düzenlenmesi, hücresel sinyal ağları, epigenetik mekanizmalar, RNA biyolojisi, protein dinamiği ve sistem biyolojisi gibi alanlarda karşılaşılan temel sorunları, yenilikçi deneysel ve kuramsal yaklaşımlar ışığında tartışmaktadır. Her bir katkı, yalnızca mevcut bilgi birikimini özetlemekle kalmayıp, aynı zamanda gelecekteki araştırmalara yön verebilecek özgün bakış açıları sunmayı hedeflemektedir.

Bu eser, farklı kurum ve disiplinlerden gelen araştırmacıların ortak bir bilimsel zeminde buluşmasının bir ürünü olarak ortaya çıkmıştır. Kitabın hazırlanma sürecinde, moleküler biyolojinin doğası gereği çok katmanlı ve dinamik yapısının korunmasına özen gösterilmiş; biyoinformatik, fizik, kimya ve mühendislik gibi alanlarla kurulan etkileşimlerin altı özellikle çizilmiştir. Böylece kitap, hem alanın uzmanlarına hem de lisansüstü öğrencilerine, güncel sorunları bütüncül bir perspektiften değerlendirme olanağı sunmayı amaçlamaktadır.

Bu kitabın, moleküler biyolojide çalışan araştırmacılar için bir başvuru kaynağı olmasının yanı sıra, yeni araştırma sorularının

doğmasına ve disiplinlerarası iş birliklerinin güçlenmesine katkı sağlayamamı umuyorum. Bilimsel merakın ve eleştirel düşüncenin rehberliğinde, bu alandaki güncel sorunlara geliştirilen yeni yaklaşımların, yaşam bilimlerinin geleceğini şekillendireceğine inanıyorum.

Prof. Dr. İDRİS ARSLAN

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ (CAR)-T HÜCRELERİ VE KANSER İMMÜNOTERAPİSİ	1
---	---

ALİ KEMAL ZİREK

ORAK HÜCRE HASTALIĞINDA İYİLEŞTİRİCİ TEDAVİLER VE GEN TERAPİSİ	17
---	----

ALİ KEMAL ZİREK

GIDA GÜVENLİĞİNDE GENETİK ANALİZLERİN GELECEĞİ: POTANSİYELLER, SINIRLILIKLAR VE BİLİMSEL GERÇEKLİK	34
--	----

MUSTAFA AY

BİTKİ SİSTEMATİĞİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER	80
--	----

CÜNEYT UÇARLI

BÖLÜM 1

KİMERİK ANTİJEN RESEPTÖRÜ (CAR)-T HÜCRELERİ VE KANSER İMMÜNOTERAPİSİ

ALİ KEMAL ZİREK¹

Giriş

Genetik biliminde yakın tarihteki en önemli bilimsel gelişmelerden biri immünoterapide çığır açan kimerik antijen reseptörü (CAR)-T'nin kullanıma geçmesidir. CAR-T hücreleri, tedavisi güç bulaşıcı hastalıklar, otoimmün hastalıklar, kanserler gibi ciddi rahatsızlıklarda önemli bir tedavi potansiyeli sunmaktadır (Patel vd., 2025).

Somatik hücrelerin genetik bir rahatsızlığı olan kanser çevre ve genetik unsurlardan fazlaca etkilenen ölümcül bir rahatsızlıktır. Kanser hastalıklarının çoğunluğunda kalıtım önemli bir neden olarak kabul edilmektedir (Knudson, 2002). Cerrahi, radyasyon, kemoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemlerinin her zaman yeterli olmadığı ve özellikle gecikmiş ve dirençli vakalarda sonuç vermede sınırlı kaldığı bilinmektedir. Kontrol noktası inhibitörleri, kanser aşılı, monoklonal antikorlar, sitokinler ve CAR T hücre tedavisi immünoterapi için kullanılan yöntemlerdir. Kanser

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Hakkari Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Orcid: 0000-0002-7881-7251

tedavisindeki CAR-T hücre kullanımı son dönemlerde öne çıkmaktadır (Bui vd., 2024).

Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler Wilms tümör proteini (WT1), Retinoblastoma geni (RB1), Nörofibromatozisler (NF1 ve NF2), Adenomatosis poliposis koli (APC), Von Hippel-Lindau (VHL), Tübüler skleroz (TSC1 ve TSC2), Meme kanser genleri (BRCA1 ve BRCA2) şeklinde sıralanabilir. Retinoblastoma geni (RB1), ilk tanımlanan tümör baskılayıcı gendir. Çocukluk ve ergenlik döneminde büyüyen retina, kemik ve meme dokularındaki kanserlerde rol alır (Knudson, 2002).

Gen Etkileşimleri

Fazla sayıda beni olan, açık tenli bireylerde aşırı güneşe maruz kalma ile kutanöz melanom riski artar. İnterlökin-1 β üretiminin vücutta artışı Helicobacter pylori varlığında mide kanseri için risk faktörü oluşturur. Bununla birlikte yaralanma ve kronik iltihap durumlarının kanser ilişkisi bildirilmiştir. İnsan vücut dolaşımındaki hormonlar ve büyüme faktörleri kanser ilişkileri yapılmıştır. Özellikle kadınlarda menapoz sonrası aşırı östrojen varlığı meme kanserleri ile anılmıştır. İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) belirli kanser türleri ile bir arada çalışılmıştır (Ponder, 2001). Kanserlere neden olan genler, hücre çoğalması ve hücre ölümünün kontrolünü sağlayan hücresel yollarda mevcuttur (Bunz, 2008).

Gen Düzenleme Araçları

CAR ekspresyonunu indüklemek amacıyla kullanılan gen düzenleme araçları arasında, transpozonlar, çinko parmak nükleazları (ZFN), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) kullanılmaktadır (Bui vd., 2024).

Transpozonlar

Sleeping Beauty ve PiggyBac transpozonlar örnek verilebilir. Bunlar CAR yapılarını T hücrelerine almakla kullanılır. Sleeping Beauty, genotoksitesi azdır ve kararlı transgen ekspresyonu oluşturur. PiggyBac transpozonlar akut lenfoblastik lösemi hücreleri (ALL) üzerinde anti-tümör aktivitesinde bulunan CD19 CAR T hücresi oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Bui vd., 2024).

Çinko Parmak Nükleazları (ZFN)

Bu yapay retriksiyon enzimleri HIV hastalarında denenmiştir. HIV dirençli CD4 hücre oluşumunda kullanılmaktadır.

Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN)

Kan kanser türlerinin tedavisinde kullanımıştır. Akut miyeloid lösemi, ileri lenfoid maligniteler, refrakter B-ALL, multipl miyelom ve B hücreli akut lenfoblastik lösemi benzeri hastalıklarda kullanılmaktadır.

Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR)

CRISPR/Cas9, CAR T hücre terapisinde yol alması gereken araçlardır (Bui vd., 2024).

T Hücresi Tedavileri

Kimerik antijen reseptörü (CAR)-T ve T hücresi reseptörü (TCR) ile tasarlanmış T hücresi (TCR-T) tedavileri, Hematolojik malignite süreçlerinde önemli başarılar alınmış yöntemlerdir (Sanomachi vd., 2025).

CAR-T hücreleri genetik olarak tasarlanmış T hücreleridir. Bu hücreler hedef hücrelerin (örneğin tümör hücreleri) yüzey antijenlerini tanır ve bu sayede T hücrelerinin tümör hücrelerini öldürülmesini sağlayan bir reseptör ifade ederler. T hücreleri, bu

hücrelerin yardımıyla hedef antijene bağlanarak tümör hücrelerini ortadan kaldırır (Brudno vd., 2024). T hücreleri, majör histokompatibilite kompleksinden (MHC) bağımsız olarak tümör hücrelerini yok eder. Bu durum, bazı mutasyon mekanizmaları gibi yöntemlerle T hücre reseptörleri tarafından tanınan tümör antijenik peptit parçaları-MHC kompleksinin oluşumunun T hücreler tarafından yok edilmesini engelleyen aksaklıklara neden olmaz (Liu vd., 2019).

CAR proteini, CAR-T hücreleri tarafından ifade edilir. Tümör hücre yüzeyinde malignite ilişkili antijene bağlanarak T hücrelerine tümör hücresinin yok edilmesi için sinyal gönderir. Bu protein iki kısımdan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi tümör hücre yüzeyindeki antijeni tanıyan kısım, ikincisi ise T hücre aktivasyonunu sağlayan, hücre içi T hücrelerinden köken alan yapılardır. Birincisi genelde bir antikorun farklılaşan bölgelerinden meydana gelir. İkincisi CD3 ζ (T hücre reseptörü zeta (ζ)) T hücre aktivasyon alanı ve bunun yanında yardımcı uyarıcı alan olarak görev yapan CD28 (Farklılaşma Kümesi 28), 4-1BB (CD137) içermektedir. Hastadan alınan T hücreleri, CAR proteinini ifade edebilmeleri için viral bir aracı sayesinde kalıcı şekilde genetik modifikasyona uğratılır (Brudno vd., 2024). FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) ve EMA (Avrupa İlaç Ajansı), CAR-T ürünlerinin tedavi amaçlı kullanılmasının yolunu açmıştır. Günümüzde Hematolojik kötü huylu kanserler ve solid kanserlerde başarı elde edilmeye başlanmıştır (Hu vd., 2024; Hinckley-Boned vd., 2025).

Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) Yapıları

Ligand Bağlayıcı Alan

Spesifik bir antijene bağlanma ve tanınmasından sorumlu alandır.

scFv

Kimerik antijen reseptörlerinden en yaygın kullanılan ligand bağlayıcı alan (spesifik bir antijene bağlanan antikor) olarak bilinir. Tek zincirli değişken fragmanın (scFv), insan antikorlarından oluşması önemlidir. scFv, antikorun değişken fragman ağır ve hafif zincirlerinin bir bağlayıcı peptid ile bağlanmasıyla oluşur. Hafif ve ağır zincirler arasındaki aminoasit dizisi Gly-Gly-Gly-Gly-Serin şeklinde dizilmiştir.

Aralayıcı Alanı

Bağlanmanın hücre membranı dışında nerede olacağına karar verir. ligand bağlayıcı alan hareketliliğini sağlar, menteşe görevi görür. Bu amaçla CD28 ve CD8 α menteşeleri antijen eşiği seviyesi oluşturur.

Transmembran Alanı

Kimerik antijen reseptörlerini hücre zarına sabitleyici alanı endodomainlere bağlar.

Endodomainler

Kimerik antijen reseptörlerin sitoplazmik bölgeleridir.

CD3 ζ

İndüklenebilir tirozin kinaz fonksiyonuna sahiptir. CAR yapılarına mutlaka dahil edilmesi gerekir.

Kostimülatör Alanlar

T hücresi aktivasyonunu modüle etmekten sorumlu proteinlerdir. CD28, 4-1BB, OX-40 (CD134), ICOS (İndüklenebilir T hücresi COS uyarıcısı, CD278), CD27 ve CD40L gibi moleküller kostimülatör alanlar olarak bilinmektedir. Genellikle CD28 ve 4-1BB kullanılmaktadır (De Marco vd., 2023).

CAR T Kullanım Alanları

CAR T hücreleri, B hücre antijeni CD19'u hedef alan akut lenfoblastik lösemi hastaları, nükseden/dirençli multipl miyelom hasta tedavisinde kullanılmaktadır. Solid tümörlerde çalışmalar devam etmektedir (Zugasti vd., 2025).

CAR T Yan Etkiler

CAR T hücreleri hasta hücrelerinin aşırı sitokin salınımına yol açarak sitokin salınım sendromu ve bununla birlikte immün efektör hücre ilişkili nörotoksisite sendromu (ICANS) meydana getirebilir (Hinckley-Boned vd., 2025; Santomasso vd., 2023). CAR T hücrelerinin hedefe yönelik tümör dışı toksisitesi (OTOT), hem tümör hücrelerini hem de sağlıklı dokuları hedef almasıdır. Graft-versus-host hastalığı (GvHD), donör T hücrelerinin hastanın sağlıklı dokularına saldırması sonucu oluşur. Karaciğer, gastrointestinal sistem ve cilt dokuları zarar görebilir. Hareket ve nörobilişle ilişkili tedavi sonucu ortaya çıkabilen yan etkiler, öngörülemeyen hedef dışı toksisite, anafilaksi benzeri durumlar oluşabilir (Jangavali vd., 2025). Bunun yanında yeni çalışmalarda güvenlik kaygılarının giderilmesi amaçlanmalıdır. Viral gen transfer yöntemleri yerine güvenilir ve uyarlanabilir yeni yöntemler üzerinde çalışılmalıdır (Kitte vd., 2023).

CAR T Sınırlamalar ve Zorluklar

Lökaferrez, uzun süren ve iki intravenöz hat aracılığıyla aferez cihazına bağlı hastadan T hücrelerini toplama işlemidir. Bu işlem hasta için dayanılmaz olabilir. Maliyeti fazladır. Yaygın kullanımı sınırlandırılabilir. T hücrelerinin aktivasyonu ve transdüksiyonu, bu hücrelerin bir hafta süresince sitokin destekli doku kültür ortamında çoğaltılmalıdır. T hücre çoğaltma ve yıkanma işlemlerinin yapılması gereklidir. T hücrelerin dondurularak saklanması gereklidir.

CAR-T kalibrasyon kontrol testlerinin yapılması zorunluluğu vardır. Bu işlemlerin kurulum ve çevre düzenlemesi pahalı işlemleri içerir (Parayath vd., 2020). Ayrıca aferezden hücre infüzyonuna kadar 24 ila 113 gün arasında süre geçer bu süre boyunca hastalık ilerlemesi değişmektedir (Li vd., 2025)

CAR T Solid Hücrelerde Sınırlama ve Zorluklar

Tümörlerin heterojenliği, immünoşüpresif tümör mikroçevresi, CAR T hücre infiltrasyonuna karşı engeller, hayati organlarda hedef dışı toksisite ve tümöre özgü antijenlerin yetersizliği sayılabilir (Li vd., 2025).

Solid Tümörlerde Yaygın ve Yüksek Oranda İfade Edilen Bazı Hedefler

CEA (karsinoembriyonik antijen) mide kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri, karaciğer kanseri, CLDN18.2 (kludin 18.2): mide kanseri, CLDN6 (kludin 6) over kanseri, EBV (Epstein-Barr virüsü) baş ve boyun kanserleri, GPC3 (glipikan 3) karaciğer kanseri, GUCY2C (guanilat siklaz 2C) kolorektal kanser, İnterlökin (IL)- IL13R α 2, IL-13 reseptör- α 2 glioma, MSLN (mezotelin) over kanseri, pankreas kanseri, mezotelyoma, NKG2DL (NKG2D ligandı) mide kanseri, pankreas kanseri, PSCA (prostat kök hücre antijeni) prostat kanseri PSMA (prostata özgü membran antijeni) prostat kanserinde ifade edilir (Tablo 1) (Li vd., 2025).

Tablo 1 Hedef Antijenler ve İlişkili Kanser Türleri

Hedef Antijen	Açılımı	İlişkili Kanser Türleri
CEA	Karsinoembriyonik antijen	Mide, meme, akciğer, pankreas, karaciğer kanseri
CLDN18.2	Klaudin 18.2	Mide kanseri
CLDN6	Klaudin 6	Over kanseri
EBV	Epstein–Barr virüsü	Baş ve boyun kanserleri
GPC3	Glipikan 3	Karaciğer kanseri
GUCY2C	Guanilat siklaz 2C	Kolorektal kanser
IL13R α 2	IL-13 reseptör- α 2	Glioma
MSLN	Mezotelin	Over kanseri, pankreas kanseri, mezotelyoma
NKG2DL	NKG2D ligandı	Mide kanseri, pankreas kanseri
PSCA	Prostat kök hücre antijeni	Prostat kanseri
PSMA	Prostata özgü membran antijeni	Prostat kanseri

Kaynak: (Li vd., 2025)

CAR T Tedavisi İşlem Basamakları

CAR T hücrelerinin genetik modifikasyon işlemleri vücut dışında yapılmaktadır. CAR T hücrelerinin bu yöntemi exvivo olarak bilinir. Hasta ya da uygun dönür kanından T hücreleri izole edilir, toplanır. CAR yapısını ifade edecek şekilde genetik olarak değiştirilir. Böylece CAR T hücre havuzu oluşturulur. CAR T hücreleri çoğaltılır. Hastaya infüzyon yoluyla verilir. Hastanın tümör hücrelerince salgılanan antijenlere CAR T hücreleri gidip bağlanır ve tedavi gerçekleşir (Tablo 2) (Bui vd., 2024).

Tablo 2 CAR-T Hücre Tedavisi İşlem Basamakları

Adım No	İşlem Basamağı
1	CAR-T hücrelerinin genetik modifikasyon işlemleri vücut dışında yapılır.
2	Bu yöntemle ex vivo yaklaşımı adı verilir.
3	Hastadan veya uygun donörden T hücreleri izole edilerek toplanır.
4	Toplanan T hücreleri, CAR yapısını ifade edecek şekilde genetik olarak değiştirilir.
5	Genetik modifikasyon sonrası CAR-T hücre havuzu oluşturulur.
6	CAR-T hücreleri laboratuvar ortamında çoğaltılır.
7	Elde edilen CAR-T hücreleri hastaya intravenöz infüzyon ile geri verilir.
8	CAR-T hücreleri, tümör hücrelerinin salgıladığı antijenleri tanır ve bağlanarak terapötik etkiyi oluşturur

Kaynak: (Bui vd., 2024)

CAR-T Hücre Tedavisinde Yeni Hedefler: GPRC5D ve CS1

Multipl miyelom (MM), Sinyal Lenfosit Aktivasyon Molekülü (SLAM) ailesi üyesi ve glikoprotein olan CS1'i (SLAMF7) ifade eder. (Altalbawy vd., 2025; Jangavali vd., 2025). CS1 hedef alan tedaviler multipl skleroz hastalarında başarı elde etmiştir. G proteinine bağlı reseptör sınıfı C grubu 5 üyesi D (GPRC5D), CAR T hücre tedavisi için bir hedef olarak kabul edilen yeni multipl miyelom tedavi hedeflerinden bir diğeridir (Jangavali vd., 2025).

Kanser Dışı CAR T Uygulamaları

Astım

CAR T hücreleri, B hücreleri tarafından üretilen IgE'yi hedef alabilir (Jangavali vd., 2025).

Bulaşıcı hastalıklar

CAR T hücreleri, HBV pozitif hücreleri tespit ederek seviyelerini düşürebilir, HCV ile enfekte hücrelerde ekili olabilir, HIV-1 replikasyonunu azaltabilir. COVID 19 (Jangavali vd., 2025), EBV (Epstein-Barr virüsü), CMV (Sitomegalovirüs), HBV (Hepatit B) için potansiyel tedavi yöntemlerindendir (Kourti vd., 2025).

Diğer İmmünoterapi Yöntemleri

İmmün kontrol noktası inhibitörleri (ICI)

İmmün kontrol noktası immün sistemin doğal bir parçasıdır. Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) ve ligandı 1 (PD-L1), lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3) ve sitotoksik T lenfosit ilişkili antijeni 4 (CTLA-4) gibi moleküller bu amaçla kullanılmaktadır. Bu moleküllerin kanser hücrelerini tanıma ve yok etme yeteneğini artırmak için bağışıklık sistemine etkileri bulunur. Bu görevlerini PD-1/PD-L1 gibi düzenleyici yolları bloke ederek çalışmaktadırlar (Gergely vd., 2025; Sherafat vd., 2025; Rezaee-Zavareh vd., 2025; Alsaafeen vd., 2025). Anti-CTLA-4, metastatik melanomlu hastalarda başarı göstermiştir (Alsaafeen vd., 2025). Hepatosellüler karsinom (HCC) hastalarında ICI tedavide nüksü önleyebilir ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, melanom ve böbrek hücreli karsinom benzeri solid tümörlerde etkili olabilmektedir (Sherafat vd., 2025; Rezaee-Zavareh vd., 2025).

İnhibitör reseptörler arasında olası yeni hedefler

B ve T lenfosit zayıflatıcı (BTLA), yumurtalık kanseri; Ig ve ITIM alanlarına sahip T hücresi immünoresptörü (TIGIT), foliküler lenfoma, meme tümörleri, akut miyeloid lösemi, karaciğer kanseri için; T hücresi immünoglobulini ve mukus-alanı içeren-3 (TIM-3), mide kanseri, kolon kanseri, rahim ağzı kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde olası hedef olabilir (Justiz-Vaillant vd., 2025).

mRNA kanser aşıları

Tümör antijenlerini kodlama ve kansere karşı bağışıklık oluşturmak için mRNA aşılarından faydalanılır. Bu aşılar kanser hücrelerini tanıır ve ortadan kaldırılmasını sağlar. İnseriyonel mutagenез oluşturmaz. Bu açıdan güvenli kabul edilirler. Kronik inflamasyon veya otoimmün yanıt azdır. Kişisel tümör tedavilerinde kullanıma uygundur. Aşıların belli sınırlılıkları vardır. Bunlarda ilki mRNA kararsızdır, etkili ve hedef uygulama sistemlerine ihtiyaç duyulur ve tümör hücreleri tarafından atlatılma riskleri bulunur (Yao vd., 2024).

Monoklonal antikorlar

Tümör hücre antijenlerini tanımak amaçlı üretilirler ve sağlıklı dokulara çok az müdahale ederler. Bağışıklık sistemi aktivasyonu, tümör büyümesinin inhibisyonu ve sitotoksik ajanların iletimi gibi mekanizmalar aracılığıyla çalışırlar. Antikorlar bağışıklık kontrol noktasını bloke eder. PD-1, PD-L1 ve CTLA-4 proteinlerini hedef alırlar. T hücre aktivitesini geri kazandırır. Bağışıklık sisteminin tümörleri tespit edilerek yok etmelerine yardımcı olurlar. Ayrıca radyoimmünoterapi amacıyla hematoloji tümörlerde kullanılırlar (Justiz-Vaillant vd., 2025).

Sitokinler

İmmünoşitokinler, sitokinlerin tümöre spesifik antikorlarla füzyonu yoluyla bağışıklık aktivasyonunu hedef alır, sistemik toksisiteyi azaltıcı etkileri vardır. İnterlökin (IL)-2, IL-12 ve IL-15 sitokin bazlı tedaviler için kullanılmaktadır (Berraondo vd., 2025).

Sonuç

Kan kanserlerinde ilerlemeyle birlikte solid kanserlerde tedaviler gelişime muhtaçtır. T hücrelerine yönlendirmek amacıyla, biyobozunur polimerik nanotaşıyıcılar formüle edilebilir.

Hedeflenen toksisite, tümör dışı dokulardaki istenmeyen etkiler ve tümör değişkenliği mutlaka göz önünde tutulmalıdır.

Kaynakça

Alsaafeen, B. H., Ali, B. R., Elkord, E. (2025). Resistance mechanisms to immune checkpoint inhibitors: updated insights. *Molecular Cancer*, 24(1), 20.

Altalbawy, F. M., Babamuradova, Z., Baldaniya, L., Singh, A., Singh, K. U., Ballal, S., Alshahrani, M. Y. (2025). The multifaceted role of CS1 (SLAMF7) in immunoregulation: Implications for cancer therapy and autoimmune disorders. *Experimental Cell Research*, 114516.

Berraondo, P., Cuesta, R., Aranda, F., Martinez-Riaño, A., Eguren-Santamaria, I., Luri-Rey, C., Melero, I. (2025). Immunocytokines and cytokine neutralization for cancer immunotherapy. *Trends in Cancer*.

Brudno, J. N., Maus, M. V., Hinrichs, C. S. (2024). CAR T cells and T-cell therapies for cancer: A translational science review. *Jama*.

Bui, T. A., Mei, H., Sang, R., Ortega, D. G., Deng, W. (2024). Advancements and challenges in developing in vivo CAR T cell therapies for cancer treatment. *EBioMedicine*, 106.

Bunz, F. (2008). *Principles of cancer genetics*. Dordrecht: Springer Netherlands.

De Marco, R. C., Monzo, H. J., Ojala, P. M. (2023). CAR T cell therapy: a versatile living drug. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6300.

Gergely, T. G., Drobni, Z. D., Sayour, N. V., Ferdinandy, P., Varga, Z. V. (2025). Molecular fingerprints of cardiovascular toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Basic research in cardiology*, 120(1), 187-205.

Hinckley-Boned, A., Barbero-Jiménez, C., Tristán-Manzano, M., Maldonado-Perez, N., Hudecek, M., Justicia-Lirio, P., Martin, F. (2025). Tailoring CAR surface density and dynamics to improve CAR-T cell therapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 13(4), e010702.

Hu, Y., Sarkar, A., Song, K., Michael, S., Hook, M., Wang, R., Song, X. (2024). Selective refueling of CAR T cells using ADA1 and CD26 boosts antitumor immunity. *Cell Reports Medicine*, 5(5).

Jangavali, S. S., Hangargekar, P. B., Gangthade, B. U., Jadhav, S. A., Havelikar, U. A., Joshi, A. A. (2025). From lab to lifesaver: the rise of CAR T-cell therapy in oncology. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 37(1), 37.

Justiz-Vaillant, A., Pandit, B. R., Unakal, C., Vuma, S., Akpaka, P. E. (2025). A comprehensive review about the use of monoclonal antibodies in cancer therapy. *Antibodies*, 14(2), 35.

Kitte, R., Rabel, M., Geczy, R., Park, S., Fricke, S., Koehl, U., Tretbar, U. S. (2023). Lipid nanoparticles outperform electroporation in mRNA-based CAR T cell engineering. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 31.

Knudson, A. G. (2002). Cancer genetics. *American journal of medical genetics*, 111(1), 96-102.

Kourti, M., Evangelidis, P., Roilides, E., Iosifidis, E. (2025). Chimeric Antigen Receptor Immunotherapy for Infectious Diseases: Current Advances and Future Perspectives. *Pathogens*, 14(8), 774.

Li, J., Liu, C., Zhang, P., Shen, L., Qi, C. (2025). Optimizing CAR T cell therapy for solid tumours: a clinical perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1-16.

Liu, J., Zhou, G., Zhang, L., Zhao, Q. (2019). Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing. *Frontiers in immunology*, 10, 456.

Parayath, N. N., Stephan, S. B., Koehne, A. L., Nelson, P. S., Stephan, M. T. (2020). In vitro-transcribed antigen receptor mRNA nanocarriers for transient expression in circulating T cells in vivo. *Nature communications*, 11(1), 6080.

Patel, K. K., Tariveranmoshabad, M., Kadu, S., Shobaki, N., June, C. (2025). From concept to cure: The evolution of CAR-T cell therapy. *Molecular Therapy*, 33(5), 2123-2140.

Ponder, B. A. (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411(6835), 336-341.

Rezaee-Zavareh, M. S., Yeo, Y. H., Wang, T., Guo, Z., Tabrizian, P., Ward, S. C., Yang, J. D. (2025). Impact of pre-transplant immune checkpoint inhibitor use on post-transplant outcomes in HCC: A systematic review and individual patient data meta-analysis. *Journal of hepatology*, 82(1), 107-119.

Sanomachi, T., Katsuya, Y., Nakatsura, T., Koyama, T. (2025). Next-Generation CAR-T and TCR-T Cell Therapies for Solid Tumors: Innovations, Challenges, and Global Development Trends. *Cancers*, 17(12), 1945.

Santomasso, B. D., Gust, J., Perna, F. (2023). How I treat unique and difficult-to-manage cases of CAR T-cell therapy-associated neurotoxicity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 141(20), 2443-2451.

Sherafat, N. S., Keshavarz, A., Mardi, A., Mohammadiara, A., Aghaei, M., Aghebati-Maleki, L., Mohammadi, M. H. (2025). Rationale of using immune checkpoint inhibitors (ICIs) and anti-angiogenic agents in cancer treatment from a molecular perspective. *Clinical and Experimental Medicine*, 25(1), 238.

Yao, R., Xie, C., Xia, X. (2024). Recent progress in mRNA cancer vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 20(1), 2307187.

Zugasti, I., Espinosa-Aroca, L., Fidyt, K., Mulens-Arias, V., Diaz-Beya, M., Juan, M., Menéndez, P. (2025). CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 210.

BÖLÜM 2

ORAK HÜCRE HASTALIĞINDA YENİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI VE GEN TERAPİSİ

ALİ KEMAL ZİREK¹

Giriş

DNA ve Genetik Hastalıklar

DNA, biyolojik dünyada çok hassas bir bilgi kopyalama ve depolama polimeridir. İnsan hücrelerinde bölünme anında DNA'larında farklı mutajen etkilerle değişiklikler meydana gelerek mutasyonlar oluşur. DNA mutasyonları organizmaya güçlü bir çevresel uyum ya da genetik hastalıklar kazandırır. Toplumlarda sık görülen genetik rahatsızlıklar; kanser, kistik fibrozis, Alzheimer, Down sendromu ve orak hücre hastalığıdır (Samir, 2024).

Hemoglobin

Hemoglobin (Hb), temel görevi oksijen taşımak olan eritrositlerin tetramerik proteinidir. İki alfa iki farklı yapı içeren insan Hb'si fetal dönem dışında her birinde demir taşıyan hem bulunan dört zincir kümelenmesinden oluşur. α globin zinciri 16. ve β globin zinciri 11. kromozomdaki globin gen topluluğu tarafından

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Hakkari Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Orcid: 0000-0002-7881-7251

kodlanır. Bebeklik döneminin başında, (Hemoglobin F) HbF'in yerini (Hemoglobin A) HbA alır. Yetişkin dönemde eritrositlerde HbA $\alpha_2\beta_2$, HbA2 $\alpha_2\delta_2$ ve HbF ise $\alpha_2\gamma_2$ globin zincir yapılarında bulunur (Firth, 2009; Hartevelde, 2014; Lidonnici vd., 2023). Hemoglobin alt birimi alfa (HBA1 ve HBA2) ve hemoglobin altbirimi beta (HBB) lokusları iki polipeptid zincirin yapısında görevli gen kümeleridir. Ayrıca HBG1 ve HBG2 γ -alt birimini, HBD δ -alt birimini, HBE1 ise ϵ -alt birimini, HBZ ζ -alt birim, HBQ1 θ -alt birim,kodlayan örnek genlerdir (Anashkina vd., 2023). α genleri 16. kromozom, β genleri 11. kromozom üzerinde bulunur. Beta globinde tek nokta mutasyonlarında orak hücreli anemi meydana gelir. Beta zincir sentezinin olmaması β^0 ve talasemiye neden olur. Beta globinin az miktarda olması ise β^+ ve talasemiye neden olur (Lidonnici vd., 2023).

