

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞADA BULUNAN YABANİ MAYALARIN HAYATTA KALIM BAŞARILARI
ÜZERİNE SOYLAR ARASI VE SOY İÇİ ÜREMELERİNİN ETKİSİ

Onur Erk KAVLAK

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Aralık

2019

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Onur Erk KAVLAK

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ danışmanlığında Onur Erk KAVLAK tarafından hazırlanan bu çalışma 26/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Mine TÜRKTAS ERKEN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Doğada Bulunan Yabani Mayaların Uyum Başarıları Üzerine Soylar Arası ve Soy İçi Üremelerinin Etkisi

Onur Erk KAVLAK

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Biyoteknoloji alanında canlıların verimliliğini arttırmak için çeşitli ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Eşeyli üreme tiplerinden olan soy içi ve soylar arası üreme ıslah çalışmalarında temel alınan üreme çeşitlerindedir. Soylar arası (outcrossing) üreme genetik olarak farklı bireylerin üremesini tanımlarken soy içi üremede (inbreeding) ise akraba bireyler çiftleşirler. Islah çalışmaları soylar arası üremenin canlıların uyum başarısını arttırdığını gösterse de doğada soy içi üremenin birçok tür arasında (mayalar, örümcekler, bitkiler vs.) yaygın olduğu bulunmuştur. O nedenle doğadaki yüksek soy içi üreme olgusu hâlâ bilinmezliğini korumaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışmada, yüksek oranda soy içi üreme yapan yabani maya türü *Saccharomyces paradoxus* canlıları kullanılmıştır. Bu doğrultuda eşleşme analizi yapılarak yüksek soy içi üreme olgusu araştırılmıştır. Bu adımda soylar arası üremenin önündeki engelleri kaldırmak için genetik olarak farklı suşlar bir araya getirilmiş ve soylar arası üremenin gerçekleşip gerçekleşmediğine bakılmıştır. İkinci olarak matematiksel modelleme ile çevresel dalgalanmaların soy içi ve soylar arası üremiş *S. paradoxus*'ların frekansını nasıl etkilediği tespit edilmiştir. Son olarak soy içi ve soylar arası üremeyle oluşmuş canlıların hayatta kalım oranlarının doğal koşullarda karşılaştırılabileceği düşünülmüştür bu doğrultuda uyum başarısı analizi yapılmıştır. Sonuç olarak eşleşme analiziyle soylar arası üremenin iki haftalık süre içinde tercih edilmediği gözlenmiştir. Matematiksel modellemede çevresel dalgalanmanın soy içi ve soylar arası üremiş bireylerin uyum başarılarını değiştirebildiği gözlenmiştir. Son olarak uyum başarış analizinde genetik belirteç bulma adımında uygun bölgeler bulunamadığı için analiz tamamlanamamıştır. Özet olarak, soy içi ve soylar arası üremenin canlılara olan etkisi doğa temelli yaklaşımlarla daha net anlaşılabilir ve ıslah çalışmalarının geliştirilmesi için kullanılabilir.

2019, 75 sayfa

Anahtar kelimeler: *Saccharomyces paradoxus*, yabani mayalar, uyum yeteneği, soy içi üreme, soylar arası üreme, mikrobiyal ekoloji, popülasyon, matematiksel modelleme.

ABSTRACT

MSc Thesis

The Effect of Outcrossing and Inbreeding on the Survival Success of Wild Yeasts Found in Nature

Onur Erk KAVLAK

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ

Strain improvement techniques are widely used in the biotechnology field. Particularly, outcrossing and inbreeding have significant effects on strain improvement studies. During outcrossing genetically distant individuals mate with each other. In contrast, inbreeding is a mating type that occurs between close relatives (i.e sibling-sibling, parent-offspring). Although there are comprehensive strain improvement studies showing benefits of outcrossing (i.e fitness gain), inbreeding is quite common among several populations in nature such as plants, spiders, yeasts, etc. However, little is known about the reason for the high inbreeding rate in nature. We used a highly inbred, wild yeast species called *Saccharomyces paradoxus* to understand the fitness effects of inbreeding and outcrossing. We designed a mating assay to find out the reasons of the high inbreeding rate in nature. In the mating assay, we removed the barriers in the way of outcrossing to see if *S. paradoxus* prefer to do outcrossing in nature-like conditions. Moreover, a mathematical model was developed to track how environmental fluctuation affects the frequency of inbred and outcrossed individuals. Finally, we attempted to measure the relative fitness of outcrossed and inbred cells in nature by improving a fitness assay. As a result, the mating assay showed that outcrossing may not be preferable in two weeks. In addition, the model indicated that environmental fluctuation may change population structure from fixation to coexistence. Lastly, fitness assay could not set up because of several setbacks in the genetic marker determination step which is essential for distinguishing inbred and outcrossed individuals during relative fitness measurement. In conclusion, the fitness effect of inbreeding and outcrossing can be understood clearly via nature-based experimental designs and this information can be implied to strain improvement studies.

2019, 75 pages

Keywords: *Saccharomyces paradoxus*, wild yeasts, fitness, inbreeding, outcrossing, microbial ecology, population, mathematical model.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasının oluşmasında bana tüm imkânları sunan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Nur KOÇBERBER KILIÇ'a, bunun yanında zor zamanlarda desteğini esirgemeyen ve yaptığı yorumlarla bu çalıőmanın geliştirilmesini sağlayan sayın Doç Dr. Evrim GÜNEŐ ALTUNTAŐ'a, tez deneylerimin yapılmasına olanak veren Max Planck Enstitüsü Evrimsel Biyoloji bölümündeki danışmanlarım sayın Dr. Primrose J. BOYNTON ile sayın Dr. Michael SIEBER'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca, bu tez çalışması sırasında her türlü desteğini sağlayan sevgili dostlarım Sevgi KAYNAR ve Dilara TUNCA'ya, yazım hatalarını düzeltmemde yardımcı olan sevgili babam Senih KAVLAK'a da teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. ÜREME TİPLERİ.....	3
2.2. ÜREME TİPLERİNİN BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ.....	5
2.3. <i>S. PARADOXUS</i> MAYALARININ YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	7
2.4. MİKROSATELLİTLERİN SOY İÇİ VE SOYLAR ARASI ÜREME ANALİZİNDE KULLANIMI ..	8
2.5. MATEMATİKSEL MODELLEME.....	9
2.5.1. KEMOSTAT MODELİ.....	10
2.6. UYUM BAŞARISI VE ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	13
3. GEREKÇE VE AMAC	16
4. MATERYAL VE YÖNTEM	17
4.1. MİKROORGANİZMA.....	18
4.2. EŞLEŞME ANALİZİ.....	19

4.2.1. SUŞLARIN TERARYUMDA İNKÜBASYONU	20
4.2.2. MİKROSATELLİT BİLGİSİYLE SOYLAR ARASI ÜREME TESPİTİ	22
4.2.3. SUŞLARIN FİLTREDEN İZOLASYONU	23
4.3. MATEMATİKSEL MODELLEME	24
4.3.1. ÇEVRESEL SENARYOLAR	25
4.3.2. GENOTİPLERİN ÇEVREYLE ETKİLEŞİMLERİ	26
4.3.3. GENOTİPLERİN BÜYÜME ÖZELLİKLERİ	27
4.4. UYUM BAŞARISI ANALİZİ	28
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	<u>31</u>
5.1. EŞLEŞME ANALİZİ	31
5.2. MATEMATİKSEL MODELLEME	33
5.3. UYUM BAŞARISI ANALİZİ	34
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>36</u>
6.1. TARTIŞMA	36
6.1.1. EŞLEŞME ANALİZİ	36
6.1.2. MATEMATİKSEL MODELLEME	39
6.1.3. UYUM BAŞARISI ANALİZİ	40
6.2. SONUÇ	42
<u>KAYNAKLAR</u>	<u>44</u>
<u>EKLER</u>	<u>52</u>
Ek 1: Matematiksel modelleme için kullanılan kodlar	52
Ek 2: Uyum başarı analizinde kullanılan sekiz bölgenin gen dizileri	53
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>58</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>	<u>59</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Soy içi ve soylar arası üremenin gösterimi.	4
Şekil 2.2. Üreme tiplerinin mikrosatellit bilgileri doğrultusunda tanımlanması.	9
Şekil 2.3. Kemostat kültürün basit bir gösterimi.	11
Şekil 4.1. Test edilecek hipotezlerin akış diyagramı.	17
Şekil 4.2. Filtrenin hücre süspansiyonu ile inkübasyonu ve tüpe yerleştirilmesi.....	21
Şekil 4.3. Deneyde kullanılan filtre, tüp tasarımı ve teraryumun gerçek görüntüleri.	22
Şekil 4.4. Çevresel dalgalanmaları gösteren sinüs grafikleri.....	25
Şekil 4.5. Genotiplerin çevreye gelen besinin kendi büyüme oranlarına (g) ve popülasyon yoğunluklarına (Y) göre tüketimini gösteren şema.	26
Şekil 4.6. Üç farklı genotipin büyüme özelliğine göre çizilmiş büyüme oranı ve besin derişimi grafiği.	27
Şekil 5.1. Eşleşme analizi sonuçları.	32
Şekil 5.2. İki çevresel senaryonun popülasyon üzerindeki etkisi. (a) düşük çevresel dalgalanma.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışma sırasında kullanılan tüm besi yerlerinin kimyasal içerikleri.....	19
Çizelge 4.2. Deneyde kullanılan <i>S. paradoxus</i> suşlarının genel özellikleri.	20
Çizelge 4.3. Deney süresince kullanılan örnekler ve sayıları.....	22
Çizelge 4.4. Deney sırasında kullanılan suşların mikrosatellit bilgileri ve F1 nesli için bazı olası senaryolar.....	23
Çizelge 4.5. Matematiksel modeli kurmak için kullanılan parametre değerleri.....	28
Çizelge 5.1. Uygun gen belirteçlerinin bulunması için gerçekleştirilen işlemler.....	35

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Bp	Baz çifti
CHCl_3	Kloroform
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>S. paradoxus</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. eubayanus</i>	<i>Saccharomyces eubayanus</i>
<i>S. uvarum</i>	<i>Saccharomyces uvarum</i>
<i>S. kudriavzevii</i>	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
SNP	Single nucleotid polymorphism
GDO	Genetiği değiştirilmiş organizma
GC	Guanin-sitozin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ddPZR	Dijital damlacık polimeraz zincir reaksiyonu
bç	Baz çifti
sa	Saat
\dot{E}	Besin miktarındaki değişim
I	Çevreye gelen besin miktarı
g_{max}	Maksimum büyüme oranı

K_s	Substrat spesifik sabiti
\dot{Y}	Popülasyon yoğunluğundaki değişim
g	Spesifik büyüme oranı



1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar insanlık tarihi boyunca bira, şarap, çikolata vb. gibi sayısız biyoteknolojik ürünlerin elde edilmesinde kullanılmıştır. Özellikle *Saccharomyces* cinsi mayalar günümüzde biyoteknoloji alanında sıklıkla tercih edilmektedir (1,2). Çünkü mayalar yüksek alkol üretebilme kapasiteleri ve alkole olan toleransları sayesinde çevreci yakıt üretiminde diğer bir deyişle mikrobiyal enerji üretiminde önemli yere sahiptir (3). Bu doğrultuda birçok bilim insanı mayaların gerek biyokütle, gerek biyoyakıt üretim verimliliğini artırma yolunda çalışmalar yapmaktadır (4).

Bu denli önem taşıyan *Saccharomyces* cinsi gerçekleştirilen tez çalışmasında da kullanılmıştır. Bu çalışmada *S. cerevisiae* (bira mayası) mayasının doğada bulunan en yakın akrabası olan *Saccharomyces paradoxus* türü kullanılmıştır. *S. paradoxus*'lar hem ekolojik hem evrimsel hem de biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan bir türdür (3,5). Bu mayaların insanlar tarafından yapay seçilime uğratılmamış olmaları onları evrimsel ve ekolojik açıdan, algal karbon kaynağı olan manitolden yüksek verimlilikte biyoyakıt üretme özelliğine sahip olmaları ise biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır (3,5).

Eşeyli üreme tiplerinden olan soylar arası (outcrossing) ve soy içi üreme (inbreeding) ıslah çalışmalarında temel alınan üreme tipleridir. Soylar arası üremede genetik olarak uzak, akraba olmayan bireyler çiftleşirler (6). Bunun yanında soy içi üreme (inbreeding) yakın akraba olan bireylerin çiftleşmesini tanımlamaktadır ve genellikle oğul döllerin uyum başarısını düşürdüğü kabul edilmektedir (7–9). Şu ana kadar yapılan laboratuvar çalışmaları soylar arası üremenin daha faydalı olduğunu öne sürse de, popülasyon genetiği çalışmalarında doğada hâlâ birçok canlı türünün soy içi üremeyi tercih ettiği görülmektedir (10–12). Bu çalışmada mayaların verimliliğini, uyum başarılarını önemli ölçüde etkileyebilen soylar arası ve soy içi üreme üzerinde yapılmıştır. Doğadaki yüksek soy içi üreme oranını araştırmak için doğal koşulları içeren deneysel tasarımlar ve matematiksel yaklaşımlar kullanılabilir (8,9). Deneysel olarak, eşleşme analizi yapıp canlıların hangi üreme tipine daha yatkın olduğu, hayatta kalım başarı (bundan sonra 'uyum başarısı' terimi olarak kullanılacaktır.) analiziyle soylar arası ve soy içi olarak üreyen canlıların çevreye uyumları ölçülebilir. Evrimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılan kemostat modeliyle çevresel

dalganmaların soy içi ve soylar arası üremiş mayaların uyum başarısını nasıl etkilediği tespit edilebilir (10).

Bu çalışmada soylar arası üremenin doğal koşullarda iki haftalık sreden daha fazla zamanda olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca matematiksel modelleme sayesinde çevresel dalgalanmaların genotiplerin uyum başarılarını ve popülasyon yapısını değiştirebildiği gösterilmiştir. Son olarak soy içi ve soylar arası üremiş canlıların uyum başarılarını karşılaştırmak için genetik belirteçler araştırılmıştır. Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasının konu ile ilgili yapılacak araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

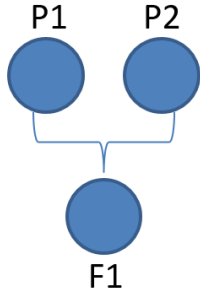


2. KURAMSAL TEMELLER

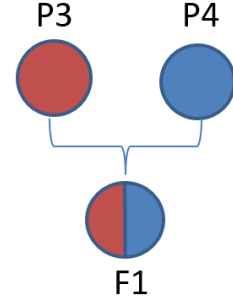
Eşeyli üreme çeşitlerinden olan soy içi ve soylar arası üreme canlıların evrimsel süreçlerini ve verimliliklerini farklı şekillerde etkileyen olgulardır (13). Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler canlıların verimliliğinin artırılması konusunda ıslah çalışmalarıyla, suş geliştirmeleriyle ve GDO uygulamalarıyla çeşitli ilerlemeler sağlamaktadır. Bu doğrultuda canlıların verimliliğini arttırabilmek için üreme tiplerinin evrimsel etkileri gerek deneysel gerek matematiksel yaklaşımlarla araştırılabilir.

2.1. ÜREME TIPLERİ

Canlılar kendi soylarını devam ettirmek ve genetik bilgilerini gelecek kuşaklara aktarmak için farklı üreme stratejileri kullanmaktadır. Bu yöntemler temel olarak eşeyli ve eşeysiz üreme olarak sınıflandırılabilir. Eşeysiz üremede canlı herhangi bir eşe ihtiyaç duymadan, kendi genetik yapısının birebir kopyasını oluşturarak soyunu devam ettirir (14). Fakat eşeyli üremede eşler bir araya gelerek genetik bilgilerini paylaşırlar ve oğul döllerini oluştururlar. Eşeyli üremenin alt dallarından olan soy içi ve soylar arası üreme canlıların yaşam döngülerinde önemli bir yer kaplamaktadır (15). Soylar arası üreme genetik olarak farklı olan eşlerin üremesidir. Diğer taraftan soy içi üreme genetik olarak benzer diğer bir deyişle akraba ebeveynlerin üremesidir (Şekil 2.1.). Dolayısıyla iki üreme tipi genetik açıdan farklı olguların meydana gelmesine neden olmaktadır: Soy içi üreme homozigot genotipin frekansını artırırken soylar arası üreme ise heterozigot birey sayısında yükselişe sebep olmaktadır ve bundan ötürü popülasyondaki genetik çeşitlilik artmaktadır (16).



Soy içi üreme



Soylar arası üreme

Şekil 2.1. Soy içi ve soylar arası üremenin gösterimi. Renkler ebeveynlerin genetik yapısını göstermektedir. ‘P’ harfi her bir ebeveyni simgelerken ‘F1’ ilk nesil oğul dölleri göstermektedir. Benzer renkler benzer genetik arka planı yansıtırken farklı renkler farklı genetik arka planı göstermektedir. Soy içi üreme de benzer genetik yapıdaki ebeveynler bir araya gelerek oğul dölleri oluştururlar. Oluşan oğul döllerde tıpkı ebeveynleri gibi benzer genetik yapıya sahip olacaktır. Diğer yandan soylar arası üreme de genetik farklılığa sahip olan ebeveynler üreme davranışı sergilerler. Bu sayede oğul döllerde yeni çeşitlilik ortaya çıkabilir.

Üreme tiplerinin uyum başarısına olan etkisi iki varsayıma dayandırılabilir: [1] soylar arası üreme faydası- soy içi üreme zararı ve [2] soy içi üreme faydası-soylar arası üreme zararı. Soylar arası üreme popülasyondaki genetik çeşitliliği artırarak oğul döllerin uyum başarılarını olumlu yönde etkileyebilmektedir (Şekil 2.1.). Ayrıca, soylar arası üreme sonucunda ebeveyn canlılardan daha üst karakterde (fenotipik olarak daha gelişkin ya da daha verimli) ‘melez azmanı’ olarak adlandırılan nesiller oluşabilmektedir (17). Bu aşamada her iki ebeveyndeki baskın alleller oğul nesillerde bir araya gelerek üstün bir karakter oluşturabilirler. Nitekim şu ana kadar yapılan bilimsel çalışmalar bunu kanıtlamaktadır. Örneğin; *Sabatia angularis* bitkileri üzerinde yapılan deneylerde bitkilerin yaptığı soylar arası üreme sayesinde çevresel şartlara daha iyi uyum sağlayan bireyler meydana gelmiştir (18). *S.paradoxus* ve *S. cerevisiae* mayaları arasında gerçekleşen melezleşme sonucunda da daha dayanıklı döller ortaya çıkmıştır (19). Benzer bir şekilde bira mayalarında (*S. cerevisiae*) soylar arası üreme oranı arttıkça çevresel koşullara hızlı bir şekilde uyarlandıkları ve uyum başarılarının her geçen nesil yükseldiği tespit edilmiştir (20). Diğer taraftan, soy içi üremenin hastalık yapıcı çekinik allellerin frekansını arttırdığını ve bu nedenle oğul döllerin hayatta kalma başarılarını düşürdüğü ispatlanmıştır (6,16). Bununla birlikte kimi durumlarda soy içi üreme faydalı hale geçip soylar arası üreme canlıların uyum başarılarını

düşürebilmektedir. Her ne kadar soy içi üreme zararlı, çekinik allel eşleşme olasılığını arttırsa da bireylerin üreme şansını da arttırabilir (21). Örneğin bireyler kolayca akrabalarıyla eşleşerek genetik olarak farklı eş bulmak için zaman harcamak zorunda kalmazlar (21). Ayrıca soylar arası üreme ebeveynlerin genetik olarak uzak yapıda olması sonucunda kromozom uyumsuzluğuna neden olabilmektedir. Diğer bir ifadeyle ebeveynlerin genetik farklılığı popülasyondaki çeşitliliği arttırmak için önem arz etse de bu durum üreme sırasında kromozomların birbirleriyle uyuşamamalarına ve kısır döllerin oluşmasına neden olabilmektedir (6,16,22). Bu nedenle üreme tiplerinin verimlilik üzerine etkisi canlı türüne, çevreye ve popülasyon dinamiklerine göre değişim göstermektedir.

2.2. ÜREME TİPLERİNİN BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ

Biyoteknoloji alanında enzim, kimyasal, biyoetanol gibi ürünlerin elde edilmesinde mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Günümüzde ülkemizin enerji konusunda dışarıya bağımlı hale gelmesi biyoetanol üretimini can alıcı bir noktaya getirmiştir (23). Mikroorganizmaların gerek hızlı büyümeleri, gerek kolay bir şekilde yönetilmeleri (basit bir besi ortamına ihtiyaç duymaları vb.) onları biyoetanol üretiminde vazgeçilmez unsur yapmıştır (24). Şu ana kadar literatürde birçok organizmadan (*E. coli*, *Zymomonas mobilis*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* vb.) biyoetanol üretimi için faydalanılmaktadır (25). Fakat bakteriler hızlı bir şekilde alkol üretmelerine rağmen alkol toleransları düşük olduğu için daha verimli mikroorganizma arayışları sürmektedir. Bu noktada, *Saccharomyces* cinsi mayaların yüksek alkol toleransına ve diğer birçok olumlu yöne sahip olmaları biyoetanol üretimini daha verimli bir noktaya çıkarmıştır. Örneğin, *S. cerevisiae*'ler geniş pH aralıklarında aktif olabildikleri için fermantasyon sırasında oluşabilecek kontaminasyonlara karşı dirençlidirler (4). Fakat bakteri odaklı biyoetanol üretimi sırasında kontaminasyon büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bu nedenle *S. cerevisiae*'ler diğer mikroorganizmaların olumsuz etkisine maruz kalmadan etanol üretebilmektedirler (3). Ek olarak *S. cerevisiae* mayaları etanol üretimi çeşitli substratlar kullanılmaktadır. Örneğin şeker kamışından, şeker pancarından, samandan, mısır atıklarından, ligno-selülozik maddelerden biyoetanol üretebilmektedirler (4). Fakat, ligno-selüloz gibi mono veya disakkarit olmayan kompleks şekerler enzimatik ön muameleye tabi tutulurlar. Yine bir başka maya türü olan *S. paradoxus* NBRC 0259-3 suşu ve *E. coli* KO11 bakterilerinin üzerinde yapılan bir çalışmada *E. coli* KO11 bakterisinin 50 g/l'lik alkol derişimine dayanamadığı fakat *S. paradoxus*'ların bu alkol

oranını tolere edebildikleri görülmüştür (3). Yine aynı çalışmada *S. paradoxus*'ların mikroalgal karbon kaynağı olan manitolden en yüksek oranda etanolü ürettiği ve *E. coli K011* bakterilerinin aksine alg kaynaklı metabolitlerden de etkilenmediğini ortaya koymuştur (3). Bu doğrultuda *S. paradoxus*'ların biyoteknolojik açıdan oldukça elverişli canlılar oldukları ortaya çıkmaktadır. Fakat bu canlılardaki üretim verimliliğinin artırılması hâlâ önem arz etmektedir (1).