Hemoglobin A

Hemoglobin A yetişkinlikte ana hemoglobindir. İki alfa ve iki beta globin zinciri olmak üzere farklı alt birimlerden ($\alpha_2\beta_2$) oluşur. Beta globin zincirlerini kodlayan tek gen, kromozom 11'in kısa kolunda *beta* globin gen kümesinde bulunur ve alfa globin zincirlerini kodlayan iki gen, kromozom 16'nın kısa kolunda α -globin gen kümesinde bulunur. HBB gen lokusunda nokta bozulmalar ile 280 kadar beta talasemi varyantı oluşmaktadır. HBA1 ve HBA2 genlerinde, alfa globin gen kümesindeki delesyonlar sonucu 100 kadar alfa talasemi varyantı oluşmaktadır (Traeger-Synodinos vd., 2015).

Hemoglobin S

Hemoglobin S, Afrika ve Akdeniz coğrafyasında bireyleri muhtemelen sıtmadan koruma amaçlı diğer alanlara göre daha yüksek izlenir. Bu avantajın yanında HbS, ciddi sorunlara yol açar. HbS, HBB geninde mutasyon geçirmiş beta-globin alellerinin kalıtımıyla meydana gelir. β -globin geninin altıncı kodonunda

GTG' nin GAG (GAG→GTG ve CTC→CAC), ile yer değiştirdiği tek bir nükleotid polimorfizmi söz konusudur. Bunun sonucunda normal beta globin geninde 6. sırasında hidrofilik glutamik asit bulunurken bunun yerine mutasyon sonucu hidrofobik bir valin gelir. Mutasyon sonucu uzun, 7 çift zincirden oluşan, 14 zincirli polimer yapılar oluşur. Bu polimerizasyonun özellikle kılcal damarlarda önemli etkileri vardır. HbS eritrositlerin doğal olarak oksijensizleşmesine ve orak, yarım ay şeklinde dönüşmesi neden olur ve 120 günlük ömürlerinin 10-20 güne düşmesinin yanında deforme, sert ve kırılğan olmalarına neden olur (Ashley-Koch vd., 2000; Rotter vd., 2005; Kanter ve Kruse-Jarres, 2013; Ware vd.,2017; Inusa vd., 2019; Sundd vd., 2019).

Orak Hücre Hastalığı

Orak hücre hastalığı (OHH), sıtmaya karşı sağladığı koruyucu etkiyle ilişkili özgün bir coğrafi dağılım sergileyen, otozomal resesif kalıtılan bir hemoglobin bozukluğudur. En sık Sahra altı Afrika, Hindistan ve Orta Doğu'da görülmekle birlikte, küresel g   hareketlerinin artmasıyla günümüzde dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Hastanın OHH ile doğabilmesi için hastalığın her iki ebeveynde bulunması şarttır. OHH, Hb beta alt birimini kodlayan HBB geninin 17. pozisyonunda tek bir nükleotid polimorfizmi ile ortaya çıkan bir hastalık grubunu kapsar ve beta-S (β^S) alelinin homozigotluğu sonucunda ortaya çıkar. Yani iki beta globin geni de mutasyona uğrar ve bu beta genlerinden biri orak hemoglobin mutasyonundan etkilenmiştir. Normal hemoglobin HbAA şeklinde dir. Heterozigot HbAS (Bir β^S alleli taşıyan bireyler sadece taşıyıcıdır, hastalık taşımaz), homozigot ise HbSS ( ki β^S/β^S alleli taşıyanlara orak hücre anemi hastaları denir) olarak ifade edilebilir. Orak hemoglobin C hastalığı (HbSC) ise hafıf hemolitik anemi ve nadir akut ve kronik komplikasyonlar veren bir β^S bir β^C aleli veya başka bir nokta mutasyonla ifade edilen genotiptir. Oksijensiz HbS

polimerleşip eritrositi sertleştirir. (Serjeant, 2010; Williams, 2016; Kato vd., 2018; Sundd vd., 2019; Ballantine ve Tisdale, 2025; Cavazzana vd., 2025; Scaramellini vd., 2025).

Patogenezi

Orak hücre hastalarında kırmızı kan hücreleri asidik ortamda deoksijenasyonda geri dönüşümlü bir şekil değişikliğine uğrar. Hücreler sertleşir, polimerizasyona uğrar ve orak biçiminde hücreler oluşur. Oksijene maruz kaldığında düzelen hücre ve zar yapısı, hastalık seyri ile sürekli maruziyette orak şeklinde kalır. Polimerizasyon ile hasta hücrelerinde HbS konsantrasyonu arttığında taktoid de denilen katı kristaller meydana getirir (İnal ve Arpacı, 2021; Humbatov, 2013).

Epidemioloji

Orak hücre anemisi dünya çapında 7.7 milyon insanı etkileyen yaygın genetik bir hastalıktır (Lancet, 2023). Dünyada en yoğun Sahra Altı Afrika'da görülür. Afrika'da her yıl yaklaşık 240.000, Güneydoğu Asya'da 43.000, Amerika'da 13.000 (çoğunluğu siyah ve Afrika kökenli Amerikalı), Akdeniz bölgesinde 10.000, Avrupa'da 3.500 yenidoğan OHH ile doğmaktadır. Yetersiz hizmet alamayan, doğurganlık oranları yüksek olan toplumlarda yaygın olan bir hastalık olduğu için bu oranlar her yıl % 13,7 civarında artmaktadır. OHH'lı erkeklerde kadınlara göre % 9 daha yaygın ölüm oranları mevcuttur. Hastalığın genç yaş ölüm sebepleri arasında septisemi, yaşlılarda ise pek çok organda hasarı vardır. Türkiye'de her 1000 kişiden yaklaşık 2-3'ü hastalık taşıyıcısı, yaklaşık 1200 hasta vardır. Antakya, Adana, İçel, Tarsus, Ceyhan, Mersin ve Kuzey Kıbrıs gibi bölgelerde her yüz kişiden 3-44'ü risk taşımaktadır (Antmen, 2009; Williams, 2016; Aytac, 2021; Bathla, 2024). Yayınlanan bir çalışmada dünya genelinde 2010'da doğan HbSS'li çocuk sayısı 312.302'dir (Ware vd.,2017).

Tanı

Bazı fenotiplerde ve taşıyıcı bireylerde klinik semptomların görülmemesi nedeniyle gözden kaçabilir. Ancak, biyokimya testlerinden HbA1c'nin HPLC yöntemi ile çalışılması sırasında HbS pikinin görülmesi ile tesadüfen hastalık tespit edilebilir. Tam kan sayımı ve periferik yaymada Hb ve Hct düşük, MCV, MCH ve MCHC normal, RDW yüksektir. Retikülositler artmıştır. Kapiller elektroforez ve HPLC yöntemi ile HbS pikinin görülmesi tanıyı moleküler olarak tespit eder. Ayrıca gap-PCR ve MLPA analizi, orak hücre hastalığı, Hb varyantları ve talasemi vakalarında kesin tanıda yardımcı olur. Tanıda deneyimli laborant, genetikçi ve hematolog teşhisi kolaylaştırır (Antmen, 2009; Harteveld vd., 2022).

HbA1c HPLC cihazı ile çalışılırken uygun mobil faz ve sabit faz ile HbS tesadüfen tespit edilebilir (Güven vd., 2011).

Komplikasyonlar

HbSS hastaları diğer genotiplere nazaran daha sık ve şiddetli orak hücre hastalığı komplikasyonları yaşamaktadır. Anemi, enfeksiyon hastalıkları, vazo-oklüzif krizler, böbrek hastalıkları gibi komplikasyonlar HbSS hastalığında daha yaygın komplikasyonlardır. HbSC'de ise şiddetli proliferatif retinopati daha yaygın görülür (Sussman vd., 2024).

Vazo-oklüzyon

Orak hücre hastalığı olan hastaların tümünde en az bir kez etkileyen epizodik bir krizdir. Orak hücre şeklini alan eritrositler kan akışını belli bölgelerde engeller ve doku hipoksisi oluşur. İskemi, ödem, ağrı, nekroz ve organ hasarı oluşur. Ağrı daha çok sırtta, göğüste veya ekstremitelerde gelişir. Fiziksel stres, enfeksiyonlar, ateş, dehidratasyon, asidoz, rüzgar hızı, soğuk, yağmur ve hava kirliliği tetikleyici faktörlerdendir. Hastaların iyi

oksijen alması, solunum semptomlarında hastaya oksijen uygulanması, normal su alması ve gerekli durumlarda intravenöz sıvı takviyesi, yemek yemesi, uyuması yararlıdır (Inusa vd., 2019; Björkman vd., 2024).

Ağrı krizleri

Vazo-oklüzif krizler veya ağrı krizleri, orak hücreli eritrositler tarafından kan damarlarının tıkanması sonucu oluşan şiddetli ağrı ataklarıdır. Daha sonra dokularda iskemi ve iltihaplanma görülür. Göğüs, karın, kemik ve eklem bölgelerinde ağrılar oluşur (Elendu vd., 2023; Taher vd., 2025).

Anemi

Eritrositlerin hızla hemolize uğraması sonucunda sarılık ve kronik hemolitik anemi gelişir. Artan bilirubin düzeyleri safra taşı oluşumuna zemin hazırlar. Anemi; yorgunluk, halsizlik, solukluk ve nefes darlığı gibi klinik bulgularla kendini gösterir. Düşük hemoglobin düzeylerine bağlı olarak gelişen doku hipoksisi ve şok tablosu oluşur (Inusa vd., 2019; Elendu vd., 2023; Taher vd., 2025).

Felç

Beyindeki kan damarları orak hücreli eritrositler tarafından tıkanır ve iskemik felce yol açar (Inusa vd., 2019; Elendu vd., 2023; Taher vd., 2025).

Organ hasarı

Orak hücre hastalığı uzun süreçte dalakta fonksiyonel aspleniye, akut böbrek hasarı, kronik böbrek hastalığına yol açar. Gözlerde retinopati, kemikler de ise avasküler nekroz riskini artırır. Ayrıca safra kesesinde bilirubin çökmesi sonucu safra taşı ve kolesistit gelişebilir (Inusa vd., 2019; Elendu vd., 2023).

Enfeksiyonlar

Orak hücreli hastalar özellikle çocukluk çağında pnömoni, menenjit ve sepsisemi benzeri ciddi bakteriyel (Pneumococcus, Meningococcus, Haemophilus influenzae, ve Salmonella gibi bakteriler) enfeksiyonlara maruz kalırlar (Meremikwu ve Okomo, 2016).

Tedavi

Akut ve kronik komplikasyonlar için ilaç ve gen terapilerinin yanında ısıtma, hidrasyon, oksijen, antibiyotik tedavisi, ağrı için opioidlerle tedavi vardır. Ciddi komplikasyonlarda, donör kan transfüzyonu veya değişim transfüzyonu ve şelasyon tedavisi önemlidir (Hardouin vd., 2023; Kabrah, 2025; Taher vd., 2025).

İlaç Tedavileri

Geri kalmış ülkelerde (Afrika gibi) OHH ile doğan çocukların % 50'i kadarı 5 yaşına gelmeden hayatını kaybeder. Gelişmiş ülkelerde ise tıbbi olanaklar sayesinde 40-45 yaşa kadar yaşam sürelerine ulaşırlar. Nitekim hastalar, kısalmış yaşam süresi boyunca ciddi semptomlar ve çok sayıda komplikasyonla mücadele etmek zorunda kalmaktadır. Hastalığın klinik yükünü azaltmada uzun süredir önemli bir yere sahip olan hidroksiüre tedavisi ve eritrosit değişim transfüzyonlarına ek olarak, son yıllarda kullanıma giren L-glutamin, crizanlizumab ve voxelotor gibi ajanların da kronik semptomların hafifletilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. OHH tedavilerinde ilk denenen ilaç 1995'te hidroksiüredir. Bu ilaç özellikle vazo-oklüzif krizlerin sıklığını yarı yarıya azaltır. Çalışmalarda HbF'yi indüklediği, nötrofil sayısını azalttığı bilinir. Böylece hastaneye yatış süreleri, ölüm sayıları ve organ hasarları azalır (Crossley vd., 2022; Cavazzana vd., 2025). L-glutamin, krizanlizumab ve vokselotor onaylı 3 yeni ilaçtır. Yapılan klinik çalışmalarda, plaseboya göre L-glutaminin, hastaneye yatışı %33

düşüdüğü ve hastanede ortalama kalış süresini de 11'den 7 güne düşürdüğü gösterilmiştir. Bunun yanında crizanlizumab, ağrı krizlerini yılda 2,98'den 1,63'e düşürdüğü, voxelotorun ise hemoglobini en az 1 g/dL artırdığı raporlanmıştır (Kavanagh vd., 2022; Newman vd., 2023).

HbF İndüksiyonu

Orak hücre hastalarında doğumdan birkaç ay sonraya kadar belirtiler ortaya çıkmaz. Bunun nedeni fetal hemoglobinin büyük kısmının henüz HbS ile değişmemiş olmasındandır. Fetal hemoglobinin kalıtsal devamlılığı (HbS/HPFH) orak hücre hastalığına nazaran görece iyidir. Yükselmiş HbF düzeyleri, HbS içeriğini azaltır ve HbS polimerizasyonunu geciktirir (Ngo, 2012; Eaton, ve Bunn, 2017). HbF Hidroksiüre birincil tedavidir. (Pecker ve Lanzkron, 2021).

Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Allogenik insan lökosit antijeni eşleşmesi gerektiren bir uygulamadır. HLA uyumlu donör bulunabilirliği, sosyokültürel ve ekonomik koşullar bu tedavi yönteminde belirleyicidir. 5 yaş altı çocuklarda ya da 5-18 yaş aralığında OHH komplikasyonlarından rahatsızlanan hastalarda greft reddi sonucunda uygulanır (Raghuraman vd., 2024; Ball vd., 2025) Kemik iliği nakli tedavisinin kısırlık, organ disfonksiyonları, tedaviyle ilişkili ölümler, enfeksiyon, greft-versus-host hastalığı (GVHD) ve greft reddi gibi nakil ile ilişkili komplikasyonlar açısından değerlendirilmesi gerekir (Buchanan vd., 2010; Gluckman vd., 2017; Orkin ve Bauer, 2019; Ball vd., 2025).

Genom Düzenleme

Gen düzenleme teknolojileri, belirli dizilerin düzeltilmesi, silinmesi, eklenmesi ve bozulması aracılığıyla hastalık nedeni genleri kalıcı olarak değiştirme prensibine dayanır. Örneğin orak

hücre hastalığı olan bir hastadan kan kök hücreleri alınıp, β -globinde hastalığa neden olan mutasyon düzeltilmesi yapılır. Yani β -globinin yerine γ -globinin ekspresyonunu aktive edilir. Genom düzenleme ile oluşturulan bu kök hücreler hastaya geri nakledilir ve bu aşamadan sonra normal fizyolojide eritrositler üretilmeye başlanır. İstem dışı nokta mutasyonlar, delesyonlar, eklemeler veya ters çevirmeler hedef dışı genom düzenlemesi açısından göz önünde bulundurulması gereken noktalardır (Park ve Bao, 2021; Hardouin vd., 2023; Lidonnici vd., 2023; Ball vd., 2025).

Gen Terapisi

Gen terapisi, kanser başta olmak üzere genetik bozukluklar ve bulaşıcı hastalıkların klinik çalışmalarında kullanılmaktadır. Viral vektörler yaygın kullanılan gen aktarım araçlarıdır. Bu amaçla retroviral ve adenoviral vektörler oldukça etkin ve güvenli terapötik gen değişimi sağlar (Arabi vd., 2022). Orak hücre hastalığında Vazo-oklüzif öyküsü olan 12 yaş ve üzeri hastalarda kullanılabilen bu tedaviler maliyetli olmasının yanında OHH hastaları için büyük bir kazanımdır. Modifikasyon ve reinfüzyon işlemleri için hastanın kemik iliği veya periferik kanından otolog hematopoietik progenitör hücreler (HSPC) toplanır ve oraklaşmayı azaltmak için ex vivo ortamda HSPC'yi genetik olarak modifiye etmek. Bu hücrelerin kemik iliğine geri infüzyonundan önce şartlandırma kemoterapisi uygulanır. Hastanın kendi öncül ve kök hücrelerinin kullanılması sonucunda Graft-versus-host hastalığı (GVHD) riskini azalır. Gen terapisinin etkinliğini HSPC doz ve kalitesi ve alıcı kemik iliği mikroçevresi belirler. Gen trapileri olarak onaylanan iki yöntem vardır. Biri Lovo-cel olarak bilinir ve orak hücrelere modifiye edilmiş β -globin geni iletmek amacıyla lentiviral bir vektör kullanır. Diğeri ise viral olmayan bir gen terapisi. Exagamglogene autotemcel (exa-cel) olarak bilinir ve otolog CD34+ hematopoietik kök ve HBSC'lerin BCL11A (HbF baskılayıcı) geninin eritroid-spesifik güçlendirici bölgesindeki ex

vivo düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR)-Cas9 sistemi yoluyla fetal hemoglobin sentezini yeniden etkinleştirir. Bu tedavilerde hastaların yaklaşık % 90'ında 12 aydan fazla süre boyunca vazo-oklüzif krizleri düzelir (Jayavaradhan ve Malik, 2018; Lancet, 2023; Lidonnici vd., 2023; Frangoul vd., 2024; Tang ve Shan, 2024; Jones vd., 2025).

Günümüz gen tedavisinde, infüzyon işleminden yaklaşık 1 ay sonra tutunma olur. Tutunma sürecinde, hastaların immün sistemi baskılanır ve transfüzyon kaynaklı GVHD riski olduğundan transfüzyon gerekli olabilir. Hastalarda ışınlanmış kan ürünleri kullanılır. Tutunma gerçekleştiğinde, terapötik gen ürünlerinin kullanımı 1-3 yıl arasında takip edilir (Tang ve Shan, 2024).

Sonuç

Orak hücre hastalığı tedavisi amacıyla yukarıda sayılan tedavilerin bir kısmı kemoterapi koşullarıyla ex vivo hücre izolasyon prosedürlerini içermektedir. Büyük bir kısmı ekonomik açıdan geri kalmış ülkelerde ulaşılmazdır. Bu açıdan daha ucuz ve ulaşılabilir gen düzenleme işlemlerinin in vivo olarak geliştirilmesi ve gerçekleştirilmesi gerekir. Bu pahalı ve komplike bir uygulama merkezi gerektirmediğinden tüm dünyada uygulanabilir olacaktır. Bununla birlikte gen terapisinin orak hücre hastalığında küratif tedavi seçeneği olması yakın gelecekte büyük kazanım olacaktır.

Kaynakça

Anashkina, A. A., Simonenko, S. Y., Orlov, Y. L., & Petrushanko, I. Y. (2023). Glutathione Non-Covalent Binding Sites on Hemoglobin and Major Glutathionylation Target betaCys93 Are Conservative among Both Hypoxia-Sensitive and Hypoxia-Tolerant Mammal Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 53.

Antmen, B. (2009). Orak hucre anemisi/sickle cell anemia. *Turkish Pediatrics Archive*, 39-43.

Arabi, F., Mansouri, V., & Ahmadbeigi, N. (2022). Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113324.

Ashley-Koch, A., Yang, Q., & Olney, R. S. (2000). Sickie hemoglobin (Hb S) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology*, 151(9), 839-845.

Aytaç, N. (2021). Oral Hücre Anemisinde Epidemiyoloji ve Bir Halk Sağlığı Sorunu Olarak Ülkemizde Durum. *Türkiye Klinikleri Pediatric Hematology and Oncology-Special Topics*, 2(1), 1-4.

Ball, J., Bradley, A., Le, A., Tisdale, J. F., & Uchida, N. (2025). Current and future treatments for sickle cell disease-from hematopoietic stem cell transplantation to in vivo gene therapy. *Molecular Therapy*.

Ballantine, J., & Tisdale, J. F. (2025). Gene therapy for sickle cell disease: recent advances, clinical trials and future directions. *Cytotherapy*, 27(7), 826-834.

Bathla, T., Lotfollahzadeh, S., Quisel, M., Mehta, M., Malikova, M., & Chitalia, V. C. (2024). End Organ Affection in Sickle Cell Disease. *Cells*, 13(11), 934.

Björkman, H., Fager Ferrari, M., Arvanitakis, A., & Kjellander, C. (2024). Sicklecellsjukdom-vanliga och farliga komplikationer. *Läkartidningen*, 121.

Buchanan, G., Vichinsky, E., Krishnamurti, L., & Shenoy, S. (2010). Severe sickle cell disease—pathophysiology and therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(1), S64-S67.

Cavazzana, M., Corsia, A., Brusson, M., Miccio, A., & Semeraro, M. (2025). Treating sickle cell disease: gene therapy approaches. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 65(1), 397-413.

Crossley, M., Christakopoulos, G. E., & Weiss, M. J. (2022). Effective therapies for sickle cell disease: are we there yet?. *Trends in Genetics*, 38(12), 1284-1298.

Eaton, W. A., & Bunn, H. F. (2017). Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(20), 2719-2726.

Elendu, C., Amaechi, D. C., Alakwe-Ojimba, C. E., Elendu, T. C., Elendu, R. C., Ayabazu, C. P., ... & Adenikinju, J. S. (2023). Understanding sickle cell disease: causes, symptoms, and treatment options. *Medicine*, 102(38), e35237.

Firth, P. G. (2009). Anesthesia and hemoglobinopathies. *Anesthesiology clinics*, 27(2), 321-336.

Frangoul, H., Locatelli, F., Sharma, A., Bhatia, M., Mapara, M., Molinari, L., ... & Grupp, S. A. (2024). Exagamglogene

Autotemcel for Severe Sickel Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 390(18), 1649-1662.

Gluckman, E., Cappelli, B., Bernaudin, F., Labopin, M., Volt, F., Carreras, J., ... & Eapen, M. (2017). Sickel cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(11), 1548-1556.

Güven, B., Can, M., & Eskici, Z. (2011). Hemoglobin varyantının HbA1c ölçümüne etkisi. *Fırat Tıp Dergisi*, 16(2), 97-99.

Hardouin, G., Magrin, E., Corsia, A., Cavazzana, M., Miccio, A., & Semeraro, M. (2023). Sickel cell disease: from genetics to curative approaches. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 24(1), 255-275.

Harteveld, C. L. (2014). State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *International journal of laboratory hematology*, 36(1), 1-12.

Harteveld, C. L., Achour, A., Arkesteijn, S. J., Ter Huurne, J., Verschuren, M., Bhagwandien-Bisoen, S., ... & Koopmann, T. T. (2022). The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *International Journal of Laboratory Hematology*, 44, 28-36.

Humbatov, S. (2023). Orak hücreli anemide demir profili. Tıpta Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.

Inusa, B. P., Hsu, L. L., Kohli, N., Patel, A., Ominu-Evbota, K., Anie, K. A., & Atoyebi, W. (2019). Sickel cell disease—

genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. *International journal of neonatal screening*, 5(2), 20.

İnal, G., & Arpacı, (2021). A. Orak Hücre Anemisinin Moleküler ve Hücresel Patofizyolojisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 19(1): 89-98.

Jayavaradhan, R., & Malik, P. (2018). Genetic therapies for sickle cell disease. *Pediatric Clinics*, 65(3), 465-480.

Jones, R. J., Kassim, A. A., Brodsky, R. A., & DeBaun, M. R. (2025). Is allogeneic transplantation for sickle cell disease still relevant in the era of gene therapy?. *Blood Advances*, 9(4), 877-883.

Kabrah, S. M. (2025). Emerging gene therapies in sickle cell disease: A comparative review of efficacy and safety against standard treatments. *Journal of Blood Medicine*, 493-507.

Kanter, J., & Kruse-Jarres, R. (2013). Management of sickle cell disease from childhood through adulthood. *Blood reviews*, 27(6), 279-287.

Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., ... & Vichinsky, E. P. (2018). Sickle cell disease. *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 1-22.

Kavanagh, P. L., Fasipe, T. A., & Wun, T. (2022). Sickle cell disease: a review. *Jama*, 328(1), 57-68.

Lancet, T. (2023). The promise of genetic therapies in sickle cell disease. *Lancet (London, England)*, 402(10419), 2265.

Lidonnici, M. R., Scaramuzza, S., & Ferrari, G. (2023). Gene therapy for hemoglobinopathies. *Human Gene Therapy*, 34(17-18), 793-807.

Meremikwu, M. M., & Okomo, U. (2016). Sick cell disease. *BMJ Clinical Evidence*, 2016.

Newman, T. V., Yang, J., Suh, K., Jonassaint, C. R., Kane-Gill, S. L., & Novelli, E. M. (2023). Use of disease-modifying treatments in patients with sickle cell disease. *JAMA Network Open*, 6(11), e2344546-e2344546.

Ngo, D. A., Aygun, B., Akinsheye, I., Hankins, J. S., Bhan, I., Luo, H. Y., ... & Chui, D. H. (2012). Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *British journal of haematology*, 156(2), 259-264.

Orkin, S. H., & Bauer, D. E. (2019). Emerging genetic therapy for sickle cell disease. *Annual review of medicine*, 70(1), 257-271.

Park, S. H., & Bao, G. (2021). CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science*, 60(1), 103060.

Pecker, L. H., & Lanzkron, S. (2021). Sick cell disease. *Annals of internal medicine*, 174(1), ITC1-ITC16.

Raghuraman, A., Lawrence, R., Shetty, R., Avanthika, C., Jhaveri, S., Pichardo, B. V., & Mujakari, A. (2024). Role of gene therapy in sickle cell disease. *Disease-a-Month*, 70(7), 101689.

Rotter, M. A., Kwong, S., Briehl, R. W., & Ferrone, F. A. (2005). Heterogeneous nucleation in sickle hemoglobin: experimental validation of a structural mechanism. *Biophysical journal*, 89(4), 2677-2684.

Samir, S. (2024). Human DNA Mutations and their Impact on Genetic Disorders. *Recent Patents on Biotechnology*, 18(4), 288-315.

Scaramellini, N., Panzieri, D. L., Cappellini, M. D. (2025). Gene therapy for sickle cell disease and thalassemia. *Current Opinion in Hematology*, 32(3), 120-129.

Serjeant, G. R. (2010). One hundred years of sickle cell disease. *British journal of haematology*, 151(5), 425-429.

Sundd, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2019). Pathophysiology of sickle cell disease. *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 14(1), 263-292.

Sussman, R. G., Mburu, J., Steele, M., Bang, A., Friedman, J., Goldman, R., ... & Kahr, W. H. (2024). Constitutive hypercoagulability in pediatric sickle cell disease patients with hemoglobin SS genotype. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 8(3), 102374.

Taher, M., Aminondin, A. S., Nasir, N. A., Jasmadi, N. A., Nizam, N. I., Bin Shahrul, I. S., Salahuddin Haris, M. (2025). Sickle cell disease: understanding pathophysiology, clinical features and advances in gene therapy approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1630994.

Tang, M. S., & Shan, H. (2024). Current state of gene therapy in sickle cell disease. *Vox Sanguinis*, 119(6), 521-528.

Traeger-Synodinos, J., Hartevelde, C. L., Old, J. M., Petrou, M., Galanello, R., Giordano, P., ... & May, A. (2015). EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the

haemoglobinopathies. *European Journal of Human Genetics*, 23(4), 426-437.

Ware, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sick cell disease. *The Lancet*, 390(10091), 311-323.

Williams, T. N. (2016). Sick cell disease in sub-Saharan Africa. *Hematology/Oncology Clinics*, 30(2), 343-358.

BÖLÜM 3

Gıda Güvenliğinde Genetik Analizlerin Geleceği: Potansiyeller, Sınırlılıklar ve Bilimsel Gerçeklik

Mustafa AY¹

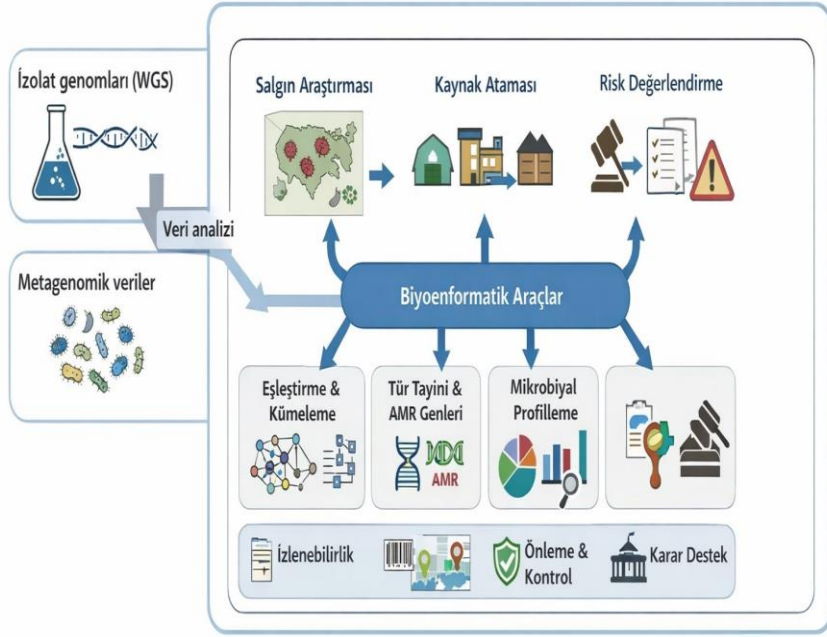
Giriş

Gıda güvenliği, uzun yıllar boyunca kültürel yöntemler, mikrobiyolojik sayımlar ve kimyasal analizler üzerine temellenmiş klasik bir yaklaşım izlemiştir. Ancak artan küresel ticaret, karmaşıklaşan tedarik zincirleri ve gıda kaynaklı salgınların çeşitlenmesi, daha hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip analiz tekniklerine olan gereksinimi artırmıştır (Scallan & ark., 2011). Bu bağlamda moleküler biyoloji ve genetik analizler, gıda güvenliğinde dönüşüm yaratan teknolojiler olarak öne çıkmaya başlamıştır.

Genetik testlerin gıda alanına entegrasyonu özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) keşfinden sonra hız kazanmış, 2000’li yıllarla birlikte gerçek zamanlı PZR (qPZR) (Heid & ark., 1996), DNA barkodlama (Hebert & ark., 2003), mikrodizi bazlı platformlar ve tam genom dizileme (Whole Genome Sequencing; WGS) gibi yöntemlerin yaygınlaşmasıyla büyük bir ivme kazanmıştır. Günümüzde metagenomik (Quince & ark., 2017), dijital PZR (Hindson & ark., 2011), CRISPR-tabanlı tespit sistemleri (Gootenberg & ark., 2017) ve taşınabilir sekanslama teknolojileri (Oxford Nanopore) gıda güvenliği laboratuvarlarında giderek daha fazla kullanılmaktadır.

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Teknolojisi Bölümü
Orcid: 0000-0002-1765-4858

Şekil 1: Gıda Güvenliğinde Genomik ve Metagenomik Yaklaşımların risk Değerlendirme, İzlenebilirlik ve Karar Destek Süreçlerindeki Yeri



EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2019'dan uyarlanmıştır.

Genetik testlerin gıda güvenliğinde önem kazanmasının başlıca nedenleri arasında; hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllük, kaynak doğrulama, gıda hileciliğinin tespiti, antimikrobiyal direnç izleme ve mikrobiyal ekosistemin bütüncül analizi yer almaktadır (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019; FDA, 2020). Ayrıca ISO 23418, ISO 16140 ve benzeri standartların yayımlanması, moleküler yöntemlerin validasyonu ve gıda güvenliği yönetim sistemlerine entegrasyonu için güçlü bir regülasyon zemini oluşturmuştur.

Bununla birlikte genetik analizler sınırsız değildir. Gıda matrislerinde DNA izolasyonunu zorlaştıran inhibitörler (Schrader & ark., 2012), ölü hücre DNA'sının yanlış pozitif sonuçlara yol açması (Emerson & ark., 2017), metagenomik verilerin yorumlanmasındaki karmaşıklık (Billington & ark., 2022), laboratuvarlar arası standardizasyon eksikliği ve yüksek maliyetler, bu teknolojilerin gıda sektöründe rutin kullanımını kısıtlamaktadır.

Bu kitap bölümü, genetik analizlerin gıda güvenliği alanındaki mevcut durumunu potansiyeller, sınırlılıklar ve bilimsel gerçeklik ekseninde ele almayı amaçlamaktadır. İlk olarak temel uygulama alanları sistematik olarak sunulacak, ardından güçlü yönler ve teknik kısıtlılıklar bilimsel açıdan tartışılacaktır. Son olarak düzenleyici boyut ve geleceğe yönelik teknolojik eğilimler değerlendirilerek gıda güvenliğinde genetik analizlerin gerçekçi bir çerçevede nasıl konumlanması gerektiğine yönelik kapsamlı bir değerlendirme yapılacaktır.

Genetik Testlerin Gıda Güvenliğindeki Temel Uygulama

Alanları

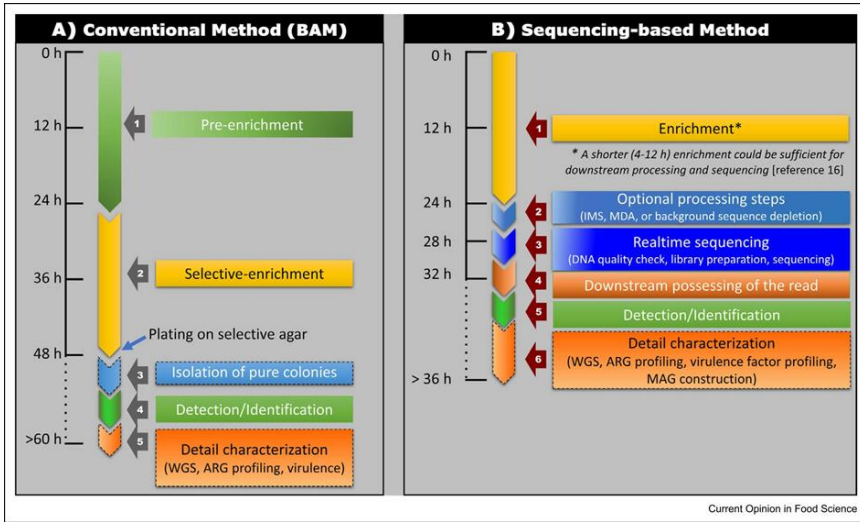
Genetik analizler, gıda güvenliği alanında biyolojik risklerin tanımlanması, izlenmesi ve kontrol altına alınmasında merkezi bir konuma sahiptir. Moleküler biyoloji temelli bu yaklaşımlar, klasik kültür ve fenotipik yöntemlerin zaman, duyarlılık ve kültüre edilebilirlik gibi sınırlılıklarını aşarak patojen mikroorganizmaların hızlı tespiti, ürünlerin tür ve orijin doğrulaması, gıda hileciliğinin ortaya çıkarılması ve toksijenik potansiyelin değerlendirilmesi gibi kritik alanlarda önemli avantajlar sunmaktadır. Ayrıca fermente gıdalar ve probiyotik ürünlerde suş düzeyinde tanımlamaya olanak tanınması, genetik testleri yalnızca güvenlik değil, kalite ve süreç kontrolü açısından da vazgeçilmez kılmaktadır. Bununla birlikte, her uygulama alanı kullanılan yöntemin teknik kapasitesi, biyolojik bağlamı ve elde edilen verilerin risk değerlendirme süreçlerine entegrasyonu dikkate alınarak ele alınmalıdır. Bu bölümde genetik testlerin gıda güvenliğindeki başlıca uygulama alanları, olanakları ve sınırlılıkları birlikte değerlendirilmektedir (Law, 2015; Quince, 2017; Jagadeesan & ark., 2019; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Patojen ve Bozulma Mikroorganizmalarının Tespiti

Patojen ve bozulma mikroorganizmalarının hızlı ve güvenilir biçimde tespiti, gıda güvenliğinde risk yönetiminin temelini oluşturmaktadır. Klasik kültür temelli yöntemler yüksek özgüllük sunmakla birlikte uzun analiz süreleri ve bazı mikroorganizmaların kültüre edilememesi nedeniyle uygulamada önemli sınırlılıklar taşımaktadır. Bu nedenle PZR ve türevlerine dayalı genetik yöntemler, son otuz yılda gıda mikrobiyolojisinde temel tespit araçları hâline gelmiştir (Law, 2015).

Konvansiyonel PZR ve gerçek zamanlı PZR (qPZR), *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Campylobacter spp.* gibi başlıca gıda kaynaklı patojenlerin hızlı ve özgül tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle qPZR, kantitatif veri sağlaması ve kapalı sistem yapısı sayesinde resmi kontrol analizlerinde tercih edilmektedir (Hoorfar, 2003). Bununla birlikte gıda matrislerine özgül PZR inhibitörleri ve ölü hücrelere ait DNA'nın amplifikasyonu, sonuçların yorumlanmasında dikkate alınması gereken sınırlılıklar arasında yer almaktadır.

Şekil 2: Gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde konvansiyonel (BAM) ve sekanslama temelli yöntemlerin karşılaştırmalı iş akışı.



Banerjee, G., Agarwal, S., Marshall, A., Jones, D. H., Sulaiman, I. M., Sur, S., & Banerjee, P. (2022). Application of advanced genomic tools in food safety rapid diagnostics: Challenges and opportunities. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100886. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100886>

Dijital PZR (dPZR), düşük hedef kopya sayılarının tespiti ve mutlak kantitasyon gerektiren uygulamalarda önemli bir tamamlayıcı yöntem olarak öne çıkmaktadır. Reaksiyonun çok sayıda mikro bölmeye ayrılması sayesinde standart eğrilere ihtiyaç duymadan mutlak DNA miktarının belirlenebilmesi, özellikle kompleks gıda matrislerinde doğruluğu artırmaktadır (Huggett, 2013).

Yeni nesil dizileme (NGS) temelli metagenomik yaklaşımlar ise hedefe yönelik analizlerin ötesine geçerek gıda örneklerindeki tüm mikrobiyal topluluğun eş zamanlı olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Shotgun metagenomik analizler, patojenler, bozulma mikroorganizmaları ve potansiyel virülans genlerinin birlikte incelenmesini mümkün kılmaktadır (Quince, 2017). Ancak DNA varlığı ile canlı ve risk oluşturan mikroorganizma varlığı arasındaki ayrımın yapılamaması, kantitatif eşiklerin belirsizliği ve biyoinformatik standartların eksikliği, bu yaklaşımların rutin uygulamalardaki temel sınırlılıklarıdır (Jagadeesan & ark., 2019; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Ürün Orijininin ve Tür Doğrulamanın Genetik Temeli

Küresel ticaretin ve karmaşık tedarik zincirlerinin artması, ürün orijini ve tür kimliğinin doğru biçimde belirlenmesini gıda güvenliği açısından kritik bir gereklilik hâline getirmiştir. Tür yanlış etiketleme ve ekonomik motivasyonlu hileler, yalnızca tüketici güvenliğini zedelemekle kalmayıp alerjen riski ile etik ve dini hassasiyetler açısından da ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Bu bağlamda genetik analizler, morfolojik ve kimyasal yöntemlere kıyasla daha yüksek özgüllük sunmaktadır (Haider & ark., 2012). DNA barkodlama, tür doğrulamada en yaygın kullanılan yaklaşımlardan biridir. Hayvansal gıdalarda mitokondriyal COI geni, bitkisel ürünlerde ise rbcL ve matK genleri sıklıkla hedeflenmektedir (Hebert, 2003). Mitokondriyal DNA'nın yüksek kopya sayısı, özellikle işlenmiş gıdalarda yöntemin başarısını artırmaktadır. Bununla birlikte, yakın akraba türlerin ayrımı ve çok bileşenli ürünlerde barkodlama sınırlı kalabilmektedir.

Bu nedenle tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP) dayalı yöntemler, tür düzeyinin ötesinde popülasyon yapısı ve coğrafi köken bilgisi sunarak özellikle et ve balık ürünlerinde ileri izlenebilirlik uygulamalarında önem kazanmıştır (Ogden, 2010; Nielsen & ark., 2012). Ayrıca metabarkodlama yaklaşımları, çoklu tür içeren gıdalarda eş zamanlı tespit olanağı sağlamaktadır; ancak referans veri tabanlarının kapsamı ve kantitatif güvenilirlik hâlen tartışma konusudur (Staats & ark., 2016; Jagadeesan & ark., 2019).

Gıda Hileciliğinin Genetik İzlenmesi

Gıda hileciliği, ürün bileşiminin veya etiket bilgilerinin kasıtlı olarak değiştirilmesini içeren karmaşık bir risk alanıdır. Bu bağlamda genetik izleme, yalnızca tür doğrulamasına değil, beklenmeyen veya gizlenmiş bileşenlerin saptanmasına odaklanmaktadır (Spink & Moyer, 2011).

qPZR ve dPZR tabanlı yaklaşımlar, hedef DNA'nın kantitatif olarak belirlenmesine olanak tanıyarak iz düzeyindeki kontaminasyon ile kasıtlı adulterasyonun ayırımında kritik rol oynamaktadır (Floren & ark., 2015; Köppel & ark., 2020). Bal, süt ürünleri ve baharatlar gibi kompleks gıdalarda ise polen DNA profilleri veya beklenmeyen bitkisel/hayvansal DNA desenleri dolaylı genetik göstergeler olarak değerlendirilebilmektedir (Galimberti & ark., 2013; Staats & ark., 2016).

Metabarkodlama yaklaşımları çoklu türlerin eş zamanlı tespitiinde yüksek duyarlılık sağlamakla birlikte, "DNA tespiti" ile "ekonomik açıdan anlamlı hile" arasındaki sınırın net biçimde tanımlanamaması nedeniyle resmi denetim süreçlerinde temkinli kullanılmaktadır (Jagadeesan & ark., 2019).

Toksijenik Suşların Belirlenmesi ve Mikotoksin Riskinin

Öngörüsü

Mikotoksinler, düşük konsantrasyonlarda dahi ciddi toksik etkilere sahip olup gıda güvenliği açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Genetik analizler, toksin üretme potansiyeline sahip mikroorganizmaların erken aşamada tanımlanmasına olanak tanıyarak kimyasal analizleri tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir (Pitt & Miller, 2017: 45).

Aflatoksinler için afl, fumonisinler için fum ve trikotekenler için tri gen kümeleri, toksijenik suçların belirlenmesinde yaygın olarak hedeflenmektedir. Ancak bu genlerin varlığı, gerçek toksin üretimini garanti etmemekte; yalnızca potansiyel risk hakkında bilgi sunmaktadır (Vegi & Wolf-Hall, 2013: 12). Toksijenik potansiyelin genetik olarak belirlenmesi, mikotoksin üretiminin her koşulda gerçekleşeceği anlamına gelmemektedir. Nitekim, *Fusarium* türlerinde deoksinivalenol üretiminin, toksin biyosentez genlerinin varlığından ziyade sıcaklık, su aktivitesi ve çevresel stres koşullarına

bağlı gen ekspresyon dinamikleriyle şekillendiğini göstermiştir. (Schmidt-Heydt & ark., 2011: 121-123)

Metagenomik yaklaşımlar küf topluluklarını ve toksijenik gen repertuarını eş zamanlı değerlendirebilse de, canlılık ve gen ekspresyonu hakkında doğrudan bilgi sağlamamaktadır (Jagadeesan & ark., 2019: 8). Bu nedenle genetik verilerin kimyasal toksin analizleriyle birlikte yorumlanması gerekmektedir (EFSA CONTAM Panel, 2020: 15).

Fermente Gıdalar ve Probiyotiklerde Suş Düzeyi Tanımlama

Fermente gıdalar ve probiyotik ürünlerde mikrobiyal varlık, ürün kalitesi ve fonksiyonel özelliklerin temel belirleyicisidir. Bu ürünlerde tür düzeyindeki tanımlamalar çoğu zaman yetersiz kalmakta; sağlık iddiaları ve güvenlik değerlendirmeleri suş düzeyinde doğrulama gerektirmektedir (Hill & ark., 2014: 12; Marco & ark., 2017: 8).

Tam genom dizileme (WGS), suş düzeyi ayırt edicilik sağlamasının yanı sıra antibiyotik direnç genleri ve virülans faktörlerinin değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Bu yönüyle WGS, kalite ve güvenlik unsurlarını aynı çerçevede ele alan güçlü bir araçtır (Salveti & ark., 2016; Salvetti & ark., 2018; EFSA BIOHAZ Paneli, 2018: 9). Metagenomik yaklaşımlar fermentasyon dinamiklerini izleyebilse de, çoğu durumda suş düzeyinde kesin ayırım için WGS veya kültür temelli analizlerle desteklenmesi gerekmektedir (Ercolini, 2013: 5).

Sonuç olarak fermente gıdalar ve probiyotiklerde genetik analizler, yalnızca risklerin sınırlandırılmasına değil, ürün standardizasyonunun sağlanmasına ve fonksiyonel iddiaların bilimsel temellere dayandırılmasına da katkı sunmaktadır. Ancak genetik verilerin bağlamından koparılarak pazarlama amaçlı kullanılmaması, bilimsel güvenilirliğin korunması açısından kritik öneme sahiptir.

Genetik Analizlerin Gıda Güvenliğindeki Güçlü Yönleri Ve Potansiyel Katkıları

Genetik analiz temelli yaklaşımlar, gıda güvenliği alanında klasik kültür temelli ve kimyasal yöntemlere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajların temelinde, moleküler biyoloji tekniklerinin sağladığı yüksek hassasiyet, özgülük ve hız

yer almaktadır. Özellikle PZR ve türevleri, düşük düzeyde kontaminasyon içeren örneklerde dahi hedef mikroorganizmanın güvenilir biçimde tespit edilmesine olanak tanımış; bu durum, gıda güvenliğinde erken uyarı yaklaşımlarının bilimsel temelini güçlendirmiştir (Law, 2015; ISO 22174:2019).

Genetik testlerin en belirgin güçlü yönlerinden biri, patojenlerin ürün henüz piyasaya sunulmadan önce saptanabilmesine imkân tanıyarak risk yönetimini daha proaktif bir yapıya dönüştürmesidir. Erken tespit, halk sağlığı risklerinin azaltılmasının yanı sıra, geri çağırma maliyetlerinin düşürülmesi ve üretim zincirinde hızlı müdahale açısından da kritik bir rol oynamaktadır. Bu yönüyle moleküler yöntemler, reaktif kontrol yaklaşımlarının ötesine geçen modern gıda güvenliği stratejilerinin uygulanmasını desteklemektedir.

Genetik analizlerin sunduğu bir diğer önemli katkı, kaynağa kadar geri izleme kapasitesidir. Özellikle tüm genom dizileme (WGS) ve suş düzeyi genotipleme yaklaşımları, kontaminasyon olaylarının üretim zinciri boyunca yüksek ayırt edici güçle izlenebilmesini mümkün kılmaktadır. Bu yöntemler, gıda kaynaklı salgınların araştırılmasında patojenlerin kaynak atamasını kolaylaştırmakta ve epidemiyolojik analizlerin çözünürlüğünü önemli ölçüde artırmaktadır (Allard & ark., 2016; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Bu yüksek çözünürlüklü izlenebilirlik, küresel gıda ticaretinde güvenilirlik ve şeffaflık açısından da dikkate değer bir potansiyel sunmaktadır. Uluslararası ticarete analiz sonuçlarının ülkeler arasında karşılaştırılabilir olması büyük önem taşımaktadır. Genetik testlere dayalı doğrulama yaklaşımları, standartlaştırılabilir ve objektif veri üretimi sayesinde ticari anlaşmazlıkların çözümünde ve tüketici güveninin güçlendirilmesinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Van Belkum & ark., 2007).

Son yıllarda genetik verilerin dijital altyapılarla entegrasyonu, bu yöntemlerin potansiyelini daha da artırmıştır. Yüksek hacimli genomik verilerin biyoinformatik ve yapay zekâ tabanlı analizlerle değerlendirilmesi, gıda güvenliğinde karar destek sistemlerinin gelişimine katkı sağlamaktadır. Bu bağlamda genetik testler, yalnızca birer analiz aracı değil; dijital gıda güvenliği

sistemlerinin merkezinde yer alan veri üretim platformları olarak değerlendirilmektedir (FDA, 2020; FAO, 2022; WHO, 2022).

Sonuç olarak, genetik analizler gıda güvenliği alanında hız, hassasiyet ve izlenebilirlik açısından güçlü bir potansiyel sunmaktadır. Ancak bu potansiyelin gerçek değeri, teknolojinin bilimsel sınırlarının doğru tanımlanması ve elde edilen verilerin uygun bağlamda yorumlanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bir sonraki bölümde ele alınacak sınırlılıklar, bu güçlü yönlerin neden her koşulda sorunsuz biçimde uygulanamadığını daha net biçimde ortaya koyacaktır.

Gıda Güvenliği Analizlerinde Kullanılan En Yaygın Genetik Testler

Gıda güvenliği alanında genetik temelli analizler, patojenlerin hızlı, hassas ve özgül biçimde tespit edilmesine olanak tanıyarak klasik kültür yöntemlerinin önemli sınırlılıklarını aşmaktadır. Günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan yöntemler arasında kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR), dijital damlacık PZR (ddPZR) ve tüm genom dizileme (Whole Genome Sequencing, WGS) öne çıkmaktadır. Bu yöntemler; duyarlılık, uygulama süresi, maliyet ve sağladıkları bilgi derinliği açısından birbirinden belirgin şekilde ayrılmaktadır.

qPZR (Real-Time PZR); gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında rutin analizlerin bel kemiğini oluşturan yöntemdir. Floresan prob veya boyalar (ör. TaqMan®, SYBR Green) kullanılarak amplifikasyonun eş zamanlı izlenmesine olanak tanır ve hedef DNA'nın kantitatif olarak belirlenmesini sağlar. qPZR'nin gıda güvenliği açısından başlıca avantajları; yüksek analitik hassasiyet (10^1 – 10^2 kopya düzeyi), hızlı sonuç süresi (3–4 saat), ISO ve uluslararası standartlara entegrasyonunun kolay olması ve patojen tarama, alerjen tespiti, tür doğrulama ve GDO analizlerinde yaygın kullanımı olarak sıralana bilir. Bununla birlikte qPZR sonuçları; PZR inhibitörleri, yalancı pozitiflik ve ölü hücrelerden kaynaklanan DNA varlığı gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (Schrader & ark., 2012; Cangelosi & Meschke, 2014). Bu durum, özellikle gıda matrislerinin karmaşık olduğu örneklerde metodolojik dikkat gerektirmektedir.

ddPZR (Dijital Damlacık PZR); PZR reaksiyonunun binlerce mikrodamlacığa bölünmesi prensibine dayanır ve standart eğriye ihtiyaç duymadan mutlak DNA kantifikasyonu sağlar. qPZR'ye kıyasla: düşük kopya sayılarına karşı daha yüksek hassasiyet sahiptir, PZR inhibitörlerine karşı daha yüksek toleransa sahiptir, kantitatif belirsizliğin azaltılması gibi avantajlar sunmaktadır. (Hindson & ark., 2011; Huggett & ark., 2013). Bu özellikleri sayesinde ddPZR, özellikle doğrulama çalışmaları, referans analizler ve kritik regülasyon uygulamalarında tercih edilmektedir. Ancak ekipman ve sarf maliyetlerinin yüksekliği, ddPZR'nin rutin kullanımını sınırlandırmaktadır.

WGS (Whole Genome Sequencing); gıda kaynaklı patojenlerin genom düzeyinde karakterizasyonunu mümkün kılarak suş düzeyinde ayırım, virülans profili, antimikrobiyal direnç genleri ve epidemiyolojik ilişkilendirme gibi ileri düzey bilgiler sunar. WGS'nin gıda güvenliğindeki başlıca kullanım alanları: salgın araştırmaları, kaynak izleme (traceability), risk değerlendirme ve sürveyans sistemleri olarak özetlenebilir (Allard & ark., 2016; EFSA BIOHAZ Panel, 2019). Buna karşın WGS, yüksek maliyet, uzun analiz süresi ve ileri biyoinformatik altyapı gereksinimi nedeniyle rutin tarama aracı olmaktan ziyade stratejik bir analiz yöntemi olarak konumlanmaktadır.

Şekil 3: qPZR-ddPZR-WGS Yöntemlerinin Hassasiyet, Maliyet, Analiz Süresi ve Uygulama Alanları Açısından Karşılaştırılması

	qPCR (Real-Time PCR)	ddPCR (Dijital Damlacık PCR)	WGS (Whole Genome Sequencing)
Hassasiyet			
Maliyet			
Analiz Süresi	 3-4 sa	 5-6 sa	 24-72 sa
Uygulama Alanı	✓ Patojen tarama ✓ Alerjen ve GDO analizleri	✓ Doğrulama çalışmaları ✓ Referans analizler	✓ Epidemiyoloji ✓ Direnç ve virülens profili ✓ Salgın araştırmaları

Gıda güvenliği analizlerinde yaygın kullanılan PZR kitleri ve üretici firmalardan bazıları şu şekilde sıralana bilir.

- **Thermo Fisher Scientific**
(TaqMan® Pathogen Detection Kits, SureTect™ platformu)
- **Bio-Rad Laboratories**
(iQ-Check®, ddPZR™ sistemleri)
- **QIAGEN**
(Mericon®, artus® gıda patojen kitleri)
- **Roche Diagnostics**
(LightCycler® gıda güvenliği çözümleri)
- **Merck / Sigma-Aldrich**
(qPZR master mix ve moleküler biyoloji reaktifleri)

Gıda güvenliği laboratuvarlarında kullanılan ticari qPZR kitleri genellikle hız, validasyon ve regülasyon uyumluluğu kriterlerine göre seçilmektedir.

Bu kitlerin büyük bölümü ISO 22174, AOAC ve EFSA rehberleriyle uyumlu olacak şekilde geliştirilmiş olup, gıda endüstrisi ve resmi kontrol laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (AOAC, 2020; ISO, 2019).

PZR Primer ve Prob Sistemlerinin Gıda Analizlerindeki Önemi

PZR temelli analizlerde kullanılan primer ve prob tasarımları, yöntemin hassasiyeti, özgüllüğü ve gıda matrisleri gibi karmaşık örneklerdeki güvenilirliği üzerinde doğrudan belirleyici rol oynamaktadır. Gıda analizlerinde sıklıkla karşılaşılan düşük hedef konsantrasyonu, PZR inhibitörleri ve karmaşık mikrobiyal arka plan, yalnızca amplifikasyon verimliliğini değil, elde edilen sinyalin biyolojik anlamlılığını da kritik hâle getirmektedir. Bu nedenle floresans temelli tespit sistemlerinin seçimi, analitik başarının temel unsurlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Postollec & ark., 2011).

Gerçek zamanlı PZR uygulamalarında en yaygın iki floresans temelli yaklaşım SYBR Green ve prob bazlı (özellikle TaqMan) sistemlerdir. SYBR Green, çift sarmallı DNA'ya bağlanarak floresans sinyal üretmesi nedeniyle maliyet açısından avantajlı ve yöntem kurulumu açısından basit bir yaklaşımdır. Ancak bu boyanın tüm çift sarmallı DNA yapılarına bağlanması, primer-

dimer oluşumu veya özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin de sinyal üretmesine yol açabilmektedir. Bu durum, özellikle gıda matrikslerinden elde edilen karmaşık DNA ekstraktlarında yalancı pozitiflik riskini artırmaktadır (Bustin & ark., 2009).

Buna karşılık, TaqMan prob sistemleri, hedef dizinin özgül bir bölgesine bağlanan ve 5'–3' ekzonükleaz aktivitesi ile sinyal üreten proplar sayesinde çok daha yüksek analitik özgüllük sunmaktadır. Probun yalnızca doğru hedef amplifiye edildiğinde parçalanması ve floresans sinyal oluşturmaları, gıda analizlerinde kritik öneme sahip olan yanlış pozitif sonuçların azaltılmasına katkı sağlamaktadır. Bu özellik, regülasyonel analizlerde ve resmi kontrol uygulamalarında prob bazlı qPZR yöntemlerinin tercih edilmesinin temel nedenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır (ISO, 2019; EFSA BIOHAZ Panel, 2019).

Multiplex qPZR yaklaşımları, farklı hedeflerin aynı reaksiyon içinde farklı floresans kanalları kullanılarak eş zamanlı tespitine olanak sağlamaktadır. Bu yöntem, analiz süresinin kısaltılması, örnek başına maliyetin düşürülmesi ve özellikle gıda patojenlerinin birlikte izlenmesi gereken durumlarda operasyonel avantaj sağlamaktadır. Ancak multiplex sistemlerin başarısı, primer ve prob tasarımlarının birbirleriyle etkileşime girmeyecek şekilde optimize edilmesine ve floresans spektrumlarının net biçimde ayrılmasına bağlıdır. Bu nedenle multiplex qPZR, SYBR Green tabanlı yaklaşımlara kıyasla prob bazlı sistemlerle daha güvenilir sonuçlar sunmaktadır (Hoorfar & ark., 2004).

Gıda matrikslerinde yaygın olarak bulunan yağlar, proteinler, polisakkaritler ve fenolik bileşikler gibi PZR inhibitörleri, amplifikasyon kinetiğini ve floresans sinyal yoğunluğunu olumsuz etkileyebilmektedir. Prob bazlı sistemler, yalnızca amplifikasyon varlığına değil, hedefe özgü sinyal oluşumuna dayandıkları için bu tür inhibitörlerin neden olduğu belirsizlikleri daha iyi tolere edebilmektedir. Bu bağlamda, prob sistemleri gıda güvenliği analizlerinde yalnızca analitik hassasiyet açısından değil, sonuçların yorumlanabilirliği ve regülasyonel kabulü açısından da önemli avantajlar sunmaktadır (Wilson, 1997; Demeke & Jenkins, 2010).

Sonuç olarak, gıda analizlerinde kullanılan PZR yöntemlerinin başarısı, yalnızca cihaz teknolojisine değil, primer ve prob sistemlerinin bilinçli seçimine dayanmaktadır. SYBR Green

yaklaşımları tarama amaçlı analizlerde pratik bir seçenek sunarken, prob bazlı qPZR ve multiplex sistemler, özgüllük, doğrulama gücü ve resmi analizlere uygunluk açısından daha güvenilir çözümler olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle gıda güvenliği uygulamalarında karar verilirken, floresans temelli sistemlerin biyolojik ve analitik sınırlılıkları birlikte değerlendirilmelidir.

Sınırlılıklar: Teknik Operasyonel ve Bilimsel Engeller

Genetik testler, gıda güvenliği alanında önemli bir potansiyel sunmakla birlikte, bu teknolojilerin yaygın ve güvenilir biçimde uygulanmasının önünde ciddi teknik ve bilimsel sınırlılıklar bulunmaktadır. Literatürde genetik analizlerin çoğu zaman “hızlı ve kesin çözümler” olarak sunulduğu görülse de, uygulamada karşılaşılan sorunlar bu yaklaşımın pratikte her zaman geçerli olmadığını ortaya koymaktadır (Hoorfar, 2011).

Bu sınırlılıkların başında, gıda örneklerinin karmaşık yapısından kaynaklanan matris etkileri ve PZR inhibitörleri gelmektedir. Yağ, protein, polisakkaritler, fenolik bileşikler ve işleme sırasında oluşan yan ürünler, DNA izolasyonu ve amplifikasyon verimliliğini olumsuz etkileyebilmekte; bu durum yalancı negatif sonuçlara veya kantitatif hatalara yol açabilmektedir (Wilson, 1997; Schrader & ark., 2012). Dolayısıyla genetik testlerin analitik performansı, çoğu zaman hedef mikroorganizmadan ziyade gıda matrisinin özellikleri tarafından belirlenmektedir.

Bir diğer önemli sınırlılık, ölü hücrelere ait DNA'nın tespit edilmesi sonucu ortaya çıkan yanlış pozitiflik problemi. PZR ve dizileme temelli yöntemler, canlı ve ölü hücreler arasında ayırım yapmaksızın genetik materyali saptamaktadır. Bu durum, özellikle ısıl işlem uygulanmış veya dekontamine edilmiş ürünlerde, analitik sonuçlar ile gerçek halk sağlığı riski arasında anlamlı bir uyumsuzluk yaratabilmektedir (Nocker & ark, 2009). Bu nedenle genetik test sonuçlarının, doğrudan risk göstergesi olarak yorumlanması bilimsel açıdan dikkat gerektirmektedir.

Metagenomik yaklaşımlar, mikrobiyal toplulukların daha kapsamlı biçimde analiz edilmesine olanak tanısa da, veri yorumlama sürecinin karmaşıklığı önemli bir engel oluşturmaktadır. Bir gıda örneğinde patojen DNA'sının varlığı, her zaman halk sağlığı açısından anlamlı bir risk bulunduğu anlamına

gelmemektedir. Kantitatif eşiklerin belirsizliği, canlılık bilgisi eksikliği ve bağlamdan kopuk yorumlar, metagenomik sonuçların yanlış veya abartılı biçimde değerlendirilmesine yol açabilmektedir (Quince & ark., 2017).

Genetik testlerin yaygın kullanımını sınırlayan bir diğer faktör ise standartlaşma ve validasyon eksikliğidir. Farklı laboratuvarlarda kullanılan DNA izolasyon protokolleri, primer setleri, biyoinformatik analiz veri bankaları ve değerlendirme eşikleri, sonuçlar arasında önemli değişkenlik yaratabilmektedir. Bu durum, özellikle resmi kontroller ve hukuki süreçler açısından genetik verilerin güvenilirliğini tartışmalı hâle getirmektedir (Van Belkum & ark., 2007; ISO 22174:2019).

Son olarak, genetik analizlerin maliyet ve erişilebilirlik boyutu da göz ardı edilemez bir sınırlılıktır. Yüksek altyapı gereksinimi, uzman personel ihtiyacı ve veri analizine ilişkin maliyetler, özellikle küçük ve orta ölçekli işletmelerin bu teknolojilere erişimini zorlaştırmaktadır. Bu durum, genetik testlerin gıda sektöründe eşit ve sürdürülebilir biçimde uygulanmasının önünde yapısal bir engel oluşturmaktadır (FAO, 2022).