Biyoteknoloji alanında verimliliği artırmak için gen manipülasyonları, adaptif evrim çalışmaları, ıslah yöntemleri gibi çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (26). Gen manipülasyonlarında verimliliği arttıracakları düşünülen gen bölgesi gen aktarım yöntemleriyle (elektroporasyon, viral vektörle aktarım vb.) ilgili canlıya aktararak verimlilik artırılmaktadır (27). Adaptif evrim çalışmalarıyla da mikroorganizmalar bir seçim baskısı altına alınarak en dayanıklı veya verimli bireylerin eldesi sağlanır (28). Bu süreçte yararlı mutasyonların popülasyonda yaygınlaşması sağlanacağı gibi o ortama adapte olan çeşitlerin (genetik farklılığa sahip olan bireylerin) popülasyonu baskılaması sağlanır (29). Her iki durumda da verimlilik fenotipik, uyum başarısı vb. bakımından artmaktadır.

Tarımdan hayvancılığa verimliliği artırmak için uygulanan diğer bir yöntem ise ıslah çalışmalarıdır (1,30). Bu yöntemde birbirleriyle çiftleşmesi en verimli olabilecek olan bireyler çiftleştirilir ve oluşan neslin ebeveynlere göre daha verimli olması beklenir (31). Örneğin; mısır bitkilerinde yapılan bir çalışmada UH250 ve UH005 türü mısırlar birbirleriyle çaprazlanmış ve ebeveynler fenotipik açıdan oğul döllerleriyle karşılaştırılmıştır (32). Alınan sonuca göre, soylar arası üreme oğul neslin daha uzun bir kök sistemine ve daha verimli fenotipik özelliklere (koçan büyüklüğü, tane sayısında artış vb.) sahip olmasını sağlamıştır (32). Bir diğer örneğe, büyük baş hayvanların süt verimliliği üzerine verilebilir. İnsanlar yıllardan beri büyük baş hayvanların süt verimliliğini artırmak için yapay seçim uygulamıştır. Diğer bir deyişle en verimli hayvanları birbirleriyle çiftleştirmiştir. Yapay seçimin bu olumlu etkisi geçmiş yıllardaki süt üretimiyle karşılaştırıldığında daha açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır (31). Mikroorganizma düzlemine inildiğinde ıslah çalışmalarının devam ettiği görülmektedir. Örneğin, *S. cerevisiae* X *S. eubayanus* melezi; fermantasyon oranı, şeker kullanımı, aroma ve stres koşullarına dayanıklılık bakımından ebeveyn canlılara göre daha gelişkin özelliklere sahiptir (2). Ek olarak insanlık tarihi boyunca *S. cerevisiae*'ler bira ve şarap gibi biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi için *S. uvarum*, *S. kudriavzevii*, gibi

diğer türlerle çaprazlanarak daha verimli melez soylar elde edilmiştir (15). Bu örnekler, yapılan çaprazlamaların suşların geliştirilmesinde olumlu katkı sunduğunu göstermektedir. Fakat *S. cerevisiae* ve *S. uvarum* çaprazlaması üzerine yapılan bir diğer araştırma, oluşan melez neslin alkol üretim oranının düştüğünü göstermektedir (33). Bu nedenle üreme tiplerinin canlılar üzerindeki etkisi detaylı bir şekilde birçok bilim insanı tarafından araştırılmaktadır.

Özet olarak, biyoteknoloji alanında yapılan ıslah çalışmalarında üreme tiplerinin etkisinin anlaşılması önem taşımaktadır. Özellikle *Saccharomyces* cinsi canlılar biyoetanol ve diğer bira, ekmek gibi biyoteknolojik ürünlerin eldesinde ana unsuru oluşturmaktadır. Bu doğrultuda, *Saccharomyces* cinsi canlıların üreme tiplerinin onların verimliliğini nasıl etkilediğini bu bağlamda ne gibi iyileştirmeler yapılabileceğini bulmak yeni biyoteknolojik gelişmelerin temelini oluşturmaktadır.

2.3. *S. PARADOXUS* MAYALARININ YAŞAM DÖNGÜSÜ

S. paradoxus mayaları biyoteknolojik öneme sahip *S. cerevisiae* mayalarının doğada yaşayan en yakın akrabalarıdır (15). Tek hücreli, kolay kültüre edilebilen *S. paradoxus* mayaları *S. cerevisiae*'lerin aksine insanlar tarafından yapay seçilime tabii tutulmadığı için ekolojik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (5). Ortalama olarak 5-10 µm boyuta sahip *S. paradoxus*'lar doğada özellikle meşe ağaçlarının çevresinde bulunurlar. Ayrıca çam, elma ağaçlarında, asma bitkisinde yaşayabildiği saptanmıştır (34). Ökaryot olan *S. paradoxus* mayaları eşeyli ve eşeysiz üreme yoluyla soylarını devam ettirebilirler (35). Bunun yanı sıra eşeysiz üreme tiplerinden olan tomurcuklanma yoluyla da yeni bireyler oluşturabilirler (36). Eşeyli üremeyi çevresel stresin arttığı koşullarda yaparlarken çevresel koşulların uygun olduğu durumlarda eşeysiz olarak üremeyi tercih ederler (36). Eşeyli üreme sırasında diploid olan ana hücreler mayoz bölünme geçirerek dört haploid birey oluşturur. Bu haploid hücreler spor kesesi (ascus) denilen koruyucu bir zarın içerisinde bulunurlar ve çevredeki koşulların iyileşmesiyle birlikte zarı parçalayıp çevreye yayılırlar (37). Diğer bir haploid bireyle karşılaştıklarında hücre proteinlerinin uyum göstermesi sonucunda birleşirler ve tekrar diploid birey oluştururlar. Bazı durumlarda ise ascus içindeki haploid hücrelerin çiftleştikleri (inter-tetrad) de gösterilmiştir (15). *S. paradoxus*'lar temelde üç tip eşeyli üreme yaparlar: Bunlar soylar arası, soy içi üreme ve öz diploidleşmedir (autodiploidization). Soy içi üremede genetik olarak benzer maya hücreleri çiftleşirken, soylar arası üremede genetik

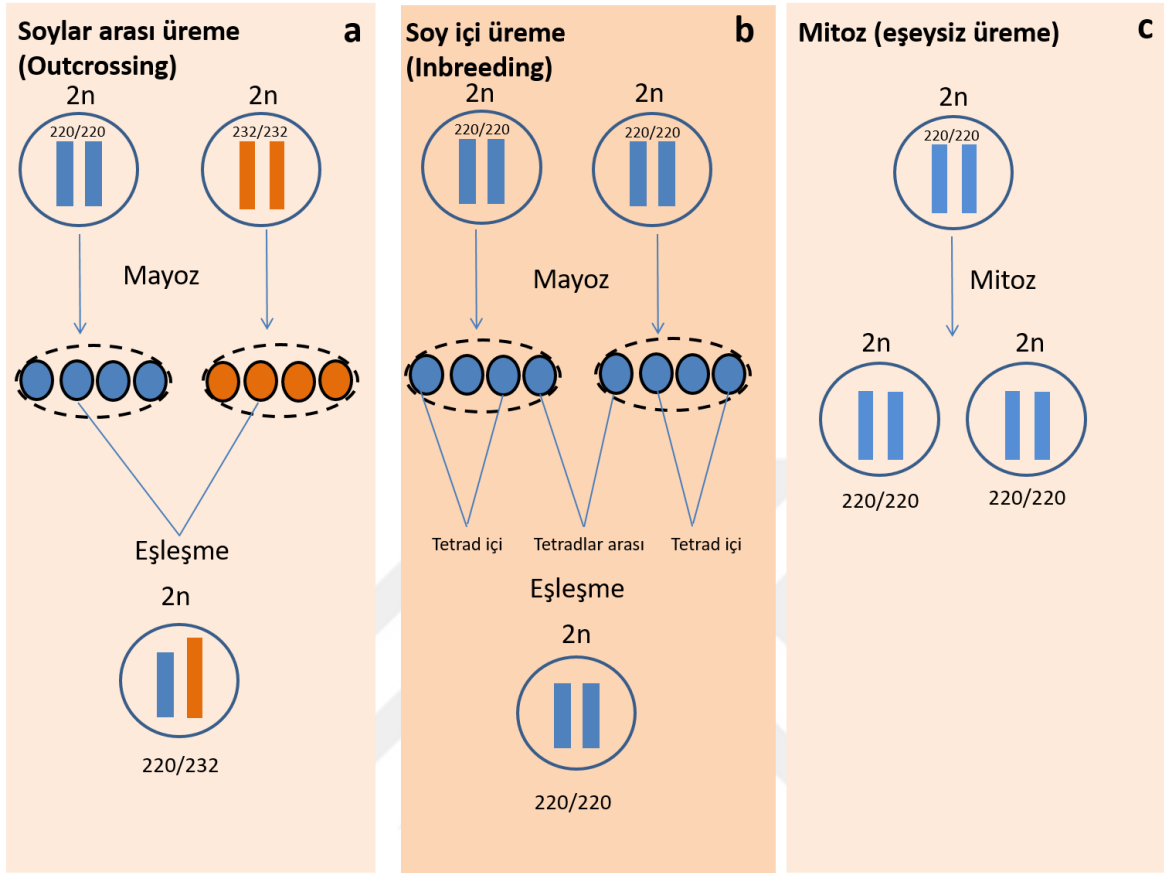
olarak farklı haploid hücreler birleşerek diploid yapıya tekrar dönerler. Öz diploidleşmede mayoz sonucu oluşan haploid hücreler önce tomurcuklanırlar ve daha sonra bu tomurcukla birleşerek homozigot, diploid hücreyi oluştururlar (37). *S. paradoxus*'ları üreme tiplerini araştırmak için önemli kılan nokta bu mayaların yüksek oranda soy içi üreme yapmalarıdır. Yapılan popülasyon genetiği çalışmalarında *S. paradoxus*'ları hayat döngülerinde soy içi üremenin yüksek oranda gerçekleştiği bulunmuştur. Diğer bir deyişle her 100 eşeyli üremeden 94'ünde soy içi üreme, 5'inde öz diploidleşme ve yalnızca 1'inde soylar arası üreme meydana gelmektedir (10). Bu oran literatürde soylar arası üremeye dair olumlu bilgilerle karşılaştırıldığında daha belirgin hale gelmektedir. *S. paradoxus*'ların diğer bir önemli özelliği ise kısa zamanda (iki saatte bir nesil) birçok nesil oluşturmasıdır. Böylelikle uzun zaman alabilecek evrimsel süreçler kısa zamanda gözlenmektedir (38).

2.4. MİKROSATELLİTLERİN SOY İÇİ VE SOYLAR ARASI ÜREME ANALİZİNDE KULLANIMI

Mikrosatellitler yüksek mutasyon oranına sahip, genellikle 3-6 baz çifti uzunluğunda tekrarlı gen dizileridir (39). Mikrosatellit uzunluklarının her iki ebeveynde farklı olması bu gen dizilerini ebeveyn tespiti için kullanışlı hale getirmektedir. Ayrıca mikrosatellitler nötral yapıya sahip oldukları için protein sentezinde görev almamaktadırlar fakat nötral bölgelerinde çeşitli genetik etkileşimler sonucu metabolik bazı etkilere sahip olduğuna dair bulgular da mevcuttur (39,40).

Benzer bir yaklaşımla mayaların hangi tip üreme gerçekleştirdiği popülasyondaki bireylerin mikrosatellit bilgileri kontrol edilerek incelenebilir (17–19). Bunun için Mendel genetiği temel alınabilir. Örneğin, mikrosatellit uzunlukları bakımından farklı genotiplere sahip suşlar çaprazlanırsa (soylar arası üreme yaparsa) oluşacak yeni oğul döllerin aynı lokustaki mikrosatellitleri farklı olacaktır. Diğer bir deyişle heterozigot genotipler meydana gelecektir. Daha detaylı bakılacak olursa eğer bir ebeveyn mikrosatellit bilgisi bakımından 220/220 homozigot ve diğer ebeveyn de 232/232 homozigot ise soylar arası üreme sonucunda 220/232 heterozigot yapıdaki oğul döller meydana gelecektir (Şekil 2.2.). Elbette soylar arası üremeye işaret edebilecek daha farklı genotipler de popülasyonda kendini gösterebilir. Soylar arası üreme sonucu oluşmuş oğul döller tekrar çiftleşebilir (F2 nesli) ve bu sırada

parça değişimi (crossing-over) olayı meydana gelebilir. Bu doğrultuda oluşan yeni neslin genotipi kimi lokuslar için homozigot kimisi içinse heterozigot olabilir.



Şekil 2.2. Üreme tiplerinin mikrosatellit bilgileri doğrultusunda tanımlanması. Soy içi, soylar arası ve mitoz ile üreme sonucu oluşabilecek genotipler gösterilmiştir. Renkler mikrosatellit bölgelerine göre farklı genotipleri göstermektedir (mavi renk 220 baz uzunluğu, turuncu renk 232 baz uzunluğu temsil etmektedir). (a) Soylar arası üremede genetik olarak uzak iki birey (220/220 ve 232/232) çiftleşme olanağına sahip dörder adet haploid hücreler oluştururlar. Bu hücreler bir araya gelerek mikrosatellit bölgesi bakımından heterozigot birey oluştururlar. (b) Soy içi üremede ise genetik olarak yakın akrabalar üreme davranışı sergilerler. Bu adımda aynı tetrad içindeki haploid hücreler üreyebileceği gibi tetradlar arası olarak da üreme gerçekleşebilir fakat genetik açıdan aynı sonuçlar alınır; homozigot 220/220 oğul döller. (c) Diğer yandan *S. paradoxus* hücreleri mitoz ile bölünerek de çoğalabilirler. Mitoz sırasında diploid olan hücre kendi kopyası olan iki tane diploid hücre oluşturur ve genotip de ata canlıyla tamamen aynı olur.

2.5. MATEMATİKSEL MODELLEME

Matematiksel modellemeler özellikle karmaşık eko-evrimsel süreçleri incelemek için oldukça yararlı yaklaşımlardır (41). Özellikle uzun zamanlar alan evrimsel deneyler modellemeler sayesinde saniyelere kadar indirilebilmektedir. Bunun haricinde modellemeler

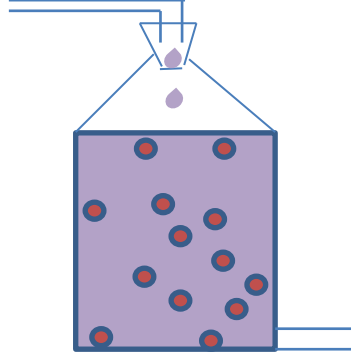
birçok çalışmayı birleştirerek bilimsel bir olgunun daha da genelleşmesini sağlayabilir (42). Örneğin bir canlı grubu için oluşturulmuş bir model çeşitli geliştirmeler sağlanarak diğer canlı gruplarına da uygulanabilir. Bu nedenle günümüzde birçok biyolojik olgu matematiksel temellerle de güçlendirilmeye çalışılmaktadır (43).

Çevrenin, canlıların evrimsel süreçlerine olan etkisi birçok araştırmaya konu olmuştur. Özellikle doğal seçilimin belirli çevresel şartlarda en uygun genotipin seçilmesini sağlaması ve bu genotipin popülasyonda baskın hale gelebilmesi çevre-organizma ilişkisinin dinamik bir şekilde evrimsel süreçleri etkilediği anlamına gelmektedir. Doğada canlılar birçok etmene maruz kalmaktadır (44). Örneğin sıcaklık gün içerisinde değişmekte, besin miktarı dalgalanabilmektedir (45). Bu değişimler uzun süreçte popülasyondaki gen frekansında değişimlere neden olabilmektedir. Özellikle popülasyon farklı tip genotiplerden oluşuyorsa her bir genotipin çevresel değişime verdiği tepki farklı olabilir. Nitekim bitkiler üzerinde yapılan bir deneyde soylar arası üremenin incelenen üç farklı çevresel koşulda (sera, tarla ve bahçe) soy içi üremeden daha dayanıklı nesiller meydana getirdiği bulunmuştur (18). Yani heterozigot genotipler çevresel koşullara daha dayanıklı olmuşlardır.

Araştırmacılar çevresel dalgalanmaların farklı genotipler üzerinde olan etkisini matematiksel modelleme tabanlı yaklaşımla ele almaya çalışmışlardır. Örneğin *Lynch ve ark.* 'Gaussian seçilimi'ni formülize ederek popülasyondaki heterozigot karakterlerin çevresel etmenler ışığında nasıl seçildiğini tahmin etmeye çalışmışlardır (46). Benzer bir şekilde popülasyonların hayatta kalma olasılıklarını hesaplamaya çalışan, üreme tiplerini hesaba katarak canlıların çevresel etmenlere olan tepkisini araştıran modeller de mevcuttur (12,47). Fakat evrimsel deneylerde sıklıkla kullanılan kemostat modelinde yararlanılarak daha basit ve temel diferansiyel denklemler içeren yaklaşımlar gerçekleştirilebilir.

2.5.1. KEMOSTAT MODELİ

Kemostat modeli deneysel evrim çalışmalarında kullanılan, canlıların büyüme oranları sabit tutularak sınırlı bir substratla muamele edildiği bir modeldir (48). Kültüre edilen hücre solüsyonuna, eş zamanlı olarak besin girişi ve atık çıkışı olur. Böylelikle kemostat kültürü sabit bir hacimde tutulur (Şekil 2.3.). Bu tekniğin asıl amacı popülasyonda meydana gelen yararlı mutasyonların elenmeden popülasyonda baskın hale gelmesini sağlamaktır (49).



Şekil 2.3. Kemostat kültürün basit bir gösterimi. Görüldüğü gibi besin maddeleri kültür içerisine gelirken aynı zamanda tabanda bulunan başka bir musluk aracılığıyla atıklar dış ortama aktarılmaktadır. Yuvarlak, içi kırmızı olan şekiller kültürdeki hücreleri temsil etmektedir.

Adaptif laboratuvar evrimi çalışmalarında kullanılan kemostat aynı zamanda matematiksel modelleme geliştirmede kullanılabilir (48). Özellikle yeni mutasyonların oluşması canlıların büyüme karakteristiğini oluşturan maksimum büyüme oranı (g_{max}) ve afinitelerini (K_s) değiştirmektedir. Örneğin doğada bulunan popülasyonlar kendi içlerinde birçok çeşitliliğe sahiptir (50) ve her birey çevreye gelen besin maddesini kendi büyüme karakteristiğine göre kullanmaktadır. Dolayısıyla bu farklılık evrimsel süreçler sonucunda popülasyonların değişmesine neden olur. Ekolojik bir model olan kemostat modeli bu noktada devreye girerek genotip ve besin maddesi ilişkisinin ortaya çıkmasını sağlar (49).

Kemostat sisteminde hücre sayısı ve besin miktarı iki temel değişkeni oluşturur. Zamana bağlı olarak kültürdeki hücreler bölünerek çoğalırlar ve seyreltme oranına göre sayıları azalır (51). Besin miktarıysa eklenen yeni besin çözeltisiyle artar, seyreltme oranı ve hücrelerin besini tüketmesi sonucunda besin miktarı düşer. Böylelikle canlıların evrimsel süreçlerinde yer etmiş olan genetik sürüklenme de sisteme dâhil edilmiş olur. Örneğin, seyreltme oranının $0,2 \text{ sa}^{-1}$ olduğu durumda canlının genotipine bağımlı olmaksızın şans eseri elenme oranı %20 olacaktır (49).

$$\frac{dx}{dt} = g_{max} \frac{s}{K_s + s} x - D_x$$

$$\frac{ds}{dt} = D_R - D_S - \frac{x}{Y} g_{max} \frac{s}{K_s + s}$$

Yukarıdaki denklemlerde hücre sayısının zamana bağlı olarak değişimi (dx/dt) ve substrat yani besin miktarındaki değişim (ds/dt) gösterilmektedir. Kemostat sisteminde hücre sayısındaki artış maksimum büyüme oranı (g_{max}) ve besin derişimine (s) bağlıdır. Fakat aynı zamanda seyreltme oranına (Dx) bağlı olarak hücre sayısı azalmaktadır. $g_{max} \frac{s}{K_s+s}$ ifadesi mikroorganizmanın *Monod* denklemine göre büyümesini tanımlamaktadır. K_s hücrelerin besine olan afinitesini gösteren substrat spesifik sabitidir. Denklemin diğer kısmındaysa kemostat ortamındaki besin miktarının değişimi (ds/dt) gösterilmektedir. Bu kısımda ise sisteme D_R oranında yeni besin girmekte, D_S oranında ise sistemden atılmaktadır. Y parametresi ise besin maddesinin mol başına hücre sayısındaki artışı göstermektedir. Bu doğrultuda K_s , Y ve g_{max} parametreleri hücrelerin evrimsel süreçlerine etki eden parametrelerdir. Diğer bir deyişle, evrimsel süreçlerde bu parametrelerdeki bir değişiklik canlıların uyum başarılarını etkileyecektir (48,49,52).

Kemostat deneyleriyle bugüne kadar birçok mikroorganizma düşük besin stresine maruz bırakılarak suş geliştirme deneyleri yapılmıştır (53). Model organizma olan *E. coli* üzerinde yapılan bir kemostat deneyinde hücrelere düşük glikoz stresi uygulanarak n-bütanol maddesine olan direnç arttırılmaya çalışılmıştır (54). Nitekim 200 nesil sonunda popülasyonda birçok faydalı mutasyonun biriktiği ve bu mutasyonlar sayesinde hücrelerin n-bütanole karşı daha dayanıklı hale geldikleri tespit edilmiştir (54). *S. cerevisiae*'ler üzerinde de benzer çalışmalar yapılmıştır. Bu deneylerde besin kısıtlaması yalnızca glikoz ile yapılmamış aynı zamanda ksiloz, sülfat ve arabinoz gibi karbon kaynakları da kullanılmıştır (53). Bu çalışmalar genel itibariyle birkaç hafta sürebildiği gibi aylarca da devam etmektedir. Dolayısıyla kemostat sistemlerinde evrimsel süreçlerin oldukça kısa zaman aralıklarında gerçekleşmesi söz konusudur.