Bu çerçevede genetik testler, gıda güvenliği alanında güçlü araçlar olmakla birlikte, her koşulda ve her amaç için “altın standart” çözümler olarak değerlendirilmemelidir. Aşağıdaki alt bölümlerde bu sınırlılıklar, teknik ve bilimsel boyutlarıyla daha ayrıntılı biçimde ele alınacaktır.

Matris Etkileri ve İnhibitör Sorunu

Genetik testlerin gıda güvenliği alanındaki uygulanabilirliğini sınırlayan temel faktörlerden biri, gıda örneklerinin karmaşık yapısından kaynaklanan matris etkileri ve buna bağlı PZR inhibitörleridir. Moleküler biyoloji teknikleri çoğunlukla saf veya kontrollü biyolojik örnekler için optimize edilmişken, gerçek gıda matrisi yağlar, proteinler, polisakkaritler, fenolik bileşikler, tuzlar ve işleme sırasında oluşan yan ürünler gibi çok sayıda bileşeni aynı anda içermektedir. Bu durum, DNA izolasyonu ve amplifikasyon aşamalarında analitik performansın doğrudan etkilenmesine neden olmaktadır (Wilson, 1997; Schrader & ark., 2012).

PZR inhibitörleri, DNA polimeraz aktivitesini baskılayarak veya hedef DNA ile etkileşimi engelleyerek amplifikasyon verimliliğini düşürmektedir. Et ürünlerinde hem ve miyogloblin, süt ürünlerinde kalsiyum ve protein kompleksleri, bitkisel gıdalarda ise polifenoller ve polisakkaritler bu etkiye sıkça yol açan bileşenler arasında yer almaktadır (Demeke & Jenkins, 2010). Sonuç olarak, hedef mikroorganizma örnekte bulunsa dahi genetik testler yalnızca negatif sonuçlar üretebilmektedir.

Bu sorun, kantitatif PZR (qPZR) uygulamalarında daha da kritik hâle gelmektedir. Matris kaynaklı inhibisyon, amplifikasyon kinetiğini değiştirerek Ct değerlerinin hatalı yorumlanmasına yol açabilmekte ve ölçülen sinyal ile gerçek mikrobiyal yük arasında anlamlı sapmalar oluşturabilmektedir. Bu durum, genetik test sonuçlarının risk değerlendirme ve mevzuat eşikleriyle ilişkilendirilmesini zorlaştırmaktadır (Bustin & ark., 2009).

Bu bağlamda DNA izolasyonu, genetik analizlerde yalnızca teknik bir ön adım değil, analitik güvenilirliği belirleyen kritik bir aşama olarak değerlendirilmelidir. Farklı izolasyon protokolleri ve ticari kitler arasında gözlenen performans farklılıkları, aynı örnekten elde edilen sonuçların yöntem bağımlı olmasına neden olabilmektedir. Bu durum, laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliği azaltmakta ve genetik testlerin rutin denetimlerde kullanımını sınırlandırmaktadır (ISO 22174:2019).

Matris etkilerinin varlığı, genetik testlerin her gıda örneğinde aynı doğrulukla çalışan evrensel araçlar olduğu yönündeki yaygın algının bilimsel olarak geçerli olmadığını ortaya koymaktadır. Özellikle yoğun işlenmiş ve çok bileşenli gıdalarda, analiz performansı çoğu zaman hedef organizmadan ziyade örnek matrisi tarafından belirlenmektedir. Bu nedenle gıda güvenliğinde genetik testlerin etkin kullanımı, ürün grubu bazında validasyon ve yöntem optimizasyonunu zorunlu kılmaktadır.

Bu çerçevede matris etkileri, genetik testlerin potansiyelini ortadan kaldıran bir zayıflık değil; bu teknolojilerin hangi koşullarda güvenilir sonuç üretebileceğini tanımlayan temel bir sınırlılık olarak ele alınmalıdır. Aksi hâlde genetik analizler, sahada gerçekte olduğundan daha güçlü araçlar olarak algılanma riski taşımaktadır.

Ölü Hücre DNA'sı ve Yanlış Pozitiflik Sorunu

Genetik testlerin gıda güvenliğinde yaygınlaşmasıyla birlikte, sonuçların yorumlanmasını doğrudan etkileyen temel bir sınırlılık daha belirgin hâle gelmiştir: ölü hücrelere ait DNA'nın tespit edilmesi. PZR ve sekanslama temelli yöntemler, hedef mikroorganizmanın canlı olup olmadığına bakmaksızın genetik materyali saptamakta; bu durum analitik sonuç ile gerçek halk sağlığı riski arasında dikkatli bir ayırım yapılmasını zorunlu kılmaktadır (Nocker & ark, 2009).

Gıda işleme ve muhafaza süreçleri (ısıl işlem, yüksek basınç, kurutma ve dezenfeksiyon gibi), mikroorganizmaların canlılığını ortadan kaldıracıdır; ancak hücresel DNA'nın tamamını parçalamamaktadır. Bu nedenle genetik testler, etkisiz hâle getirilmiş patojenlere ait DNA'yı da pozitif sinyal olarak algılayabilmektedir. Özellikle ısıl işlem görmüş veya raf ömrü boyunca stabil kalan ürünlerde bu durum, yanlış pozitif sonuçların temel nedenlerinden biri olarak tanımlanmaktadır (Nocker & ark, 2009; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Bu sınırlılık, “patojen DNA'sı tespit edildi” ifadesinin çoğu zaman doğrudan “sağlık riski mevcuttur” şeklinde yorumlanmasına yol açmaktadır. Oysa gıda güvenliği açısından anlamlı risk, patojenin genetik varlığından ziyade canlı, çoğalabilir ve enfektif olmasıyla ilişkilidir. Canlılık bilgisinin analitik sonuçtan bağımsız değerlendirilmesi, genetik testlerin risk temelli yorumlanmasında temel bir gereklilik olarak kabul edilmektedir (Nocker & ark, 2009; ISO 22174:2019).

Yanlış pozitiflik problemi, yalnızca bilimsel yorum düzeyinde değil, resmi kontroller ve ticari denetimler açısından da önemli sonuçlar doğurabilmektedir. Canlı patojen bulunmadığı hâlde pozitif raporlanan ürünler, gereksiz geri çağırımlara, ekonomik kayıplara ve üretici–denetleyici ilişkilerinde güven sorunlarına yol açabilmektedir. Bu durum, genetik testlerin bağlamdan kopuk şekilde tek başına karar verici araçlar olarak kullanılmasının sakıncalarını açıkça ortaya koymaktadır (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Bu çerçevede ölü hücre DNA'sının tespiti, genetik testlerin teknik bir hatasından ziyade, biyolojik gerçekliğin moleküler

analizlerle tam olarak örtüşmemesinden kaynaklanan yapısal bir sınırlılık olarak değerlendirilmelidir. Bu sınırlılığın göz ardı edilmesi, gıda güvenliğinde “DNA varsa risk vardır” şeklinde indirgemeci bir yaklaşımın yaygınlaşmasına ve genetik analizlerin sunduğu potansiyelin olduğundan fazla algılanmasına neden olmaktadır (Nocker & ark, 2009; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

qPZR Tabanlı Analizlerde Yalancı Pozitiflik ve Canlı-Ölü

Ayrım Yöntemleri

qPZR ve diğer PZR tabanlı genetik analizler, gıda güvenliği uygulamalarında yüksek hassasiyetleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin temel sınırlılıklarından biri, hedef DNA’nın canlı bir mikroorganizmaya mı yoksa ölü hücre kalıntılarına mı ait olduğunun ayırt edilememesidir. PZR, yalnızca nükleik asidin varlığını tespit eder ve hücrenin metabolik durumu hakkında doğrudan bilgi sağlamaz. Bu durum, özellikle gıda örneklerinde yalancı pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Cangelosi & Meschke, 2014; Nocker & ark., 2007).

Gıda zincirinde serbest DNA kaynaklı pozitiflik önemli bir sorundur. Isıl işlem, dezenfeksiyon veya çevresel stresler sonucunda ölen mikroorganizmaların hücre bütünlüğü bozulmakta ve DNA çevreye salınabilmektedir. Bu serbest DNA, qPZR analizlerinde canlı patojen varmış gibi sinyal üreterek riskin olduğundan yüksek değerlendirilmesine yol açabilmektedir. Özellikle pastörize ürünler, fermente gıdalar ve uzun süreli depolanan örneklerde bu durum daha belirgin hâle gelmektedir (Emerson & ark., 2017).

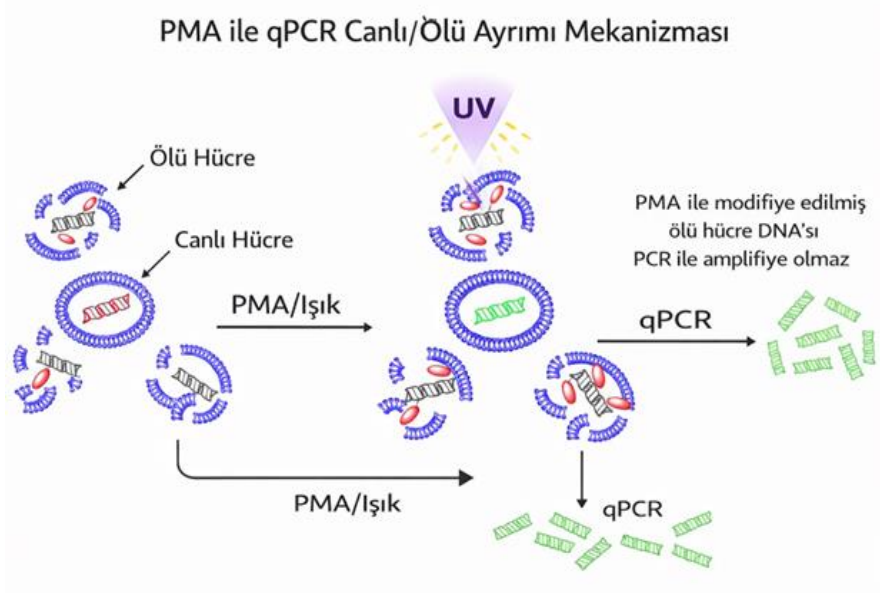
Bir diğer önemli biyolojik belirsizlik, “viable but non-culturable” (VBNC) olarak adlandırılan hücrelerdir. VBNC hücreler metabolik olarak düşük düzeyde aktif olabilir, kültür yöntemleriyle tespit edilemez ancak DNA bütünlüğünü korudukları için PZR ile pozitif sonuç verebilirler. Bu hücrelerin halk sağlığı açısından gerçek risk oluşturup oluşturmadığı hâlen tartışmalı olmakla birlikte, moleküler analizlerin sonuçlarının yorumlanmasını güçleştiren bir faktör olarak kabul edilmektedir (Foddai & Grant, 2020).

Çevresel kontaminasyon da yalancı pozitifliğe yol açan bir diğer etkidir. Laboratuvar ortamında amplikon taşınması, reaktif kontaminasyonu veya analiz sırasında çapraz bulaşma, özellikle yüksek duyarlılığa sahip qPZR sistemlerinde özgün olmayan pozitif

sinyallerin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle moleküler analizlerde teknik kontrollerin ve doğrulama adımlarının önemi büyüktür (Hoorfar & ark., 2004).

Bu sınırlılıkları azaltmak amacıyla geliştirilen en yaygın yaklaşımlardan biri PMA-qPZR (viability PZR) tekniğidir. Propidium monoazide (PMA), hücre zarı bütünlüğü bozulmuş, yani ölü hücrelerin içine girerek DNA'ya bağlanan bir boyadır. UV ışıkla aktive edildiğinde PMA, DNA ile kovalent bağ oluşturarak bu DNA'nın PZR sırasında amplifiye edilmesini engeller. Canlı hücrelerde hücre zarı sağlam olduğu için PMA hücre içine giremez ve bu hücrelerin DNA'sı normal şekilde çoğaltılır. Bu mekanizma sayesinde PMA-qPZR, ölü hücrelerden kaynaklanan DNA sinyallerini büyük ölçüde baskılayarak canlı mikroorganizmaların daha gerçekçi biçimde tespit edilmesini sağlar (Nocker & ark., 2006; Schwendener & ark., 2015).

Şekil 4. PMA-qPZR yöntemi ile canlı ve ölü bakterilerin ayırımına dayalı analiz prensibi.



Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., & Li, B. (2016). Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833>

Bununla birlikte PMA tekniği kusursuz değildir. PMA'nın etkinliği mikroorganizma türüne, hücre zarının yapısına ve gıda matriksinin karmaşıklığına bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca yüksek hücre yoğunluğu veya yetersiz ışık aktivasyonu gibi teknik faktörler,  l  hücre DNA'sının tamamen baskılanamamasına yol açabilmektedir. Bu nedenle PMA-qPZR sonuçları, mutlak canlılık göstergesi olarak değil, risk değerlendirmesini destekleyen bir araç olarak yorumlanmalıdır (Fittipaldi & ark., 2012).

Canlı l  ayırımında kullanılan bir diğer yaklaşım RNA temelli RT-qPZR yöntemleridir. Özellikle mRNA'nın kısa yarı ömrü nedeniyle, bu molekülün varlığı genellikle metabolik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir.  l  hücrelerde RNA hızla parçalandığı için, RT-qPZR analizleri canlı mikroorganizmaların varlığına dair daha güçlü biyolojik kanıt sunabilmektedir. Ancak RNA'nın çevresel koşullara karşı son derece hassas olması ve örnek işleme sürecinin zorluğu, bu yöntemin rutin gıda analizlerinde sınırlı kullanımına yol açmaktadır (Cangelosi & Meschke, 2014).

Daha ileri yaklaşımlar arasında metatranskriptomik analizler yer almaktadır. Bu yöntemler, yalnızca hangi mikroorganizmaların bulunduğunu değil, hangi genlerin aktif olarak ifade edildiğini ortaya koyarak fonksiyonel düzeyde bilgi sunmaktadır. Ancak yüksek maliyet, veri analizi karmaşıklığı ve regülasyonel kabul eksikliği nedeniyle bu teknikler hâlen araştırma ağırlıklı uygulamalarla sınırlıdır (Franzosa & ark., 2014).

Pratik uygulamalarda en güvenilir yaklaşım, moleküler yöntemlerin geleneksel kültür teknikleriyle birlikte değerlendirilmesidir. Kültür + qPZR veya PMA-qPZR kombinasyonları, hem canlılığın doğrulanmasına hem de hızlı tarama yapılmasına olanak tanıyarak gıda güvenliği risklerinin daha dengeli biçimde değerlendirilmesini sağlamaktadır (EFSA BIOHAZ Panel, 2019).

Sonuç olarak, qPZR tabanlı analizlerde yalancı pozitiflik ve canlı l  ayırımı, genetik testlerin en kritik yorumlama sorunlarından biridir. PMA-qPZR, RNA temelli yöntemler ve kültürle doğrulama yaklaşımları, bu sınırlılıkları azaltmak için geliştirilen tamamlayıcı araçlardır. Ancak hiçbir yöntem tek başına mutlak doğruluk sağlamadığından, gıda güvenliği uygulamalarında bu tekniklerin

risk temelli ve bağlamsal biçimde birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Metagenomik Verilerin Yorumlanmasındaki Karmaşıklık

Metagenomik yaklaşımlar, gıda örneklerindeki tüm genetik içeriğin eş zamanlı olarak analiz edilmesine olanak tanıyarak gıda güvenliği alanında yüksek çözünürlüklü veri üretimi sağlamaktadır. Ancak bu veri zenginliği, beraberinde önemli bir bilimsel sorunu da getirmektedir: metagenomik sonuçların doğru, bağlama uygun ve risk temelli biçimde yorumlanması (Quince, 2017).

Bir gıda örneğinde patojen DNA'sının tespit edilmesi, çoğu zaman yanlış biçimde doğrudan bir sağlık riski göstergesi olarak algılanmaktadır. Oysa bu durum, mikroorganizmanın canlı, çoğalabilir, toksijenik ya da enfektif olduğu anlamına gelmemektedir. Bu ayrım, metagenomik verilerin analitik çıktıları ile biyolojik anlamı arasındaki temel farkı ortaya koymaktadır (Knight & ark., 2018).

Yorumlama güçlüğünün en kritik boyutlarından biri, kantitasyon ve eşik değer belirsizliğidir. Metagenomik analizler çoğunlukla bağlı bolluk bilgisi üretmekte; bu veriler mutlak mikrobiyal yük ile doğrudan ilişkilendirilememektedir. Oysa halk sağlığı açısından belirleyici olan “ne kadar var?” sorusu, risk değerlendirme süreçlerinin merkezinde yer almaktadır (Franzosa & ark., 2014).

Metagenomik verilerin yorumu ayrıca biyoinformatik analizlere ve referans veri tabanlarına yüksek derecede bağımlıdır. Veri tabanlarının kapsayıcılığı ve doğruluğu ile kullanılan biyoinformatik veri bankaları, aynı ham veriden farklı sonuçlar elde edilmesine yol açabilmektedir. Bu durum, metagenomik analizlerin standardizasyonu ve tekrarlına bilirliliği açısından önemli bir sınırlılık oluşturmaktadır (Sczyrba & ark., 2017).

Buna ek olarak, ürün tipi, işleme düzeyi, raf ömrü ve saklama koşulları gibi bağlamsal faktörler dikkate alınmadan yapılan yorumlar, analitik olarak doğru ancak biyolojik açıdan anlamsız sonuçlar doğurabilmektedir. Bu durum, metagenomik analizlerin “her şeyi ortaya çıkaran” araçlar olarak sunulmasının bilimsel gerçeklikle örtüşmediğini göstermektedir (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Son olarak, metagenomik verilerin güvenilir biçimde yorumlanması; moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, biyoinformatik ve risk değerlendirme alanlarında eş zamanlı uzmanlık gerektirmektedir. Bu çok disiplinli gereksinim, metagenomik yaklaşımların gıda güvenliğinde rutin kullanımı önündeki temel sınırlılıklardan biri olarak değerlendirilmektedir (FAO & WHO, 2021).

Bu çerçevede metagenomik analizler, gıda güvenliği açısından güçlü bir izleme ve keşif aracı olmakla birlikte, dikkatli ve bağlam temelli yorumlanmadığında yanıltıcı sonuçlara yol açabilmektedir. Yüksek miktarda genetik veri üretimi, tek başına doğru risk değerlendirmesi anlamına gelmemekte; aksine yorumlama kapasitesi yetersiz olduğunda risk algısının abartılmasına neden olabilmektedir.

Standartlaşma Eksikliği: Laboratuvarlar Arası Değişkenlik ve Validasyon Sorunları

Genetik testlerin gıda güvenliğinde rutin ve karşılaştırılabilir biçimde kullanılmasının önündeki temel engellerden biri, standartlaşma eksikliğidir. Moleküler analizler yüksek teknik hassasiyet sunsa da, örnek hazırlamadan veri yorumlamaya kadar uzanan süreçteki çok sayıda değişken, laboratuvarlar arasında anlamlı sonuç farklılıklarına yol açabilmektedir. Bu durum, genetik testlerin resmi kontroller ve hukuki süreçlerdeki güvenilirliğini sınırlamaktadır (ISO 22174:2019).

Laboratuvarlar arası değişkenliğin önemli bir kaynağı, DNA izolasyon protokollerindeki farklılıklardır. Kullanılan kitler, lizis yöntemleri ve saflaştırma adımları, elde edilen DNA'nın miktarını ve kalitesini doğrudan etkilemektedir. Aynı gıda örneğinin farklı izolasyon yaklaşımlarıyla analiz edilmesi, yalnızca bu aşamaya bağlı olarak farklı PZR veya qPZR sonuçlarının elde edilmesine neden olabilmektedir (Bustin & ark., 2009).

Standartlaşma sorunu, laboratuvar aşamalarıyla sınırlı değildir. Primer ve prob tasarımı, amplifikasyon koşulları ve eşik değerlerin belirlenmesi gibi analitik kararlar da sonuçların karşılaştırılabilirliğini etkilemektedir. Özellikle qPZR ve dijital PZR uygulamalarında eşik ayarlarının yoruma açık olması, ölçüm

belirsizliğini artıran önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Hoorfar & ark., 2004).

Yeni nesil dizileme ve metagenomik yaklaşımlarda ise standartlaşma problemi daha da belirginleşmektedir. Biyoinformatik veri bankaları, referans veri tabanları ve algoritmaları arasındaki farklılıklar, aynı ham veriden farklı mikrobiyal profiller elde edilmesine yol açabilmektedir. Bu durum, metagenomik sonuçların tekrarlına bilirliliği ve resmi denetimlerde kullanımı açısından ciddi bir sınırlılık oluşturmaktadır (Sczyrba & ark., 2017).

Bu sorunlara yanıt olarak uluslararası kuruluşlar, genetik testlerin gıda güvenliğinde kullanımına yönelik çerçeve standartlar ve rehber dokümanlar geliştirmektedir. ISO 22174, PZR temelli yöntemler için temel kalite gerekliliklerini tanımlarken; EFSA, genomik verilerin risk değerlendirmesi ve salgın araştırmalarında kullanımına ilişkin bilimsel görüşler yayımlamıştır (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019). Benzer şekilde FDA, GenomeTrakr programı kapsamında WGS verilerinin standardizasyonuna yönelik uygulamalar geliştirmektedir (FDA, 2020).

Buna karşın, genetik testlerin küresel ölçekte tam anlamıyla harmonize edilmiş bir yapıya ulaştığını söylemek güçtür. Ülkeler, laboratuvar altyapıları ve denetim sistemleri arasındaki farklılıklar, genetik analizlerin bağlayıcı karar mekanizmalarına entegrasyonunu zorlaştırmaktadır.

Bu bağlamda standartlaşma eksikliği, genetik testlerin bilimsel değerini azaltan bir kusurdan ziyade, bu teknolojilerin hangi sınırlar içinde güvenilir sonuç üretebileceğini tanımlayan yapısal bir engel olarak değerlendirilmelidir. Standartlaşma ve validasyon sorunları çözülmeden, genetik testlerin gıda güvenliğinde tek başına referans yöntem olarak kabul edilmesi bilimsel açıdan temkinli bir yaklaşım gerektirmektedir.

Maliyet ve Erişilebilirlik: Genetik Testlerin KOBİ'ler İçin

Sınırları

Genetik testler gıda güvenliğinde yüksek teknik hassasiyet sunmasına karşın, bu yöntemlerin yaygın ve eşitlikçi biçimde uygulanmasının önündeki temel engellerden biri maliyet ve erişilebilirliktir. PZR, qPZR ve özellikle tüm genom dizileme (WGS) ve metagenomik gibi ileri moleküler yaklaşımlar, yalnızca analiz

aşamasında değil; altyapı, insan kaynağı ve veri yönetimi açısından da önemli yatırım gereksinimleri doğurmaktadır.

Moleküler analizlerin ilk ve en belirgin maliyet kalemi laboratuvar altyapısıdır. Konvansiyonel PZR ve real-time PZR cihazları, dizileme platformları ve biyogüvenlik düzenlemeleri, özellikle küçük ve orta ölçekli işletmeler (KOBİ'ler) için ciddi bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Buna ek olarak sarf malzemeleri ve ticari kitler, analiz başına maliyeti daha da artırmaktadır (FAO, 2011).

İleri genomik yaklaşımlarda maliyet sorunu daha karmaşık hâle gelmektedir. WGS ve metagenomik analizler; dizileme giderlerinin yanı sıra yüksek kapasiteli veri depolama, biyoinformatik altyapı ve uzman personel gereksinimi doğurmaktadır. Bu durum, genetik testlerin büyük kamu laboratuvarları ve referans merkezleri dışında rutin kullanıma girmesini zorlaştırmaktadır (OECD, 2016).

Erişilebilirlik sorunu yalnızca ekonomik değil, aynı zamanda insan kaynağı ve bilgi eşitsizliğiyle de ilişkilidir. Genetik testlerin doğru uygulanması ve yorumlanması, moleküler biyoloji ve biyoinformatik alanlarında eğitilmiş uzmanlık gerektirmektedir. Özellikle gelişmekte olan bölgelerde bu kapasitenin sınırlı olması, teknolojik olanaklar bulunsada dahi uygulamada ciddi kısıtlar yaratmaktadır (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Bu durum, gıda güvenliğinde iki katmanlı bir denetim yapısının ortaya çıkması riskini beraberinde getirmektedir. Büyük ölçekli ve ihracat odaklı firmalar ileri genetik testlere erişebilirken, KOBİ'ler daha sınırlı ve klasik analiz yöntemlerine bağımlı kalabilmektedir. Bu eşitsizlik, bilimsel kapasite farkının ekonomik rekabet avantajına dönüşmesine yol açabilmektedir (FAO & WHO, 2018).

Uluslararası kuruluşlar bu soruna yanıt olarak, genetik testlerin risk temelli ve kademeli biçimde uygulanmasını önermektedir. ISO ve FAO gibi kurumlar, genetik analizlerin her durumda zorunlu tutulmasından ziyade, amaca uygun ve valide edilmiş yöntemlerle kullanımının daha sürdürülebilir olduğunu vurgulamaktadır (ISO 22174:2019; FAO, 2011).

Bu çerçevede maliyet ve erişilebilirlik, genetik testlerin bilimsel değerini azaltan sınırlılıklar değil; bu teknolojilerin hangi

koşullarda rasyonel ve sürdürülebilir biçimde kullanılabileceğini belirleyen temel gerçeklikler olarak değerlendirilmelidir.

Bilimsel Gerçeklik: Hangi İddialar Bilimsel Hangileri Abartılı

Genetik analizler, gıda güvenliği alanında son otuz yılda önemli bir dönüşüm yaratmış; klasik mikrobiyolojik yöntemlere kıyasla hız, hassasiyet ve ayırt edicilik açısından belirgin avantajlar sağlamıştır. Ancak bu teknolojilerin yaygınlaşmasıyla birlikte, bilimsel olarak kanıtlanmış uygulamalar ile henüz yeterli deneysel ve regülasyonel temele dayanmayan iddialar giderek daha fazla iç içe geçmektedir. Özellikle “ileri teknoloji” algısı, genetik testlerin gerçek kapasitesinin zaman zaman olduğundan daha geniş yorumlanmasına yol açmaktadır.

Bilimsel kanıtlar incelendiğinde, bazı genetik analiz yaklaşımlarının rutin gıda güvenliği uygulamalarında etkinliği ve güvenilirliği açık biçimde ortaya konmuştur. PZR temelli patojen tespiti, tür doğrulama ve toksijenik potansiyelin genetik düzeyde değerlendirilmesi, çok sayıda validasyon çalışması ve uluslararası rehber dokümanla desteklenen, yerleşik uygulamalar arasında yer almaktadır (ISO 22174:2019; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Buna karşılık, metagenomik analizlerin tek başına tüm riskleri ortaya koyabileceği, tüketiciye yönelik hızlı genetik testlerin laboratuvar düzeyinde doğruluk sunduğu veya raf ömrünün yalnızca genetik verilerle güvenilir biçimde öngörülebileceği yönündeki bazı iddialar, mevcut bilimsel kanıtların ötesine geçmektedir. Bu durum, genetik testlerin değerini azaltmaktan ziyade, bu teknolojilere yüklenen beklentilerin yeniden dengelenmesi gerektiğini göstermektedir (FAO & WHO, 2018).

Bu bölümde, gıda güvenliğinde kullanılan genetik analiz yöntemlerine ilişkin iddialar; kanıtlanmış uygulamalar ile abartılı veya yanlış yorumlanan alanlar ayrımı üzerinden ele alınarak, teknolojik potansiyel ile bilimsel gerçeklik arasındaki sınırlar netleştirilecektir.

Bilimsel Olarak Güçlü Biçimde Kanıtlanmış Genetik Uygulamalar

Genetik analizlerin gıda güvenliği alanında sunduğu olanaklar geniş olmakla birlikte, bazı uygulamalar bilimsel geçerlilik ve rutin kullanım açısından diğerlerinden açık biçimde

ayrılmaktadır. Özellikle PZR temelli yaklaşımlar, tür doğrulama ve toksijenik potansiyelin genetik düzeyde değerlendirilmesi, uzun yıllardır çok sayıda çalışma, validasyon protokolü ve uluslararası standart ile desteklenen, yerleşik uygulamalar arasında yer almaktadır.

PZR ve türevleri (qPZR, multiplex PZR), *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 gibi kritik gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde yüksek hassasiyet ve özgüllük sunmaktadır. Bu yöntemler, klasik kültür temelli analizlere kıyasla önemli ölçüde zaman kazancı sağlamış ve birçok resmi kontrol laboratuvarında rutin olarak uygulanmaya başlanmıştır. PZR temelli analizlerin güvenilirliği, yalnızca akademik literatürle değil; ISO, AOAC ve CEN gibi kuruluşlar tarafından yayımlanan standartlar ve referans metotlarla da açık biçimde tanımlanmış durumdadır (ISO 22174:2019; AOAC, 2020).

DNA temelli tür doğrulama yaklaşımları da bilimsel açıdan güçlü biçimde kabul görmüş bir diğer uygulama alanını oluşturmaktadır. Özellikle et ve balık ürünlerinde mitokondriyal DNA bölgeleri (COI, cyt b), bitkisel ürünlerde ise *rbcL* ve *matK* gibi barkod genleri, tür düzeyinde yüksek ayırt edicilik sağlamaktadır. Bu yöntemler, ürünün güvenliğinden ziyade biyolojik kimliğinin doğrulanmasına odaklanmakta; yanlış etiketleme ve hileli uygulamaların ortaya çıkarılmasında güvenilir bir bilimsel temel sunmaktadır (Hebert ark., 2003; FAO, 2011).

Genetik analizlerin kanıtlanmış olduğu bir diğer alan, mikroorganizmaların toksijenik potansiyelinin belirlenmesidir. Mikotoksin üreten küflerde toksin biyosentezinden sorumlu gen kümelerinin PZR veya qPZR ile tespiti, risk değerlendirmesinde kabul gören bir ön tarama yaklaşımıdır. Benzer şekilde bazı bakterilerde toksin genlerinin varlığı, suşun potansiyel tehlikesine ilişkin değerli bilgiler sunmaktadır. Her ne kadar genetik düzeyde toksijenik genlerin varlığı doğrudan toksin üretimi anlamına gelmese de, bu yaklaşım çevresel ve fenotipik verilerle birlikte değerlendirildiğinde kanıta dayalı risk yönetimi açısından güçlü ve geçerli bir araç olarak kabul edilmektedir (Paterson & Lima, 2010; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019).

Bilimsel Olarak Abartılan veya Yanlış Yorumlanan Genetik Uygulamalar

Genetik analizlerin gıda güvenliği alanındaki hızlı gelişimi, bu teknolojilere yönelik beklentilerin de aynı hızla artmasına yol açmıştır. Ancak bazı uygulama alanlarında, mevcut bilimsel kanıtların ötesine geçen genelleştirmeler yapılmakta ve genetik testlerin gerçek kapasitesi olduğundan daha geniş biçimde sunulmaktadır. Özellikle metagenomik analizler, tüketiciye yönelik genetik test kitleri ve raf ömrü tahmini gibi başlıklar, bilimsel gerçeklik ile pazarlama söylemi arasındaki sınırın en fazla bulanıklaştığı alanlar olarak öne çıkmaktadır.

Metagenomik yaklaşımlar, gıda örneklerinde bulunan mikroorganizma topluluklarının kapsamlı biçimde analiz edilmesine olanak tanımakla birlikte, bu yöntemin “her patojenin, her koşulda ve her düzeyde güvenilir biçimde tespit edilebileceği” yönündeki iddialar bilimsel açıdan abartılıdır. Metagenomik analizlerde elde edilen DNA verisi, mikroorganizmaların canlılığı, metabolik aktivitesi veya enfektivite potansiyeli hakkında doğrudan bilgi sunmamaktadır. Ayrıca sekans derinliği, DNA ekstraksiyon verimliliği ve biyoinformatik analiz parametreleri gibi teknik değişkenler, sonuçlar üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Bu nedenle patojen DNA’sının tespiti, otomatik olarak gıda güvenliği riski bulunduğu anlamına gelmemekte; EFSA da metagenomik verilerin ancak klasik mikrobiyolojik ve epidemiyolojik bulgularla birlikte yorumlanması gerektiğini özellikle vurgulamaktadır (Quince ark., 2017; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019: 12).

Benzer biçimde, son yıllarda piyasaya sunulan hızlı ve taşınabilir genetik test kitleri, gıda güvenliğinin bireysel düzeyde kontrol edilebileceği izlenimini yaratmaktadır. Ancak bu ürünlerin büyük bir kısmı, resmî validasyon süreçlerinden geçmemiş olup, analitik performansları laboratuvar koşullarında kullanılan yöntemlerle karşılaştırılabilir düzeyde değildir. Kontrolsüz örnek alma, kontaminasyon riski ve kullanıcı kaynaklı hatalar, bu testlerde yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuç olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle düzenleyici kurumlar, tüketiciye yönelik genetik test kitlerinin resmî gıda güvenliği karar mekanizmalarında

kullanılmasını uygun görmemektedir (FAO, 2011:7; ISO, 22174 2019: 5).

Genetik analizlerin raf ömrü tahmininde tek başına belirleyici olabileceği yönündeki iddialar da benzer şekilde bilimsel sınırların ötesine geçmektedir. Raf ömrü, mikroorganizmaların genetik potansiyelinden ziyade sıcaklık, pH, su aktivitesi ve ürün formülasyonu gibi çevresel ve teknolojik faktörler tarafından şekillendirilmektedir. Genetik veriler, bozulma potansiyeli veya risk taşıyan mikroorganizmaların varlığına ilişkin destekleyici bilgiler sunsa da, raf ömrünün yalnızca genetik analizlere dayanarak güvenilir biçimde öngörülmesi mümkün değildir (Tarlak, 2023).

DNA barkodlama yöntemleri de zaman zaman aşırı beklentilerle ilişkilendirilmektedir. Tür doğrulama açısından son derece güçlü olan bu yaklaşım, gıda zincirinde “tam şeffaflık” sağlayan bir araç olarak sunulabilmektedir. Oysa DNA barkodlama, ürünün biyolojik kimliğini ortaya koymakla sınırlı olup; üretim koşulları, işleme süreçleri, hijyen durumu veya besinsel kalite hakkında doğrudan bilgi sağlamamaktadır. Bu nedenle barkodlama analizleri, gıda güvenliği ve özgünlük değerlendirmelerinde değerli bir bileşen olmakla birlikte, tek başına bütüncül bir kalite ve güvenlik göstergesi olarak yorumlanmamalıdır.

Bu çerçevede, genetik analizlerin gıda güvenliğinde sunduğu katkılar bilimsel açıdan tartışmasız olmakla birlikte, bu teknolojilere atfedilen her iddianın aynı ölçüde kanıta dayandığını söylemek mümkün değildir. Bilimsel gerçeklik, genetik testlerin gücünün doğru bağlamda, uygun sınırlamalarla ve tamamlayıcı verilerle birlikte kullanıldığında ortaya çıktığını göstermektedir.

Bilimsel Kanıt ile Regülasyonlar Arasındaki Yapısal Uyum

Sorunu

Genetik testler, gıda güvenliği alanında güçlü bir bilimsel potansiyel sunmasına rağmen, bu teknolojilerin regülasyonel çerçevelerle tam anlamıyla uyumlu hâle getirilmesi önemli yapısal zorluklar içermektedir. Bilimsel bilgi üretim hızı ile yasal düzenlemelerin güncellenme temposu arasındaki fark, genetik analizlerin gerçek dünya uygulamalarında beklenen etkiyi göstermesini çoğu zaman sınırlandırmaktadır. Bu durum, genetik

testlerin bilimsel değerinden ziyade, düzenleyici sistemlerin bu değeri ne ölçüde absorbe edebildiğiyle ilişkilidir.

Birçok ülkede gıda güvenliği mevzuatı hâlen klasik mikrobiyolojik kültür yöntemlerini temel almakta; genetik analizler ise çoğu zaman destekleyici veya doğrulayıcı araçlar olarak konumlandırılmaktadır. Oysa PZR temelli patojen tespiti, tür doğrulama veya toksijenik gen analizleri gibi yöntemler, güçlü bilimsel kanıtlarla desteklenmiş olmasına rağmen, resmî kontrol mekanizmalarına sınırlı ve kontrollü biçimde entegre edilebilmektedir (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019: 12). Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri gibi bölgelerde bu durum, bilimsel olarak geçerli yöntemlerin yasal kabulünde gecikmelere yol açmakta ve uygulamada heterojenliğe neden olmaktadır (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019: 15).

Benzer şekilde, DNA barkodlama ve metagenomik analizler gibi daha yeni yaklaşımlar, bilimsel literatürde giderek daha fazla yer bulmasına karşın, regülasyonel düzeyde henüz standartlaştırılmış ve yaygın kabul görmüş yöntemler hâline gelmemiştir. Özellikle metagenomik verilerin yorumlanmasına ilişkin belirsizlikler, bu teknolojilerin rutin gıda güvenliği testlerine entegrasyonunu zorlaştırmaktadır (Quince & ark., 2017: 214; FAO, 2011: 7). Regülasyonlar, genellikle ölçülebilir, tekrarlanabilir ve açık eşik değerlere dayalı sonuçları tercih etmekte; bu da çok boyutlu ve yoruma açık genetik verilerin yasal çerçeveye oturtulmasını güçleştirmektedir (EFSA BIOHAZ Paneli, 2019: 20).

Sorunun temelinde, regülasyonların bilimsel gelişmelere dirençli olması değil; bilimsel bilginin regülasyonel dile çevrilmesinin karmaşıklığı yatmaktadır. Genetik testlerin güvenilir biçimde kullanılabilmesi, yalnızca teknolojinin varlığına değil; standartizasyon, validasyon, kalite güvencesi ve sonuçların nasıl yorumlanacağına ilişkin açık rehberlerin oluşturulmasına bağlıdır. Bu unsurlar sağlanmadan yapılan erken düzenleyici kabuller, bilimsel belirsizliklerin yasal sorunlara dönüşmesine yol açabilmektedir (ISO, 22174 2019: 5).

Bu nedenle genetik analizlerin gıda güvenliğinde daha etkin ve yaygın biçimde kullanılabilmesi için, bilimsel kanıt üretimi ile regülasyonel süreçlerin eşgüdüm içinde ilerlemesi gerekmektedir. Bilimsel topluluk, genetik yöntemlerin sınırlarını ve güçlü yönlerini

net biçimde ortaya koyarken; düzenleyici kurumların da bu bilgiyi esnek, güncellenebilir ve kanıta dayalı mevzuat yapılarıyla karşılaması önem taşımaktadır. ISO ve benzeri kuruluşların geliştirdiği standartlar, bu entegrasyon sürecinde kritik bir köprü işlevi görmekte; bilim ile regülasyon arasındaki mesafenin kapatılmasına katkı sağlamaktadır (ISO, 221742019: 12).

Etik Regülasyonlar ve Ticari Gerçeklik

Genetik analizlerin gıda güvenliği alanında yaygınlaşması, yalnızca teknik yeterlilik ve analitik doğrulukla sınırlı olmayıp, etik, regülasyonel ve ticari boyutları da iç içe geçmiş çok katmanlı bir gerçekliği ortaya koymaktadır. Önceki bölümlerde belirtildiği gibi, genetik testler belirli uygulama alanlarında güçlü ve kanıta dayalı araçlar sunarken, bu teknolojilerin gıda sistemlerine nasıl, hangi sınırlar içinde ve kimler tarafından entegre edileceği sorusu giderek bilimsel olduğu kadar yönetsel ve politik bir nitelik kazanmaktadır (FAO, 2011: 25; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019: 12).

Gıda zincirinde üretilen genomik veriler, özellikle mikroorganizma ve suş düzeyinde analizler söz konusu olduğunda, veri sahipliği ve kullanım hakları açısından önemli etik belirsizlikler taşımaktadır. Bir işletmeden izole edilen mikroorganizmanın genetik bilgisinin kime ait olduğu, hangi amaçlarla kullanılabileceği ve ticari değere dönüştürülüp dönüştürülemeyeceği konularında uluslararası ölçekte net ve bağlayıcı bir çerçeve bulunmamaktadır. Bu durum, özellikle fermente gıdalar ve probiyotikler gibi suş temelli ürünlerde daha da belirgin hâle gelmektedir. Bu nedenle uluslararası kuruluşlar, genomik verilerin öncelikle halk sağlığı ve risk yönetimi amacıyla kullanılmasını etik bir temel ilke olarak tanımlamaktadır (OECD, 2016: 30; FAO & WHO, 2018: 15).

Bilimsel açıdan güçlü kanıtlar mevcut olmasına rağmen, genetik testlerin gıda güvenliği mevzuatına entegrasyonu hâlen sınırlı ve parçalıdır. Mevcut regülasyonların büyük ölçüde klasik kültür temelli yöntemlere dayanması, PZR, tüm genom dizileme ve metagenomik gibi yaklaşımların resmî denetim süreçlerindeki konumunu belirsiz kılmaktadır. Düzenleyici kurumların talep ettiği kapsamlı validasyon ve standardizasyon süreçleri bilimsel açıdan gerekçeli olmakla birlikte, genetik analizlerin sunduğu hız ve ayırt edicilik avantajlarının uygulamada tam karşılık bulmasını

geciktirmektedir. Bu durum, bilimsel ilerleme ile regülasyonel uyum arasında yapısal bir zaman farkının kaçınılmaz olduğunu göstermektedir (ISO 22174:2019: 10; EFSA BIOHAZ Paneli, 2019: 18).

Genetik analizlerin yaygınlaşması aynı zamanda gıda sektöründeki kapasite farklılıklarını da görünür hâle getirmektedir. Büyük ölçekli ve ihracat odaklı firmalar ileri genetik teknolojilere erişebilirken, küçük ve orta ölçekli işletmeler için bu yöntemler çoğu zaman ekonomik ve teknik açıdan ulaşılması güç araçlar olarak kalmaktadır. Bu tablo, genetik testlerin yalnızca gıda güvenliğini artıran bir araç değil, aynı zamanda rekabet avantajı yaratan bir unsur hâline gelme riskini de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle uluslararası kuruluşlar, genetik analizlerin risk temelli, orantılı ve kapasite geliştirici modellerle uygulanmasının yapısal eşitsizlikleri derinleştirmemesi açısından kritik olduğunu vurgulamaktadır (OECD, 2016: 42; FAO & WHO, 2018: 20).

Bu çerçevede etik, regülasyon ve ticari boyutlar, genetik testlerin bilimsel değerini sınırlandıran dışsal engeller olarak değil; bu teknolojilerin gıda güvenliğinde hangi koşullarda güvenilir ve sürdürülebilir biçimde kullanılabileceğini belirleyen temel belirleyiciler olarak değerlendirilmelidir. Genetik analizlerin etkinliği, yalnızca teknolojik gelişmeye değil; etik ilkelerle uyumlu, regülasyonel olarak net ve ekonomik açıdan erişilebilir bir çerçevenin varlığına bağlıdır.

Geleceğe Bakış: Gıda Güvenliğinde Genetik Testlerin Evrimi

Genetik analizler, gıda güvenliğinde dönüşüm potansiyeli taşıyan güçlü araçlar sunmaktadır; ancak bu potansiyelin gerçek değeri, teknolojinin kendisinden çok nasıl ve hangi bağlamda kullanıldığıyla belirlenmektedir. Son yıllarda genomik, hızlı dizileme ve veri temelli analiz yaklaşımlarındaki gelişmeler, gıda sistemlerinin daha izlenebilir ve öngörülebilir hâle gelebileceğini göstermiştir. Buna karşın, bu teknolojilerin bilimsel gerçeklik, operasyonel uygulanabilirlik ve regülasyonlarla uyumlu biçimde ele alınmadığı durumlarda, risk algısının güçlenmesi yerine karmaşıklaşması kaçınılmazdır (FAO & WHO, 2018: 22; EFSA BIOHAZ Panel, 2022: 14).

Yapay zekâ ve makine öğrenmesi uygulamaları, özellikle genomik ve metagenomik veri yığınlarının analizinde önemli katkılar sunmaktadır. Patojen profillemeye, kontaminasyon desenlerinin tanımlanması ve risk öngörüsü gibi alanlarda bu araçlar giderek daha fazla kullanılmaktadır. Ancak bu sistemlerin çıktıları, veri kalitesi ve biyolojik bağlamdan bağımsız düşünülemez. Bu nedenle yapay zekâ, gıda güvenliğinde karar veren bir mekanizma değil; insan uzmanlığını destekleyen analitik bir araç olarak konumlandırılmalıdır (Libbrecht & Noble ark., 2015: 7; Marvin ark., 2017: 12).

Gerçek zamanlı DNA sekanslama teknolojileri, özellikle nanopore tabanlı sistemler aracılığıyla, saha koşullarında hızlı patojen tespiti ve salgın izleme açısından umut vadetmektedir. Zaman faktörünün kritik olduğu durumlarda bu yaklaşımlar önemli avantajlar sunsa da, veri doğruluğu, standartlaştırma ve regülasyonel kabul hâlen temel sınırlılıklar arasında yer almaktadır. Bu nedenle gerçek zamanlı dizileme, klasik yöntemlerin yerine geçen değil; onları tamamlayan bir araç olarak değerlendirilmelidir (Quick ark., 2016: 5; EFSA BIOHAZ Panel, 2022: 16).

Genetik doğrulama yöntemlerinin blockchain altyapıları veya dijital ikiz gıda sistemleriyle entegre edilmesi, gıda zincirinde şeffaflık vaadiyle sıkça gündeme getirilmektedir. Ancak bu yaklaşımların başarısı, biyolojik verinin miktarından çok veri giriş noktalarının güvenilirliğine, yönetim yapısına ve bağlamsal doğrulamaya bağlıdır. Genetik verilerin çevresel, proses ve fenotipik bilgilerden bağımsız ele alındığı sistemler, teknik olarak etkileyici ancak biyolojik olarak sınırlı kalmaktadır (Galvez ark., 2018: 10; Verdouw ark., 2021: 14).

Bu çerçevede geleceğin gıda güvenliği sistemleri, genetik testleri “her sorunu çözen” teknolojiler olarak değil; çok disiplinli, risk temelli ve bağlama duyarlı karar mekanizmalarının bir bileşeni olarak ele almak zorundadır. Yeni düzenleyici modellerin geliştirilmesi, genomik verilerin hangi koşullarda anlamlı kabul edileceğinin netleştirilmesi ve yanlış pozitiflik gibi yapısal sorunların regülasyonel düzeyde nasıl ele alınacağını tanımlanması bu sürecin temel gereklilikleridir (FAO & WHO, 2018: 24; EFSA BIOHAZ Panel, 2022: 18).

Sonuç olarak genetik testlerin gıda güvenliğindeki evrimi, teknolojik ilerlemeden çok bilimsel temkin, regülasyonel netlik ve etik sorumluluk anlayışıyla şekillenecektir. Gerçek ilerleme, daha fazla genetik veri üretmekten değil; bu veriyi doğru bağlamda, doğru sınırlar içinde ve doğru amaçlarla kullanabilmekten geçmektedir.

Türkiye’de Gıda Güvenliği Analiz Altyapısı ve Regülasyonlar

Türkiye’de gıda güvenliği analizleri, kamu otoriteleri ile özel sektör laboratuvarlarının birlikte yer aldığı çok katmanlı bir yapı içerisinde yürütülmektedir. Bu sistemin merkezinde Tarım ve Orman Bakanlığı’na bağlı gıda kontrol laboratuvarları yer almakta olup, ülke genelinde planlı denetimler, izleme programları ve şikâyet bazlı kontroller kapsamında gıda ve yem numuneleri analiz edilmektedir.

Bakanlık bünyesinde faaliyet gösteren gıda kontrol laboratuvarlarında mikrobiyolojik, kimyasal ve moleküler temelli analizler uygulanmakta; bu kapsamda PZR ve real-time PZR gibi genetik yöntemler de resmi kontrol süreçlerinde kullanılmaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024a). Türkiye genelinde faaliyet gösteren gıda kontrol laboratuvarları ile Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, analiz metotlarının doğrulanması, kalite güvencesi ve laboratuvarlar arası uyumun sağlanması açısından kritik bir rol üstlenmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024b).

Kamu laboratuvarlarına ek olarak, Türkiye’de çok sayıda özel gıda analiz laboratuvarı da faaliyet göstermektedir. Bu laboratuvarlar, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiş olup deney ve analiz yeterliliklerini belgelemek amacıyla TÜRKAK tarafından akredite edilmektedir. Türkiye’de laboratuvar akreditasyonu, TS EN ISO/IEC 17025 standardı çerçevesinde yürütülmekte; bu standart, deney laboratuvarlarının teknik yeterliliğini, ölçüm doğruluğunu ve kalite yönetim sistemlerini güvence altına almaktadır (TÜRKAK, 2019). ISO/IEC 17025 akreditasyonu, özellikle PZR gibi yüksek hassasiyetli genetik analizlerde sonuçların resmi denetimlerde ve hukuki süreçlerde kabul edilebilirliğini sağlamaktadır.

Gıda analizlerinin yasal ve teknik çerçevesi Türk Gıda Kodeksi ile belirlenmektedir. Türk Gıda Kodeksi, gıdalarda güvenilirlik kriterlerini, numune alma esaslarını ve analiz metotlarının temel ilkelerini tanımlamakta; bu yönüyle resmi kontrol

mekanizmasının hukuki temelini oluşturmaktadır. Son yıllarda yayımlanan Türk Gıda Kodeksi tebliğleri, analiz metotlarının Avrupa Birliği mevzuatı ile uyumlu hale getirilmesini hedeflemekte ve moleküler analizlerin kullanım alanlarını açık biçimde tanımlamaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2025). Bu düzenlemeler, genetik testlerin yalnızca araştırma amaçlı değil, resmi kontrol süreçlerinde de standart yöntemler olarak kullanılmasının önünü açmaktadır.

PZR tabanlı yöntemler, Türkiye’de özellikle gıda kaynaklı patojenlerin tespiti, GDO analizleri ve tür doğrulama çalışmalarında yaygın olarak uygulanmaktadır. Real-time PZR (qPZR), yüksek hassasiyeti, kısa analiz süresi ve kantitatif veri üretme kapasitesi nedeniyle resmi gıda kontrollerinde tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır. Türkiye’de GDO taramalarında p35S ve tNOS gibi genetik belirteçlere dayalı qPZR protokolleri kullanılmakta; bu analizler ISO standartları ve referans metotlara uygun şekilde gerçekleştirilmektedir (Türkiye Klinikleri, 2019). Bu durum, genetik analizlerin ulusal mevzuat kapsamında geçerliliğe sahip olduğunu ve resmi kontrol sistemine entegre edildiğini göstermektedir.

Ülke genelinde hem kamu hem de özel akredite laboratuvarlar, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde PZR ve real-time PZR yöntemlerini rutin olarak uygulamaktadır. TÜRKAK akreditasyonuna sahip bazı laboratuvarlar, PZR temelli analizleri referans metotlara uygun şekilde raporlamakta ve bu sonuçlar resmi denetimlerde kullanılmaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024a). Ayrıca Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, PZR temelli yöntemlerin doğrulanması, laboratuvarlar arası karşılaştırma testlerinin yürütülmesi ve analiz performansının izlenmesi gibi faaliyetlerle genetik analizlerin ulusal düzeyde standardizasyonuna katkı sağlamaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024b). Bu uygulamalar, Türkiye’de PZR ve diğer genetik testlerin gıda güvenliği alanında yalnızca destekleyici değil, karar verici nitelikte yöntemler haline geldiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç

Genetik analizler, son otuz yıl içinde gıda güvenliği alanında en hızlı gelişen ve en fazla beklenti yaratan yöntemler arasında yer

almıştır. PZR tabanlı patojen tespiti, tür doğrulama, toksijenik potansiyelin genetik göstergeler aracılığıyla değerlendirilmesi ve tüm genom dizileme uygulamaları, gıda kaynaklı risklerin daha erken ve daha yüksek çözünürlükte tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Law ark., 2015; EFSA BIOHAZ Panel, 2019).

Bu kitap bölümünde vurgulandığı üzere, genetik testlerin gıda güvenliğine en önemli katkısı, mikrobiyal ve biyolojik risklerin moleküler düzeyde izlenebilir hâle gelmesidir. Özellikle gıda kaynaklı salgınların araştırılmasında, suş düzeyinde ayırım yapabilen WGS temelli yaklaşımlar, klasik yöntemlerle elde edilmesi mümkün olmayan bir epidemiyolojik çözünürlük sunmaktadır. Bu durum, genomik araçların bilimsel değerini ve risk yönetimindeki potansiyelini açık biçimde ortaya koymaktadır (Allard ark., 2016; FAO & WHO, 2018).

Bununla birlikte, genetik analizlerin sunduğu teknik kapasite çoğu zaman biyolojik bağlamdan ve risk değerlendirme ilkelerinden bağımsız şekilde yorumlanmaktadır. Gıda matrislerinden DNA izolasyonu sırasında karşılaşılan analitik sınırlılıklar, ölü hücrelerden kaynaklanan DNA'nın yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmesi ve metagenomik verilerin nicel risk değerlendirmesine doğrudan çevrilememesi, genetik testlerin her koşulda güvenilir olduğu varsayımını sorgulatmaktadır. Cangelosi & Meschke (2014) tarafından da vurgulandığı gibi, genetik bilginin varlığı her zaman biyolojik etkinliği veya gerçek bir halk sağlığı riskini temsil etmemektedir. Bu ayırımın göz ardı edilmesi, genetik testlerin bilimsel değerini zayıflatan temel unsurlardan biridir (EFSA BIOHAZ Panel, 2022).

Gıda hileciliği, tür doğrulama ve fermente gıdalarda suş tanımlaması gibi alanlarda genetik analizlerin sunduğu katkılar tartışmasızdır. Ancak bu uygulamaların güvenilirliği; kullanılan referans veri tabanlarının kalitesi, yöntemlerin standardizasyonu ve düzenleyici gerekliliklerle uyumu ile doğrudan ilişkilidir. Bu unsurlar yeterince dikkate alınmadığında, genetik testler güçlü bir bilimsel araç olmaktan çıkarak ticari ve hukuki riskler doğurabilen bir belirsizlik kaynağına dönüşebilmektedir (Galimberti ark., 2013; FAO & WHO, 2018).

Geleceğe yönelik değerlendirmeler, genetik analizlerin yapay zekâ destekli veri işleme, gerçek zamanlı sekanslama ve dijital

izlenebilirlik sistemleriyle entegrasyonunun gıda güvenliği uygulamalarını dönüştürebileceğini göstermektedir. Ancak bu dönüşümün başarısı, teknolojik yenilikten çok bilimsel muhakeme, disiplinler arası iş birliği ve regülasyonel çerçevenin gelişimi ile belirlenecektir (Marvin ark., 2017; Verdouw ark., 2021).

Sonuç olarak, gıda güvenliğinde genetik testler ne koşulsuz bir umut ne de temelsiz bir abartıdır. Bu teknolojiler, doğru sorularla, uygun bağlamda ve bilimsel sınırlılıkları gözetilerek kullanıldığında güçlü bir risk yönetimi aracına dönüşmektedir. Ancak genetik verilerin biyolojik gerçeklikten ve gıda güvenliği prensiplerinden koparılarak yorumlanması durumunda, beklentilerin bilimsel kanıtların önüne geçtiği abartılı bir beklenti alanının oluşması kaçınılmazdır. Bu nedenle genetik testlerin gıda güvenliğindeki gerçek değeri, teknolojinin kendisinden çok, onu kullanan bilimsel aklın niteliğiyle tanımlanmalıdır.

Kaynakça

Allard, M. W., Strain, E., Melka, D., Bunning, K., Musser, S. M., Brown, E. W., & Timme, R. (2016). Practical value of food pathogen traceability through building a whole-genome sequencing network and database. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 1975–1983. <https://doi.org/10.1128/JCM.00081-16>

AOAC International. (2020). *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Rockville, MD: AOAC International.

Banerjee, G., Agarwal, S., Marshall, A., Jones, D. H., Sulaiman, I. M., Sur, S., & Banerjee, P. (2022). Application of advanced genomic tools in food safety rapid diagnostics: Challenges and opportunities. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100886. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100886>

Billington, C., Kingsbury, J. M., & Rivas, L. (2022). Metagenomics approaches for improving food safety: A review. *Journal of Food Protection*, 85(3), 448–464. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-301>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Cangelosi, G. A., & Meschke, J. S. (2014). Dead or alive: Molecular assessment of microbial viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 5884–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-14>

Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and*

Bioanalytical Chemistry, 396(6), 1977–1990.
<https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2018). Statement on the use of whole genome sequencing (WGS) for the assessment of microorganisms intentionally added to the food chain. *EFSA Journal*, 16(12), 5405. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5405>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2019). Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *EFSA Journal*, 17(12), e05898. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2022). Integration of genomics in surveillance and risk assessment for outbreak investigation of food-borne microorganisms. *EFSA Journal*, 20(4), e200417. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.e200417>

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal*, 18(3), 6040. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>

Emerson, J. B., Adams, R. I., Roman, C. M. B., Brooks, B., Coil, D. A., Dahlhausen, K., ... Rothschild, L. J. (2017). Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*, 5(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0285-3>

Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3148–3155. <https://doi.org/10.1128/AEM.00256-13>

FAO & WHO. (2021). *Microbiological risk assessment: Guidance for food* (Microbiological Risk Assessment Series No. 36). Rome: FAO & World Health Organization.

Fittipaldi, M., Nocker, A., & Codony, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 91(2), 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007>

Floren, C., Wiedemann, I., Brenig, B., Schütz, E., & Beck, J. (2015). Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry*, 173, 1054–1058. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.138>

Foddai, A. C. G., & Grant, I. R. (2020). Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4281–4288. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10542-x>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) & World Health Organization (WHO). (2018). *Whole genome sequencing for food safety and public health*. Rome: FAO/WHO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2011). *Food safety and related topics*. Erişim tarihi 16 Aralık 2025, <https://www.fao.org/food-safety/en/>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2022). *Thinking about the future of food safety: A foresight report* (CB8667EN). Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/cb8667en>

Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., ... Huttenhower, C. (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(22), E2329–E2338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319284111>

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>

Gálvez, J. F., Mejuto, J. C., & Simal-Gándara, J. (2018). Future challenges on the use of blockchain for food traceability analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 107, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.011>

Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>

Haider, N., Nabulsi, I., & Al-Safadi, B. (2012). Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science*, 90(2), 490–493. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.013>

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term

probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>

Hoorfar, J. (2011). Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *APMIS Supplement*, 119(133), 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02767.x>

Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., & Fach, P. (2003). Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5835. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5835.2003>

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004>

Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., ... Bustin, S. A. (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 59(6), 892–902. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>

International Organization for Standardization. (2019). *Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: General requirements and definitions* (ISO 22174:2019). Geneva, Switzerland: ISO.

Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., ... Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology*, 79, 96–115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>

Knight, R., Vrbanc, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 410–422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>

Köppel, R., van Velsen, F., Ganeshan, A., Pietsch, K., Weber, S., Graf, C., ... Licina, A. (2020). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from chamois, roe, deer, pork and beef. *European Food Research and Technology*, 246, 1007–1015. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03468-1>

Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>

Libbrecht, M. W., & Noble, W. S. (2015). Machine learning applications in genetics and genomics. *Nature Reviews Genetics*, 16(6), 321–332. <https://doi.org/10.1038/nrg3920>

Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., ... Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

Marvin, H. J. P., Janssen, E. M., Bouzembrak, Y., Hendriksen, P. J. M., & Staats, M. (2017). Big data in food safety: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(11), 2286–2295. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1257481>

Nielsen, E. E., Cariani, A., Mac Aoidh, E., Maes, G. E., Milano, I., Ogden, R., ... Carvalho, G. R. (2012). Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. *Nature Communications*, 3, 851. <https://doi.org/10.1038/ncomms1845>

Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015>

Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A. K., & Brousseau, R. (2009). Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.004>

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D., & Camper, A. K. (2007). Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5111–5117. <https://doi.org/10.1128/AEM.02987-06>

Ogden, R. (2010). Forensic science, genetics and wildlife biology: Getting the right mix for a wildlife DNA forensics lab. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 6(3), 172–179. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9178-5>

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2016). *Biotechnology for sustainable growth and development*. Paris: OECD Publishing.

Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43(7), 1902–1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.010>

Pitt, J. I., & Miller, J. D. (2017). A concise history of mycotoxin research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021–7033. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494>

Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>

Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., Cowley, L., ... Carroll, M. W. (2016). Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 530(7589), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature16996>

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

Salveti, E., Harris, H. M. B., Felis, G. E., & O'Toole, P. W. (2018). Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(20), e02052–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02052-18>

Salveti, E., Orrù, L., Capozzi, V., Martina, A., Lamontanara, A., Keller, D., ... Spano, G. (2016). Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4595–4605. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7416-9>

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2011). Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *Journal of the Royal Society Interface*, 8(54), 117–126. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0131>

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

Schwendener, S., Cotting, K., Perreten, V., & Berchtold, C. (2015). Evaluation of propidium monoazide qPCR to quantify viable bacteria in processed foods. *Journal of Microbiological Methods*, 113, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.014>

Sczyrba, A., Hofmann, P., Belmann, P., Koslicki, D., Janssen, S., Dröge, J., ... McHardy, A. C. (2017). Critical assessment of metagenome interpretation—A benchmark of metagenomics software. *Nature Methods*, 14(11), 1063–1071. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4458>

Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), R157–R163. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x>

Staats, M., Arulandhu, A. J., Gravendeel, B., Holst-Jensen, A., Scholtens, I., Peelen, T., ... Kok, E. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17), 4615–4630. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>

Tarım ve Orman Bakanlığı. (2024a). *Gıda ve yemlerde resmi kontrol laboratuvarları ve analiz faaliyetleri*. <https://www.turktarim.gov.tr>

Tarım ve Orman Bakanlığı. (2024b). *Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı ve görevleri*. <https://www.turktarim.gov.tr>

Tarım ve Orman Bakanlığı. (2025). *Türk Gıda Kodeksi numune alma ve analiz metotları tebliği*. <https://www.resmigazete.gov.tr>

Tarлак, F. (2023). The use of predictive microbiology for the prediction of the shelf life of food products. *Foods*, 12(24), 4461. <https://doi.org/10.3390/foods12244461>

TÜRKAK. (2019). *TS EN ISO/IEC 17025: Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar*. Türk Akreditasyon Kurumu. <https://www.turkak.org.tr>

Türkiye Klinikleri. (2019). *GDO analizlerinde kullanılan resmi PCR yöntemleri*. <https://www.turkiyeklinikleri.com>

U.S. Food and Drug Administration. (2020). *Whole genome sequencing (WGS) program*. Retrieved December 18, 2025, from <https://www.fda.gov/food/whole-genome-sequencing-wgs-program>

van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., ... Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(Suppl. 3), 1–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>

Vegi, A., & Wolf-Hall, C. E. (2013). Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. *Journal of Food Science*, 78(1), M70–M76. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.03008.x>

Verdouw, C., Tekinerdogan, B., Beulens, A., & Wolfert, S. (2021). Digital twins in smart farming. *Agricultural Systems*, 189, 103046. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.103046>

Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>

World Health Organization. (2022). *WHO global strategy for food safety 2022–2030: Towards stronger food safety systems and global cooperation*. Geneva: World Health Organization. Retrieved December 18, 2025, from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240057685>

Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., & Li, B. (2016). Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833>

BÖLÜM 4

BİTKİ SİSTEMATİĞİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

CÜNEYT UÇARLI¹
MUHAMMED SAFA TOPÇU²

Giriş

Filogenetik, ortak bir atadan miras alınan moleküler mekanizmaları analiz ederek organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri araştırır. Bu ilişkiler, filogenetik ağaçlar ve "yaşam ağacı" ile temsil edilir. Önemli adımlar arasında 16S rRNA gibi korunan genlerin seçilmesi, NCBI ve INSDC gibi veri tabanlarının kullanılması ve doğru dizi hizalamalarının gerçekleştirilmesi bulunur. Jukes-Cantor ve Kimura gibi istatistiksel modeller, evrimsel mesafeleri yorumlamak için kullanılır. PCR gibi gelişmeler,

¹Doç. Dr., İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Orcid: 0000-0002-9526-576X

²İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Orcid: 0009-0000-6712-1278

DNA'nın hassas şekilde çoğaltılmasını ve çeşitli moleküler belirteçlerin kullanılmasını sağlayarak filogenetik çalışmalarda devrim yaratmıştır. Bu yöntemler, farklı türler arasındaki evrimsel tarih ve ilişkilerin anlaşılmasını artırır. Protein belirteçleri, izoenzimler ve alloenzimler, elektroforetik ayırma yoluyla genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkileri incelemek için kullanılırken, RFLP, RAPD, SSR, ISSR, AFLP ve SNP'ler gibi DNA tabanlı teknikler daha fazla polimorfizm ve genetik analiz ve haritalama için doğruluk sunar. Gen dizileme ve DArT gibi teknikler, çeşitli organizmalar arasındaki genetik ilişkiler ve çeşitlilik anlayışını daha da geliştirir.

Filogenetik

Filogenetik organizmalar arası evrimsel ilişkiyi çözümlemeye çalışıp, sahip oldukları moleküler mekanizmaların ortak bir atadan geldiğini ve bu ortak atadan evrimleştikleri için aralarında ilişkilendirilebilir olduklarını açıklar [1,2]. Bu ilişkilendirme organizmalar arasındaki fizyolojik, morfolojik, genetik, coğrafik ve ekolojik farklılıklardan yola çıkılarak yapılır [3]. Bu ilişkilendirmelerin gösterimlerine “filogenetik ağaçlar” denir ve bu evrimsel ilişkilerin tamamını kapsayan grafiğe ise “yaşam ağacı” denir. Yaşam ağacı organizmaların tek atadan gelerek ve dallanıp farklılaşarak diğer türleri oluşturduğunu gösteren evrim teorisi kapsamında geliştirilmiş bir grafikdir.

Filogenetikte İzlenmesi Gereken Adımlar

Gen Seçimi, analiz için seçilecek gen tüm organizmalarda yapı ve fonksiyonunu korumuş olmalıdır. Örneğin: 16S rRNA, ribozomal küçük alt birim yapısına katılan ve tüm hücrelerde aynı işlevi gören bir molekül, dolayısıyla analizlerde sıkça tercih edilir [2,4].

Dizi Özellikleri, seçilen dizi hem korunmuş hem de değişken bölgeler içermeli. Korunmuş bölgeler, evrimsel açıdan ortak atayı

gösterir, değişken bölgeler ise yakın türler arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılır. Bu sayede diziler benzerliklerine göre sıralanır ve farklılıklarına göre tür veya taksonomik düzeyde ayırt edilir.

Gen Aktarımı, filogenetik analizde kullanılacak gen, yalnızca ata bireyden yeni nesle vertikal olarak aktarılmalıdır. Horizontal gen aktarımı, yani genlerin farklı türler arasında transfer edilmesi, organizmaların evrimsel ata-soy ilişkisini karıştırabilir ve yanlış sonuçlara yol açar.

Analizde Veri Tabanlarının Kullanımı

Analizlerde dizilerin karşılaştırılmasında ve incelenmesinde daha önceden dizilenmiş ve kaydedilmiş olan bazı veri bankalarından yararlanılır.

NCBI (“NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION”): Amerikan Ulusal Kütüphanesi’nin bir parçasıdır, genomik ve proteomik veri tabanları, bilgisayar destekli araştırma ve dizi analizi yazılımları sunar. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), GenBank ve PubMed gibi uygulamalar ile donatılmıştır.

INSDC (“INTERNATIONAL NUCLEOTIDE SEQUENCE DATABASES”): DNA dizilerini toplayan ve paylaşan uluslararası bir iş birliği ağıdır. GenBank, DDBJ ve EMBL gibi kuruluşları içerir [5].

DDBJ (“DNA DATA BANK OF JAPAN”):Japonya’da yer alan ve nükleotid dizi verilerini toplayarak bilimsel araştırmalara destek sağlayan bir veri bankasıdır [6].

PDB (“PROTEİN DATA BANK”):Protein ve nükleik asitlerin üç boyutlu yapılarını araştıran ve toplayan bir veri tabanıdır [5].

Genlerin Analizi

Hizalama, dizi karşılaştırılmasının ilk aşamasıdır. Doğru hizalama en kritik noktadır. Yanlış hizalama, sistematik hata veya tamamen yanlış filogenetik ağaçlara neden olabilir. Genellikle doğru bir hizalama benzer kalıntıların eşleşmesini ve benzer fizikokimyasal özelliklere uymasını sağlar. Sekonder yapısal faktörler biliniyorsa, bunlar rehber olarak kullanılabilir. Hizalama kalitesini artırmak için manuel düzenleme önemli bir etkidir. Hizalamanın kalitesini artırmak için hataların düzeltilmesi ve ilişkisiz veya bağımsız dizilerin ortadan kaldırılması mümkündür [2].

Çoklu Yer Değiştirmeler, Hizalamadaki yer değiştirmelerin sayılmasıyla diziler arası farklılıklar basit şekilde ölçülebilir. Yer değiştirme oranları iki dizi arasındaki gözlenen uzaklığı gösterir. Bu gözlenen sayı daime gerçek evrimsel süreci yansıtmayıp rastgele mutasyonlar dolayısıyla olmuş olabilir. “Yanlış Homoplazi” adı verilen çoklu yer değiştirmeler ve bireysel pozisyonadaki yer değişimleri bu analizin doğru saptamasını zorlaştırır. Doğru bir şekilde sonuca ulaşmak için doğru homoplazi kullanılmalıdır [2]. Bu doğru homoplaziye ulaşmak için birkaç istatistiksel modeller kullanılır.

JUKES-CANTOR MODELİ: 1969 yılında geliştirilmiştir. Tek parametrelili bir modeldir. Bu modelde dizilerin birbirine dönüşme olasılığı eşit varsayılır. En basit yer değiştirme modelidir. Dizilerin evrimsel uzaklıklarından yararlanılan bir modeldir.

KIMURA MODELİ: 1980 yılında geliştirilmiştir. İki parametrelili bir modeldir. Bu modelde dizilerin farklı olasılıklarla birbirlerine dönüştükleri varsayılır. Daha karmaşık fakat gerçekçi bir modeldir. Bu model transisyonların transversiyonlardan daha sık gerçekleştiğini gösterir ve evrimsel uzaklık saptamada önemlidir [2,7].

Filogenetik Çalışmalarda Kullanılan Moleküler Yöntemler

DNA Belirteçler, Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) K. Mullis ve arkadaşları tarafından icadı moleküler biyolojinin metodolojik repertuarını devrim niteliğinde değiştirdi [8]. Bu teknik aracılığıyla DNA dizisini in vitro olarak yüksek sayıda kopyalanır ve moleküler klonlama ihtiyacını ortadan kaldırır. Yeni teknolojilerin ortaya çıkmasıyla günümüzde birçok moleküler belirteç mevcuttur. Günümüzde sistematik, genetik çeşitlilik ve filogenetik çalışmalarda genel olarak çeşitli yöntemler kullanılır.

Protein Belirteçler, Protein profil analizi, protein polimorfizmlerine dayanan en eski moleküler belirteçlerdir. En sık kullanılan teknik, proteinlerin elektroforetik ayrımı ve ardından belirli bir protein alt sınıfının spesifik boyanmasıdır. Enzimatik ve enzimatik olmayan proteinler kullanılarak, doğal popülasyonlardaki genetik değişkenliği tahmin etme ve anlama, gen akışı, hibritleşme, tür sınırlarının tanınması ve filogenetik ilişkiler gibi birçok sorun üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır [9]. Modern protokol, PAGE'in kullanımı ve proteinlerin SDS ile denatüre edilmesiyle 1970'lere kadar uzanır [10]. SDS deterjanı, proteinleri negatif yüklü polipeptid alt birimlerine denatüre etmek için kullanılır [11]. Poliakrilamid jeller üzerinde elektroforetik ayırım sonrasında, proteinler Coomassie Brilliant Blue gibi evrensel bir protein boyası ile görselleştirilir. Allelik farklılıklar, polipeptid boyutlarındaki değişiklikler olarak tespit edilir ve alleller genellikle kodominanttır, ancak dominant/boş allelik sistemler de mevcuttur [12].

Elektroforetik yöntemler kullanılarak aynı anda iki genel protein verisi toplanabilir. Biri, farklı gen lokusları tarafından üretilen veya aynı lokustaki farklı alleller tarafından üretilen tüm polimerlerin alt birimlerini içeren enzimlerin fonksiyonel olarak benzer formları olan izoenzimlerden türetilmiştir [13]. Diğer veri seti, aynı gen lokusunun farklı allelik alternatiflerini temsil eden

polipeptidlerin varyantları olan allozimlerdir. Her iki veri türü de moleküler sistematikte önemlidir ve her ikisi de net yük ve boyuta göre ayrılabilen proteinleri içerir [9]. İzoenzimlerin genetik belirteçler olarak ortaya çıkışı, bitki popülasyonlarının genetik çalışmalarında büyük bir ilerleme sağlamıştır, çünkü o zamana kadar yalnızca morfolojik ve bazı durumlarda sitolojik belirteçler mevcuttu. Tür başına yaklaşık 20-30 lokus, birçok türün popülasyonları için genetik çeşitliliğin ve çiftleşme sistemi parametrelerinin tahmin edilmesine olanak tanımıştır. Hala izoenzimler, genetik varyasyonların analiziyle ilgili birçok araştırma sorusunu yanıtlamak için güvenilir belirteçlerden biridir. Protein belirteçlerinin başlıca avantajları, kodominant kalıtım ve teknik basitlik ve maliyet etkinliğidir. Ancak, bazı sınırlamaları da vardır. Yeni bir allel, yalnızca ilgili molekülün elektroforetik hareketliliğini etkiliyorsa tespit edilebilir. Nükleotid değişimlerinin yalnızca yaklaşık %30'u polimorfik parça desenlerine yol açar ve bu nedenle alloenzim analizi genetik değişkenliği eksik tahmin eder [14]. Ayrıca, birçok bitki türü poliploiddir ve bu da alloenzim desenlerinin yorumlanmasını zorlaştırabilir. Bunun yanı sıra, allozim çalışmaları için amaçlanan bitki dokusu hasattan hemen sonra işlenmelidir çünkü proteinler genellikle oldukça kararsızdır. Allozim çalışmaları, genetik çeşitliliği incelemek için yaygın olarak kullanılır çünkü tekrarlanabilir, nispeten hızlı ve ucuzdur ve nötr belirteçlerdir [15,16,17].

Bu tekniğin başlıca dezavantajı, bir popülasyonda mevcut olan çok sayıda genotipi tanımlamak için yüksek seviyede polimorfizm üretmemesidir, çünkü enzim aktivitesi gerekliliği çalışılabilecek lokusların aralığını sınırlar [18]. DNA tabanlı teknikler, daha fazla polimorfizm üretmek için genellikle allozimlerin yerini alır veya onlarla kullanılır.

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

1980'lerin başında genetik belirteç analizi, özellikle mevcut potansiyel belirteç sayısının artması sonucunda protein belirteçlerden DNA belirteçlerine kaymıştır. RFLP'nin ilk kullanımı, insan genetik haritasının oluşturulmasında olmuştur ve bu, genel bir genetik analiz yöntemi olarak önerilmiştir [19,20]. Bu prosedürde, genomik DNA, tipik olarak belirli altı baz çiftlik dizileri tanıyan restriksiyon endonükleazları kullanılarak kesilir. Parçalar agaroz jeller üzerinde elektroforetik olarak boyutlarına göre ayrılır, denatüre edilir ve naylon veya nitroselüloz membranlara (blotlar) sabitlenir. Spesifik DNA parçalarının görselleştirilmesi, bireysel cDNA veya genomik DNA klonlarına radyoaktif olarak işaretlenmiş tamamlayıcılar olarak enzimatik olarak sentezlenen DNA probları kullanılarak gerçekleştirilir. Blotlar, belirteçleri ortaya çıkarmak için birkaç gün ila 2 hafta boyunca X-işını filmine maruz bırakılır.

Günümüzde, izotopik olmayan tespit yöntemleri de mevcuttur [21]. RFLP ile tespit edilen polimorfizmin temeli, restriksiyon enzimi kesim noktalarındaki farklılıklardır. Büyük eklemeler ve silmeler de tespit edilebilir, ancak restriksiyon noktalarındaki değişikliklerden ayırt edilemez. Nokta mutasyonları, restriksiyon noktalarının kendisinde olmadıkça tespit edilmez. Elektroforezin standart yöntemine bir varyasyon olan denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DGGE), re gradyanı içeren poliakrilamid jellerde örneklerin ayrılması yoluyla restriksiyon noktaları arasındaki nokta mutasyonlarının tespitini mümkün kılar [22,23].

RFLP belirteçleri kodominant ve genellikle lokus spesifiktir. Potansiyel olarak kritik deneyler için faydalı olmasına rağmen, RFLP analizi zaman alıcı ve emek yoğundur. Diğer dezavantajları, yüksek kalitede ve büyük miktarda DNA ile hibridizasyon için DNA problemlerinin gerekliliğidir. Kesilmiş amplifiye polimorfik dizi (CAPS), aynı zamanda PCR-RFLP olarak da bilinir, geleneksel

RFLP belirtecinin değiştirilmiş bir formudur [24,25]. PCR teknolojisinin gelişmesiyle, bilinen dizili bir DNA bölgesinin amplifikasyonu daha kolay hale gelmiştir. Standart bir CAPS deneyinin ilk adımında, bilinen dizilere tamamlayıcı primerler kullanarak tanımlı nükleer veya organel DNA bölgeleri PCR ile çoğaltılır. İkinci adımda, PCR ürünleri bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesilir ve restriksiyon noktası polimorfizmleri agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması ile gösterilir. Alternatif olarak, denatüre edici olmayan PAA jelleri ve SSCP jelleri de kullanılır [26]. Geleneksel RFLP analizinin aksine, CAPS yaklaşımı çok az miktarda şablon DNA ile gerçekleştirilebilir ve radyoaktif işlem veya blotlama adımları gerektirmez. Ancak, uygun amplikon ve restriksiyon enzim kombinasyonlarını belirlemek için, bir CAPS projesinin başlangıç aşamasında geniş bir PCR primer çiftleri ve restriksiyon enzimleri yelpazesi taranmalıdır.

Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA (RAPD)

En yaygın DNA parmak izi tekniği RAPD'dir. Bu teknikte, rastgele dizilime sahip kısa (10 baz) primerlerin düşük özgülkle bağlanması kullanılarak bilinmeyen dizilerin ürünlerinin amplifikasyonu yönlendirilir [27]. Diğer PCR tabanlı sistemlerden farklı olarak, sadece bir primer kullanılır. Primerlerin kısa dizilimi, genom boyunca çok sayıda potansiyel primer bağlanma noktası sağlar ve iki primer bağlanma noktası yakın konumda olduğunda DNA parçalarının verimli amplifikasyonu gerçekleşebilir. RAPD analizinde, küçük (yaklaşık 10 ng) genomik DNA örneklerinden birçok kısa (yaklaşık 300 ila 2000 bp) DNA dizisi amplifiye edilir. Amplifiye edilen DNA genellikle agaroz jeller üzerinde elektroforetik olarak ayrılır, etidyum bromür ile boyanır ve ultraviyole ışık altında görselleştirilir. Ancak, bantların radyolabeling'i, poliakrilamid jeller üzerinde ayrılması ve otoradyografi ile tespiti daha zayıf amplifikasyon ürünlerini de tespit edebilir. Bu tekniğin varyasyonları arasında DAF (DNA

amplifikasyon parmak izi) ve AP-PCR (rastgele primerli PCR) bulunur [28,29].

RAPD tekniği, teknik olarak basit, verimli ve yüksek verimliliği destekleyen bir yöntemdir [30]. Kısa oligonükleotid primerler kullanarak genomik bölgelerin PCR amplifikasyonu, neredeyse sınırsız bir bilgi verici genetik polimorfizm kaynağı sağlar [27,29]. Ayrıca, PCR'nin DNA amplifikasyonundaki hassasiyeti, büyük miktarda doku ve hedef genomik DNA ihtiyacını minimize eder [8]. Bireylerin moleküler genetik profilleri, morfolojik ölçümler ve izoenzim analizine kıyasla belirli bir avantaj sunan çevresel etkilerden arındırılmıştır.

RAPD uygulamaları arasında kltivar ayrımı [31], belirteç destekli seleksiyon [32], bağlantı haritalama [33,34] ve koruma biyolojisi [35] yer alır. RAPD yönteminin basitliği, içsel sınırlamalarla birlikte gelir. RAPD'ler dominant belirteçler olarak kabul edilir, bu da genetik çalışmalarda heterozigotluğu tespit edememe dezavantajını taşır. RAPD'lerin kullanımıyla ilgili hata kaynakları mevcuttur. RAPD'lerin oluşturulması, anonim diziliimli oligonükleotid primerler kullanılarak gerçekleştirildiğinden, amplifiye edilen parçalar da bilinmeyen nükleotid dizilimindedir. Bu RAPD bantları, moleküler ağırlık (yani parça boyutu) ve elektrikselsel yüke dayalı olarak bir jel üzerinde ayrılır. Bu nedenle, görünen bir bant, nükleotid diziliminde farklılık gösteren benzer moleküler ağırlığa sahip amplifiye parçaları içerebilir. Ayrıca, bant yoğunlukları amplifiye parça dozajını yansıtır ve daha az yoğun bantlar tekrarlanamaz olabilir [36]. RAPD bant yoğunluğuındaki farklılıklar, soya fasulyesinde yaprak ve kök dokusunun analizinde gözlenmiştir [37]. RAPD'lere atfedilen iki yaygın hata kaynağı bant tekrarlanabilirliği ve skorlamadır [38]. RAPD'lerin kullanımında, analiz edilen dokunun yaşı, patojen enfeksiyonu, kontaminasyon ve PCR reaktifleri stokları arasındaki varyasyon gibi ek hata kaynakları değerlendirilmiştir [39].

Mikrosatellit DNA Belirteçleri (SSRs)

Mikrosatellit DNA, basit dizi tekrarları (SSRs) olarak da adlandırılır ve iki ila beş baz çiftinden oluşan çekirdek dizilerin ardışık tekrarlarını içeren tekrarlayan DNA bölgeleridir. Bir mikrosatellit lokusundaki farklı alleller, çekirdek dizinin ardışık tekrar sayısında farklılık gösterir. Bu diziler ökaryot genomlarında yaygın olarak bulunur ve çoğu tür için binlerce potansiyel mikrosatellit belirteci geliştirilebilir. Mikrosatellit DNA belirteçleri, çeşitlilik değerlendirmeleri için büyük avantajlar sunar. Tek kopya nükleer DNA'ya (scnDNA) kıyasla çok yüksek mutasyon oranlarına tabidirler ve bazen onlarca allel üretirler. Allozimler ve scnDNA belirteçleri gibi, mikrosatellit belirteçlerin kalıtımı kodominanttır, bu nedenle heterozigotlar genellikle homozigotlardan güvenilir bir şekilde ayırt edilebilir. Mikrosatellit lokuslarındaki heterozigotluk, bu lokuslardaki nadir ayrılan allellerin çok sayıda olması nedeniyle diğer nükleer DNA belirteçlerine göre çok daha hassastır. Bu nadir allellerin kaybı, heterozigotluktan daha hassas bir popülasyon darboğazı ölçüsü sağlar [40].

Mikrosatellit DNA belirteçlerinin başlıca dezavantajı, geliştirme maliyetidir. Mikrosatellit belirteçler, protein kodlamayan DNA bölgelerinden geliştirildiğinden, taksonlar arasında korunmazlar; bu nedenle, bir tür için geliştirilen mikrosatellit DNA belirteçleri genellikle yalnızca çok benzer türler için kullanışlıdır. Mikrosatellit belirteçlerinin geliştirildiği organizma sayısı hızla artmaktadır, bu yüzden mikrosatellit geliştirme maliyetlerinin yakın gelecekte daha düşük olması mümkündür. Ayrıca, bazı mikrosatellit lokuslarında bulunan çok sayıda allel, allel frekanslarını doğru bir şekilde tahmin etmek için büyük örneklem büyüklükleri gerektirir.

Kısa Dizi Tekrarları Arası (ISSR)

Genom dizisi hakkında ön bilgi gerektirmeyen RAPD benzeri bir markör sistemidir [41]. Mikrosatellit-spesifik oligonükleotidlerin PCR primerleri olarak başarılı bir şekilde uygulanması ilk olarak Meyer ve arkadaşları tarafından 1993 yılında tanımlandı. Bu teknik, daha sonra çeşitli diğer organizmalara uygulandı ve ISSR-PCR [42], SPAR [43] ve MP-PCR [44] gibi çeşitli kısaltmalar önerildi. ISSR, tekrarlayan bölgelerin 5' veya 3' ucunda ankrajlanmış primerler kullanarak bu bölgelerdeki varyasyonları belirler. Bu teknik, ters yönlendirilmiş tekrarlar arasındaki genomik segmentlerin amplifikasyonuna olanak tanır. Genellikle, tek primerler serisi kullanılarak agaroz jel veya poliakrilamid jel üzerinde boyutlarına göre ayrılan bir dizi fragman üretilir [45].

ISSR markör analizi üç aşamadan oluşur: oligonükleotid primerlerin tasarımı, ISSR segmentlerinin PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin ayrılması. ISSR-PCR primerleri genellikle mikrosatellitlerin tekrar dizisi motiflerine dayanarak tasarlanır. Bu ankrajlar, ISSR profillerindeki bantların daha yüksek çözünürlüğünü ve daha iyi tekrarlanabilirliğini sağlar. ISSR, parmak izi oluşturma, genetik çeşitlilik analizi ve genetik haritalama için faydalıdır. Hızlıdır ve birbirine çok yakın bireyler arasında ayrım yapabilir. Avantajları arasında çok sayıda polimorfik lokus, yüksek verimlilik ve düşük maliyet bulunur. ISSR, genomlar boyunca dağılmış çok sayıda mikrosatellit bölgesindeki varyasyonlara erişir. ISSR markörlerinin ilk çalışmaları [42,43], kültür bitkileri üzerinde yoğunlaşmış ve ISSR markörlerinin son derece değişken doğasını göstermiştir [46,47,48].

ISSR lokuslarının kalıtımı, klasik Mendel oranlarına çok yakın bir yaklaşımı göstermiştir [49]. Yüksek değişkenlik ve yüksek haritalama yoğunluğu, bu yeni dominant mikrosatellit bazlı moleküler markörleri, bireysel türlerin genetik haritalarını üretmek

için ideal hale getirir [50]. Bu özellikler, tekrarlanabilirlik deneylerinde daha büyük sağlamlık ve bileşen veya DNA şablon konsantrasyonlarındaki değişikliklerle bant desenlerinin değişme olasılığının daha düşük olması ile birleştğinde, ISSR'yi genetik varyasyon araştırmalarında ve mahsul çeşidi sınıflandırmasında üstün kılar [50,51]. Dezavantajları ise ISSR markörlerinin dominant ve daha az tekrarlanabilir olmasıdır. Standart ISSR-PCR protokolüne ek bir PCR yeniden amplifikasyon adımı eklemek, tekrarlanabilirliği ve verimliliği önemli ölçüde artırabilir [52].

Minisatellit Dna'nın Doğrudan Amplifikasyonu (DAMD)

Minisatellit DNA'nın doğrudan amplifikasyonu (DAMD)-PCR terimi, Gustafson ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış ve ilk kez bitkilere minisatellit-primerli PCR uygulamışlardır [53,54,55]. Minisatellitler, değişken sayıda ardışık tekrarlar (VNTR) olarak da bilinir ve ardışık tekrar eden DNA dizileridir. Boyutları birkaç yüz ile birkaç kilobaz çifti arasında değişirken, tekrarlanan birimleri 10 ila 60 baz çifti arasında değişir. Ardışık olarak düzenlenmiş tekrarlayıcı dizilerin ortak bir özelliği, yüksek polimorfizm dereceleridir. Bu polimorfizm, çoğunlukla ardışık tekrar sayısındaki varyasyondan ve ayrıca bireysel tekrarların iç yapısından kaynaklanır [56].

Minisatellitler terimi, Jeffreys ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış ve başlangıçta 10 ila 50 baz çifti ünitelerinin ardışık tekrarlarına uygulanmıştır. Bu tekrarlar, 10 ila 15 baz çifti uzunluğunda ortak bir GC açısından zengin çekirdek dizi taşıırken, daha uzun ünite boyutlarına ve daha yüksek AT içeriğine sahip tekrarlar da tanımlanmıştır. Bu öncü çalışmalardan bu yana, minisatellit lokusları birçok organizmadan klonlanmış ve dizilenmiştir, bunlar arasında insan, sığır, fare, kuşlar ve bitkiler bulunur [14]. Çoğu minisatellit, çekirdek dizi olarak bilinen ortak bir motifi paylaşır [57,58]. Çalışmalar, minisatellit lokuslarının Mendel

tarzında kalıtıldığını ve fare [59], sığır [60], domates [61] ve pirinç [62] gibi birçok türün genomuna dağıldığını göstermiştir.

Minisatellitlerin ökaryotik genomlardaki yüksek bolluğu, minisatellit-komplementer oligonükleotidlerin PCR primerleri olarak kullanılmasına ve birçok polimorfik amplifikasyon ürünü üretilmesine olanak tanır. Bu yöndeki erken çalışmalar mantarlarla yapılmıştır. Meyer ve arkadaşları, M13 minisatellit tekrar biriminin, bir PCR primeri olarak kullanıldığında insan mantar patojeni *Cryptococcus neoformans*'ın farklı izolatlarını ayırt ettiğini ve tanımladığını göstermiştir. Benzer şekilde, Heath ve arkadaşları, balık, kuş ve insan genomlarını incelemek için M13 dahil olmak üzere çeşitli minisatellit çekirdek dizilerini primer olarak kullanmışlardır. PCR ürünlerinin elektroforetik ayrımından sonra, türler arasında farklılıklar bulunmuş, ancak tür içi varyasyon gözlenmemiştir. Minisatellit çekirdek dizisini tek primer olarak kullanarak, bu PCR uygulaması, bir genomdaki belirli bölgeleri tanımlamak için RAPD benzeri sonuçlar üretebilir. Minisatellit çekirdek dizileri RAPD primerlerinden daha uzun olduğundan, DAMD-PCR, nispeten yüksek katılıklarda etkili bir şekilde gerçekleştirilebilir ve böylece yüksek derecede tekrarlanabilir sonuçlar elde edilir [63].

Güçlendirilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP)

AFLP, ilk olarak Vos ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu teknik, genomik DNA'nın tam bir sindiriminden elde edilen restriksiyon fragmanlarının seçici PCR amplifikasyonuna dayanır. Teknik üç aşamadan oluşur: DNA'nın restriksiyonu ve oligonükleotid adaptörlerinin ligasyonu, restriksiyon fragmanlarının setlerinin seçici amplifikasyonu ve amplifiye edilmiş fragmanların jel analizi. Restriksiyon fragmanlarının PCR amplifikasyonu, adaptör ve restriksiyon yeri dizisi hedef alanları olarak kullanılarak gerçekleştirilir. Seçici

amplifikasyon, restriksiyon fragmanlarına uzanan primerler kullanılarak sağlanır ve bu primer uzantılarının restriksiyon yerlerini çevreleyen nükleotidlerle eşleştiiği fragmanlar amplifiye edilir. Bu yöntemle, nükleotid dizisi bilgisi olmadan restriksiyon fragmanları PCR ile görselleştirilebilir.

AFLP, biyolojik çeşitlilik, çeşit tanımlama ve genetik haritalama çalışmaları için potansiyel bir araçtır [64]. Bununla birlikte, AFLP analizi, mikrosatellitler gibi, izotopik veya floresan etiketli PCR ürünlerini tespit etmek için daha gelişmiş bir laboratuvar altyapısı gerektirir.