Sonuç olarak kemostat modeli canlıların evrimsel süreçlerine dair kısa zamanda birçok bilgi vermektedir. Bu modelin -örneğin seri aktarım metoduna kıyasla- daha kullanışlı olmasının bir diğer nedeni *in silico* olarak denklemlerinden yararlanılabilmesidir (49). Tıpkı yukarıda gösterildiği gibi canlıların büyüme oranı ve besin miktarındaki değişimler denklemler sayesinde hesaplanabilmektedir. Ayrıca kemostat sisteminin *Saccharomyces* mayaları üzerinde çokça test edilmeleri, bu doğrultuda *Saccharomyces*-kemostat ilişkisine dair güvenilir bilgiler vermiştir. Bu nedenle kemostatın matematiksel yapısının *Saccharomyces*

mayalarında kullanılması *in silico* olarak onların verimliliğini etkileyen evrimsel süreçlerin aydınlatılmasını sağlamaktadır (53).

2.6. UYUM BAŞARISI VE ANALİZ YÖNTEMLERİ

Uyum başarısı (fitness) evrimsel biyolojide canlıların çevreye ne kadar uyum sağladığının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Oğul döl sayısı, büyüme oranı, vücut büyüklüğü vb. parametreler ölçülerek hedef canlının var olan koşula uyum derecesi ölçülmektedir (55). Örneğin popülasyondaki bir grup canlı diğer üyelere göre daha fazla yavru veriyorsa ya da daha fazla büyüme oranına sahipse bu durum onların uyum başarılarının daha yüksek olduğunu gösterir. Ayrıca ilerleyen nesillerde uyum başarısı yüksek olan bu genotiplerin frekansının artacağı varsayılır (55). Böylelikle popülasyon yapısı en uygun olan canlının genotipine göre şekillenecektir.

Biyoteknoloji alanındaki suş geliştirme çalışmaları da hedef organizmaların uyum başarısını yükseltmeye yönelik çalışmalardır (30,56). Önceki paragraflarda belirtildiği gibi ıslah araştırmalarında verimi düşük (ör; büyüme oranı düşük), endüstriyel öneme sahip mikroorganizmalar çeşitli soy hatlarıyla çaprazlanarak daha verimli hale getirilmiştir (2,19). Bu doğrultuda oğul nesil ve ebeveyn canlıların uyum başarılarını doğru bir şekilde kıyaslama adına farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir (56). Yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi uyum başarısı için bir vekil parametre belirlemektir (57). Örneğin nesil verme süresi uzun olan canlılarda vücut büyüklüğü, kas oranı gibi fizyolojik girdiler uyum başarısı için bir gösterge olabilmektedir. Vücudu büyük ve kaslı olan canlı muhtemelen eş bulmada daha şanslı olacaktır. Bu doğrultuda daha fazla yavru oluşturacaktır. Fakat gösterge olarak kabul edilen fizyolojik etmenler uyum başarısını birebir, tam olarak ölçmemektedir (58). Sonuçta cinsel seçilim, genetik sürüklenme vb. gibi diğer evrimsel süreçler de uyum başarısında önemli roller oynamaktadır (55,56). Nesil verme süresi daha kısa olan canlılar hedef alındığında (ör; mikroorganizmalar) ise vekil parametre belirlenebileceği gibi farklı yaklaşımlar da kullanılabilir. Örneğin büyüme oranı vekil olarak kullanıldığında yarış halinde olan canlıların bir zaman aralığında ne kadar birey oluşturdukları hesaplanır (59). Daha sonra hangi canlı daha çok üremiş ise ya da hangi canlının büyüme oranı daha fazla ise o canlının uyum başarısı daha yüksek olarak kabul edilmektedir. Bu durumda büyüme oranları uyum başarısının bir göstergesi, bir vekili olarak kullanılmıştır (58). Diğer bir yöntemde ise yarış halinde olan iki canlının birbirlerine göre göreceli uyum başarıları

hesaplanmaktadır (55). Bu yöntemde uyum başarısı yarış halinde olan iki canlının gen frekansının birbirlerine oranlanmasıyla bulunur. Yani eğer bir grubun gen frekansı oransal olarak diğerinden fazlaysa o grubun uyum başarısının daha yüksek olduğu anlamına gelir (58).

Günümüze kadar birçok bilim insanı canlıların uyum başarılarını ölçmek adına çeşitli deney tasarımları geliştirmiştir (58). Örneğin, evrimsel biyoloji alanında önemli çalışmalar yapmış olan Richard Lenski deneylerinde kullandığı *E. coli* bakterilerinin uyum başarılarını karşılaştırmak için mutasyona uğramış bakteri kültürü kullanmıştır. *E. coli* bakterisinde bulunan arabinoz (Ara) operonundaki mutasyona göre atasal ve evrimleşen bakterileri birbirinden ayırt etmiştir (60–62). Çünkü Ara operonu mutasyona uğramış koloniler seçici medya üzerinde beyaz renkte olmaktadır, mutasyona uğramamış koloniler kırmızı renk almaktadırlar. Böylelikle renk farkından yararlanılarak hangi soy hattının (atasal veya adapte olan hatlar) daha fazla büyüdüğünü hesaplamıştır (61). Böylelikle yarış halinde olan iki türün hangisinin daha fazla ürediği ve dolayısıyla uyum başarısının yüksek olduğu farklı renklerdeki kolonileri sayarak basit bir yöntemle ortaya konmuştur.

Doğa temelli deneylerde çevre, kontrollü ve steril olmadığı için *Lenski ve ark.'nın* geliştirdiği düzenek verimli olmamaktadır. Bunun yanı sıra genetiği değiştirilmiş canlıların doğa koşullarında kullanılması hem yasal hem de etik olarak uygun görülmemektedir (44). Sonuç olarak polimorfik gen bölgelerinin kullanımı doğa temelli deneylerde uyum başarısını hesaplamak için tercih edilmektedir (58).

Canlı türleri birçok popülasyondan oluşmaktadır ve her popülasyonda genetik olarak farklılığa sahip bireyler bulunmaktadır. Bu nedenle popülasyonda farklılığa sahip olan, nötral gen bölgeleri hedeflenerek yarış halinde olan mikroorganizmaların görece uyum başarıları hesaplanmaktadır (58). Örneğin bir gen bölgesi için iki farklı allel mevcut ise karşılaştırılacak olan mikroorganizmalar farklı allellerde seçilerek gen bölgelerinin frekansı uyum başarısını hesaplamak için hedef alınır (58). Böylelikle uyum başarıları hedef gen bölgelerinin kopya sayısının oranına bakılarak hesaplanır. Özellikle uyum başarısının kesin olarak hesaplanamayacağı durumlarda görece başarı ölçümüyle hangi canlının çevreye daha uygun olduğu genel hatlarıyla belirlenir.

Gen bölgelerinin kopya sayısının gerçeğe en yakın olarak tespit edilmesi için Q-PZR'den yararlanılmıştır (63). Q-PZR'de hedef gen bölgeleri farklı floresan boyalarla işaretlenerek ışımaya miktarlarına bakılır. Hangi gen bölgesi daha fazla ışımaya yapıyorsa o bölge daha çok sentezlenmiştir. Bu yöntemin en temel zorluklarından birisi gen bölgesinin sentez miktarının belli bir eşik değeri geçmesinden sonra hesaplanabiliyor olmasıdır. Bir başka deyişle düşük miktardaki gen sentezi tespit edilememektedir. Bu da Q-PZR yönteminin hassasiyetini azaltmaktadır. Fakat teknolojinin gelişmesiyle birlikte daha doğru ve kesin sonuçlar veren araçlar geliştirilmiştir. Dijital damlacık PZR (ddPZR) bunlardan birisidir (63). Normal PZR'den farklı olarak ddPZR'sinde DNA molekülleri (100-150 baz uzunluğundaki) damlacıkların içine hapsedilerek çoğaltılırlar (64). Tıpkı Q-PZR'deki gibi gen parçaları farklı boyalarla işaretlenirler ve her damlacıkta meydana gelen PZR sırasında meydana gelen ışımaya ölçülerek hedeflenen bölgenin kaç kopya olduğu gerçeğe çok yakın bir şekilde bulunmaktadır (63,65).

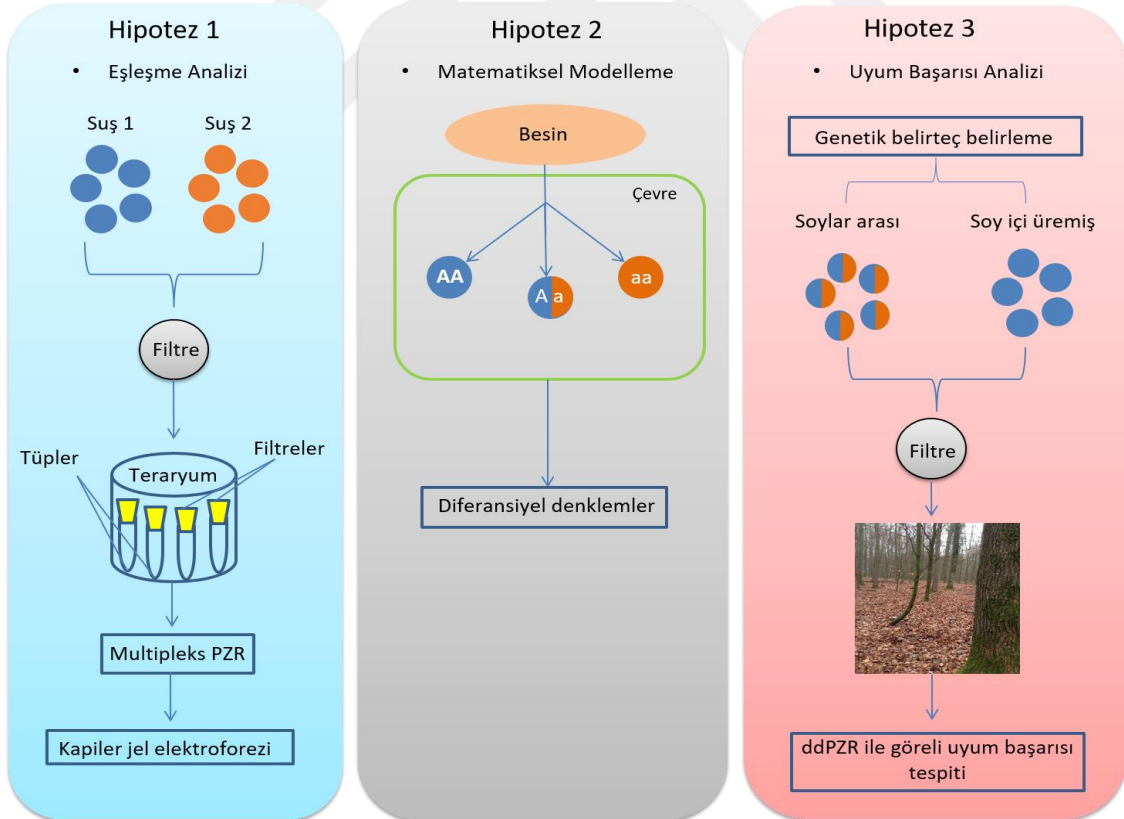
Kısaca, ıslah çalışmalarında yapılan çaprazlanmaların sonucu uyum başarı analizi yöntemiyle hesaplanmaktadır. Mikroorganizmalar gibi hızlı bölünen canlılarda gen frekansları hedef alınarak görelî uyum başarıları ölçülmektedir. Dijital PZR gibi umut vadeden teknolojilerin geliştirilmesiyle birlikte doğadaki canlıların uyum başarılarının hesaplanması kolaylaşmıştır.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasında biyoteknolojik ıslah çalışmalarında öneme sahip soy içi ve soylar arası üremenin yapısı ve *S. paradoxus* mayaları üzerindeki etkisi incelenecektir. Öncelikli olarak soy içi üremenin doğada neden yüksek oranda tercih edildiği üzerinde durulacaktır. İlk olarak hücrelerin kendi akrabaları tarafından çevrili oldukları için soy içi üreme yapmak zorunda kaldıkları düşünülmektedir. Bu doğrultuda soylar arası üreme analizi yapılarak genetik farklılığa sahip iki *S. paradoxus* suşu bir araya getirilmiş ve doğal koşullara benzer bir ortamda (teraryum) inkübe edilmiştir. Deneyin sonunda mikrosatellit bölgeleri hedef alınarak suşların soylar arası üreme yapıp yapmadığı belirlenmiştir. İkinci hipotezde çevresel dalgalanmaların soy içi ve soylar arası üremiş canlıların uyum başarılarını değiştirdiği varsayılmıştır. Özellikle soy içi üremiş canlılar hâlihazırda var olan durağan koşullara uyarlandıysa durağan koşulların, soy içi üremenin yararına olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için kemostat sisteminden denklemler kullanılarak matematiksel modelleme yapılmıştır. Maya popülasyonunun toplamda 3 genotipten var olduğu (homozigot çekinik ve homozigot baskın ebeveynler, heterozigot oğul döller) sayılmış ve genotiplerden heterozigot olanın soylar arası üreme sonucu oluştuğu kabul edilmiştir. Son olarak soy içi ve soylar arası üreme sonucu meydana gelen hücrelerin uyum başarılarının incelenmesi için yeni yöntemler geliştirilebileceği öngörülmüştür. Bu kısımda soy içi ve soylar arası üreme sonucu oluşan hücrelerin uyum başarılarını tespit etmek ve birbirleriyle karşılaştırmak için *S. paradoxus* popülasyonunda 16. kromozomunda bulunan sekiz gen bölgesi araştırılmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Soylar arası üremeyi tespit etmek amacıyla eşleşme analizi gerçekleştirildi. Bu adımda genetik olarak farklı yabancı maya suşları teraryumda inkübe edildi. Soylar arası üreme suşların mikrosatellit uzunluklarına bakılarak incelendi. Bunun için ebeveyn suşlar mikrosatellit uzunlukları bakımından homozigot olacak şekilde seçildi (bir suş çifti hariç). Fakat ebeveyn suşlar homozigot olmalarına rağmen- farklı uzunlukta mikrosatellitlere sahipti. Bu sayede soylar arası üreme olması durumunda heterozigot yapıda genotiplerin meydana gelmesi tasarlanmış oldu. Diğer hipotezde çevresel dalgalanmaların popülasyon yapısını nasıl etkilediğini incelemek için basit diferansiyel denklemlerden oluşan kemostat modeli geliştirildi. Modelde düşük ve yüksek çevresel dalgalanmaların genotip frekanslarını nasıl etkilediği simüle edildi. Son hipotezde, uyum başarı analizi için bazı ön çalışmalar yapıldı. Doğada yapılan deneylerde soylar arası üreme ve soy içi üreme yapmış canlıları ayırt etmek zor olmaktadır. Fakat popülasyonda farklılığa sahip olan gen bölgeleri bu ayırma işlemi için belirteç olarak kullanılabilir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Test edilecek hipotezlerin akış diyagramı.

4.1. MİKROORGANİZMA

Bu çalışmada kullanılan tüm *S. paradoxus* suşları Kuzey Almanya'nın Scheleswig-Holstein bölgesinde bulunan Nehnten Ormanı'ndan elde edilmiştir. İzolasyon işlemi *S.paradoxus* mayalarının doğal habitatı olan meşe ağaçlarından örnekleme yapılarak tamamlanmıştır. Bu amaçla yapılan işlemler şu şekildedir:

- Öncelikle meşe ağaçlarının 1m çapındaki çevresinden meşe yaprakları toplandı.
- Bu örnekler 50 ml'lik tüplere aktarıldı. Kurumuş yapraklar tüpün 5 ml seviyesine kadar sıkıştırıldı.
- Laboratuvarda her tüp yaklaşık 20 ml steril su ile dolduruldu. 10 saniye şiddetli bir şekilde çalkalandı.
- Daha sonra tüplerden 200 µl örnek alınarak PIM1 agar yüzeyine yayıldı (Çizelge 4.1.).
- Agar yüzeyler kuruduktan sonra cam boncuklar çıkartıldı ve petriyer 30 °C de inkübe edildi.
- Koloniler görünür hale geldiğinde 12 adet maya benzeri koloni YEPA agara aktarıldı (Çizelge 4.1.).
- Bir günlük inkübasyondan sonra oluşan koloniler %20'lik gliserol çözeltisine konularak -80 °C saklandı.
- Kolonilerin gerçekten maya olup olmadığını anlamak için KAc agar (potasyum asetat agar) kullanıldı (Çizelge 4.1.). Bu agar mayalarda spor oluşumuna neden olmaktadır.
- Elde edilen maya kolonilerinin hangisinin *S. paradoxus* türüne ait olduğunu belirlemek içinse gen dizileme tekniği kullanıldı (66).

Çizelge 4.1. Çalışma sırasında kullanılan tüm besi yerlerinin kimyasal içerikleri.

PIM1 Besi Yeri İçeriği	YEPD Besi Yeri İçeriği	KAc Besi Yeri İçeriği
3 g/l Maya ekstraktı	10 g/l Maya ekstraktı	2.2 g/l Maya ekstraktı
5 g/l Pepton	20 g/l Pepton	0.5 g/l dekstroz
10 g/l Sükroz	20 g/l Dekstroz	20 g/l potasyum asetat
3 g/l Malt ekstraktı	3 g/l Malt ekstraktı	870 mg/l temel aminoasitler (COM)
25 g/l Agar	25 g/l Agar	25 g/l agar
54 µl/l Kloramfenikol		
80ml/l Ethanol		
2 M 2.6 ml/l HCl		

4.2. EŞLEŞME ANALİZİ

Denemelerin bu aşamasında, soylar arası üremenin önündeki engelleri kaldırmak için genetik olarak farklılığa sahip olan *S. paradoxus* suşları bir araya getirildi.

- Bu nedenle öncelikle doğal koşulları taklit etmeyi sağlayan teraryum oluşturuldu.
- Suşların üzerinde yaşayacağı tüp ve filtreden oluşan yapılar tasarlandı.
- Genetik olarak farklı 4 *S. paradoxus* suşu teraryumda inkübe edilmek için kullanıldı.
- 4 suş ikili grup haline getirildi. Böylelikle toplamda incelenecek iki suş çifti oluşturuldu (Çizelge 4.2.).
- Hücreleri aktif hale getirmek için 4 suş YEPD agarın üzerine yayıldı.
- Hücreler büyüdüktan sonra 5 ml'lik YEPD sıvı besi yerine alındı ve burada hücrelerin gerekli oksijeni alabilmesi için çalkalamalı inkübatörde 30 °C, 200 rpm'de bir gün boyunca inkübe edildi.
- Genetik olarak farklı olan 2 suş eşit hacimlerde karıştırılarak suş çiftleri oluşturuldu.

Çizelge 4.2. Deneyde kullanılan *S. paradoxus* suşlarının genel özellikleri.

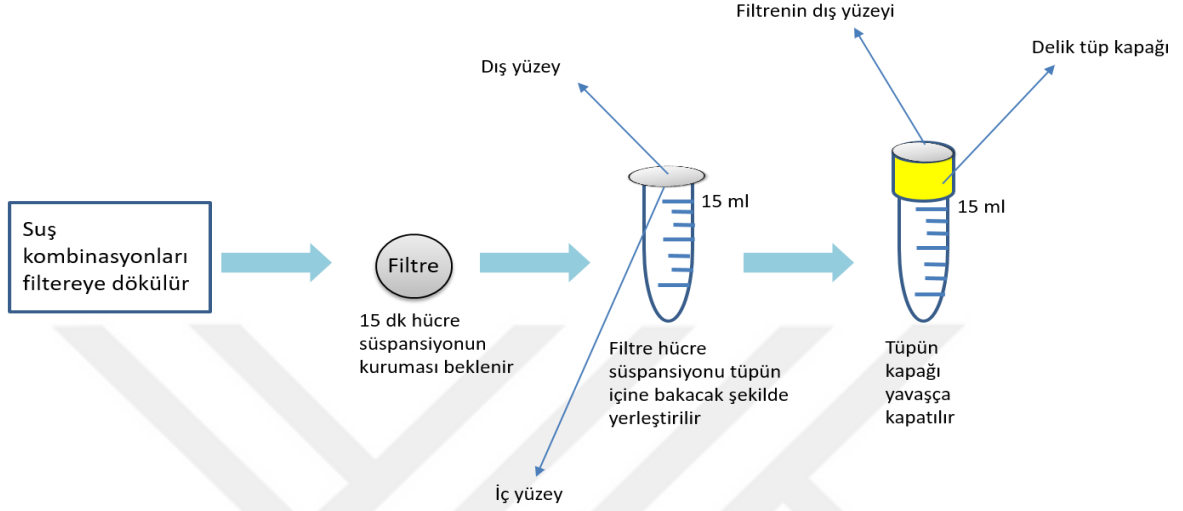
Suş numarası	Organizma	Bölge	Örnekleme zamanı	Suş çifti
5203	<i>S. paradoxus</i>	Nehmten, Almanya	Mart	1
5213	<i>S. paradoxus</i>	Nehmten, Almanya	Mart	1
5238	<i>S. paradoxus</i>	Nehmten, Almanya	Mart	2
5212	<i>S. paradoxus</i>	Nehmten, Almanya	Mart	2

4.2.1. SUŞLARIN TERARYUMDA İNKÜBASYONU

Soylar arası üremenin doğal koşullara yakın bir ortamda gözlenmesi için teraryum sistemi kuruldu.

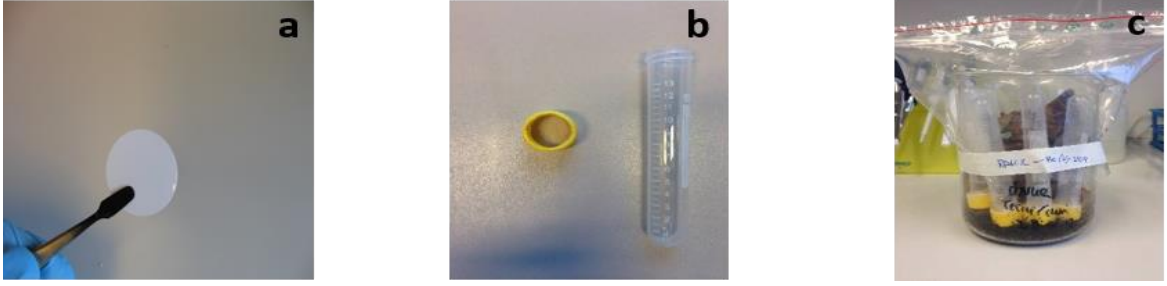
- Bu adımda suş birleşimleri pipet yardımıyla filtrelerin üzerine döküldü.
- Filtreye koyulacak olan *S. paradoxus* sayısı dikkat edilmesi gereken bir noktayı çünkü doğa koşulları belirli bir sayıdaki hücreyi desteklemektedir. Yapılan araştırmalara göre bu sayının 100 ile 1000 hücre arasında olduğu bulunmuştur (58). Bu nedenle ~660 hücre filtrelerin üzerine aktarıldı.
- Hücre sayısını uygun miktara getirmek için (~660 hücre inkübe etmek için) hücre örnekleri YEPD sıvı kültüründen alındı.
- 12000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Supernatant kısım atıldı ve pelletin üzerine %0,9 NaCl çözeltisi eklendi. Böylelikle hücreler YEPD kalıntılarından temizlendi.
- Daha sonra tüpün içine konulan tuz çözeltisi pellet ile karıştırıldı. Alınan 100 µl hücre solüsyonu seri seyreltme yoluyla 10^{-1} 'den 10^{-5} 'e kadar seyreltildi.
- Bu doğrultuda uygun seyreltme oranından (10^{-3}) uygun hacimde (10 µl) örnek olarak hücre sayısı ~660'a ayarlandı.
- Ayrıca hücre sayısını kontrol etmek için pozitif kontrol de yapıldı. Bu aşamada aynı derişimde hücre alınarak YEPD agara yayıldı. Böylelikle filtredeki yaklaşık hücre sayısı bu şekilde tahmin edildi.

- Hücre inkübasyonu sırasında öncelikle filtreler steril bir kaba yerleştirildi. Filtreler hücrelerin dışarı kaçmasını engellerken kimyasal ve besin maddelerinin geçişine izin verecek boyutta porlara sahipti. 10 µl hücre çözeltisi (~660 hücre) pipet yardımıyla filtrelerin üzerine döküldü. Negatif kontrol için aynı hacimde steril su konuldu. 15 dakika filtrelerin kuruması için oda sıcaklığında beklenildi.



Şekil 4.2. Filtrenin hücre süspansiyonu ile inkübasyonu ve tüpe yerleştirilmesi

- Filtreler kuruduktan sonra plastik tüpün üst tarafına yerleştirildi. Fakat hücrelerin güvende kalması için hücre içeren filtre yüzeyi tüpün içine bakacak şekilde çevrilerek konuldu (Şekil 4.2.).
- Plastik tüpün kapakları neşter yardımıyla kesildi. Böylelikle kapakların üzerinde filtrelerin çevreyle temas edebileceği bir alan açıldı
- Tüpün kesik kapağı yavaşça kapatılarak filtre tüpe sabitlendi.
- Daha sonra parafilm yardımıyla tüpün kapağı iyice tüpe sabitlendi ve tüpün sızdırmazlığı artırıldı.
- Teraryumu oluşturmak için *S. paradoxus* mayalarının doğal habitatu olan ormandan toprak örneği ve yaprak kuruntuları kullanıldı. Toprak ve yapraklar behere yerleştirildi ve plastik tüpler filtrenin toprak ile temas etmesi için ters çevrilerek teraryumun içine konuldu.



Şekil 4.3. Deneyde kullanılan filtre, tüp tasarımı ve teraryumun gerçek görüntüleri. (A) 0,2 µm por çapına sahip polikarbon filtreler. (B) Neşter ile ortasında delik açılmış kapak ve 15 ml'lik plastik tüp. (C) Toprak ve yaprak kuruntularıyla oluşturulmuş teraryum sistemi.

- Teraryum plastik bir poşetle kapatıldı (Şekil 4.3.). İki gün aralıklarla fısfs yardımıyla su püskürtülerek teraryum nemlendirildi. Böylelikle, ormandaki nemli hava koşulu oluşturuldu.
- Deney sırasında suş çiftleri ve negatif kontrol için toplamda 16 adet tüp kullanıldı.
- Her bir suş çifti için hem deneyin başında hem de deneyin sonunda örnek alınmasını sağlayacak şekilde 6'şar tüp (üçü başlangıçta, üçü deney sonunda), negatif kontrol için 4 (ikisi başlangıçta, ikisi deney sonunda) adet -hücre içermeyen filtreye sahip- tüp kullanıldı (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Deney süresince kullanılan örnekler ve sayıları.

Örnek	Toplamda kullanılan tüp sayısı
Suş çifti 1	6
Suş çifti 2	6
Negatif kontrol	4

4.2.2. MİKROSATELLİT BİLGİSİYLE SOYLAR ARASI ÜREME TESPİTİ

Suşların soylar arası üreme yapıp yapmadıklarını tespit etmek için 5 lokusa ait mikrosatellit bilgilerinden yararlanıldı. Her bir suş hedeflenen 5 lokus için tamamıyla homozigot özellik göstermektedir fakat mikrosatellit uzunlukları birbirlerinden farklı olarak ayarlanmıştır. Diğer bir deyişle farklı genotiptedirler. Örneğin suşlardan birinin bir lokustaki tekrar sayısının 200 bp uzunluğa sahip olduğu düşünülürse eşlenik suş aynı lokus için farklı uzunluğa sahip olacaktır (örneğin 232 bp). Bu tasarım sayesinde eğer soylar arası üreme

gerçekleşirse heterozigot bireyler (200/232 uzunluğunda mikrosatellitler) oluşacaktır (bakınız Bölüm 2.3, Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Deney sırasında kullanılan suşların mikrosatellit bilgileri ve F1 nesli için bazı olası senaryolar. Suş çifti 1’de suşların mikrosatellit uzunlukları yalnızca iki lokus için farklıyken suş çifti 2 için 5 lokus farklıdır. Lokusların mikrosatellit bilgileri sırasıyla kromozom 16’ da ‘CTT’, kromozom 11’de ‘TTG’, kromozom 4’te ‘TAA’ ve kromozom 15’de ‘CAA’ dizi tekrarından oluşmaktadır.

Suş numarası	Krom 16_CTT	Krom11_TTG	Krom4_TAA	Krom4_CAA	Krom15_CAA
5203	220/220	274/274	212/212	255/255	301/301
5213	223/223	274/274	212/212	261/261	301/301
5203-5213 (soylar arası,F1)	220/223	274/274	212/212	255/261	301/301
5203-5213 (soy içi,F1)		5203 veya 5213 no’lu suş genotipi			
5203-5213 (mitoz)		5203 veya 5213 no’lu suş genotipi			
5212	223/223	274/274	212/212	261/261	301/301
5238	220/220	280/280	208/208	255/255	292/292
5212-5238 (soylar arası,F1)	220/223	274/280	208/212	255/261	292/301
5212-5238 (soy içi,F1)		5212 veya 5238 no’lu suş genotipi			
5212-5238 (mitoz)		5212 veya 5238 no’lu suş genotipi			

4.2.3. SUŞLARIN FİLTREDEN İZOLASYONU

Suş çiftlerinin filtre üzerinde yaşayabilmesi bu çalışmada önemli bir noktaydı. Bu yüzden ilk adım olarak hücreler filtre inkubasyonu için hazır hale getirildi. Daha sonra suş çiftleri filtrelerin üzerine aktarıldı ve deney sonunda bu filtrelerden hücreler izole edilmeye çalışıldı.

Teraryum deneyinin sonunda soylar arası üreme olup olmadığını görmek için tüpler dışarı çıkarılarak filtreler alındı. Filtrelerdeki hücreleri elde etmek için filtreler deterjan çözeltisi olan %0,05’lik 1 ml Tween 20 çözeltisiyle muamele edildi. Yaklaşık 2 dakika boyunca kuvvetli çalkalama işlemi uygulandı. Tüplerden 100 µl örnek alınarak PIM1 besiyeri üzerine aktarıldı. Kolonilerin görünür hale gelmesi için petriyer 3 gün boyunca 30 °C’de inkübe edildi. Görünür hale gelen kolonilerden 6 adet seçilerek soylar arası üreme tespiti

yapılmıştır. İncelenen kolonilerin mikrosatellit bilgilerini elde etmek için öncelikle multipleks PZR daha sonra ise kılcal jel elektroforezi işlemi uygulandı.

- Multipleks PZR için 270 µl multipleks karışımı, 32,4 µl primer karışımı ve 237.6 µl PZR suyu koyu bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
- Oluşturulan bu karışım 5µl'lik kısımlar halinde 96 kuyulu well-plate'e aktarıldı.
- Elde edilen koloniler pipet yardımıyla solüsyonların içerisine konuldu. Pipetaj yöntemiyle iyice karıştırıldı.
- Her kuyuya 100µl'lik PZR-grade konularak 30 dakikalık inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Denaturasyon adımı için yeni bir 96'lık well-plate alınarak 10 µl ROX/formamit solüsyonu aktarıldı.
- ROX/formamit karışımın hazırlanmasında 1000 µl HiDi formamit ve 10 µl ROX-500 kimyasalları karıştırıldı ve 10 µl olacak şekilde kuyulara aktarıldı.
- Kolonilerin bulunduğu solüsyondan 1 µl'lik örnekler alınarak ROX/formamit solüsyonu içeren kuyulara aktarıldı.
- Well-plate plastik bir parçayla kapatılarak 30 saniye, 2000 rpm'de santrifüj edildi.
- Denaturasyon adımını bitirmek için, plate 90 °C'de 2 dak ve 20 °C'de 5 dak inkübe edildi.
- Bu adım tamamlanır tamamlanmaz plate buzun üzerine yerleştirildi. Daha sonra 4 °C'de saklandı.
- PZR adımı bittikten sonra solüsyonlar kılcal jel elektroforezi aletine yüklenerek beş lokustaki mikrosatellit bilgileri elde edildi (66).

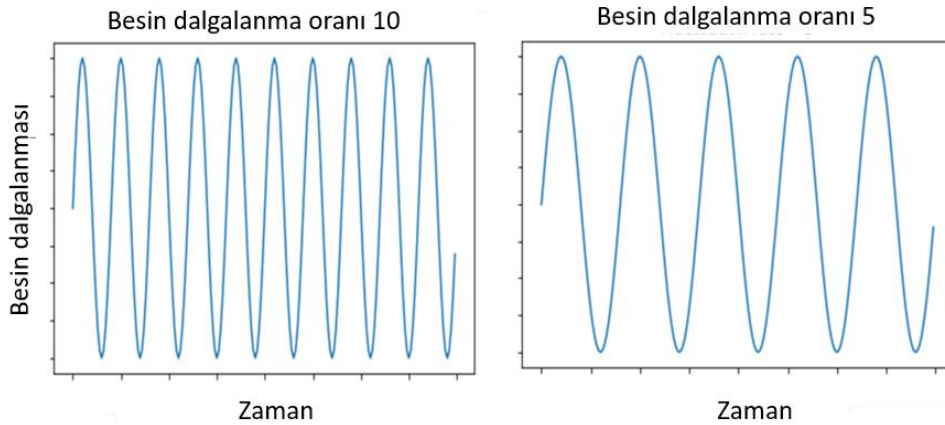
4.3. MATEMATİKSEL MODELLEME

Bu bölümde çevresel dalgalanmaların soy içi ve soylar arası üremiş bireyleri nasıl etkilediği matematiksel modelleme ile belirlenmeye çalışıldı. Modelleme yapılırken üç temel ilke göz önünde bulunduruldu. İlk olarak sistemi etkileyebilecek çevresel parametreler tek bir parametreye indirgenerek besin miktarı çevresel dalgalanmanın temel göstergesi olarak seçildi. Çünkü besin miktarı hem mikro habitat da gerekli dalgalanmayı sağlayacak bir parametre hem de canlıların büyüme oranını doğrudan etkileyebilecek bir değişkendi (67). Diğer bir nedense karmaşık yapıdaki abiyotik (sıcaklık, nem, pH vb.) ve biyotik (diğer

mikroorganizmalar) etmenlerin hepsinin modele dâhil edilmesinin çok karmaşık, anlaşılması zor bir yapıya neden olmasıdır (68). Besin miktarındaki dalgalanma sinüs fonksiyonuna eklendi. Böylelikle besin miktarındaki dalgalanmalar canlandırıldı. Besin dalgalanmasının frekansı artırılıp azaltılarak besin stresi uygulandı. İkinci olarak mayaların uyum başarılarının monogenik olarak aktarıldığı varsayıldı. Başka bir deyişle popülasyonda yalnızca bir dominant (örneğin 'A') ve bir resesif allel (örneğin 'a') olduğu kabul edildi. Modeli oluşturmak için kemostat tekniğinden yararlanıldı. Daha sonra her bir genotipin büyüme karakteristiği *Monod* denklemine göre oluşturuldu. Bu noktada soylar arası üreme sonucu oluşmuş olan heterozigot bireyler homozigot genotiplerin ortalaması olarak kabul edildi (ör; büyüme oranı iki ebeveynin arasında yer aldı). Kullanılan parametreler oluşturulan senaryoya göre tercihen oluşturuldu.

4.3.1. ÇEVRESEL SENARYOLAR

Doğada çevresel koşullar hızla değişim gösterebilmektedir. Özellikle çevrede bulunan besin miktarı gün içerisinde dalgalanabilmektedir. Bu nedenle besin miktarındaki dalgalanma çevresel dalgalanmaların göstergesi olarak kabul edildi. Çevredeki dalgalanma sinüs fonksiyonu kullanılarak gösterildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Çevresel dalgalanmaları gösteren sinüs grafikleri. (A) yüksek çevresel dalgalanmayı gösterirken (B) daha düşük dalgalanmayı göstermektedir. Bir başka deyişle grafik (A)'da birim zamanda daha sık değişim olurken grafik (B)'de daha seyrek değişim gerçekleşmektedir.

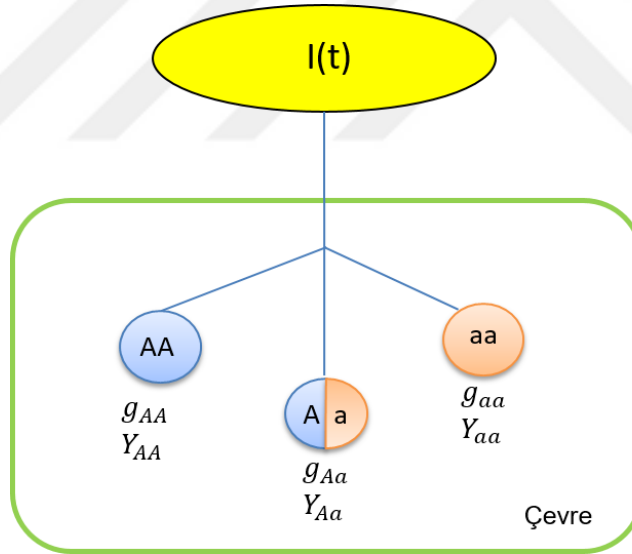
Daha sonra yukardaki gibi çevresel dalgalanmaları yansıtabilecek şekilde besin miktarındaki dalgalanmayı gösterecek bir eşitlik oluşturuldu.

$$I(t) = E_{min} + 0.5*(1 + \sin(w*t))*(E_{max} - E_{min}) \dots \dots \dots I$$

Denklem 1’de I(t) zamana bağılı besin miktarını yansıtırken, E_min çevrede bulunan en düşük besin miktarını, E_max ise en yüksek besin miktarını göstermektedir. ‘w’ terimi ise çevresel dalgalanma frekansını belirtmektedir. Denklem yukarıdaki şekilde kurulmasının temel nedeni normal sinüs fonksiyonunun model için uygun hale getirilmek istenmesidir. Örneğin, bu denklemde sinüs fonksiyonun bir eklendikten sonra 0,5 ile çarpılması, sinüs fonksiyonunun 0 ve 1 arasında pozitif değerlerde salınım yapmasını sağlamıştır. E_min ve E_max değerlerinin de eklenmesiyle sinüs fonksiyonunun minimum ve maksimum değerler arasında dalgalanması sağlandı.

4.3.2. GENOTİPLERİN ÇEVREYLE ETKİLEŞİMLERİ

Popülasyonu oluşturan genotiplerin çevresel dalgalanmalardan nasıl etkilendiği tespit etmek için kemostat modeli kullanıldı. Bu doğrultuda genotiplerin çevredeki besinleri kendi büyüme özelliklerine göre tükettiği varsayıldı (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Genotiplerin çevreye gelen besinin kendi büyüme oranlarına (g) ve popülasyon yoğunluklarına (Y) göre tüketimini gösteren şema. Besin akışı başladığında her genotip kendi büyüme özelliğine göre besinden yararlanır ve soyunu devam ettirmeye çalışır. Fakat bu modelde heterozigot (‘Aa’) olan genotipler iki homozigot bireyin ortalamasıdır.

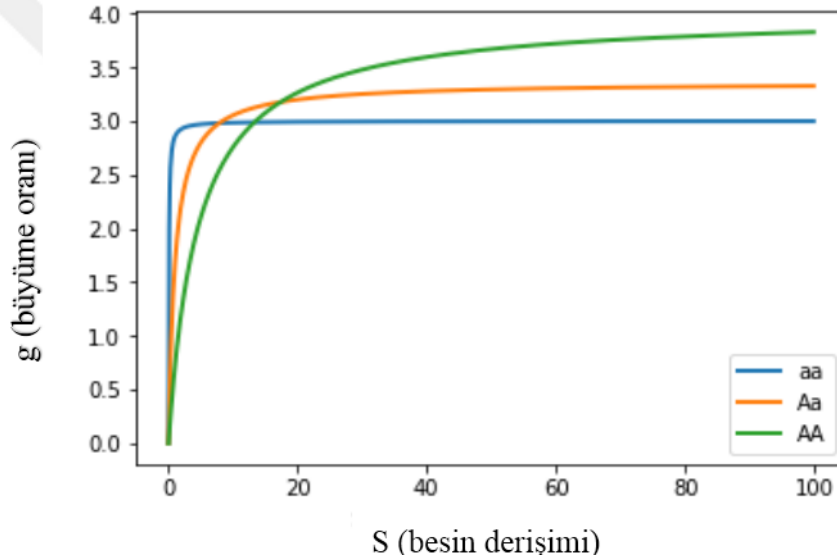
$$\dot{E} = I(t) - g_{AA}(E) * Y_{AA} - g_{Aa}(E) * Y_{Aa} - g_{aa}(E) * Y_{aa} \dots \dots \dots 2$$

Bu denklem (denklem 2) I(t) çevreye gelen besin miktarını gösterirken maksimum büyüme oranı (g(E)) ve popülasyon yoğunluğu (Y) çarpımı tüketilen besin miktarını ifade

etmektedir. \dot{E} simgesi ise çevredeki besin miktarı değişimini göstermektedir. Buna göre çevreye olan besin girişi ($I(t)$) besin miktarının artmasında pozitif etkiye sahip olduğu için '+', besin azalmasına neden olan genotiplerin işaretleri '-' olarak ifade edilerek çevredeki besin miktarı değişimi gösterilmiştir.

4.3.3. GENOTİPLERİN BÜYÜME ÖZELLİKLERİ

Genotiplerin büyüme özellikleri *Monod* denklemi kullanılarak oluşturuldu. *Monod* denklemi popülasyonların büyüme eğrilerini çıkartmak için sıklıkla kullanılan bir denklemdir. Bu denkleme göre çevredeki besin miktarı sonsuz derecede arttırılsa bile canlıların maksimum büyüme oranı bir noktadan sonra sabitlenmektedir. Büyüme oranları her bir genotipe özgü olduğu için kimi genotipler düşük besin seviyesinde daha çok büyüebilirken kimisi de yüksek orandaki besin derişimine uyum sağlamışlardır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Üç farklı genotipin büyüme özelliğine göre çizilmiş büyüme oranı ve besin derişimi grafiği. Besin miktarının fazla olduğu yerlerde (örneğin 60 birim/hacim) her genotip maksimum büyüme oranı ile büyüme göstermektedir. Fakat ortamdaki besin miktarı azaldıkça büyüme oranları değişmektedir. Bu noktada besine karşı reaksiyonu en hızlı olan (en düşük K_s) daha avantajlı duruma geçmektedir ('aa' genotipinin büyümesi düşük besin derişiminde örneğin 10 birim/hacim de en yüksektir). Bu doğrultuda genotipler büyüme oranı ve substrat spesifik sabiti arasındaki ilişkiye göre popülasyonda var olma savaşı vermektedir.

Monod denklemi aşağıda gösterilmektedir:

$$g = g_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

'g' spesifik büyüme oranı, 'g_{max}' maksimum büyüme oranı ve 'S' (bu çalışmada E olarak gösterilmiştir) ise maksimum büyüme oranının yarısının olduğu besin derişim noktasını göstermektedir. *Monod* denklemi her bir genotipin büyüme oranını hesaplamak için kullanılmıştır.

Aşağıdaki denklemlerde (denklem 3,4 ve 5) eşitliğin sol tarafındaki değer her bir genotipin frekansının büyüme oranı (g), ölüm oranı (d) ve popülasyon yoğunluğuna (Y) göre zaman içindeki değişimini vermektedir.

$$\dot{Y}_{AA} = g_{AA}(E) * Y_{AA} - d * Y_{AA} \dots\dots\dots 3$$

$$\dot{Y}_{Aa} = g_{Aa}(E) * Y_{Aa} - d * Y_{Aa} \dots\dots\dots 4$$

$$\dot{Y}_{aa} = g_{aa}(E) * Y_{aa} - d * Y_{aa} \dots\dots\dots 5$$

Çizelge 4.5. Matematiksel modeli kurmak için kullanılan parametre değerleri.

Genotip	Maksimum büyüme oranı (g _{max})	Substrat spesifik sabiti (Ks)	Ölüm oranı (d)	Başlangıç popülasyon yoğunlukları (Y)
AA (homozigot baskın)	0.100	0.01	0.075	0.1
Aa (heterozigot)	0.125	0.10	0.075	0.1
Aa (homozigot çekinik)	0.150	0.15	0.075	0.1

4.4. UYUM BAŞARISI ANALİZİ

Soylar arası ve soy içi üreme ile oluşmuş bireylerin görelî uyum başarılarını karşılaştırmak için uygun gen bölgeleri test edildi. Çünkü doğa temelli yürütülen deneylerde inkübe edilen mikroorganizmaların birbirinden ayırt edilebilmesi laboratuvar deneylerinden daha farklı olmaktadır (69). Bu nedenle çevreye zararı dokunmayacak şekilde deneylerin tasarlanması gerekmektedir. Dolayısıyla herhangi bir gen manipülasyonu yapmadan çeşitli gen bölgelerinin belirteç olarak kullanılması uyum başarı analizi için önem arz etmektedir (58).

Genetik belirteç bulmak için uygulanan bu yöntem iki parçada özetlenebilir:

- A) Hedef gen bölgelerinin *in silico* olarak yeterli çeşitliliğe (polimorfizme) sahip olup olmadığını incelemek,

B) Gen bölgelerini laboratuvarında bulunan *S. paradoxus* suşları üzerinde test etmek ve uygun suşları uyum başarı analizine dâhil etmektir.