Filogenide Gen Dizileri

Filogenetik ve taksonomik ilişkileri çıkarmak amacıyla, hem morfolojik hem de moleküler veriler genellikle dikkate alınır. Son yıllarda, teknoloji ve gen dizileri bilgisi konusundaki ilerlemeler, angiosperm filogenisine önemli katkılarda bulunmuştur [65]. Biyologlar, taksonomik sıranın tüm seviyelerinde ilişkileri aydınlatmak için nükleer, kloroplast ve mitokondriyal genleri kullanmışlardır. Morfolojik karakterlerin farklı seviyelerdeki taksonları ayırt etmekte yetersiz kaldığı durumlarda, filogeniyi analiz etmek için moleküler yaklaşımlar giderek daha yararlı hale gelmiştir [66].

Bitkilerin moleküler sistematiiği ve filogenisinde en yaygın olarak kullanılan genlerden bazıları şunlardır: ribuloz-1,5-bifosfat karboksilazın büyük alt birimini kodlayan bir kloroplast geni olan *rbcL* [67]; ATP sentazın beta alt birimini kodlayan bir plastid geni olan *atpB* [68]; intronları birleştirmede rol oynadığı düşünülen bir kloroplast geni olan *matK* [65] ve çekirdeğin nükleolar organizasyon bölgesinde bulunan 18S, 5.8S ve 26S gibi nükleer rDNA cistron biriminin bölümleri [69]. Bu genler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kolayca amplifiye edilebilmeleri, az sayıda ekleme-silme

olayına sahip olmaları ve evrimsel olarak korunmuş olmaları nedeniyle filogenide kullanılmıştır [70,69,65].

RDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Bölgeleri

Farklı organizmaların filogenetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bölgelerden biri, nükleer ribozomal DNA cistronudur [71]. Sitoplazmik ribozomal RNA'ları (rDNA) kodlayan nükleer genler, çoğu ökaryotta, iç transkribe edilen spacer bölgeleri ITS1 ve ITS2 ile ayrılmış küçük (18S/SSU), 5.8S ve büyük (28S/LSU) alt birim rDNA bölgesine sahip transkripsiyonel rDNA birimlerine organize edilmiştir. LSU ve SSU rDNA'nın DNA dizileri, ribozom sentezindeki kritik rolleri nedeniyle güçlü stabilizasyon seçilimi altındadır. ITS rDNA bölgeleri gibi kodlamayan bölgeler ise benzer işlevsel kısıtlamalar altında değildir.

Rapor edilen çalışmalarda, ITS dizileri arasındaki varyasyon çoğunlukla nokta mutasyonlarına atfedilmektedir. Bu nedenle, daha hızlı mutasyon birikimi nedeniyle, bu bölgeler genellikle daha yüksek değişkenlik gösterir. Benzer sinyal korumuş diziler arasında yer alan bölgelerde, yerleştirme veya silme (indel) olaylarından etkilenen sitelerin nispeten küçük bir oranı vardır. Bu sınırlar içinde, dizilim hizalaması genellikle küçük yapısal kısıtlamaların olduğu bölgeler dışında belirsiz değildir. ITS1 ve ITS2 spacer bölgelerinin birleşik veri setlerinden yapılan filogenetik analizler, tek başına herhangi bir spacera dayanan analizlere kıyasla daha yüksek çözünürlük ve iç destek sağlayan ağaçlar verir. Aynı anda yapılan analizlerin bu yararlı etkisi, her spacerdeki faydalı karakterlerin azlığına dayanmaktadır. Bu etki, çoğu araştırılmış yakın ilişkili angiosperm gruplarında ITS1 ve ITS2'nin boyut, dizi değişkenliği ve G + C içeriği açısından benzerliklerine uygun olarak spacer verilerinin yüksek tamamlayıcılığını da gösterir [72, 73].

ITS bölgesinin birkaç genel özelliği, onun angiosperm filogenetik analizlerinde kullanımını teşvik eder. İlk olarak, diğer

nrDNA çokgen ailesi bileşenleri ile birlikte, ITS bölgesi bitki nükleer genomunda yüksek oranda tekrar eder. Tüm nrDNA tekrar birimi, kromozomal bir lokusta veya birden fazla lokusta ardışık tekrarlar halinde düzenlenmiş binlerce kopyada bulunur. Bu yüksek kopya sayısı, nrDNA'nın tespit edilmesini, amplifikasyonunu, klonlanmasını ve dizilenmesini teşvik eder. İkinci ve filogeni yeniden yapılandırma açısından en önemlisi, bu gen ailesinin eşitsiz crossing-over ve gen dönüşümü yoluyla hızlı eşgüdümlü evrim geçirmesidir. Bu özellik, bazı durumlarda homolog olmayan kromozomlardaki nrDNA lokusları arasında bile, tekrar birimlerinin intragenomik uniformluğunu teşvik eder ve genel olarak bu dizilerden tür ilişkilerinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılmasını sağlar [74, 75, 76, 77]. Sonuç olarak, birçok türde filogenetik bilgi çıkarmak için havuzlanmış nrDNA PCR ürünlerinin doğrudan dizilenmesi kullanılabilir. Ayrıca, eşgüdümlü evrim ve cinsel rekombinasyon, nrDNA uniformluğunu içmelez popülasyonlar içinde teşvik edebilir ve böylece filogenetik çalışmalarda iç popülasyon örneklemesinin önemini minimize edebilir [78]. Üçüncü olarak, ITS bölgesinin küçük boyutu (angiospermelerde <700bp) ve iki spacerı çevreleyen yüksek derecede korunmuş dizilerin varlığı, bu bölgenin evrensel ökaryotik primerler kullanılarak, hatta herbaryum materyalinden bile, kolayca amplifiye edilmesini sağlar [70]. Bu birçok özelliği nedeniyle, ITS bölgeleri, birçok bitki taksonunda aileler arası düzeyden tür içi düzeye kadar geniş bir genetik varyasyonu incelemek için kullanılmıştır [79, 80, 81]

Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP'ler)

SNP'ler, genetik kodla eşleşen bir genin, bir genin bir parçasının veya hatta birkaç gen veya ara gen dizisini içeren bir DNA parçasının, bir tek nükleotidin (A, T, C veya G) değiştiği DNA dizisi varyasyonlarıdır. Bir varyasyonun düşünülmesi için, SNP'nin en az %1'lik bir popülasyonda meydana gelmesi gerekir. SNP'ler, DNA

dizisi varyasyonlarının en yaygın şeklidir ve insan ve hayvan genetiği çalışmaları, insan genomunun haritalanması ve tıbbi araştırmalarda insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiş haplotiplerin tanımlanması da dahil olmak üzere kullanılmıştır [82]. Diğer genetik işaretçilere kıyasla, SNP'ler genel olarak genom içinde daha yaygın ve korunmuş durumdadır ve bu nedenle, her 1.000 baz çifti başına birden fazla olmaları nedeniyle tercih edilirler [83].

SNP araştırmalarının ortaya çıkmasıyla, SNP keşfi için birçok yöntem önerilmiş, kullanılmış ve hala geliştirilmektedir. Yüksek verimli dizileme için birçok yöntem benimsenmiştir. SNP tespiti için kullanılan platformlardan bazıları pirasekanslama [84], polimorfizm oranı dizileme [85], dejenere oligonükleotid primer PCR [86], ekotillemek [87], ve SNP avcısıdır [88]. SNP verisinin artması, SNP bilgisi uygulamaları ve SNP'lerin elde edilmesi için çeşitli teknikler nedeniyle, SNP'leri keşfetme ve analiz etmeyi kolaylaştırmak için biyoinformatik teknikler geliştirilmiştir. Veriye erişim ve görüntüleme için internete erişilebilir araçlar, araştırmacıların ilgi duydukları genler, genetik veya fiziksel harita konumları veya ekspresyon desenine göre SNP'ler hakkında veri almasına yardımcı olmak üzere geliştirilmiştir [89]. Son 10 yıl içinde, SNP'ler tıbbi araştırmalarda ve insan genomundaki SNP işaretçilerinin haritalanmasında yoğun bir şekilde incelenmiş ve çeşitli hastalıklara yatkınlıkla ilişkilendirilmiş birçok lokusun keşfedilmesine yol açmıştır [90].

SNP'ler, aynı zamanda popülasyon parametrelerinin ve yapılandırılmış insan popülasyonlarındaki farklılaşmanın tahmin edilmesi için de kullanılmıştır [91]. Biyologlar, SNP'lerin popülasyon parametrelerini tahmin etme yeteneğini araştırmışlar ve SNP belirleme yönteminin popülasyonlar içinde genetik olayları tahmin etme doğruluğunu etkileyebileceğini bulmuşlardır [92]. SNP'lerin uygulama alanı, insan ve sığır popülasyonlarını, bakterileri ve bitkileri incelemekten, bitki taksonlarında SNP tabanlı

işaretçilerin geliştirilmesi ile filogenetik ilişkileri çıkarmaya kadar değişmektedir. SNP'lerin tarla genetiğindeki uygulamaları Rafalski tarafından incelenmiş, bağlantı dengesizliği, ifade dizisi etiketlerinin (EST'lerin) kullanımı ve keşif prosedürleri, deneyler, SNP'lerin işaretçi olarak kullanımı ve SNP haritalaması hakkında bilgi verilmiştir.

SNP araştırmaları hem büyük tarım bitkilerinde hem de özelleştirilmiş ürünlerde yapılmıştır ve bitki tarımında SNP araştırmaları hız kazanmıştır. Zhu ve diğerleri soya fasulyesinin 25 genotipini [93] ve buğdayın 12 genotipini [94] içeren geniş kapsamlı bir çalışmada SNP sıklığını ve haplotip varyasyonunu belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada, Grivet ve diğerleri şeker kamışında SNP'lerin keşfi için EST'leri kullanmış ve bu polimorfizmlerin şeker kamışı yetiştiriciliği için potansiyel işaretçiler olarak hizmet edebileceğini öne sürmüşlerdir. SNP'ler ayrıca, *Eurycoma longifolia* populasyonlarındaki genetik çeşitliliği incelemek için bir potansiyel araç olarak hizmet etmiş ve bu popülasyonların coğrafi kökenini yansıtmıştır [83]. Bitkilerde filogenetik ilişkileri çıkarmak için SNP'ler henüz kullanılmamıştır ve bu nedenle, bir takson içinde SNP tabanlı işaretçilerin geliştirilmesi, filogenetik analizlerin gerçekleştirilmesinde faydalı olacaktır.

Çeşitlilik Dizi Teknolojisi (DArT)

DArT, DNA polimorfizm analizinin yeni bir tekniğidir. Bu, katı hal yüzeylerine immobilize edilmiş nükleik asitler kullanılarak hibridizasyon tabanlı yöntemlerdir. Çeşitlilik dizi teknolojisi, bu lokuslar hakkında önceden herhangi bir dizi bilgisi olmadan genom üzerinde yayılmış birkaç yüz polimorfik lokusun aynı anda tiplemesine izin verir [95,96]. Teknik ayrıca tekrarlanabilir ve maliyet etkin olduğu gösterilmiştir. DArT işaretçileri, belirli bir genomik temsilcilikte bulunan ve bu amaç için özellikle geliştirilen

bir çeşitlilik 'genotipleme dizisi' üzerinde farklı hibridizasyon ile tanımlanan genomik DNA'nın polimorfik bölümleridir. Bu teknoloji, başlangıçta bir 'keşif dizisi' geliştirme işlemine içerir, ardından polimorfik DArT işaretçilerini tanımlamak için kullanılır ve bunlar bir 'genotipleme dizisi' haline getirilir. 'Keşif dizisi', ilgi alanının genetik materyalini temsil eden genomlar havuzundan (metagenom) başlayarak tekrarlanan DNA seviyesini azaltmak için işleme tabi tutulur [97].

Çeşitlilik dizileri genellikle restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerinde tek baz çifti değişikliklerine (SNP'ler) ve restriksiyon fragmentlerindeki ekleme-silme/düzenlemelere bağlı polimorfizmeleri tespit eder [95]. İyi bir işaretçi olmak için genellikle şu özellikler arzu edilir: Orta düzeyden yüksek düzeye kadar polimorfik, kodominant kalıtım, allellerin açık bir şekilde ataması, genomda sık görülme, genom boyunca eşit dağılım, seçici olarak nötr davranış (yani, pleiotropik etkilerin olmaması), kolay erişim (rneğin, satın alma veya hızlı prosedürlerle), kolay ve hızlı test (rneğin, otomatikleştirilmiş prosedürlerle), yüksek tekrarlanabilirlik, laboratuvarlar arasında veri alışverişinin kolay olması, ve işaretçi geliştirme ve testi için düşük maliyet. Hiçbir tek moleküler işaretçi tüm bu kriterleri karşılamaz. Ancak, birçok marker sistemleri arasından seçim yapabilir ve her biri yukarıda bahsedilen özelliklerin bazılarını veya hatta çoğunu bir araya getirebilir.

RAD-SEQ/Genotyping By Sequencing (GBS)

RAD, genomdaki belirli bir restriksiyon enzimi tanıma dizisinin yanındaki DNA parçalarını içeren DNA'nın restriksiyon blėesi ile ilişkilendirilmiş DNA kapsar [98, 99, 100] ve RAD tags, son zamanlarda bitki [101, 102, 103, 104, 105] ve hayvan [106, 107, 108, 109, 110, 111] gruplarının çalışmalarında kullanılmıştır.

Moleküler filogenetikte yaygın bir sorun, yakın zamanda ayrılan türler arasındaki filogenetik ilişkilerin moleküler işaretçilerde yetersiz filogenetik sinyal veya gen ağaçları arasındaki çatışmalardan dolayı çözülmesinin zor olmasıdır [112, 113, 114]. RAD-Seq ve ilgili GBS yöntemi, nükleer genomlardan büyük miktarda değişken siteleri (SNP'ler) elde etme potansiyeli sunar [115].

RAD dizileme (RAD-Seq), multipleksleme sağlar ve özellikle Illumina HiSeq enstrümanı [102] gibi yüksek verimli platformlarda birçok örnek için tek bir şeritte dizileme yapmanın maliyet etkin bir yoludur. Restriksiyon enzimleri genomik DNA'yı küçük parçalara ayırmak için kullanılır, ardından adaptör dizileri fragmentlerin her iki ucuna lige edilir, böylece adaptörlerin dizisi içeren primerler dizilemeden önce amplifikasyon için kullanılabilir. RAD-Seq yöntemi, herhangi bir önceki genomik veri olmadan model olmayan türlerde filojeografinin ayrıntılı desenlerini sağlamış ve doğal populasyonlarda başlangıçta türleşme ve genom çapında varyasyonu belirlemiştir [106]. Ayrıca, başlangıçta bilinen tüm genom dizileriyle yapılan simülasyon çalışmaları, RAD-Seq yönteminin filogenetik çıkarım için kullanılabilirliğini göstermiştir [116, 117].

RAD-Seq'ı filogenetik yerine filojeografik çıkarım için kullanan bir vaka çalışması, Eaton & Ree tarafından gerçekleştirilmiştir. Doğu Asya'daki Hengduan Dağları-Himalaya bölgesinden bir nonmodel bitki cinsinin atasal hibridizasyonu tespit ettiler. Aday taksonlar arasındaki introgresyonun daha ince ayrıntılarına olanak tanıyan modifiye Patterson'un D-istatistik testini kullanan Eaton & Ree, birinci kladde neredeyse tüm taksonlar arasında önemli bir introgresyon tespit etmişlerdir, ancak ikinci kladin taksonları arasında veya iki ana kladenin arasında introgresyon tespit edilmemiştir. Genotyping by sequencing (GBS), ilişkili, son derece maliyet etkin bir genotipleme prosedürüdür

[118,119,120]. Barkodlama stratejisi, RAD-Seq'inkine benzerdir. Ancak, GBS, uygun adaptörlerle restriksiyon fragmentlerinin oluşturulmasının daha basit olduğu için RAD-Seq'a göre daha az karmaşıktır: tek bir kuyudaki genomik DNA'nın restriksiyonu ve adaptör lige edilmesi, numune işleme sayısının azalmasına neden olur, daha az DNA saflaştırma adımı gerektirir ve fragmentler boyut seçilmez. Maliyetler, sıg genom örnekleme ve haplotip bloklarındaki eksik iç SNPLerin tahmini ile azaltılır.

GBS, karmaşık bir genoma sahip [118] mısır için başlangıçta geliştirilmiştir ve son zamanlarda diğer türlerin genotiplendirilmesinde [121,122] ve yakın zamanda ayrılan kladların filogenetik çıkarımında kullanılmıştır [123]. Moleküler filogenetikte yaygın bir sorun, yakın zamanda ayrılan türler arasındaki filogenetik ilişkilerin moleküler işaretçilerde yetersiz filogenetik sinyal veya gen ağaçları arasındaki çatışmalardan dolayı çözülmesinin zor olmasıdır [112, 124, 114]. RAD-Seq ve GBS, nükleer genomlardan büyük miktarda değişken siteleri (SNP'ler) elde etme potansiyeli sunar [115]. RAD-Seq yaklaşımı, şüpheli hibritlerin ebeveynlerini belirlemede başarılı olmuş ve ayrıca otomatik vs. allopolidlerin ayrımını da yapabilir [125].

Genom Taraması

Total genomik DNA'nın düşük ila yüksek kapsama aralığında shotgun dizileme yoluyla hızlı ve maliyet etkili bir şekilde phylojenetik olarak bilgi sağlamak için bir stratejidir [126,127,128,129,130]. Başlangıçta, genome taraması, nükleer ribozomal ve kloroplast DNA belirteçlerinden ek phylojenetik bilgi sağlamak üzerine odaklanmıştır. Çünkü bitki nükleer rDNA tekrarları ,kloroplast DNA ve mitokondriyal DNA, genomlarında yüzlerden binlere kadar kopyada bulunurlar [131] ve düşük derecede dizi kapsamı [132] ile kolayca elde edilebilirler.

İntraspesifik ve özellikle interspesifik tür karşılaştırmaları için tam bir nükleer rDNA, genellikle hala büyük ölçüde hizalanabilirken, ITS ve ETS içerdiği için bir cinse genellikle hizalanabilir. Ancak, bazı interspesifik ve özellikle intraspesifik tür karşılaştırmaları için, NTS bölgesini içeren tam bir nükleer rDNA, büyük ölçüde hizalanabilirken önemli miktarda değişiklik sunabilir [133].

Mevcut yaygın olarak kullanılan primerlerle üretilen organeller DNA dizisi, genome taraması yoluyla daha fazla üretilir [134]. Son bir çalışmada, Bock ve ark. (2014), genome taramasını kullanarak Yer elması (*Helianthus tuberosa*; Compositae), bir kalıcı heksaploid yumru bitkisinin kökenini belirledi. Bu, rDNA dizilerini kullanarak taksonun katkısını *H. annuus*, ve Yer elmasının muhtemel atalarını belirlemek için *H. grosseserratus* (dişli ayçiçeği) ve *H. hirsutus*'un (tüylü ayçiçeği) tetraploid olarak desteklediği kendisinin *H. divericatus*'un otopoliploidi olarak tanımlanabilmesiyle mümkündü. Bu, genom taraması kullanılarak, yalnızca rDNA dizilerini kullanarak, yazarların organellerin genomlarının yalnızca *H. hirsutus*'tan geldiğini gösterebilmeleri nedeniyle de oldu.

rDNA ve plastid kodlama bölgelerinin genom taraması aynı zamanda bitki ailesi Goodeniaceae'nin derin düğümlerinde çözünürlüğü artırmak için de etkili oldu. En önemli açıklıkta bir kök fosil fiziğin sağlamasını üretti. Plastid dizilerden elde edilen toplu verilerin çoğu, cins içindeki ilişkiler arasında farklılık gösterse de, nükleer gen verileri genellikle bu ilişkileri teyit etmektedir. Her iki yöntem de birbiriyle uyumsuzluğu azaltmak için hedeflenen bir zenginleştirme yöntemi kullanılarak daha fazla nükleer işaretleyici dizisi dizilirse daha yakın bir mutabakata yol açabileceğini düşündürmektedir. Genom taraması, asterid Plantaginaceae cins *Penstemon*'un [136] işaretleyici geliştirme için başarıyla kullanıldı. Tüm *Penstemon* genom dizileri, Plantaginaceae ve Orobanchaceae için birkaç mevcut EST kütüphanesi ve *Arabidopsis thaliana* ve

Solanum lycopersicum - PPR/COS için protein dizileri ile karşılaştırıldı. Son olarak, fern genomlarının özelliklerini incelemek için etkili bir şekilde kullanılmıştır [137].

Transkriptomlar

Özellikle model olmayan organizmalar ve/veya çok büyük genomlara sahip olanlar dahil olmak üzere ökaryotlarda filogeniler üretmek için zengin bir karakter seti sağladığı gösterilmiştir [138, 139, 140, 141, 142, 143]. Yüksek verimli RNA dizileme (RNA-Seq) teknolojilerinin son gelişimi, transkriptomik hassasiyeti [144] büyük ölçüde artırmıştır. RNA-Seq kullanılarak yayınlanan çoğu çalışma, derin dallanmaları keşfediyordu [145, 146, 147] ve birkaçı da aile düzeyinde veya daha alt düzeydeki ilişkilere odaklanıyordu [142, 148].

Orthologların çıkarılması, RNA-Seq filogenetiğinin en kritik ve zorlayıcı adımlarından biridir [139, 149]. Doğrudan transkriptom verilerinden elde edilen ortolog gen dizilerinin bitki cinsi içinde veya yakından ilişkili cinsler arasında etkin olup olmadığı sıkı bir şekilde araştırılmalıdır.

Transkriptomlar ayrıca belirteç geliştirmede de [150] kullanılmıştır, örneğin eğrelti otlarında [151] ve baklagiller gibi çiçekli bitkilerde [152]. Ancak, transkriptom verilerini doğrudan filogenetik çalışmalar için kullanmanın bazı zorlukları vardır. Öncelikle, geniş bir takson örnekleme ile RNA kalitesi doku örneklerini elde etmek teknik olarak zorlayıcıdır [153, 142, 143]. İkinci olarak, transkriptom verileri, bir genomun bir dönemde, bir doku tarafından ve/veya belirli bir çevresel koşul kümesinin etkisi altında aktarılan kodlama genlerinin bir kısmını içerir. Üçüncüsü, hibridizasyon, introgression ve allopoliploidi geçmişine sahip gruplar için, RNA-Seq filogenetik yaklaşımını doğrudan kullanmak filogenilerini oluşturmayı daha karmaşık hale getirebilir [143]. Bununla birlikte, transkriptom verilerinin, retikülasyon evrimin ve

genom duplikasyonlarının geçmişini aydınlatmak için nükleer dizileri sağlama potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. RNA-Seq, anahtar yeniliklerin moleküler mekanizmalarını keşfetmek de dahil olmak üzere karakter gelişimi ve evrimini incelemek için geniş bir şekilde kullanılmıştır [154]. Gelecek on yılda RNA-Seq yaklaşımının, karakterlerin ontogenezini, homolojisini ve evrimini anlama konusunda büyük görüşler getireceğini bekliyoruz.

Hedefe Yönlendirilmiş Zenginleştirme

Birçok bitki türü için, özellikle arazi toplama örneklerinden yüksek kaliteli RNA izole etmek problemlili olabilir, ancak genomik DNA'lar, hatta herbaryum ve "antik" örneklerden bile oldukça stabil oldukları için oldukça kolaydır [155, 156]. Hedefe yönlendirilmiş zenginleştirme veya dizi yakalama, başlangıçta hibridizasyon yoluyla yapıliyordu, ancak daha sık olarak kullanılan prob veya bait olarak adlandırılan korunmuş dizi oligonükleotidleri, mikroarray verilerinin üretimi daha maliyetli ve daha az basit olduğu için daha sık kullanılmaktadır [157, 158, 159, 160, 161, 162].

Hayvanlar için, PCR tarafından oluşturulan veya cDNA türetilmiş baitlerin yanı sıra [163], birçok filumun genomlarında Ultra Korunmuş Elemanlar (UCE'ler) etrafındaki kodlamayan nükleer gen bölgelerini kullanarak dizi yakalama yapmak mümkündür. Bitki genomları ise, kodlamayan bölgelerinde birbirine çok benzer nonsentetik tekrarlayan elementler içerir, bu da UCE yaklaşımını filogeni üretmek için kullanılamaz hale getirir [165]. Hedefe yönlendirilmiş zenginleştirme yöntemleri arasında PCR tabanlı ve moleküler inversiyon probu tabanlı amplifikasyon da bulunmasına rağmen, en basit, en hızlı ve en maliyet etkin teknoloji dizi yakalama yaklaşımıdır [166]. Bu tür hedefe yönlendirilmiş zenginleştirmeyi uygulamak için çeşitli yöntemler mevcuttur. Belirli bir yola ait veya belirli bir doku tarafından ifade edilen genlerin dizileri özellikle hedeflenebilir. Alternatif olarak, çalışmada yüksek

kaliteli RNA üretebilen iki farklı takson için mevcut EST ve/veya transkriptom dizileri kullanılabilir. Her iki durumda da, muhtemel dizileri tanımlamak için BLAST araması yapılır ve ardından kullanıcı, olası dizileri "bait" üreten bir tesise/şirkete gönderir veya ticari olarak mevcut bir "bait üretim kiti" kullanır. Bir NGS enstrümanında kaç bireysel örneğin çalıştırılabileceğini belirlemek için, her bir hedef için gereken kapsama ve gereken kapsama miktarı hesaplanır. Özetlemek gerekirse, transkriptom ve bütün genom dizilerinin nonmodel türler için elde edilmesiyle, hedefe yönlendirilmiş zenginleştirme, geniş bir taksonomik aralıkta bitki filogenetiği için giderek daha maliyet etkin bir yöntem haline gelmektedir [155,167,168,169,170].

EPIC İşaretçileri

Yakın akraba türler ve tür kompleksleri arasında çözüm sağlayan nükleer gen işaretçilerinin geliştirilmesinde giderek artan kullanım gören bir yöntem, “Exon-primed Intron-Crossing” (EPIC) olarak adlandırılır. İlk kez 1994 yılında Palumbi ve Baker tarafından EST kütüphanelerinden geliştirilen ekzonlarla kullanılsa da, daha hızlı evrilen dizileri kapsayabilecek hangi ekzonların kullanışlı olabileceğini belirlemek öncelikle birkaç iyi incelenmiş geni seçmek ve test etmek meselesiydi [171]. Ancak, EPIC işaretçileri şimdi, tüm genom referans dizileri ile birlikte EST veya transkriptom verilerini kullanarak da etkili bir şekilde geliştirilmektedir. Bir türün transkribe edilen bölgelerinden birçok ekzonun dizileri, bir veya birkaç ilgili tüm genom karşısında BLAST edilebilir. Ardından, BLAST verilerindeki pozitif sonuçlar, primer tasarımı için korunmuş bölgeleri belirlemek için kullanılabilir ve bu bölgeler, daha düşük taksonomik düzeylerde önemli çözünürlük sağlayan bir derecede değişken intronları kapsar.

EPIC işaretçileri, ekzon ve intron bölgelerinin sırasıyla türler arası ve tür içi işaretçiler üretmek için kullanıldığı teleost

balıklarında kullanışlı olmuştur [172]. Bitki ailelerinde, EPIC işaretçileri baklagiller familyası Fabaceae için [173], incirler için [174], Pasifik Adası cinsi *Metrosideros* için [175] ve mür cinsi *Commiphora* için [176] geliştirilmiştir

Sonuç ve Gelecek Perspektifi

Moleküler yöntemler, bitki sistematigi alanında son birkaç on yılda köklü bir paradigma değişimine yol açmıştır. Morfolojik ve anatomik karakterlere dayalı geleneksel yaklaşımlar, günümüzde moleküler verilerle desteklenerek daha güvenilir ve evrimsel olarak anlamlı sınıflandırma sistemlerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır. DNA barkodlama, hedef gen dizileme, yüksek verimli dizileme (NGS) ve filogenomik yaklaşımlar; tür tanımlama, filogenetik ilişkilerin çözülmesi ve evrimsel süreçlerin aydınlatılmasında vazgeçilmez araçlar hâline gelmiştir.

Bununla birlikte, tek bir moleküler yöntemeye dayalı sistematik çalışmaların, özellikle melezleşme, poliploidi ve hızlı adaptif radyasyon gibi karmaşık evrimsel süreçlerin söz konusu olduğu bitki gruplarında yetersiz kalabildiği açıktır. Bu nedenle, modern bitki sistematiginde entegratif yaklaşımlar giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Kloroplast, nükleer ve mitokondriyal genom verilerinin birlikte değerlendirilmesi; morfolojik, ekolojik ve biyocoğrafik verilerle desteklenmesi, daha sağlam filogenetik hipotezlerin oluşturulmasına olanak tanımaktadır.

Gelecek perspektifinde, bitki sistematiginin filogenomik ve çok-omikli (multi-omic) bir yapıya doğru evrileceği öngörülmektedir. Transkriptomik, epigenomik ve metabolomik verilerin sistematik çalışmalara entegre edilmesi, yalnızca soy ilişkilerinin değil, aynı zamanda adaptasyon ve fenotipik çeşitliliğin moleküler temellerinin de anlaşılmasını sağlayacaktır. Ayrıca, hedef zenginleştirme teknikleri (örneğin *Angiosperms353*) ve düşük maliyetli genom tarama yaklaşımlarının yaygınlaşması, model

olmayan bitki gruplarında da yüksek çözünürlüklü filogenetik analizlerin yapılmasını mümkün kılacaktır.

Bunun yanında, yapay zekâ ve makine öğrenmesi tabanlı analiz araçlarının gelişmesi, büyük ölçekli moleküler veri setlerinin yorumlanmasında yeni ufuklar açmaktadır. Otomatik tür tanımlama, filogenetik ağaç tahmini ve karakter evrimi analizlerinde bu yaklaşımların kullanımı, sistematik araştırmaların hızını ve doğruluğunu artıracaktır.