Bu doğrultuda aşağıdaki yollar izlenmiştir.

- Öncelikle daha önceden NCBI veri tabanı kullanılarak *S. paradoxus* mayasında 16. kromozom üzerindeki 10 kb'lik parçalara bakılarak olası SNP (indel, nokta mutasyonu vb.) içeren bölgeler seçildi.
- Daha sonra hedeflenen bu bölgeler NCBI-blastx programı yardımıyla incelendi (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastx). Blastx programı sayesinde gen bölgelerinin herhangi bir protein kodlayıp kodlamadığı tespit edildi. İncelenen gen bölgesi önemli bir protein kodladığı takdirde elendi. Çünkü protein kodlayan bölgeler canlının uyum başarısını etkileyen bir özelliğe sahip olabilir.
- Daha sonra elemeyi geçen gen bölgeleri SGRP veri seti (http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/sgrp/blast_original/) kullanılarak *S. paradoxus* Avrupa popülasyonu ile karşılaştırıldı. *Litti ve ark.* Sağladığı bu veri seti *S. paradoxus*'ların Avrupa popülasyonunda var olan gen dizilimlerini göstermekteydi (70). Böylelikle gen bölgesinin Avrupa popülasyonunda yeteri kadar farklılığa (SNP, silinme, eklenme vb) sahip olup olmadığı *in silico* olarak tespit edildi. En az iki haplotip (polimorfizm) tespit edildiği takdirde gen bölgesi ileriki aşamaya alındı. Çünkü polimorfik bölgenin birisi homozigot ebeveynde diğeri ise heterozigot oğul dölde yer almalıydı. Böylelikle her iki hücre tipi birbirinden ayırt edilebilecekti.
- Gen bölgelerinin laboratuvardaki *S. paradoxus* suşlarında da polimorfizme sahip olup olmadığını bulmak için altı genetik olarak farklı *S. paradoxus* suşu (Nehmten, Almanya bölgesinden izole edilmiş) incelendi. Altı adet suşun incelenmesinin nedeni *S. paradoxus* popülasyonunun genetik çeşitliliğini ortaya koymaktı. Bu sayede polimorfik bölgeler popülasyon genelinde incelendi.
- Elemeyi geçen gen bölgeleri altı *S. paradoxus* suşunda primer tasarlanarak çoğaltıldı. Primer tasarımında Primer3 2.4.2 programı kullanıldı (71). Tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadığı jel elektroferizi ile kontrol edildi. Daha sonra altı farklı *S. paradoxus* suşundan elde edilen gen bölgeleri Sanger dizileme yöntemiyle karşılaştırıldı.

- Sanger dizileme metodunda 2,5 µl PZR ürünü 0,5 µl Shrimp Alkalın Fosfotaz ve 0,5 µl Ekzonüleaz I çözeltisiyle muamele edildi. Böylelikle PZR ürünü arta kalmış primer ve dNTP'lerden temizlendi.
- Daha sonra çözelti 37 °C 'de 5 dakika ve 80 °C'de 10 dakika boyunca bekletildi. İnkübasyon süreci bittiğinde sekans PZR'si yapmak üzere 1 µl örnek 6 µl su, 2 µl SB çözeltisi, 0,5 µl Big Dye ve 0,5 µl sekanslama primeriyle karıştırıldı.
- Sekans PZR'si işleminde ilk denatürasyon işlemi 96 °C'de 1 dk daha sonra 25 döngü içerisinde 95 °C'de 10 dk denatürasyon, 55 °C'de 15 dk bağlanma ve 60 °C'de 4 dk uzama işlemi uygulandı.
- Elde edilen PZR örnekleri dizilemeden önce saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Bunun için 10 µl'lik PZR ürününe karşılık 47 µl SAM ve 10 µl X Terminator çözeltisi eklendi.
- 96'lık well-plate kuyucuklarında bulunan örnekler üzerleri kapatılarak 30 dk 2000 rpm'de çalkalandılar ve son olarak 1200 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek dizileme için hazır hale getirildiler (66).
- Dizileme işleminden sonra gen bölgeleri Geneious 2019.0.4 programı kullanılarak görüntülendi. Böylelikle suşlarda hedeflenen gen bölgesinin yeteri kadar farklılığa sahip olup olmadığı belirlenmiş oldu.
- Bu adımdan sonra dijital damlacık PZR'si için gen bölgesinin uygunluğu BioRad™ firmasının kullanım kılavuzuna göre araştırıldı. Uygun prob tasarımı için ilgili gen bölgesinin GC içeriğinin %30-80 arasında olması, 30 nükleotidden kısa olması, 5' ucunda guanin bazının olmaması vb. gibi kurallar göz önüne alındı (72).

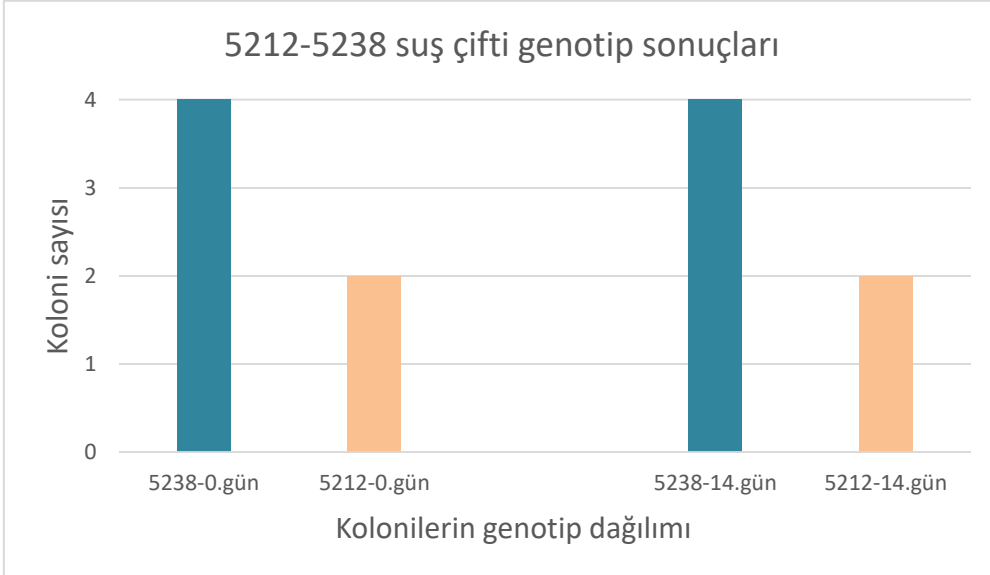
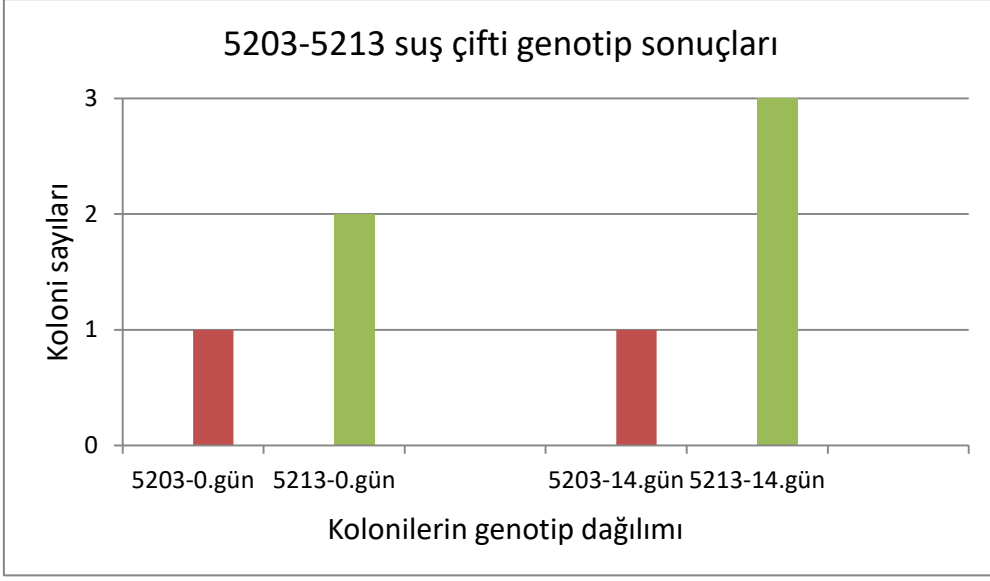
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Max Planck Enstitüsü Evrimsel Biyoloji Bölümünde yapılan bu çalışmada üç hipotez test edilerek soy içi üremeye olan eğilim araştırıldı.

- A) İlk olarak soylar arası üremenin suş çiftleri arasında gerçekleşip gerçekleşmediği test edildi. Bu bağlamda teraryum deneyi yürütüldü. Mikrosatellit bölgeleri incelenerek genetik olarak farklı olan suşların eşleşme analizi gerçekleştirildi.
- B) Matematiksel modellemede kemostat tekniğindeki denklemler kullanılarak çevresel dalgalanmaların popülasyonun yapısını nasıl etkilediği test edildi.
- C) Uyum başarı analizi için soylar arası ve soy içi üreme yapmış canlıların birbirlerinden ayırt edilmesini sağlayacak genetik belirteçler belirlenmeye çalışıldı.

5.1. EŞLEŞME ANALİZİ

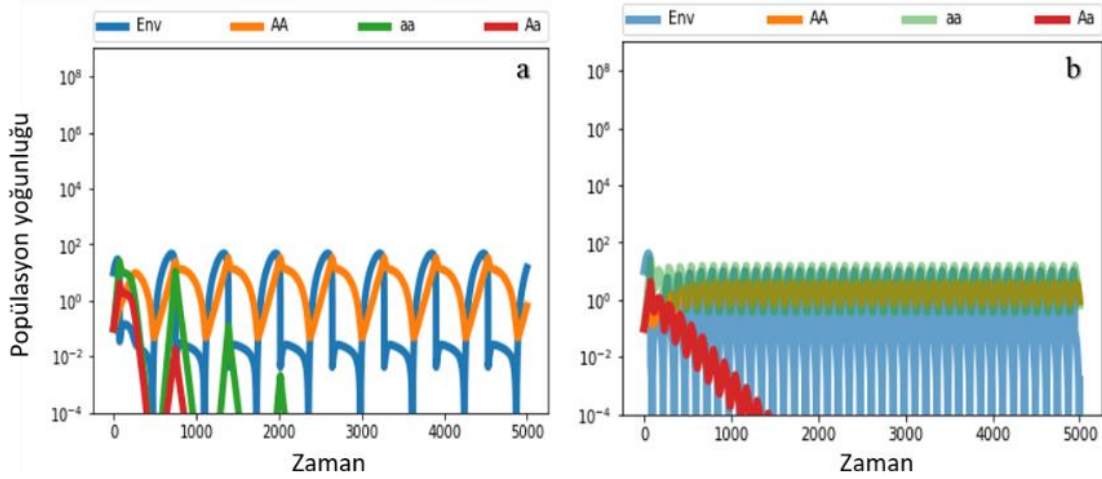
Soylar arası üremeyi gözlemlemek için bir araya getirilen suş çiftlerinin mikrosatellit bilgileri incelendi. Toplamda 5 lokusun mikrosatellit yapısı karşılaştırıldı (Çizelge 4.4.). Bu bilgilere göre her iki suş çiftinin oluşturduğu karışımda yalnızca homozigot genotipler (ebeveynlerin genotipleriyle aynı olan) gözlemlendi. 5203-5213 çiftinde deney başlangıcında 1 koloni 5203 nolu suşla aynı genotipi sergilerken 2 koloni ise 5213 nolu suş ile aynı yapıdaydı. Deneyin sonunda genotipler tekrar incelendiğinde 1 koloninin 5203, 3 koloninin ise 5213 nolu suşla aynı yapıda olduğu görüldü. Bunların haricinde herhangi bir farklı genotip gözlenmedi (Şekil 5.1.). İkinci suş çiftinde de benzer sonuçlar alındı. Deneyin başlangıcında 4 koloni 5238 suşuyla, 2 koloni ise 5212 suşuyla aynı genotipi gösterdi. Deneyin sonunda (iki hafta sonunda) da aynı dağılım gözlemlendi (Şekil 5.1.). Negatif kontrollerde beklendiği üzere deneyin sonunda ve başında herhangi bir koloni oluşumu gözlemlenmedi. Bu sonuçlar soylar arası üremenin gerçekleşmediğini gösterse de tartışılması gereken bazı noktalar vardır.



Şekil 5.1. Eşleşme analizi sonuçları. 'x' eksenini kolonilerin hangi suşla aynı genotipe sahip olduğunu gösterirken 'y' eksenini ise kaç tane koloninin hangi suşa ait olduğunu göstermektedir. Örneğin, deneyin 14. gününde 5212-5238 suş çiftinden alınan 6 koloni örneğinden 4'ü 5238 nolu suşla aynı genotipe sahipken 2'si 5212 nolu suşla aynı genotipe sahiptir. Sonuçlara genel olarak bakıldığında ise soylar arası üremeye işaret edebilecek yeni bir genotip yapısının ortaya çıkmadığını göstermektedir.

5.2. MATEMATİKSEL MODELLEME

Matematiksel modellemeyle çevresel dalgalanmaların soylar arası ve soy içi üremeye oluşmuş olan canlılar üzerindeki etkisi test edildi. Alınan sonuçlara göre çevresel dalgalanmanın düşük olduğu durumda yalnızca bir homozigot genotipin (AA) hayatta kaldığı diğer genotiplerin yok olduğu gözlemlendi (Şekil 5.2a.). Diğer taraftan çevresel dalgalanma arttıkça popülasyon yapısının değiştiği ve iki soy içi genotipin bir arada hayatta kaldığı gözlemlendi (Şekil 5.2b.). Bu sonuç çevresel dalgalanmadaki değişimin popülasyonun yapısını değiştirebileceğini göstermiştir. Fakat çevresel dalgalanmadaki artış beklendiği gibi soylar arası üremeye türeyen genotipin (heterozigot) frekansında artışa neden olmamıştır. Aksine her iki çevresel senaryoda (düşük ve yüksek çevresel dalgalanma) heterozigot bireyler popülasyondan silinmiştir.



Şekil 5.2. İki çevresel senaryonun popülasyon üzerindeki etkisi. (a) düşük çevresel dalgalanma. (b) yüksek çevresel dalgalanma. 'Env' çevredeki değişim, 'AA' ve 'aa' homozigot soy içi üremiş canlıların genotipi, 'Aa' soylar arası üreme sonucu üremiş canlıların genotipi. Tüm genotipler başlangıçta eşit frekanstalar ve deney boyunca ölüm oranları birbirlerine eşit ve sabit. Düşük besin dalgalanmasında sadece 'AA' genotipi (turuncu renkle gösterilen) hayatta kalırken diğer genotipler yok olmaktadır. Dalgalanma oranı arttırılınca popülasyon yapısı değişerek iki homozigot genotip ('AA' ve 'aa') hayatta kalmaya başlamaktadır. Her iki senaryoda soylar arası üremeye oluşan heterozigot genotip yok olmaktadır.

5.3. UYUM BAŞARISI ANALİZİ

Soy içi ve soylar arası üremiş *S. paradoxus* mayalarının uyum başarılarını karşılaştırmak için genetik belirteç bulunmaya çalışıldı. Bu doğrultuda *S. paradoxus*'ların 16. kromozomunda bulunan sekiz gen bölgesi incelendi. Sonuç olarak genetik belirteç olarak kullanılabilir herhangi bir gen dizisi bulunamadı (Çizelge 5.1.).

Gen bölgelerinin belirteç olarak kullanılabilmesi için birçok özelliği barındırması gerekiyordu. Bu özellikler incelenen gen bölgesinin popülasyonda yeteri kadar çeşitliliğe sahip olması ve yapılacak olan PZR'ler için uygun olmasıydı. Gen bölgesindeki çeşitlilik gerek şu ana kadar oluşturulmuş veri setleri kullanarak gerek doğadan izole edilmiş farklı *S. paradoxus* maya suşlarının Sanger dizisiyle araştırılmıştır. PZR içinse gen bölgesinin uzunluğu, GC içeriği vb. özellikleri göz önünde bulundurularak ilgili bölgenin çoğaltılıp çoğaltılamayacağı kararlaştırılmıştır.

Toplamda sekiz adet gen bölgesi incelenerek içlerinden uygun bir genetik belirteç bulunmaya çalışıldı (Şekil 5.1. ve Ek 2). Sürecin ilk adımında sekiz aday bölgeden altısı mayaların uyum başarısını etkileyebilecek protein kodladığı için elendi. G bölgesi ATP-bağımlı helikaz, H bölgesi hücre ölümünde görevli bir protein, J bölgesi gliserol metabolizmasında görevli protein, K bölgesi NADH kinaz, L bölgesi tRNA ligaz, M bölgesi DNA hasar tepkisi veren kinaz proteini kodladıkları ve dolayısıyla uyum başarısına etkileri olabileceği için diğer adımlarda incelemeye alınmadı. Geriye kalan iki gen bölgesi SGRP veri setinde incelenerek bu gen bölgelerinin polimorfik olup olmadıkları belirlendi. Bu işlem sonucunda her iki sekans testi geçti. Yani ilgili gen bölgelerinin veri setinde polimorfik oldukları gözlemlendi. Daha sonra laboratuvarında Almanya, Nehmten bölgesinden izole edilmiş olan *S. paradoxus*'ların gerçekte olan polimorfizmini gözlemlemek için diğer adımlara geçildi. Geriye kalan iki bölgeden birisi primer tasarımına uygun olmadığı için elendi. Bölgeyi çoğaltmak için tasarlanan primerler primer dimerine neden oluyordu. Primer tasarımının önem arz etmesinin nedeni hedeflenen gen bölgesinin incelenen altı *S. paradoxus* suşunda doğru bir şekilde sentezlenebilmesiydi. Geriye kalan son bölgeyle son adıma kadar gidilebilse de bu noktada ddPZR için prob tasarımına uygun olmaması (probun olduğu kısmı sentezleyecek olan primerin bulunamaması) süreci sonlandırdı.

Çizelge 5.1. Uygun gen belirteçlerinin bulunması için gerçekleştirilen işlemler. *S. paradoxus* mayalarının 16. kromozomunda toplamda sekiz bölge araştırılmış ve bu bölgelerin uygunluğu denetlenmiştir (Ek 2). Altı gen bölgesi ilk aşamada hücrelerin uyum başarısını etkileyebileceği düşünülerek elenmiştir. Geriye kalan iki gen bölgesinden birisi primer tasarlama için uygun olmadığı için üçüncü adımda elenmiştir. Diğer gen bölgesi her ne kadar son aşamaya kadar gelse de dijital damlacık PZR'si için kullanılamayacağı tespit edilmiştir.

Kromozom bölgesi	Baz aralığı	Protein kodluyor mu?	Populasyon içerisinde polimorfizm var mı?	6 <i>S.paradoxus</i> suşu için primer tasarlanabiliyor mu?	6 Suşun çeşitliliğini sanger dizileme ile inceleme. Yeterli çeşitlilik mevcut mu?	ddPZR için uygun mu?
		Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4	Adım 5
Krm16 (G)	4539-6727	Evet. ATP-bağımlı helikaz				
Krm16 (H)	13650-14821	Evet, Mitokondriyal hücre ölümü efektörü				
Krm16 (I)	21616-22807	Evet, ama bilinmeyen işlev	Evet, SNP ve delesyon			Hayır
Krm16 (J)	184791-187174	Evet, anaerobik gliserol üretimi				
Krm16 (K)	176721-179088	Evet, eşleşme (mating) etmeni				
Krm16 (L)	230834-232017	Evet, tRNA ligaz				
Krm16 (M)	247844-250215	Evet, DNA hasar tespiti				
Krm16 (N)	254431-256808	Evet, ama bilinmeyen işlev	Evet, SNP	Hayır	Hayır	Hayır

Sonuç olarak, toplamda incelenen sekiz aday bölgeden herhangi bir uygun belirteç bulunamadı.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Soylar arası ve soy içi üreme canlıların evrimsel süreçlerini etkileyen ve biyoteknoloji alanında genetik ıslah çalışmalarında önemli yere sahip olan eşeyli üreme tiplerindedir. Bugüne kadar birçok çalışma bu iki üreme tipinin canlıların uyum başarısı üzerindeki etkisini araştırmıştır (13,73,74). Geline son noktada ise laboratuvar temelli yaklaşımlar soylar arası üremeyi daha faydalı gösterirken, popülasyon genetiği çalışmalarında hâlihazırda soy içi üremenin sıklıkla tercih edildiğini göstermiştir (19,37). Bu çalışmada gerek matematiksel, gerek eşleşme analizinden alınan sonuçlarda soylar içi üremenin popülasyonda yaygın olduğuna dair ön bilgiler edinilmiştir.

6.1.1. EŞLEŞME ANALİZİ

Soylar arası üremenin canlıların hem hayatta kalma başarısını hem de verimliliğini (daha fazla alkol üretimi, enzim sentezi vb.) arttırdığı konusunda literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (17,19). Fakat doğada birçok canlı türünde (bitkiler, örümcekler, mayalar vb.) soy içi üreme oranı oldukça yüksek oranda seyretmektedir (37,75). Bu noktada üreme tiplerinin popülasyonlara -eğer varsa- ne gibi bir katkısı olduğu veya ne gibi durumların soy içi üremeyi arttırdığının öğrenilmesi canlılar üzerinde yapılan ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır (2). Bu doğrultuda doğadaki soy içi üremeye olan yatkınlığı çözmek için eşleşme analizi yapılmıştır.

Soylar arası üremenin canlıların uyum başarılarını arttırmada önemli etkisi vardır (13). Fakat doğada popülasyonlar abiyotik ve biyotik birçok etmene maruz kalmaktadır. Bu nedenle canlılar var oldukları koşullara göre hareket etmektedirler. Örneğin, eğer canlılar kendi soydaşlarıyla bir arada yaşıyor ve genetik olarak uzak eşler bulamıyorlarsa tek şans olarak soy içi üremeye yönelebilmektedirler (21). Nitekim bu çalışmadaki bir hipotezde soy içi üremenin yüksek oranda seyretmesi bu görüşe dayandırılmıştır. Diğer taraftan bazı çalışmalar genetik olarak uzak, farklı tür veya suştaki yabancı mayaların birbirlerine çok yakın (1 cm²'lik alanda) mesafelerde yaşayabildiklerini öne sürmüştür (15). Fakat bu durum *S. paradoxus*'ların yaşadığı bölgeler arasında değişiklik gösterebilir (15).

Suş karışımlarını doğa benzeri ortamda (teraryum) inkübe edebilmek için polikarbon yapıdaki 0,2 µm por çapına sahip filtreler kullanılmıştır. Bu filtrelerin temel amacı hücrelere tutunacak bir yüzey sağlamak ve porlu yapı sayesinde hücrelerin dışarıyla olan besin ve gaz alışverişini düzgün bir şekilde gerçekleştirmektir (76). 0,2 µm por çapına sahip filtrelerin kullanılması ortalama olarak 5-10 µm olan *S. paradoxus* mayalarının dış ortama kaçmasını engellemiştir (77). Böylelikle inkübasyon süresince suş karışımları tüpün iç tarafında güvenli bir şekilde tutulmuştur. Bundan önceki bir çalışmada polikarbon filtreler yerine çay poşeti kullanılarak hücre inkübasyonu sağlanmıştır (58). ay poşetinin içine yaprak süprüntüleri konularak hücreler bu süprüntülerin üzerine aktarılmıştır. Fakat ay poşetlerinin deney süresince kolaylıkla kaybolması, poşetin içine konulan yaprak süprüntülerinin steril olmaması ve poşetlerin çevresel etmenler nedeniyle tahrip olması deneylerin kurulmasını ve yönetilmesini zorlaştırmıştır (58,78). Bu nedenle doğa temelli deneylerde polikarbon filtrelerin kurulumunun ve yönetiminin daha kolay olacağı düşünölmüştür. Nitekim gerek filtrelerin tüpe kolaylıkla entegre edilmesi, gerek steril bir ortam sağlaması ve tüp-filtre tasarımının rahat bir şekilde taşınarak ilgili yere aktarılması deney sürecini olumlu yönde etkilemiştir. Yalnız filtre tasarımında geliştirilmesi gereken bazı noktalar vardır. Öncelikle, filtreden hücre izolasyonunda verimlilik yaklaşık %38 olarak hesaplanmıştır. Yani 100 hücre inkübe edilen filtreden ortalama olarak 38 hücre alınabilmektedir. Bu oran üreme tespiti için (eşleşme analizi) kabul edilebilir olmasına rağmen (ünkü önemli olan soylar arası üremenin niceliksel olarak ölçölmesidir; diğer bir deyişle soylar arası üreme var mı yok mu durumunun gözlenmesi) bu oranın arttırılması istatistiksel açıdan daha doğru verilerin elde edilmesini sağlayacaktır (66). İkinci olarak, filtre-hücre ilişkisinin ilerleyen çalışmalarda daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Her ne kadar bu filtreler hücre biyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılsa da üreme tespiti ve uyum başarı analizlerinde maya hücrelerinin davranışlarını etkileyebilir (79). Örneğin, hücreler filtreyle sıkı bir şekilde bağ yapıp izolasyon verimliliğini azaltabilir veya hareket kabiliyetlerini kısıtlayabilir.

Doğayı taklit etmek amacıyla *S. paradoxus*'ların doğal habitatlarında bulunan yaprak süprüntüleri ve toprak örneğiyle teraryum düzeneği hazırlandı. Fakat bu düzenek iki haftalık inkübasyon sırasınca laboratuvar koşullarında tutuldu. Bilindiği üzere laboratuvar ortamı sıcaklık, nem vb. etmenler bakımından sabit bir yapıya sahiptir. Doğada sıcaklık gün içerisinde değişimler gösterebilir veya hava durumuna bağlı olarak nem miktarında dalgalanmalar olmaktadır (15). Fakat laboratuvar ortamında sıcaklık yaklaşık olarak 20

°C’de sabit tutulmaktadır (80). *S. paradoxus* mayalarının hayat döngülerine bakıldığında stresli, uygunsuz koşulların soylar arası üremeyi arttırdığı görülmektedir (15). Diğer bir deyişle çevresel etmenler üreme tiplerinin belirlenmesinde dolaylı ya da doğrudan rol oynamaktadır (46). Bu nedenle, suşlar laboratuvar ortamında inkübe edildiği için (teraryumda) yeteri kadar çevresel strese maruz kalmadıklarından soylar arası ve soy içi üremeyi tercih etmeyip mitoz bölünmeyle çoğalmış olabilirler.

Diğer bir önemli noktaysa deney süresidir. Hücreler teraryumda 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda *S. paradoxus*’ların iki gün içerisinde tetrad oluşturdukları ve dolayısıyla soylar arası üreme yapmaya hazır hale geldikleri bilinmektedir (58). Fakat şu anki mevcut bilgi dâhilinde doğada bu sürenin ne kadar olduğu bilinmemektedir (81). Bu doğrultuda doğada soylar arası üremenin laboratuvar koşullarından daha uzun süreceği düşünülerek deney süresi 14 gün olarak kurgulanmıştır. Yine de deney süresinin uzatılması soylar arası üremeye dair daha geniş bilgiler sunacaktır (50).

Mikrosatellit bölgelerinin incelenmesi için filtrelerden 6 koloni izole edildi. Bu nedenle istatistiki olarak doğru bir sonuç almak için soylar arası üremenin en azından 1/6 oranında gerçekleşmesi gerekmektedir. Diğer bir deyişle altı koloniden en az birinde soylar arası üreme meydana gelmelidir. Aksi takdirde (1/6’den düşük oranda) geliştirilen deneysel düzenekle soylar arası üreme tespiti zorlaşacaktır.

Son olarak ileriki çalışmalarda deney düzeneğini geliştirilerek mayaların mitoz, soy içi üreme ve soylar arası üreme oranları tespit edilebilir. Kullanılan bu tasarımda mitoz bölünme ve soy içi üreme birbirinden ayırt edilememektedir. Çünkü her iki durumda aynı genotipler oluşmaktadır. Fakat tasarımda yapılacak bir değişiklik bu ayrımı yapmaya olanak sağlayacaktır. Örneğin, homozigot suş karışımları kullanmak yerine başlangıç popülasyonu heterozigot bireylerden oluşturulabilir ve yine çeşitli mikrosatellit bölgeleri kullanarak meydana gelen üreme tipi tespit edilebilir. Eğer deney süresince her mikrosatellit bölgesi için yalnızca heterozigot bireyler tespit ediliyorsa bu mitoz bölünmeye, homozigot genotipler oluşuyorsa bu soy içi üremeye ve farklı kombinasyonlar meydana geliyorsa (bir mikrosatellit bölgesinde homozigot iken diğer bölgelerde heterozigot olması gibi) bu da

soylar arası üremeye işaret edecektir. Bu noktada incelenen mikrosatellit bölgelerinin sayısının artırılması istatistiki olarak üreme tiplerine dair daha net bilgiler sunacaktır (16).

6.1.2. MATEMATİKSEL MODELLEME

Matematiksel modellemeler uzun zaman alabilen evrimsel süreçlerin bilgisayar ortamında hızla bir şekilde canlandırılmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında da çevresel dalgalanmaların popülasyonlar üzerindeki etkisini araştırmak için kemostat modeli kullanılmıştır.

Çevresel dalgalanmalar canlıların yaşam döngülerinde ve evrimsel süreçlerinde rol oynamaktadır (12,46,67). Yapılan birçok çalışmada çevresel dalgalanmaların (ör; besin miktarında ani yükselip alçalma gibi) arttığı koşullarda soylar arası üremiş canlıların soy içi üremiş canlılara göre daha iyi bir şekilde hayatta kaldığı bulunmuştur. Hem eşeyli hem de eşeysiz üreme gösteren *Brachionus calyciflorus* canlıları üzerinde yapılan bir çalışmada çevresel stres arttığında eşeyli üremenin arttığı görülmüştür (82). Ayrıca Lynch ve ark. modelleme temelli yaklaşımda popülasyonlarda 'Gaussian seçilimi'nin faydalı olacağını öne sürmüştür. Bu modellemeye göre heterozigot genotipin frekansı popülasyonda artış göstermektedir. Bunun temelinde ise giriş bölümünde yer aldığı gibi soylar arası üremenin genetik çeşitliliği artırması yer almaktadır.

O nedenle çevresel şartların sabit olduğu (çevresel dalgalanmaların yüksek frekansta değişmediği) durumlarda eğer soy içi üremiş canlılar bu ortama uyarlanmışlarsa doğal seçim yasası gereği varlıklarını sürdüreceklerdir (83). Nitekim kemostat model ile bu durum araştırılmıştır. Modelleme kısmında besin miktarındaki değişim çevresel dalgalanmanın ana unsuru olarak kabul edilmiştir. Bunun temelinde ise mikro-habitatlarda en çok dalgalanmayı besin miktarındaki değişimin göstermesidir. Diğer bir deyişle mikroorganizmaların çevresinde sıcaklık vb. gibi etmenler kısa zaman aralıklarında yüksek bir dalgalanma göstermemektedirler. Ayrıca besin miktarı canlıların büyümesini doğrudan etkileyen bir etmendir. Nitekim kemostat modelindeki denklemlerde besin miktarın ana değişken olarak bulunmaktadır (67). Modelleme çalışmasında çevresel etmenlerin belirli parametreler ışığında popülasyon yapısını değiştirebildiği gözlenmiştir. Fakat parametrelerdeki küçük değişimler farklı sonuçların alınmasına neden oldu. Özellikle büyüme oranı (g), substrat spesifik sabiti (K_s) değerleri genotiplerin hayatta kalmasında

önemli rol oynadı (49). Besin miktarının yüksek olduğu aralıklarda büyüme oranı en fazla olan genotip avantajlı haldeyken düşük besin miktarında en düşük Ks değerine sahip olan genotip avantajlı hale geçtiği görüldü. Çevresel dalgalanma arttığında popülasyon yapısı tek bir genotipin hayatta kalımından iki ebeveyn genotipin bir arada var olması durumuna geçti. İlk senaryoda çevresel dalgalanmanın oldukça düşük olması genotiplerin düşük besin miktarına daha fazla maruz kalmasına neden oldu. Bu nedenle, 'AA' genotipi en düşük büyüme oranına ('g') sahip olmasına rağmen en yüksek besin yatınlığına ($1/K_s$, düşük miktarda en yüksek büyüme oranı) sahip olduğu için besin miktarının azaldığı kısımlarda dahi büyümeyi sürdürerek popülasyonda baskın hale gelmiş görünmektedir. Fakat çevresel dalgalanmanı artması popülasyonun yapısını değiştirmiştir (Şekil 5.2.). İkinci senaryoda (yüksek besin dalgalanmasında) en fazla büyüme oranına sahip ama en düşük besin yatınlığına sahip diğer genotipin ('aa') popülasyonda 'AA' ile birlikte var olduğu görülmüştür. Bu duruma dalgalanmanın artmasıyla birlikte yıkıcı seçilimin oluşması neden olmuş olabilir. Yıkıcı seçimde çevresel stres arttığında heterozigot karakterler avantajını kaybeder ve homozigot uç karakterler ('AA' ve 'aa') frekansını artırır (84). Başka bir deyişle dalgalanmanın uç değerler arasında hızlıca gidip gelmesi (en düşük besin miktarından en yüksek miktara) ara besin değerinde (yüksek ve düşük besin miktarının arası) avantaja sahip olan heterozigot bireylerin yok olmasına neden olmuştur. Özet olarak 'Ks' ve 'g' parametreleri arasındaki ilişki popülasyon yapısını etkileyen büyük bir etmen oldu. *Monod* denkleminin bu iki parametre temelinde oluşturulması ortaya çıkan durumu kanıtlar niteliktedir (85). Düşük besin miktarında yüksek besin yatınlığı ($1/K_s$), yüksek besin miktarında ise yüksek büyüme oranı (g) önem kazanmaktadır.

Besin dalgalanması deterministik bir yaklaşımla sinüs fonksiyonu kullanılarak canlandırıldı. Fakat doğadaki birçok süreç kaotik etkileşimler sonucu oluşmaktadır (45,46). Kaotik süreçleri kemostat modele ekleyen bazı araştırmalar göstermiştir ki sistemde bulunan rastlantısallık arttıkça canlıların uyum başarısı olumsuz etkilenmektedir (52). Bu doğrultuda ileriki çalışmaların stokastik değişimleri hesaba katması gerekmektedir.

6.1.3. UYUM BAŞARISI ANALİZİ

Uyum başarı analizi, canlıların buldukları koşula uyarlanıp uyarlanmadıklarını gösteren bir yöntemdir (59). İslah çalışmalarında, örneğin verimliliği arttırmak için yapılan

çaprazlamanın nasıl sonuçlandığı, örneğin, uyum başarısı ölçülerek anlaşılmaktadır (19). Eğer yeni oluşan nesiller ebeveynlerine göre daha az büyüme veya üreme gösteriyorsa bu yapılan çaprazlanmanın verimsiz olduğu anlamına gelebilir. Bu nedenle üreme tiplerinin (soy içi veya soylar arası üremiş) canlıların uyum başarılarına olan etkisini ölçmek, hangi üreme tipinin ıslah çalışmasında kullanılacağını belirlenmesinde rol oynayabilir (78).

Uyum başarı analizinde soy içi ve soylar arası üremiş canlıların doğada hayatta kalma özelliklerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Şu ana kadar yapılan laboratuvar temelli yapılan çalışmalarda uyum başarısı basit düzeneklerle ölçülebilmektedir (61). Her ne kadar bu tarz tasarımlar laboratuvar ortamında rahatlıkla oluşturulabilse de doğa temelli çalışmalarda daha farklı tasarımlara ihtiyaç vardır. Çünkü doğada canlılar diğer mikroorganizmalarla (kontaminant) birlikte yaşamaktadır ayrıca mutasyona uğratılmış soy hatların doğaya bırakılarak deneylerin bir parçası yapılması etik sorunlara neden olmaktadır (44,69). Bu nedenle doğaya en iyi şekilde entegre edilen deney tasarımları gerekmektedir. Soy hatlarının birbirinden ayırt edilmesi içinde daha önceden yapılan çalışmalardaki gibi ilgili canlının doğal popülasyonunda hâlihazırda bulunan polimorfik bölgelerin kullanılması uyum başarısının ölçümü için uygun bir yöntem olacaktır (58).

Bu doğrultuda ilk olarak genetik belirteç bulmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Genetik belirteç bulunurken gen dizilerinin nötral (protein kodlamayan) olmasına dikkat edilmiştir çünkü uyum başarısına etki eden bir bölgenin kullanılması karmaşık istatistiksel modeller gerektirmektedir (58). Örneğin daha önce yapılan bir çalışmada, uyum başarısı hesaplanırken genetik belirtecin uyum başarısına olan etkisi hesaplamalara dâhil edilerek istatistiki açıdan geçerli sonuçlar alınmıştır (58). Fakat nötral bir bölgenin kullanılması, canlının uyum başarısına bir etkisi olmayacağı için hesaplamalarda sadeleştirme sağlayacaktır (58). Bu noktada değinilmesi gereken bir başka noktaysa genetik belirteç için belirlenen bölgenin protein kodlayıp kodlamadığına bakılmasıdır. Sonuç olarak bir gen bölgesinin protein kodlamıyor olması onun uyum başarısına etki etmediği anlamını taşımamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda nötral bölgelerin de çeşitli etkileşimler sonucunda dolaylı yoldan evrimsel olguları etkileyebildikleri gösterilmiştir (40).

Genetik belirteç adaylarından olan K bölgesi Almanya, Nehnten'den izole edilmiş laboratuvar suşları üzerinde çoğaltılmak istenmiştir. Bu konuda istenilen ölçüde ilerleme kaydedilememiştir. Primer tasarımı geliştirilerek ve fazla koloni alarak ileri denemelere ihtiyaç duyulmaktadır.

Genetik belirteç belirleme işlemi sırasında sekiz gen bölgesinin belirlenmesi, SGRP veri setinde polimorfik bölgelerin araştırılması vb. manuel olarak yapıldı. Yani göz yardımıyla doğrulamalar yapıldı. Fakat daha doğru ve hızlı sonuçlar almak için uyum başarı analizi biyoinformatik araçlarla bir araya getirilip hem zamandan tasarruf sağlanabilir hem de daha hassas bir şekilde diziler belirlenebilir (51,86,87). Örneğin, *S. paradoxus* olası genleri bulma, protein kodlamaya dair kontrol, SGRP veri setinde polimorfizmlerin araştırılması vb. Linux-bash sistemi yardımıyla tek bir çatı altında toplanarak işlemler yürütülebilir (87).

6.2. SONUÇ

Biyoteknoloji, daha yaşanabilir bir dünya oluşturmak ve insanların ihtiyaçlarını kısa sürede karşılamak adına birçok bilim dalını bir araya getiren disiplinler arası bir alandır. Biyoetanol, enzim, antibiyotik, aşı vb. gibi ürünlerin üretilmesinde ve geliştirilmesinde biyoteknoloji önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, mikroorganizmaların bu alanda kullanılabilir hale gelmesi biyoteknolojik ürün elde edilmesini daha verimli hale getirmiştir. Fakat hâlâ suş geliştirme ve ıslah çalışmalarında katedilmesi gereken yollar vardır. Bu bağlamda biyoetanol üretiminde sıklıkla kullanılan *Saccharomyces* cinsi mayaların verimliliğinin ilerleyen çalışmalarda artırılması önem arz etmektedir.

Bu çalışma da *S. paradoxus* mayalarının verimliliğini etkileyen etmenlerden olan soy içi ve soylar arası üremenin üzerinde durulmuştur. Eşeyli üreme tiplerinden olan soy içi ve soylar arası üreme *S. paradoxus* mayalarının yaşam döngülerinde önemli bir yer kaplamaktadır. Bu çalışmada gerek matematiksel kısımdan gerek eşleme analizinden soy içi üremeye dair bir eğilim olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar soylar içi üremenin doğada yüksek olduğunu varsayan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Yalnız yukarıda tartışıldığı gibi deney tasarımında yapılacak iyileştirmelerle ileriki çalışmalarda daha net sonuçlar alınacaktır. Diğer bir noktaysa üreme tercihleri çevresel birçok etmene bağlıdır (popülasyon yapısı, biyotik ve abiyotik faktörler vb.). Yani her koşulda soy içi üreme zararlıdır ya da soylar arası üreme her daim olumlu etkiye sahiptir gibi genel geçer bir yorum yapılamamaktadır.

Bu doğrultuda örneğin ıslah çalışmaları yapılırken soylar arası üreme her daim faydalı denilerek *S. paradoxus*'lar genetik olarak farklı bireylerle çaprazlanmamalı eğer ki soy içi üreme en uygun bireyleri oluşturuyorsa soy içi üremeyle devam edilmelidir. Çünkü daha önce belirtildiği gibi soylar arası üreme de bazı zararlara neden olmaktadır. Laboratuvar temelli incelemeler üreme tiplerinin etkileri üzerine birçok bilgi sağlasa da hâlâ doğada bu süreçlerin nasıl işlediği merak konusudur. Bu çalışmada deney tasarımları doğa temelli oluşturularak doğal süreçlere en yakın bilgilerin elde edilmesi amaçlandı. Çünkü doğal habitatlarından alınıp laboratuvar ortamında incelenen canlıların doğada olduğundan daha farklı davrandıkları bilinmektedir.

Matematiksel modellemeler biyolojik olguları anlamlandırmak için önemli araçlardır. Birçok karmaşık süreç modellemeler sayesinde anlaşılabilmiştir. Bu nedenle çevresel koşulların popülasyon yapısını ve dolayısıyla üreme tiplerini nasıl etkilediği basit bir modelle gösterilmiştir. Fakat doğa temelli çalışmalardan elde edilecek olan parametrelerle (örneğin; büyüme oranı, K_s) ve stokastik süreçlerin modele eklenmesiyle oluşturulacak olan yaklaşımlar modeli geliştirecektir.

Özet olarak, biyoteknoloji alanında ıslah çalışmaları hız kesmeden devam etmektedir. Soy içi ve soylar arası üreme canlıların verimliliği üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Doğa temelli bu çalışmada soy içi ve soylar arası üremenin *S. paradoxus* mayalarına olan etkisi üzerine durulmuştur. Fakat bu çalışma bir başlangıç çalışmasıdır. İlerleyen çalışmalarla birlikte soy içi ve soylar arası üremenin arka planı daha net bir şekilde aydınlatılacak ve ıslah çalışmalarına katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Steensels J, Snoek T, Meersman E, Picca Nicolino M, Voordeckers K, Verstrepen KJ. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014/05/08. 2014 Sep;38(5):947–95.
2. Krogerus K, Magalhães F, Vidgren V, Gibson B. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016/11/24. 2017 Jan;101(1):65–78.
3. Ota A, Kawai S, Oda H, Iohara K, Murata K. Production of ethanol from mannitol by the yeast strain *Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(3):327–32.
4. Bhadana B, Chauhan M. Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* with Different Perspectives: Substrates, Growth Variables, Inhibitor Reduction and Immobilization. *Ferment Technol.* 2016;5(2):2–5.
5. Bleuven C, Dubé AK, Nguyen GQ, Gagnon-Arsenault I, Martin H, Landry CR. A collection of barcoded natural isolates of *Saccharomyces paradoxus* to study microbial evolutionary ecology. *Microbiologyopen.* 2019 Jul 1;8(7):e00773.
6. Charlesworth D, Willis JH. The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet.* 2009;10(11):783–96.
7. Feldman MW, Christiansen FB. Population Genetic Theory of the Cost of Inbreeding Author (s): Marcus Feldman and Freddy B . Christiansen Source : The American Naturalist , Vol . 123 , No . 5 (May , 1984), pp . 642-653 Published by : The University of Chicago Press for The American. 2018;123(5):642–53.
8. Sun S, Klebaner F, Tian T. Mathematical modelling for variations of inbreeding populations fitness with single and polygenic traits. *BMC Genomics.* 2017;18(Suppl 2):1–11.
9. Holsinger KE. The population genetics of mating system evolution in homosporous plants. *Am Fern J.* 1990;80(4):153–60.
10. Tsai IJ, Bensasson D, Burt A, Koufopanou V. Population genomics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*: Quantifying the life cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2008 Mar;105(12):4957–62.