Sonuç olarak, moleküler yöntemler bitki sistematığının temel yapı taşlarından biri hâline gelmiş olup, gelecekte disiplinler arası entegrasyon ve teknolojik yeniliklerle daha da güçlenecektir. Bu gelişmeler, bitki biyoçeşitliliğinin anlaşılması, korunması ve sürdürülebilir kullanımı açısından kritik bilimsel altyapının oluşturulmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

Kaynakça

- [1] Singh Gautam B. (2015). Fundamentals of Bioinformatics and Computational Biology, Methods and Exercises in MATLAB. Vol 6: 235-270
- [2] Xiong Jin. (2006). Essential Bioinformatics: 127-169
- [3] Onursal Sıla Suzan, Uğur Avni. (1997). Böceklerin Filogenisi. Türk.entomol.derg. 21(1): 65-80
- [4] Anonim, (2024). Molecular phylogenetic analysis using ribosomal RNA (rRNA). Erişim adresi: http://eebweb.arizona.edu/blast/rna_lecture.pdf
- [5] Anonim, (2024). RCSB Protein Data Bank. Erişim adresi: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [6] Anonim, (2024). DNA Data Bank of Japan. Erişim adresi: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

- [7] Anonim, (2024). Distance Methods. Erişim adresi: <http://www.cs.rice.edu/~nakhleh/COMP571/Slides/Phylogenetics-DistanceMethods.pdf>
- [8] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487- 491
- [9] Murphy RW, Sites JW Jr, Buth DG and Haufler CH (1996) Proteins: isozyme electrophoresis. In: Molecular Systematics, 2nd Ed. Hillis DM, Moritz C and Mable BK (eds.), Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 51-120
- [10] Kendall J (1928) Separations by the ionic migration method. Science 67:163-167
- [11] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259):680-685
- [12] Burow MD and Blake TK (1998) Molecular tools for the study of complex traits. In: Molecular dissection of complex traits. Paterson AH (ed.), CRC Press, Washington, DC, pp. 13-29
- [13] Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes, tissue, ontogenetic and species specific pattern. Pro Natl Acad Sci USA, 45:753-763
- [14] Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications, 2nd edn. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida
- [15] Jenczewski E, Properi JM, Ronfort J (1999) Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA RAPD markers and comparison to allozymes. Mol Ecol 8:1317-1330

- [16] Liu Z, Furnier GR (1993) Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and big tooth aspen. *Theor Appl Gen* 87:97-105
- [17] Cruzan M (1998) Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology* 79:400-412
- [18] Beebee T and Rowe G (2004) *An Introduction to Molecular Ecology*, Oxford University Press, Oxford
- [19] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Gen* 32:314-331
- [20] Soller M, Beckmann JS (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor Appl Gen* 67:25-33
- [21] Isaac PG (1994) *Methods in Molecular Biology: Protocols for Nucleus Acid Analysis by Nonradioactive probes*. Humana Press Inc., Totowa, NJ
- [22] Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Meth Enzym* 155:501-527
- [23] Gray M, Charpentier A, Walsh K, Wu P, Bender W (1991) Mapping point mutations in the *Drosophila rosy* locus using denaturing gradient gel blots. *Genetics* 127:139-149
- [24] Williams NMV, Pande N, Nair S, Mohan M, Bennet J (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theor Appl Gen* 82:489-498
- [25] Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4:403-410
- [26] Jeandroz S, Bastein D, Chandelier A, Du Jardin P, Favre JM (2002) A set of primers for amplification of mitochondrial DNA in *Picea abies* and other conifer species. *Mol Ecol Notes* 2:389-392

- [27] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6231-6235
- [28] Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557
- [29] Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers]. *Nucleic Acids Res* 18:7213-7218
- [30] Deragon JM, Landry BS (1992) RAPD and other PCR-based analysis of plant genomes using DNA extracted from small leaf discs. *PCR Methods Appli* 1:175-180
- [31] Gidoni D, Rom M, Kunik T, Zur M, Izsak E, Izhar S, Firon N (1994) Strawberry-cultivar identification using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Breed* 113:339-342
- [32] Kelly JD, Miklas PN (1998) The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol Breed* 4:1-11
- [33] Rajapakse S, Belthoff LE, He G, Estager AE, Scorza R, Verde I, Ballard RE, Baird WV, Callahan A, Monet R, Abbott AG (1995) Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Gen* 90:503-510
- [34] Lacou V, Haurogne K, Ellis N, Rameau C (1998). Genetic mapping in pea. 1-RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. *Theor Appl Gen* 97: 905-915
- [35] Rossetto M, McLauchlan A, Harriss FCL, Henry RJ, Baverstock PR, Lee LS, Maguire TL, Edwards KJ (1999) Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). *Theor Appl Gen* 98:1091-1098
- [36] Heun M, Helentjaris T (1993). Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor App Gen* 85:961-968
- [37] Chen LFO, Kuo HY, Chen MH, Lai KN, Chen SCG (1997) Reproducibility of the differential amplification between leaf and

root DNAs in soybean revealed by RAPD markers. *Theor App Gen* 95:1033-1043

[38] Skroch P, Nienhuis J (1995) Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD-based estimates of genetic distance. *Theor Appl Gen* 91:1086-1091

[39] Staub J, Bacher J, Poetter K (1996) Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. *Hort Sci* 31:262-266

[40] Leberg PL (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46:477-494

[41] Godwin ID, Aitken EAB, Smith LW (1997) Application of intersimple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528

[42] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183

[43] Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994). Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor App Gen* 89:998-1006.

[44] Weising K, Nybom H, Wolff K and Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton: CRC Press, London

[45] Nagaraju J, Kathirvel M, Kumar RR, Siddiq EAb, Hasnain SE (2002) Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Pro Natl Acad Sci USA* 99:5836-5841

[46] Wolfe AD and Liston A (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing*. Soltis DE, Soltis PS and Doyle JJ, (eds.), Kluwer, Dordrecht, pp. 43-86

- [47] Wolfe AD, Xiang Q-Y, Kephart SR (1998a) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol Ecol* 7:1107- 1125
- [48] Wolfe AD, Xiang Q-Y, Kephart SR (1998b) Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5112-5115
- [49] Tsumura Y, Suyama Y, Yoshimura K, Shirato N, Mukai Y (1997). Sequence-Tagged-Sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. *Theor Appl Gen* 94:764-772
- [50] Nagaoka T, Ogihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Gen* 94:597-602
- [51] Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor App Gen* 95:408-417
- [52] Wiesner I, Wiesnerova D (2003) Effect of resolving medium and staining procedure on inter-simplesequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm. *Genet Res Crop Evol* 50:849-853
- [53] Somers DJ, Zhou Z, Bebeli PJ, Gustafson JP (1996) Repetitive, genome-specific probes in wheat (*Triticum aestivum* L.) amplified with minisatellite core sequences. *Theor Appl Gen* 93:982-989
- [54] Bebeli PJ, Zhou Z, Somers DJ, Gustafson JP (1997) PCR primed with minisatellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat. *Theor App Gen* 95:276-283
- [55] Zhou Z, Bebeli PJ, Somers DJ, Gustafson JP (1997) Direct amplification of minisatellite-region DNA with VNTR core sequences in the genus *Oryza*. *Theor Appl Gen* 95:942-949

- [56] Jeffreys AJ, Neumann R, Wilson V (1990) Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 60:473- 485
- [57] Wong Z, Wilson V, Jeffreys AJ, Thein SL (1986) Cloning a selected fragment from a human DNA “fingerprint”: isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucleic Acids Res* 14:4605-4616
- [58] Nakamura Y, Carison M, Krapcho K, Kanamori M, White R (1988) New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Gen* 43(6):854-859
- [59] Julier C, Gouyon DD, Georges M, Guenet JL, Nakamura Y, Avner P, Lathrop GM (1990) Minisatellite linkage maps in the mouse by cross-hybridization with human probes containing tandem repeats. *Pro Natl Acad Sci USA* 87:4585-4589
- [60] Georges M, Gunawardana A, Threadgill DW, Lathrop M, Olsaker I, Mishra A, Sargeant LL, Schoeberlein A, Steele MR, Terry C, Threadgill DS, Zhao X, Holm T, Fries R, Womack JE (1991) Characterization of a set of variable number of tandem repeat markers conserved in Bovidae. *Genomics* 11:24-32
- [61] Broun P, Tanksley SD (1993) Characterization of tomato clones with sequence similarity to human minisatellites 33.6 and 33.15. *Plant Mol Biol* 23:231-142
- [62] Winberg BC, Zhou Z, Dallas JF, McIntyre CL, Gustafson JP (1993) Characterization of minisatellite sequences from *Oryza sativa*. *Genome* 36:978-983
- [63] Heath DD, Iwama GK, Devlin RH (1993) PCR primed with the VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucl Acids Res* 21:5782-5785
- [64] Zhu J, Gale MD, Quarrie S, Jackson MT, Bryan GJ (1998) AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor Appl Gen* 96:602-611

- [65] Hilu KW, Borsch T, Muller K, Soltis DE, Soltis PS, Savolainen V, Chase MW, Powell MP, Alice LA, Evans R, Sauquet H, Neinhuis C, Slotta TAB, Rohwer JG, Campbell CS, Chatrou LW (2003) Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *Am J Bot* 90:1758-1776
- [66] Soltis DE, Soltis PS (1997) Phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato: a comparison of topologies based on 18S rDNA and rbcL sequences. *Am J Bot* 84:504-522
- [67] Soltis DE, Soltis PS, Clegg MT, Durbin M (1990) rbcL sequence divergence and phylogenetic-relationships in Saxifragaceae sensu-lato. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4640-4644
- [68] Savolainen V, Chase MW, Hoot SB, Morton CM, Soltis DE, Bayer C, Fay MF, De Bruijn AY, Sullivan S and Qiu YL (2000). Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. *Syst Biol* 49:306-362
- [69] Nickrent DL, Soltis DE (1995) A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18s rDNA and rbcL sequences. *Ann Miss Bot Gard* 82:208-234
- [70] White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.), San Diego, California: Academic Press, pp. 315-322
- [71] Hillis DM, Dixon MJ (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quart Rev Biol* 66(4):411-453
- [72] Baldwin BG (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol Phy Evol* 1:3-16
- [73] Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence. *Ann Missouri Bot Gard* 82:247-277

[74] Hillis DM, Moritz C, Porter CA, Baker RJ (1991) Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251:308-310

[75] Hamby RK and Zimmer EA (1992) Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: *Molecular Systematics of Plants*. Soltis PS, Soltis DE and Doyle JJ (eds.) Chapman and Hall, New York, pp. 50-91

[76] Sanderson MJ, Doyle JJ (1992) Reconstruction of organismal and gene phylogenies from data on multigene families: Concerted evolution, homoplasy, and confidence. *Syst Biol* 41:4-17

[77] Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T (1995) Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA* 92:280-284

[78] Soltis DE, Morgan DR, Grable A, Soltis PAS, Kuzoff R (1993) Molecular systematics of Saxifragaceae sensu stricto. *Am J Bot* 80:1056-1081

[79] Bakker FT, Olsen JL, Stam WT, van den Hoek C (1992) Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albidula* (Chlorophyta). *J Phycol* 28:839-845

[80] Connell LB (2000) Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta, Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. *Marine Biol* 136(6):953-960

[81] Lundholm N, Moestrup O, Kotaki Y, Hoef Emden K, Scholin C, Miller P (2006) Inter- and intraspecific variation of the *Pseudonitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *J Phycol* 42:464-481

[82] Wang DG, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandaur G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES (1998) Large scale

identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082

[83] Osman A, Jordan B, Lessard PA, Muhammad N, Haron MR, Riffin NM, Sinskey AJ, Rha C, Housman DE (2003) Genetic diversity of *Eurycoma longifolia* inferred from single nucleotide polymorphisms. *Pl Physiol* 131:1294-1301

[84] Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M (2002) Pyrosequencing (TM): An accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutation* 19:479-485

[85] Blazej RG, Paegel BM, Mathies RA (2003) Polymorphism ratio sequencing: A new approach for single nucleotide polymorphism discovery and genotyping. *Gen Res* 13:287-293

[86] Jordan B, Charest A, Dowd JF, Blumenstiel JP, Yeh RF, Osman A, Housman DE, Landers JE (2002) Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2942-2947

[87] Comai L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Henikoff S (2004) Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* 37:778-786

[88] Wang L, Liu S, Niu T, Xu X (2005) SNPHunter: A bioinformatic software for single nucleotide polymorphism data acquisition and management. *BMC Bioinformatics* 6:60 (doi:10.1186/1471-2105-6-60)

[89] Clifford RJ, Edmonson MN, Nguyen C, Scherpbier T, Hu Y, Buetow KH (2004) Bioinformatics tools for single nucleotide polymorphism discovery and analysis. *Ann New York Acad Sci* 1020:101-109

[90] Chen X, Sullivan PF (2003) Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics J* 3:77-96

[91] Nicholson G, Smith AV, Jonsson F, Gustaffson O, Stefansson K, Donnelly P (2002) Assessing population differentiation and isolation

from single nucleotide polymorphism data. *J Royal Stat Soci, Series B, Statistical Methodology* 64:695-715

[92] Kuhner MK, Beerli P, Yamato J, Felsenstein J (2000) Usefulness of single nucleotide polymorphism data for estimating population parameters. *Genetics* 156:439-447

[93] Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli LK, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND, Cregan PB (2003) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in soybean. *Genetics* 163:1123- 113

[94] Somers DJ, Kirkpatrick R, Moniwa M, Walsh A (2003) Mining single nucleotide polymorphism from hexaploid wheat ESTs. *Genome* 49:431-437

[95] Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucl Acids Res* 29:25

[96] Wenzl P, Carling J, Kurna D, Jaccound D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A (2004) Diversity Arrays Technology (Dart) for whole genome profiling of barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(26): 9915-9920

[97] Kilian A, Huttner E, Wenzl P, Jaccoud D, Carling J, Caig V, Evers M, Heller-Uszynska K, Cayla C, Patarapuwadol S, Xia L, Yang S, Thomson B (2005) The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement. In: *Proceedings of the international congress "In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution"*, 27 -31 May, 2003, Tuberosa R, Phillips RL, Gale M (eds) Avenue Media, Bologna, Italy, pp 443-461

[98] Lewis ZA, Shiver AL, Stiffler N, Miller MR, Johnson EA, Selker EU. 2007. High-density detection of restriction-site-associated DNA markers for rapid mapping of mutated loci in *Neurospora*. *Genetics* 177: 1163–1171. doi: 10.1534/genetics.107.078147.

- [99] Miller MR, Dunham JP, Amores A, Cresko WA, Johnson EA. 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research* 17: 240–248.
- [100] Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZL, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE* 3: e3376.
- [101] Scaglione D, Acquadro A, Portis E, Tirone M, Knapp SJ, Lanteri S. 2012. RAD tag sequencing as a source of SNP markers in *Cynaracardunculus* L. *BMC Genomics* 13: 3. doi: 10.1186/1471-2164-13-3
- [102] Eaton DAR, Ree RH. 2013. Inferring phylogeny and introgression using RADSeq data: An example from flowering plants (*Pedicularis*: *Orobanchaceae*). *Systematic Biology* 62: 689–706.
- [103] Wang N, Thomson M, Bodles WJA, Crawford RMM, Hunt HV, Featherstone AW, Pellicer J, Buggs RJA. 2013a. Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species RAD markers. *Molecular Ecology* 22: 3098–3111.
- [104] Wang XQ, Zhao I, Easton DAR, Li DZ, Guo ZH. 2013b. Identification of SNP markers for inferring phylogeny in temperate bamboos (*Poaceae*: *Bambusoideae*) using RAD sequencing. *Molecular Ecology Resources* 13: 938–945.
- [105] Hipp A, Eaton DAR, Cavender-Bares J, Fitzek E, Nipper R, Manos PS. 2014. A framework phylogeny of the American oak clade based on sequenced RAD data. *PLoS ONE* 9(4): e93975. doi: 10.1371/journal.pone.0093975
- [106] Emerson KJ, Merz CM, Catchen JM, Hohenlohe PA, Cresko WA, Bradshaw WE, Holzapfel CM. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 16196–16200.

- [107] Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE. 2012. Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and nonmodel species. *PLoS ONE* 7: e37135. doi: 10.1371/journal.pone.0037135
- [108] Reitzel AM, Herrera S, Layden MJ, Martindale MQ, Shank TM. 2013. Going where traditional markers have not gone before: Utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular Ecology* 22: 2953–2970.
- [109] Wagner CE, Keller I, Wittwer S, Selz OM, Mwaiko S, Greuter L, Sivasundar A, Seehausen O. 2013. Genome-wide RAD sequence data provide unprecedented resolution of species boundaries and relationships in the Lake Victoria cichlid adaptive radiation. *Molecular Ecology* 22: 787–798.
- [110] Cruaud A, Gautier M, Galan M, Foucaud J, Saune L, Genson G, Dubois E, Nidelet S, Deuve T, Rasplus. 2014. Empirical assessment of RAD sequencing for interspecific phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1272–1274.
- [111] Takahashi T, Nagata N, Sota T. 2014. Application of RAD-based phylogenetics to complex relationships among variously related taxa in a species flock. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 80: 137–144.
- [112] Maddison WP, Knowles LL. 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 55: 21–30.
- [113] O’Meara BC. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology* 59: 59–73.
- [114] Blanco-Pastor JL, Vargas P, Pfeil BE. 2012. Coalescent simulations reveal hybridization and incomplete lineage sorting in Mediterranean *Linaria*. *PLoS ONE* 7: e39089.
- [115] Davey JW, Blaxter ML. 2011. RADSeq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9: 416–423.

- [116] Rubin BER, Ree RH, Moreau CS. 2012. Inferring phylogenies from RAD sequence data. *PLoS ONE* 7: e33394
- [117] Cariou M, Duret L, Charlat S. 2013. Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. *Ecology and Evolution* 3: 846–852.
- [118] Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6(5): e19379. doi: 10.1371/journal.pone.0019379
- [119] Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink J-L. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel twoenzyme Genotyping-by-Sequencing approach. *PLoS ONE* 7: e32253
- [120] Peterson GW, Dong Y, Horbach C, Fu Y-B. 2014. Genotyping-BySequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity* 6: 665–680.
- [121] Miller AJ, Matasci N, Schwaninger H, Aradhya M, Prins B, Zhong G-Y, Simon C, Buckler E, Myles S. 2013. Vitis phylogenomics: Hybridization intensities from a SNP array outperform genotype calls. *PLoS ONE* 8(11): e78680.
- [122] Logan-Young CJ, Yu JZ, Verma SK, Percy RG, Pepper AE. 2015. SNP discovery in complex allotetraploid genomes (*Gossypium* sp., Malvaceae) using genotyping by sequencing. *Applications in Plant Sciences* 3: 1400077.
- [123] Escudero M, Eaton DAR, Hahn M, Hipp AL. 2014. Genotyping-bysequencing as a tool to infer phylogeny and ancestral hybridization: A case study in *Carex* (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 359–367.
- [124] O’Meara BC. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology* 59: 59–73.

- [125] Chown SL, Hodgins KA, Griffin PC, Oakeshott JG, Byrne M, Hoffmann AA. 2015. Biological invasions, climate change and genomics. *Evolutionary Applications* 8: 23–46.
- [126] Straub SCK, Parks M, Weitmair K, Fishbein M, Liston A. 2012. Navigating the tip of the genomic iceberg: Next-generation sequencing for plant systematics. *American Journal of Botany* 99: 349–364.
- [127] McPherson H, van der Merwe M, Delaney SK, Edwards MA, Henry RJ, McIntosh E, Rymer PD, Milner ML, Siow J, Rossetto M. 2013. Capturing chloroplast variation for molecular ecology studies: A simple next generation sequencing approach applied to a rainforest tree. *BMC Ecology* 13: 8.
- [128] Male PJG, Bardon L, Besnard G, Coissac E, Delsuc F, Engel J, Lhuillier E, Scotti-Saintagne C, Tinaut A, Chave J. 2014. Genome skimming by shotgun sequencing helps resolve the phylogeny of a pantropical tree family. *Molecular Ecology Resources* 14: 966–975.
- [129] Dodsworth S. 2015. Genome skimming for next-generation biodiversity analysis. *Trends in Plant Science*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.012>
- [130] Govindarajulu R, Parks M, Tennessen JA, Liston A, Ashman T-L. 2015. Comparison of nuclear, plastid and mitochondrial phylogenies and the origin of wild octoploid strawberry sequences. *American Journal of Botany* 102: 544–554. doi: 10.3732/ajb.1500026
- [131] HersHKovitz MA, Zimmer EA, Hahn WJ. 1999. Ribosomal DNA and angiosperm systematics. In: Hollingsworth P, Bateman R, Gornell R eds. *Molecular systematics and plant evolution*. London: Taylor & Francis. 268–326.
- [132] Baldwin BG, Markos S. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 449–463.

- [133] Kuzoff RK, Sweere JA, Soltis DE, Soltis PS, Zimmer EA. 1998. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15: 251–263.
- [134] Gardner A, Sessa EB, Michener P, Johnson E, Shepherd KA, Howarth DG, Jabaily RS. 2015. Utilizing next-generation sequencing to resolve the backbone of the core Goodeniaceae and inform future taxonomic and floral form studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, in press.
- [135] Bock DG, Kane NC, Ebert DP, Rieseberg LH. 2014. Genome skimming reveals the origin of the Jerusalem artichoke tuber crop species: Neither from Jerusalem nor an artichoke. *New Phytologist* 201: 1021–1030.
- [136] Blischak PD, Wenzel AJ, Wolfe AD. 2014. Gene prediction and annotation in *Penstemon*(Plantaginaceae): A workflow for marker development from extremely low-coverage genome sequencing. *Applications in Plant Sciences* 2: doi: 10.37.1400044
- [137] Wolf PG, Sessa EB, Marchant DB, Li F-W, Rothfels CJ, Sigel EM, Gitzendanner MA, Visger CJ, Banks JA, Soltis DE, Soltis PS, Pryer KM, Der JP. 2015. An exploration into fern genome space. *Genome Biology and Evolution*. doi: 10.1093/gbe/evv163.
- [138] Hittinger CT, Johnston M, Tossberg JT, Rokas A. 2010. Leveraging skewed transcript abundance by RNA-Seq to increase the genomic depth of the tree of life. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 107: 1476–1481.
- [139] Kocot KM, Cannon JT, Todt C, Citarella MR, Kohn AB, Meyer A, Santos SR, Schander C, Moroz LL, Lieb B, Halanych KM. 2011. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature* 477: 452–456.
- [140] Smith SA, Wilson NG, Goetz FE, Feehery C, Andrade SCS, Rouse GW, Giribet G, Dunn CW. 2011. Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature* 480: 364–367

- [141] Chiari Y, Cahais V, Galtier N, Delsuc F. 2012. Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biology* 10: 65. doi: 10.1186/1741- 7007-10-65.
- [142] Wen J, Xiong Z, Nie Z-L, Mao L, Zhu Y, Kan X-Z, Lckert-Bond SM, Gerrath J, Zimmer EA, Fang X-D. 2013. Transcriptome sequences resolve deep relationships of the grape family. *PLoS ONE* 8: e74394. doi: 10.1371/journal.pone.0074394.
- [143] Wen J, Egan AN, Dikow RB, Zimmer EA. 2015. Utility of transcriptome sequencing for phylogenetic inference and character evolution. *Regnum Vegetabile*, in press.
- [144] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Review Genetics* 10: 57–63.
- [145] Timme RE, Bachvaroff TR, Delwiche CF. 2012. Broad phylogenetic sampling and the sister lineage of land plants. *PLoS ONE* 7: e29696.
- [146] Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Carpenter E, Matasci N, Ayyampalayam S, Barker MS, Burleigh JG, Gitzendanner MA, Ruhfel BR, Wafula E, Der JP, Graham SW, Mathews S, Melkonian M, Soltis DE, Soltis PS, Miles NW, Rothfels CJ, Pokorny L, Shaw AJ, DeGironimo L, Stevenson DW, Surek B, Villarreal JC, Roure B, Philippe H, dePamphilis CW, Chen T, Deyholos MK, Baucom RS, Kutchan TM, Augustin MM, Wang J, Zhang Y, Tian Z, Yan Z, Wu X, Sun X, Wong GK-S, Leebens-Mack J. 2014. Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111: E4859–E4868. doi: 10.1073/pnas.1323926111.
- [147] Zeng L, Zhang Q, Sun R, Kong H, Zhang N, Ma H. 2014. Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times. *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms5956

- [148] Ma H, Huang C-H, Sun R, Hu Y, Zeng L, Zhang N, Cai L, Edger P, AlShehbaz I, Pires JC, Koch M, Tan DY. 2015. Resolving Brassicaceae phylogeny using nuclear genes facilitates molecular clock estimates of major branches, character reconstruction and analysis of gene family evolution. *Botany 2015 Abstracts*<http://2015.botanyconference.org/engine/search/index.php?func¼detail&aid¼388> [30.06.2024]
- [149] Yang Y, Smith SA. 2014. Orthology inference in nonmodel organisms using transcriptomes and low-coverage genomes: Improving accuracy and matrix occupancy for phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution* 31: 3081–3092. doi: 10.1093/molbev/msu245
- [150] Chamala S, Garcia N, Godden GT, Krishnakumar V, Jordon-Thaden IE, DeSmet R, Barbazuk WB, Soltis DE, Soltis PS. 2015. MarkerMiner 1.0: A new application for phylogenetic marker development using angiosperm transcriptomes. *Applications in Plant Sciences* 3(4): 1400115. doi: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1400115>
- [151] Rothfels CJ, Larsson A, Li F-W, Sigel EM, Huiet L, Burge DO, Ruhsam M, Graham SW, Stevenson DW, Wong GK-S, Korall P, Pryer KM. 2013. Transcriptome-mining for single-copy nuclear markers in ferns. *PLoS ONE* 8: e76957.
- [152] Chapman MA. 2015. Transcriptome sequencing and marker development for four underutilized legumes. *Applications in Plant Sciences* 3: e1400111.
- [153] Johnson MTJ, Carpenter EJ, Tian Z, Bruskiewich R, Burris JN, Carrigan CT, Chase MW, Clarke ND, Covshoff S, Depamphilis CW, Edger PP, Goh F, Graham S, Greiner S, Hibberd JM, Jordon-Thaden I, Kutchan TM, Leebens-Mack J, Melkonian M, Miles N, Myburg H, Patterson J, Pires JC, Ralph P, Rolf M, Sage RF, Soltis D, Soltis P, Stevenson D, Stewart CN Jr, Surek B, Thomsen CJ, Villarreal JC, Wu X, Zhang Y, Deyholos MK, Wong GK. 2012. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS ONE* 7(11): e50226.

- [154] Zhang N, Wen J, Zimmer EA. 2015. Expression patterns of AP1, FUL, FT and LEAFY orthologs in Vitaceae support the homology of tendrils and inflorescences throughout the grape family. *Journal of Systematics and Evolution* 53: 469–476.
- [155] de Sousa F, Bertrand YJK, Nylinder S, Oxelman B, Eriksson JS, Pfail BE. 2014. Phylogenetic properties of 50 nuclear loci in *Medicago* (Leguminosae) generated using multiplexed sequence capture and Next-Generation sequencing. *PLoS ONE* 9: e109704.
- [156] Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattaharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J. 2009. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461: 272–276.
- [157] Cronn R, Knaus BJ, Liston A, Maughan PJ, Parks M, Syring JV, Udall J. 2012. Targeted Enrichment strategies for next-generation plant Biology. *American Journal of Botany* 99: 291–311.
- [158] Lemmon AR, Emme SA, Lemmon EM. 2012. Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Systematic Biology* 61: 727–744.
- [159] Zhou L, Holliday JA. 2012. Targeted enrichment of the black cottonwood (*Populus trichocarpa*) gene space using sequence capture. *BMC Genomics* 13: 703.
- [160] Li C, Hofreiter M, Straube N, Corrigan S, Naylor GJB. 2013. Capturing protein-coding genes across highly divergent species. *Biotechniques* 54: 321–326.
- [161] Stull GW, Moore MJ, Mandala VS, Douglas NA, Kates H-R, Qi X, Brockington SF, Soltis PS, Soltis DE, Gitzendanner MA. 2013. A targeted enrichment strategy for massively parallel sequencing of angiosperm plastid genomes. *Applications in Plant Sciences* 1: doi: 10.3732/apps.1200497
- [162] Stephens JD, Rogers WL, Heyduk K, Cruse-Sanders JM, Determann RO, Glenn TC, Malmberg RL. 2015. Resolving phylogenetic relationships of the recently radiated carnivorous plant

genus *Sarracenia* using target enrichment. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85: 76–87.

[163] Penalba JV, Smith LL, Tonione MA, Sass C, Hykin SM, Skipwith PL, McGuire JA, Bowie RCK, Moritz C. 2014. Sequence capture using PCR-generated probes: A cost-effective method of targeted high-throughput sequencing for nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources* 14: 1000–1010.

[164] Faircloth BC, McCormack JE, Crawford NG, Harvey MG, Brumfield RT, Glenn TC. 2012. Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology* 61: 717–726.

[165] Reneker J, Lyons E, Conant GC, Pires JC, Freeling M, Shyu C-R, Korkin D. 2012. Long identical multispecies elements in plant and animal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: E1183–E1191. doi: 10.1073/pnas.1121356109

[166] Grover CE, Salmon A, Wendel JF. 2012. Targeted sequence capture as a powerful tool for evolutionary analysis. *American Journal of Botany* 99: 312–319.

[167] Mandel JR, Dikow RB, Funk VA, Masalia RR, Staton SE, Kozik A, Micheltore RW, Riesberg LH, Burke JM. 2014. A target enrichment method for gathering phylogenetic information from hundreds of loci: an example from the Compositae. *Applications in Plant Sciences* 2: doi: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300085>

[168] Arbizu C, Ruess H, Senalik D, Simon PW, Spooner DM. 2014. Phylogenomics of the carrot genus (*Daucus*, Apiaceae). *American Journal of Botany* 101: 1666–1685.

[169] Neves LG, Davis JM, Barbazuk WB, Kirst M. 2013. Whole-exome targeted sequencing of the uncharacterized pine genome. *The Plant Journal* 75: 146–156.

[170] Weitemier K, Straub SCK, Cronn RC, Fishbein M, Schmickl R, McDonnell A, Liston A. 2014. Hyb-Seq: Combining target enrichment and genome skimming for plant phylogenomics.

Applications in Plant Sciences 2: 1400042. doi: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1400042>

[171] Palumbi SR, Baker CS. 1996. Nuclear genetic analyses of population and genetic variation using intron primers. In: Smith TB, Wayne RK eds. *Molecular genetics approaches in conservation*. New York: Oxford University Press. 25–37.

[172] Li C, Riethoven J-JM, Ma L. 2010. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. *BMC Evolutionary Biology* 10: 90.

[173] Choi HK, Luckow MA, Doyle JJ, Cook DR. 2006. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 56–70.

[174] Yao X, Li C, Dick CW. 2013. Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) markers for evolutionary studies of *Ficus* and other taxa in the fig family (Moraceae). *Applications in Plant Sciences* 1(10): 1300037. doi: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300037>

[175] Pillon Y, Johansen J, Sakishima T, Chamala S, Barbazuk WB, Stacy EA. 2014. Primers for low-copy nuclear genes in *Metrosideros* and cross-amplification in *Myrtaceae*. *Applications in Plant Sciences* 2: doi: [10.3732/apps.1400049](http://dx.doi.org/10.3732/apps.1400049)

[176] Gostel M, Weeks A. 2014. Development of novel, exon-primed introncrossing (EPIC) markers from EST databases and evaluation of their phylogenetic utility in *Commiphora* (Burseraceae). *Applications in Plant Sciences* 2(4): apps.1300098. doi: [10.3732/ apps.1300098](http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300098) |

GEÇİCİ KAPAK

*Kapak tasarımı
devam ediyor.*