11. Magwene PM, Kayıkçı Ö, Granek JA, Reininga JM, Scholl Z, Murray D. Outcrossing, mitotic recombination, and life-history trade-offs shape genome evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(5):1987–92.
12. Harrison E, Laine A-L, Hietala M, Brockhurst MA. Rapidly fluctuating environments constrain coevolutionary arms races by impeding selective sweeps. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2013 Aug 7;280(1764):20130937.
13. Charlesworth D, Meagher TR. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2003;358(1434):1051–70.
14. Mader SS, Windelspecht M, Cognato A. *Biology*. 11th ed. McGraw-Hill; 2013. 141 p.
15. Boynton PJ, Greig D. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*. 2014 Dec;31(12):449–62.
16. Barmantlo SH, Meirmans PG, Luijten SH, Triest L, Oostermeijer JGB. Outbreeding depression and breeding system evolution in small, remnant populations of *Primula vulgaris*: consequences for genetic rescue. *Conserv Genet*. 2018;19(3):545–54.
17. Jensen C, Ørsted M, Kristensen TN. Effects of genetic distance on heterosis in a *Drosophila melanogaster* model system. *Genetica*. 2018;146(4–5):345–59.
18. Dudash MR. Relative Fitness of Selfed and Outcrossed Progeny in a Self-Compatible, Protandrous Species, *Sabatia angularis* L. (Gentianaceae): A Comparison in Three Environments. *Evolution* (N Y). 1990 Aug 1;44(5):1129–39.
19. Bernardes JP, Stelkens RB, Greig D. Heterosis in hybrids within and between yeast species. *J Evol Biol*. 2017;30(3):538–48.
20. Kosheleva K, Desai MM. Recombination Alters the Dynamics of Adaptation on Standing Variation in Laboratory Yeast Populations. *Mol Biol Evol*. 2018;35(1):180–201.
21. Kokko H, Ots I. When Not To Avoid Inbreeding. *Evolution* (N Y). 2006;60(3):467–75.
22. Boynton PJ, Janzen T, Greig D. Modeling the contributions of chromosome

- segregation errors and aneuploidy to *Saccharomyces* hybrid sterility. *Yeast*. 2018 Jan 1;35(1):85–98.
23. Melikoğlu M, Albostan A. Türkiye’de Biyoetanol Üretimi ve Potansiyeli. 2011;26(1):151–60.
 24. Rasul I, Azeem F, Hussain S, Siddique MH. Microbial Production of Ethanol. 2019;(February):307–34.
 25. Baratti JC, Bu’lock JD. *Zymomonas mobilis*: A bacterium for ethanol production. *Biotechnol Adv*. 1986;4(1):95–115.
 26. Horinouchi T, Maeda T, Furusawa C. Understanding and engineering alcohol-tolerant bacteria using OMICS technology. *World J Microbiol Biotechnol*. 2018 Oct 19;34(11):157.
 27. Keener K, Hoban T, Balasubramanian R. Biotechnology and its applications. North Carolina Coop Ext Serv. 2000;(D):1–13.
 28. Bailey SF, Bataillon T. Can the experimental evolution programme help us elucidate the genetic basis of adaptation in nature? *Mol Ecol*. 2016;25(1):203–18.
 29. Turner TL, Stewart AD, Fields AT, Rice WR, Tarone AM. Population-based resequencing of experimentally evolved populations reveals the genetic basis of body size variation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. 2011;7(3).
 30. Ramírez M, Pérez F, Regodón JA. A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(12):5039–41.
 31. Brotherstone S, Goddard M. Artificial selection and maintenance of genetic variance in the global dairy cow population. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Jul 29;360(1459):1479–88.
 32. Paschold A, Marcon C, Hoecker N, Hochholdinger F. Molecular dissection of heterosis manifestation during early maize root development. *Theor Appl Genet*. 2010;120(2):383–8.
 33. Bely M, Renault P, Silva T, Masneuf-pomarède I, Albertin W. Non-conventional yeasts and alcohol levels reduction. 2013;(September).

34. Yurkov AM. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*. 2018;35(5):369–78.
35. Garland T, Rose MR (Michael R. Experimental evolution : concepts, methods, and applications of selection experiments. University of California Press; 2009. 730 p.
36. Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 1988;52(4):536–53.
37. Tsai IJ, Bensasson D, Burt A, Koufopanou V. Population genomics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*: Quantifying the life cycle. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(12):4957–62.
38. Ratcliff WC, Denison RF, Borrello M, Travisano M. Experimental evolution of multicellularity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan;109(5):1595–600.
39. González Techera A, Jubany S, Carrau FM, Gaggero C. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett Appl Microbiol*. 2001;33(1):71–5.
40. Holderegger R, Kamm U, Gugerli F. Adaptive vs. neutral genetic diversity: Implications for landscape genetics. *Landsc Ecol*. 2006;21(6):797–807.
41. Fischer HP. Mathematical modeling of complex biological systems: From parts lists to understanding systems behavior. *Alcohol Res Heal*. 2008;31(1):49–59.
42. Torres N V., Santos G. The (mathematical) modeling process in biosciences. *Front Genet*. 2015;6(DEC):1–9.
43. Bratko I, Suc D. Learning Qualitative Models. *AI Mag*. 2004 Jan 1;24:107–19.
44. Murphy HA. Harnessing the power of digital droplet PCR to conduct real-world microbial competitions. *Mol Ecol Resour*. 2017;17(3):353–5.
45. Hiltunen T, Ayan GB, Becks L. Environmental fluctuations restrict eco-evolutionary dynamics in predator-prey system. *Proceedings Biol Sci*. 2015 Jun 7;282(1808):20150013.
46. Burger R, Lynch M. Evolution and Extinction in a Changing Environment: A Quantitative-Genetic Analysis. *Evolution (N Y)*. 1995;49(1):151–63.
47. Uecker H, Hermisson J. The role of recombination in evolutionary rescue. *Genetics*. 2016;202(2):721–32.

48. Butler GJ, Wolkowicz GSK. Mathematical Model of the Chemostat With a General Class of Functions Describing Nutrient Uptake. *SIAM J Appl Math.* 1985;45(1):138–51.
49. Gresham D, Hong J. The functional basis of adaptive evolution in chemostats. *FEMS Microbiol Rev.* 2014/12/04. 2015 Jan;39(1):2–16.
50. Schlötterer C, Kofler R, Versace E, Tobler R, Franssen SU. Combining experimental evolution with next-generation sequencing: A powerful tool to study adaptation from standing genetic variation. *Heredity (Edinb).* 2015;114(5):431–40.
51. Adams J, Rosenzweig F. Experimental microbial evolution: History and conceptual underpinnings. *Genomics.* 2014;104(6):393–8.
52. Wang L, Jiang D, Wolkowicz GSK, O'Regan D. Dynamics of the stochastic chemostat with Monod-Haldane response function. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–16.
53. Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. Vol. 12, *Microbial Cell Factories.* 2013.
54. Reyes LH, Almario MP, Winkler J, Orozco MM, Kao KC. Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2012;14(5):579–90.
55. Orr HA. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet.* 2010;10(8):531–9.
56. Barker JSF. Defining Fitness in Natural and Domesticated Populations. *Adapt Fit Anim Popul.* 2009;3–14.
57. REFARDT D, EBERT D. Inference of parasite local adaptation using two different fitness components. *J Evol Biol.* 2007 May 1;20(3):921–9.
58. Boynton PJ, Stelkens R, Kowallik V, Greig D. Measuring microbial fitness in a field reciprocal transplant experiment. *Mol Ecol Resour.* 2017;17(3):370–80.
59. Kawecki TJ, Lenski RE, Ebert D, Hollis B, Olivieri I, Whitlock MC. Experimental evolution. *Trends Ecol Evol.* 2012 Oct;27(10):547–60.
60. Pennisi E. The man who bottled evolution. *Science.* 2013 Nov;342(6160):790–3.
61. Cooper TF, Rozen DE, Lenski RE. Parallel changes in gene expression after 20,000

- generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(3):1072–7.
62. Lenski RE, Burnham TC. Experimental evolution of bacteria across 60,000 generations, and what it might mean for economics and human decision-making. *J Bioeconomics*. 2018 Apr;20(1):107–24.
 63. Gobert G, Cotillard A, Fourmestraux C, Pruvost L, Miguet J, Boyer M. Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples. *J Microbiol Methods*. 2018;148(January):64–73.
 64. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604–10.
 65. Lodrini M, Sprüssel A, Astrahantseff K, Tiburtius D, Konschak R, Lode HN, et al. Using droplet digital PCR to analyze MYCN and ALK copy number in plasma from patients with neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(49):85234–51.
 66. Boynton PJ, Kowallik V, Landermann D, Stukenbrock EH. Quantifying the efficiency and biases of forest *Saccharomyces* sampling strategies. *Yeast*. 2019 Nov 1;36(11):657–68.
 67. Sato K, Ito Y, Yomo T, Kaneko K. On the relation between fluctuation and response in biological systems. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Nov 25;100(24):14086 LP – 14090.
 68. Otto SP, Day T. Chapter 1: Mathematical Modeling in Biology. In: *A Biologist's Guide to Mathematical Modeling in Ecology and Evolution*. 2007. p. 1–16
 69. Francescon S. The New Directive 2001/18/EC on the Deliberate Release of Genetically Modified Organisms into the Environment: Changes and Perspectives. *Rev Eur Community Int Environ Law*. 2001 Nov 1;10(3):309–20.
 70. Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, et al. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 2009 Feb 11;458:337.
 71. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012/06/22. 2012 Aug;40(15):e115–e115.
 72. Biorad. Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide

- [Internet]. Biorad. 2018 [cited 2020 Jan 14]. p. 145. Available from: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf
73. Johnson LJ, Koufopanou V, Goddard MR, Hetherington R, Schäfer SM, Burt A. Population Genetics of the Wild Yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*. 2004;166(1):43–52.
 74. Monson CA, Sadler KC. Inbreeding Depression and Outbreeding Depression Are Evident in Wild-Type Zebrafish Lines. *Zebrafish*. 2010;7(2):189–97.
 75. Berger-Tal R, Tuni C, Lubin Y, Smith D, Bilde T. Fitness consequences of outcrossing in a social spider with an inbreeding mating system. *Evolution (N Y)*. 2014;68(2):343–51.
 76. Jackson RS. 8 - Postfermentation Treatments and Related Topics. In: Jackson RSBT-WS (Third E, editor. *Food Science and Technology*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 418–519.
 77. Zakhartsev M, Reuss M. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. 2018;(April):1–16.
 78. HERSKOWITZ I. Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol Resour*. 2017;26(4):545–51.
 79. Kostadinova A, Keranov I. Modifications of the polymer surface aimed at improving cell adhesion and interaction. *Importance Appl Nanotechnol*. 2019;1–6.
 80. Ikstrums I. Temperature & Humidity Environmental Controls in a Primary Standards Laboratory. :1–15.
 81. Knight SJ, Goddard MR. Sporulation in soil as an overwinter survival strategy in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2015/11/13. 2016 Feb;16(1):fov102–fov102.
 82. Becks L, Agrawal AF. The evolution of sex is favoured during adaptation to new environments. *PLoS Biol*. 2012;10(5).
 83. Mitton JB. Adaptation and Natural Selection: Overview. *Encycl Life Sci*. 2002;(March 2002).
 84. Bolnick DI, Lau OL. Predictable Patterns of Disruptive Selection in Stickleback in

- Postglacial Lakes. *Am Nat.* 2008 Jul 1;172(1):1–11.
85. Konak AR. Derivation of a generalised monod equation and its application. *J Appl Chem Biotechnol.* 1974 Aug 1;24(8):453–5.
86. Aamer Mehmood M. Use of Bioinformatics Tools in Different Spheres of Life Sciences. *J Data Mining Genomics Proteomics.* 2014;05(02).
87. Diniz WJS, Canduri F. Bioinformatics: An overview and its applications. *Genet Mol Res.* 2017;16(1):1–21.



EKLER

Ek 1: Matematiksel modelleme için kullanılan kodlar

Matematiksel modelleme yapılırken Python 3.7 programı kullanılmıştır. Aşağıdaki kodlarda oluşturulan diferansiyel denklemleri göstermektedir.

```
1. import numpy as np
2. import matplotlib.pyplot as plt
3. from math import sin
4. from scipy.integrate import odeint
5.
6.
7.
8.
9.
10. # Maksimum büyüme oranı rate (a)
11.
12. a1 = 0.1
13. a2 = 0.125
14. a3 = 0.15
15.
16. # Substrat spesifik sabiti (H)
17.
18. H1 = 0.01
19. H2= 0.1
20. H3 = 0.15
21.
22. # Ölüm oranı (d)
23. d = 0.075
24.
25. # Besin değerindeki maksimum ve minimum derişimler
26. E_max = 1
27. E_min = 0
28.
29. A = [0.01,0.05]
30.
31. # Çevresel dalgalanma oranı (w)
32. for w in np.array(A):
33.
34.
35.     A0 = [10, 0.1, 0.1, 0.1]
36.
37.     t_end = 5000
38.     t_step = 0.1
39.
40.     # Çevredeki besin değişimini gösteren eşitlik
41.     def I(t):
42.         return E_min + 0.5*(1 + sin(w*t))*(E_max - E_min)
43.
44.     # 'AA' genotipinin büyüme karakteristiği
45.     def g1(E):
46.         return a1*E/(H1 + E)
47.
48.
49.     # 'Aa' genotipinin büyüme karakteristiği
50.     def g2(E):
51.
52.         return a2*E/(H2+E)
```



```

53.
54. # 'aa' genotipinin büyüme karakteristiği
55. def g3(E):
56.     return a3*E/(H3 + E)
57.
58. # Besin dalgalanması sonucu genotiplerdeki değişim
59. def model(y, t):
60.     E, Y1, Y3, Y2 = y
61.
62.     dEdt = I(t) - g1(E)*Y1 - g3(E)*Y3-g2(E)*Y2
63.     dY1dt = g1(E)*Y1 - d*Y1
64.     dY3dt = g3(E)*Y3 - d*Y3
65.     dY2dt = g2(E)*Y2 - d*Y2
66.
67.     return [dEdt, dY1dt, dY3dt, dY2dt]
68.
69.
70. y0 = np.array(A0)
71. time = np.arange(0, t_end, t_step)
72. solution = odeint(model, y0, time)
73.
74.
75. # Tüm denklemlerin grafiği
76. plt.plot(time, solution[:,0], linewidth=5,label='Env', alpha= 0.7)
77. plt.plot(time, solution[:,1], linewidth=5, label='AA')
78. plt.plot(time, solution[:,2], linewidth=5, label='aa', alpha = 0.5)
79. plt.plot(time, solution[:,3], linewidth=5, label='Aa')
80.
81.
82. plt.yscale('log')
83. plt.ylim(0.0001, 1000000000)
84. plt.legend(bbox_to_anchor=(0., 1.02, 1., .102), loc=3, ncol=6, mode="expand",
borderaxespad=0.)
85. plt.xlabel('Time (h)')
86. plt.ylabel('Density')
87.
88. plt.show()

```

Ek 2: Uyum başarısı analizinde kullanılan sekiz bölgenin gen dizileri.

İncelenen sekiz gen bölgesinin genel özellikleri. Tüm bölgeler 16. kromozom üzerinden seçilmiştir. Ayrıca ilgili bölgeleri çoğaltmak için kullanılan reverse ve forward primer çiftleri de gösterilmektedir.

```

1. >G REF.chr16 4539-6727
2. Dizi:
3. AATCAGTGTACAGTTGGATGCGTCTTGTGTATCGTCGACGTATACGTTGCGCTGAGGACCGGCAAAAGCGAGTAGCTGAA
GCTCTGGATAACGGTAAGGGTATCCTACGGCAAAATGGACCATCCACATAAGTGGCACCGTAAGCTCGTCAATTGCAACAG
TGACTTTATTTTTAAGAGCCGCGGTCAATTTTGTAGTATCTTCTCAACTTGGGCGAGCACAATTTACGATATTTAACAG
GTATCATTTGAAGAAAAGAATCGTTTTCCAGATACTCGTCAATTCCTCGCTTTGGCTCTCTGAACAAAATTTCTCGATTAC
GCAAAATGAGCCGGCAATATCAACCACGTAGGCATATAAAAGCAGTTGTTCAACTCTCCCAAAGGTTATCGAACTGAG
CCTTGCATGCAAAAGTAAAAGCCGCGGACATACTCGGATTA AAAAGTTTTCCACATAC TGATATACCATCAGAAGAAGGTA
CCAAAGTTATTCTATAAGAGTCTTCCAGCGTGGTTCCCGCGCTACTTCGTGGTACAGAATTTTGATCCATTTCCACATTG
CAACGCCGTTGTTGTCATCAAATATATCTAAATCCCTTGCGGTACAAGCACAAGACGACACCAATAAAGCTTTCCACGGCAT
CTAGTGTCTTCTGAGTCTTCGTGGAGTGTAGGACTGCGCAACTTACATACTTTCAAGCCATGCTCGTCCACAGAGGGAA

```

TAATGGGTTCTTCATTTCGTAATAGATCGATCCTCTTCGTCACCAGCGCCACCACGGGGACCTGCCCAAATTAAGCGCAC
 ATGCTCGAAGATAATATGCAAAATATACCCAAATCGGTCTTTTTTGTTCATCATATCGTTACATATCTGTGAAAAGTACT
 TTATCTCAGTGGGTTTACGTGGGCATAGATCACGCTTACGCGCTCTGTGTCGACCTCTTTTACCAGGTAGACTTGTCT
 GATATGCGGAAAAAATCGATAGCTCATCTACGTGTAGTAACAAAAACATATAGGGTCCAAATGTATCCATATTTCTTA
 TGGTCTTTTTCTGAAGATTCTTACAATAGGTGTGCCAGAAAACAAAGTTGGTGAAAGTACGCATCGTAGAGCTGTGCTTCG
 GCCTGGCACTTGTCTTTCGTAACAACGTTCCAGGACACGGAAACTCAACTCATTATAGTATCCTCTGTTGAGGTAAAAAA
 GAGAAAGGGTATCGTAATCCTTCTATTGAATTTCAAAGTATGCACCTGAAACAACGTGTAGACCATCAAGTTGATTTTCT
 TGGGAATAAGATACTTTGAAGGGATTGGTCCGCCCTGGAATCTGGTTCGTCCTCAACAAACGTGAGAACTTTGTACAT
 TTTTCCCGACCATGACGGAAATGACTATTTTTTCAAAGACCTTTTCTATCCATTGCACCAGTCTGAATTTTACCCTT
 TGATTAGACCAGACTTTTCTGCTTTCGTAAGTACGCCACTTCCGTGGGGATCGATTCAAATAAAGTTATTGAGGGACAAT
 GTACCAAGTCGTTTTTGTATTAGAGCCGACTCAAACCTCGTCAAAGTTTGCTTTTTCAAACCTACGCCTATCGGAAACTT
 TCATTTATTTTTGTAAGTTTCGAAATTAACAATAGTATGTTGATTGTTATGCTTTTTGACAAGAAATCCATCAATATAAA
 CAAAAGATTGTCAGTTTCCGTCTTATCATCATCTAAGAATGTAATAATTAAGCTATTGAGAAGATGCAGAACTCTAGCA
 GCAGCAAAGAAAATTCAGTTAATAAGAAATCTACTAAGATAAGGGACTGTCTGTCCCCTTCAAGCACAACATAGAAAAA
 GAAGGATGTCTCATTATCCTTGATTTCCGGCTGCAAAAATAAAGTACTCGGTACGTACTTTCGTTTTCAATTTCCATGG
 TGCACAGTATCTTAACATCTGCTTAGTCGAGGAGAACCAGGATTCGTTTCGTTGCTCAGCCGCTTCGTGGATATCTCTT
 GGATACTTTAAACATGGACCTACGCTTAGCCTGCGCTTAGCCTACAACCTTCTCCGCTCTCGAAAAGACCAATATAATAA
 AAGTTATAAATTACATTTCTTATTAGGTATACGACCTCGCGCTTCGAAGTAGAGGAGCCCTTTTTGGCGTACCTACATAT
 GG

4. >G forward primer
 5. CCTCGCTTTGGCTCTCTGAA
 6. >G reverse primer
 7. ATATCCACGAAGCGGCTGAG
 8.
 9. >H REF.chr16 13650-14821
 10. Dizi:
 11. GACTGTTTCGTTAAGTTGCCAGCCAAGCTTACTCAATGATATACATAGTTATTCCCATACTTTCGTTATAGCATACCCGCGC
 TATCCCTTACTCTTGTCTCCTCATAGTATAGGCAGTTCTTGGTTTGAATCTTGGAGTACTTTTCTGAAACCCCCATAAT
 ATAAAAAAATTTATGTCCCGTTATTGCATAATGAGCTAAGTGTCTCGGAGGGGGAGGTCCTGGAGCACACTTCGAAAG
 TGTGTTATAACTTGGAGATGAGCATAACATACTTACTTCTGTTGTAGTGATTGTTGATAGAGCCACTGTGGTTAGT
 GAGGAACAATATTGGATTAGTAATTGCGAAAAGCGATATAAAAAGTAAATTACATGTCCATTAAGTATTGAAACGAGATCAG
 GTCTGGCAGTAAACACATTTCCATTTTCACAATCTGATAAGCTGCTGCAGGATTCGGCTTATACAACGATACCCTAAGA
 AAAAAATGTGACAGACTACTTCTCGAAAATGGTATCACGTTGTATTTGAACACAGTAGGGGCTTCTTCCGACACTCGCC
 AAACCGTATCTTTTAGGCGAGGGCTCATCGAAATATATAGATGCTGATTTGATTTACAAAGGCGTTGGAAATTCACCAAA
 TGTGCCAGTCAACCGTATTTGAAACCCTTGTGATAAGAAAGGGTTCATTACAGTTGAAAAGAACTTCAGAGTGAACGCTGT
 TGAGGCAGGAAACGTTTTTGTATTGGTTATGTTACAAATTCAGATATCATGGATTGGTTAAAAGGGACAATTTGGTTGA
 CGTTTTGACCCGTAATGTTATGAGTTTTTTACAAGAAGGAACAGAGCTAGTCTAGTTGATGCAGACTGTCTTGACTCAGG
 TCATGCTCAAACCTGGTGTCTCAATTTGGGCCAAATGCAGGATTTGGCCACTTCCCACTGCCATTATTTCGGGACGGTCAATAT
 CCCATCTTTTTAATTTCTAGGGCAAAGT

12. >H forward primer
 13. GAGGTCCTGGAGCACACTTC
 14. >H reverse primer
 15. TATTCGATGAGCCCTCGCC
 16.
 17. >I REF.chr16 21,616-22,807
 18. Dizi:
 19. TTGAAAATTTGGGAAGTGTGTCAGTAAGCTTCAACTCTTTTCTGTATGAAAATAAACTTTGGAAGACTAAGCACTTCTTTT
 TTGATGGATCAAGTTGCCAAGTGCATTCAGAAGATTCCTTTTACCCTTATCCTTAGTAACTTCAACGAAACAAAGTTAA
 AATTACTCAAGAAGTCCCTTATACTGAAGAAGCCCTTAAAGTATACTTACGGAAGTGGATAGAAAATGGAACCTAATCA
 ACTCTCAACAATTAAGGAATATGCCGTAGACAATATCAACTACTGGTCAATCATATTTTTTAACTTTCTCAAGT
 ATTCATGAAAACAATAAAGGAACGTAGTTTTATAACAATCGCTGCTATGGCGTGCTTCATGAGTATTTGTTCTTCACAATG
 TCTCACAAATGTTTTTACCCTCTTTTCTTGTGATTTGGGTGCTCCGATGAGTACTTGTCTTTCGAAACAAATAGATC
 CTGTTCAATGGAAGTGAACATAAAAATGCAGTTTTTGTCAACTATAATCAGTGAACAGCAGAAGTCAGATGATAATGTTT
 GGACAGAAATTCAAAAGAGGATGAACGTACTTGTCTGAGCGGAACGTTTGGGCTCAGGTGTGTTTTTCTCGATAGAGC
 TGATTGTGAACATTTCTCGAGCGTAATTTTCTCAGTTGTTTACCCTCGAGAAATTTCTTAACTACCAGTTGCTGAGT
 TGCTACCATATATTGAAATAGCAGAGACTGCCTGCGATGGTGAACACTGATGTAACCTTCTGAAGTGTGCTTTCGATTTGG
 CAAGTTCTTCTATCAGCCAGACACATTATCGATGGCGCTAACCTAAATAAGAATAGACATATTGCGTGTGAACTTGGAAAG
 TACTACTTGATAAATAAGTTAACACCCTAGCCGGATTAGCGGCTTCTTTGGTCTGGCTACAAGAATATATGACATTAATA
 AAGGCTTTTTGGGCATTTCTTACGTTTATGATTCATATATATAGGAGCTATATATATTGGCCCTAGCGTCTGTAAAAATA
 TTATAGTATTGGAATATGCCGTAATTTAAGTTTGAAGTGGAGTTTATGATAAAAAAATTTGTTTACTATCTGTGCATGTGG
 AATAAGGGCTCTAGAAAATTCCTGCTTACGAAATTCATCGTCTT

20. >I forward primer
 21. TGCTATGGCGTGCTTCATGA

22. >I reverse primer
23. CAAACGTTCCGCTCAAGCAA
24.
25. >J REF.chr16 184,791-187,174
26. Dizi:
27. TTGCTAGTATCTGATCTTTCGATGACTATATCGATTCTTGGAGATAAAAATATTTTCTGTAGCCACGGTTTGATTCATGC
CTGTCTTTGAAAGATGGGACTGGGTCTAAATGAATAAGTTATTTTGGTCTTTGGACATCATGGATGCTAGATTATCTGGA
GATGCCGTTAGCTTCATTTTTGCTGTTTTAGACACTGATATTGGCACAGATATTATGCTCTTCATTGACTTAGCTGTCAATT
TCTTTTATGTCCCTTCTTAGTTAATTTGCGTGAAAGTTTCTGGTCACAACAGTAAATTTTGAGTCAGTTGTGCCACTAT
TATGTATAGGTTCAACAGCGTAACAGTCAAGTTTTTGTCTTGATTAATAATCAAACTCTGACTAAAAGAAAGCCACTT
TTCCGAATCTCGGCCACGGCGTGTTTTTTACGGTGCTTTTTTCTTTCTTTTTTTTGTCTTCTATTTTCCCCTTCGC
ACAATACTGTTTTCTTTCAGTAAAGTAATGGCCATGATATCTTTCAATAAAAAAGAGAAAGGCTCCTTCCAGTTCAAAACCA
AACTACTAAGCGGAAGAAGTTGAAATATATACAAATTAATGTCGATGTTATTTTTGTTTATTTTACATTCCTTTAACCTTT
ATTTAAGAAGAATTGTTTGATATTATTGTCATCAGTAAGGATTGCTACTACTGGGCTATTTACAGAGGGGCAGTTACCAA
CAAAGAGATCTTTCACACTCATTATACCATACTTAGCCCTGATGTCGAATAGCCGACAAATAACCACCGTTTAAAGAGATG
TAGAGTATTTGTATACCGATAATGCTGTCCGTAGAGATGCTGCTCGGTTATAAAAAATACTTCCATTGTTTGTCTATTT
GGCGTCTGTCTTGAAGCATGAACGTGAAGTCTTGTGTCTTGTAAAAAATGGATAAACTTCTGTTATTGTTTGTACGCGG
GTGTAGTAGCACTTGAATTTTCTACGGGGTTTTGTGTCCGAATGACAGGTATCTTACATTTGTTTCAAGTAAAAATATGGT
TCGTTTTCAAAGATAATCAATTTTTTGAACGCTTTCGTCCATTTTAAAGCATGAGCCGTATTTCTTATTTCAACGAGGAAG
CATCAGGTTCTAGGAAGTCTTGCAGTGAACATCATGTCAATTTCCCTGTACAAAGTAACTGAGGGAAAGTTAAGACGG
ACTTGACGTTTTGTAGTCGTGTGTAGATCTTAGGCAATCAAGGTTCTGTTTGAACCTTTGAAAACCTTCCGTTAGTTTGT
GGTGTACCAAAGAAGTTATCAGCAGTCCATCTTCAAACATAAGGAAACAACAAAATGAGGCAATAGACCTGCCAGACAT
TTAAAATAGACAGATACCTTTCATTTTGTATGGGACGAAATGAAGGATCCTTCAAAGCAAGTATTGTTAACGTTCCCGT
TCAAATCGCAGCTTAGCTTTAATAACTTCCATTCTGGAACCAACTAAAATTTGAACGGCGTTGAATTATAATCAAAGT
TGCAGTCCATACATATTACTGCAGTTGATAGCAGTAAGTCAACTGCCCGTAAATGCTGCTTAAACAAAGATCATATGCT
GACCGTTAAAATCATACAGCAGTAATTTCTGTCTTCTGCTTGATTGGAATAAAAAATCCAGTACTTCTATTAATAATTT
TAAAACCTTCAAATTTTGAATCGTGGGTAGAAAAATAGTTATTAATCCGTACAAATTTCCAGCCACAGTTACTTCGAA
AATTATCTTCAACTTCTTTTTCTTGTATATTCATCGTCACTTTCAGATGAGTTTTCTACATCTTCCCATCCTCTCCGA
CTCCGTTCAAGGTAAGTTGATAAATATGCTCCTTATCATATTTGGAAGCTGCGGATAATCATTATTCACCGTGTGGTAGC
AGTACTTGCCCGCCCGTTCATCAAATACGTTCTGATCTCCCTGCGGAAAAATGAGACCCTCTCCCGTCTCGGTATATTT
GCATAGGTATACCCATGATTTTCGTAGTGAATTTTTCTTCTTGGAGTTGGTTACCAATCGATTCTTTTATCTTTAGTTTT
GCTCATACTTGAAGGATTTCTCCTTATATATGTCAGGTGTGCTACTTTTCCCGGCCACCAATAGCCGCGACCTCCA
AATTACCCCAATTAAGAAAGAAAACCTCCGAAATGCGGGTTGACCAGCGATGCAATAATAGAACAATTTAGCCGCGCA
ATCGAAGATATCATGAAACATAGTAAACGCTGTCTGTAATGGCTACTCTTAATAGTTTTTGTAAAGGGGTGCTACTAA
GAAAGAACAACCTAGAGAATGGT

28. >J forward primer
29. AGCCGACAAATAACCACCGT
30. >J reverse primer
31. GATATCTTCGATTGCGCGGC
32.
33. >K REF.chr16 207,393-209,776
34. Dizi:
35. CCGTCCACAAGAGAAGCGATGGTTGAATTTATTACACATTTGCACGAGTCATACCCGAGGTGAACGTTATTGTTCAACCA
GATGTTGAGAAGAAATTTCTCAGGATTTCAAATCTCCCTAGAGAATGATCCCAACCGACCTCATATACTTTATACTGGC
CCTGAACAAGATATCGTAAACAGAACAGACTTATTAGTGACATTTGGGAGGCGATGGGACTATTTTACACGGCGTATCAATG
TTTTGAAACACACAAGTTCTCCAGTTTTAGCATTGTCTTGAACACTGGGGTTCTATTGCCGTTTGATTTCAAGGAG
CATAAAAAGGCTTCCAGGAAGTAATCAGCTCGAGAGCTAAATGTTTGCATAGAACACGGTTAGAATGCCACTTGAAGAAG
AAGGATAGCAACTCCTCTATCGTGTCCCATGCTATGAATGACATATTTTTACATAGAGGTAATCCCCTCACCTCACTAAT
CTGGACATTTTTATTGATGGCGAGTTTTTGACAAGAACGACAGCAGATGGTGTGCATAGCCACTCCAACGGGTTCTACA
GCATATTCATTATCGCGGGTGGATCTATTGTCTCTCATTGGTGCCTGCTATCTTGATGACACCAATTTGTCTCGCTCC
TTGTCAATCCGACCACTGATTCTGCCTCATTCACTCCACATTAGAATAAAGATAGGTTCCAAATTAATCAAAGCCAATC
AATAGTGTGGTAAAACATCTGTTGATGGTATTTCCCAACAAGATTTAGATGTTGGTGATGAAATCCATGTTATAAATGAA
GTCGGCACTATATACATAGATGGTACTCAGCTTCCGACGACAAGGAAAACCCAACTGACTTTAACAATTTGAAAAACCT
AAAAGGTGAGGAAATTTATTGCGTGGCTAAGACCGAAAACGACTGGATCAGAGGCATCAATGAACCTCTAGGGTTCAATCT
AGCTTTAGGCTAACCAAAGGAGAGTGACAATGATTAGACGCTCCAGAGAGAAGAATATTATGATTTAAACGATATCTA
ACAGGTAGAAATTTACTTTTTATTGCTTTTTGTCTAGAGAAATCTCAGCTGGAGTGTTCGATATGGAATTTTTTGATA
TCGTGCTTTTTATTCTATTGCTATTAAGGAAAACGTGAGATATGGGATGCCACACTCATCAAGAAGAGATAATTAGATT
ATGTATATTATA
GGAATGGAGAGAGACTGTGAAGCGTGTCAACTCCTATAATCAAGAAAAGTAAACAAGCACTCGCCGTTCACTGTGCTAA
AAAAGTATGCATATTCATATTTGGTTTATTGATTTTCTTTTTGAGATGGGAGCCAACCTGATGTCGGAATATGGTTTGC
TTTCATTATGATATGCCAATTTAGGTAATAGCAAAAATCACGAAATGGTGTGGATGCTATAATTTCCGAATTAG
GAATAAATGTAAATTAATTTCCCGTTCCTTTGGTAGTGTGCATAGTTTTGATGTAATATCCAACAACATGTTTGTGA
AAGTACTATCAAAAATCCAATATACTTCTTATTAGTCTTCAATAAAAAATTTTATACTTTTTTTTTATGAACACTTTT

CTAATTAGGCCATCAACGACAGTAAAATTCGCCGTAATTAATGGTTTTCTACTGAAAAACAGTGGACAATGTAAAAAGATG
CATCTCATTTATCAAACCCATAATATGCAAGTAAGCCTTACCTCGACTATGATGAAGCGCAAGAAAACAAAAGCAACAAC
TGGTTTTAGGATAATTTTCATATATAAAGGCCCTTCGTGCTTACTGAATATGTTACTGTCTTACCATCCATCAGCAATTC
CGAATAATACAAAGTAGAATAATACAAACGCTCAATTTAATACACACAAAATAAATATCCAAAAATGAGATTTTGTTCGG
TTTTTACTGCATTTTCATTTGACGCTTCCCTCCGCTTTAGCTGCTCCAGTTAATACCACCCTGAAGACGAAATGGCTCAAA
TTCCGGCTGAAGCCATCATTGGTTACTTGGATTTAGAAGGCGATTTTATGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACA
ATAACGGCTTATTGTTCAATAACTACTATTGCTAACATTGCTGCTGAAGAAGAAGGGGTGACTTTAAACAAAAGAGAGG
CTGATGCTTGGCACTGGTTGCAATTGAAACCTGGTCAACCAATGTACAAGAGAGAAGCCGAAGCTGAAGCCAATGCTGAAG
CTTGGCACTGGTTGCAGTTAA

36. >K forward primer
37. CATTAGCCACTCCAACGGGT
38. >K reverse primer
39. TCAGCCGGAATTTGAGCCAT
40.
41. >L REF.chr16 263,376-263,971
42. TCGGAACATCCTTAACGAAGACGCATTGAGGATCGGTTGCAAACCAATAAAATCTTTTCGTAATCCATTTAGCAAAACT
GTTATTTTCGACTTGAACCCACAACCTTTTAGTGCTGAAATATAAATGAGGCGATTAGCTATTTGCAGTCTGCTTCAATTT
GCAAGCGGTCTGCTTACGTTGTCTTACGCCATCTTACGTAACCTTGGCTTACTGCGGGCGGGTAATATGATCTTATTTT
TCTTGACATGTTAAGAAAAACTTTTGGCTATCAAAAAAGTTAAGGAAGAAATATCTCAATGTGAAGGATTAGATATG
AATGAATTTACGGCCTTGGCAGTATTAGTGCACTTGTCTCAAAAAATAAATGAAAAACTATAGAGTCACGAGTACGAT
ACCAACTATTTCTTTCAGACTCTTAGAAACCTCAGCGGTAACGGTAAACCCGATAACTGGCGGGCATTGGATATTAAGGT
CTCAGTGCAAAATGATTTTATTTGGGTGGTCATTTAGGTAAGTACCATTAGGGCGAAGTTCCTTTTATGATGCTATTGTAGC
TTGCTCTTACTCCTTCTTCTCCTCAGTTAATTGCTCGTGTGATATATCCCATCGCCATTATAGGCCATTGTTATAA
TCACTTTATACGAAGTCTGGCCGTTAACGCTTCTTACCCTAAAAAAAATCAGTCACCCACGCAAACTGAAAAAAA
AAAAAAGAAAAATCAAAGCGAAAAGAACTTATGCAATTTTTTATTAGGTGTTGGATGATTGATTGATTATAAACCA
TAACCACGTAAGTTACCAATTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAGTAAAAAACATAAAACAAAATTTCTTTAACAGTTATAA
TGTCTTCTGGTTTGGTCTTAGAAAAATACGGCAGCTAGAGATGCGTTAATCGCCATCGAAAAGAAGTACCAGAAAATATGGG
CTGAAGAGCATCAATTTGAAATCGATGCTCCATCAATTGAAGATGAGCCATAACAATGGACTCTGAAGAGTTACATCGCA
AGTATCCCAAATTCATGCTGCTATGGCCTATCCGATATGAACCGTGTATGACCGCGGTCATTGCTTTACTCTTTCTA
AAGTGAATTTTCTATTGTTTTGAAAGAATGAACGGTAAAAAGAGCTTTGT

43. >L forward primer
44. CTGCGGGCGGGTAATATGAT
45. >L reverse primer
46. CGCATCTCTACGTGCCGTAT
47.
48. >M REF.chr16 279,918-282,301
49. Dizi:
50. AAGGTACCGCAAAATGTTTTTCATGAAAGACCCATTTCCCTGCATTTTGCCAAACCAAAGTCGGTTATCTTTACTAATACA
GGATCGTCTGTTCAATAAGAATATTATCGGGTTTTAGGTCACGATGACTGATACCCATAGAGTGAATGATTTTACTGCT
GTGAGTATCTGTCTGGATATTTCTTCCAGCATCTTCCCACTGCACCATGAGCAGCGACAAAATCCATTAAGTCACCA
CCAGAAACGAACTCCATCACCATATAGTAACTTTACGCGTCTTCATAAAACCTTTTAAATCGTACTATCCTTGGATGATTG
AGCTTCTGCAACACTTCCAACCTCTCTCGTCACACCATCCATATTGCCATTACTTTGCGCTTACTTATAATCTTTACCGCG
AATGTTTTCCAGTAGTTCTTTCAATGGCTTCTTTACTGTGGCGAATGCACCCTGGCCACCCTTCGTCGATAATCGAG
AAATCCTTAAAAATACCAGTCTTACGGTCATAACGGCTGATGCAGTGAAGATGTAAGACCCGGGGAAGCTATTTTGGAT
GTATTTTTCAGGTTAGATCTTTTACGGTCACTTTGTTTGTCTCGAGGCTCTGCCTAAATTTATCGTTTTATGAAAATGACC
AGAGATAAGATATCTGATTCGACACCTACCAACCGGTTATTTTCATCACCTTGAGATAATAACTGGTTACTATTTTTCTCG
ACTTTTTGTCCATTTAACAGGTCCCATTGTAGAAATGTCATTTAATAAAAGGTTACCGTCTTCTCCTAGTAGTATTTGG
AAATGCTTATTAGATAGCCTGGAAATATTTCTAAATGGTAGTCGCATGCTGGGTTTCTACCAATGTCCAACTTTCTTT
ATAGATCGTTTTTCTCAGGATCTGTGAAATATCAGCCGATAAGTCTCGGATGGGAATTTGACCCGTGGTACAAATGACT
CTGCACACAATGTTTTCTCCGATTTGTTCTTGCAGAACCTCTCGATCAAAAATCTCTGCGTAGCCTGCGTAGACTGCTGT
GTAGGTTGTGTGATTTTTCCATTTTTATTTCGATGTTGTGCAACGCTGCTTCTCTCGCTATTCTTTCTTTAAACTTAA
GGAACTCGAGTGCATATACAAAAATAGCTTGTCTTCCAATATCCCTTACAACCTTTTCTTCTGCTACCTTTTCCCTAG
CCACAACCTTCGAAAAATAGTGACTTCGGTACCTTTATCTTCAACCTGTACCTTTATTCTATGAATATTCATTTCAAAG
TTAACCCACAGTGATGATTTTTCTGCCAATTTAACGCGTGCACCCGTTGCCGTATCAACGCGTTTCATGCCATCTTACCC
TCAAAATGAAAAATAAATGTGTTAACAGATGCCCTTTTTATCAACACTCTGACAACCTTTCCGCTTAATCCACAGGAAGC
AATTTATCCATGCATCTACAAAACAGATGACGCTTAAATACGATGAAATCTCATATGCACTGGGATGATTACCTGAC
ATGCTATGTTCCATCTATACTTCGATTACCATAGTAGAAAAATAATATATCCTCCTGATATTATCATCTAGATAGATGCA
GAGTAGTGAAGCAAGTAGTATTTTTCTCCAGTATTAATGATCTACATCAAAATACTTTGTTTTGGCGGTGTACAAATAGC
CGCTTACAGATATTTTCCGGTAACGTTATCTTTTTCTCAGGGTTTACGTTGAAAGCACAGAATGGAAATCCTAATAG
ATGTGATCGAACAATAGGGATATCAATCACTGAAGAGAAAGATTTTTGTGTAGTGCCTAGTGCATATATAAGACAATAAA
GAACAGTGCATAATCCAGGAAAAATGTTGCCAGAGAAAAGACTATTGACTTCAGAGGATATGAAACTATGGGAGGAATC
CCAGACAAGAGCTGATTTTCAACCAAAATTCATGATGATTTGGCTGAGTCTGTTAAAGGACACGAAAAATCCCAAGTACAAAGA
ACCAATATCCGAGCCAGTGAACAGTATGATGAACCTACTTTCTCACATAAGGGATATTGTCCAGAAACATCCAGTAATAAA

GGATGCAGATAGTTCAAGATTTGGGAAGATTGAGTTTAGGGATTTTTATGACGAAGTTTCACAGAACTCAAGGGCTCTCTT
ACGTTTCAAGATTTCTTCTCTTACAGATGGGCAGTTAGAACAATTATCCATTTACCTAGATGAATCATGGGGTAATAAGAG
AAGGATTGATTATGGTTCAAGTCATGAGCTAAATTTCTGTGTTTACTTTATGGACTCTATAATTATGGAGTATTCAATCT
TTCAAACGATTCAACAAACCTTA
51. >M forward primer
52. TTGTTCTGCTCGAGGCTCTG
53. >M reverse primer
54. AGCGGAAAGGTTGTCTAGGAG
55.
56. >N REF.chr16 286,505-288,888
57. Dizi:
58. TTCAGAAATCAAGAACAGATACTATTGCGAATTCCTCAAGGACAAACTCTAAAGAATCGTTAAAAAGAATGTTGTTGTTG
GCGCCATTGTACCACGAAACGCTAATAATATTTTCATCAGAGAATAATAAGCTTCTGGGAATGCGGTGGGAGGCCTAAAAG
CAGCTCCGGAGTTGTTGTTAAACGAACACATTGCAATAGAGGAACCTCGTCTCAAACGCTTCAAATCATCCATATCAAGTG
AAATATCTCAAACCTTCTACTGGTAATTATGACAGCGAATCCGCGGAAAATTCTAGGTCATTTCTTTTGGTGGGAAAGTTT
CTCCCCACCGATACGAACCCGGCCATTATCAGAGATATCGCAAATTTCAAATGACACTTATATTTCTGAGTACTCCACTG
ATGGTAATAATTCGTCATTCAAATTTCTGATACAGTCAAGCCAAGCTATATACGTAAAGGCTCCGAGACTACGTACAAT
ATTCAGCTTCATCCGAAAAAATGACGAACGGCTACGGTAGGAAAGTTCTGTCAGGAGAGATTTAAGCATTGTATCAACAGCAT
CGAGCACCTCTGAGAGAAGTTCGAGAACAGATTCCTTTTACGATATCACGACAGCCACGCCGATTGTAAGCACTGATAATA
GAGGCAGCAAAAACAGTAACCTGAAGGAGTCCGTTTTGCCTAGATTTGGGGCCAAAGGCCTGGACAGGCAAAAGGACTT
ATACCACATCTCGGCATGGCAAAAATGCTCGACGTTTCATCTAAAAGAGGTCGTTCAAGATATCCTCTCCAAATACCGACT
CTATCATTGAGGAAGTAAGTTCGTCAGAAGAAGAAGACCATAATGTTATATACAGTAAGGGAAAAGGGTTTGCACACCCGG
TTTTGCAAACCAAAGGATTAATAGAGAATGGGTTGGACGAAAATGATGAAGAAGGGGACGACGAGTATGCGATTACACCCG
ACGGAGAATTTCAATCAAACCACAGTTTTCTAATGACGTTACCGACAAGCAGAACCATTTGCCAAGTGTGAAGGCAGTGG
CGACTAAACGTTTCGTTGAGCGAAGGTAGTAATTGGTCCAGTAGCTACCTGGATTTCGGATGGTAATCGACAGCGGATATCTT
CATTGCTAGTGGAGGATGGCGGAAATCCTACAGCGTACGTACCGGATAGCAGAATCGATGGAAAAAGAGACCAAAGAGTAC
TGTGAGGAAGGCAT
TAAGAAATGTGATTTTTCTTATATAAATGTATTACCTAAATAATGATCATCTATGAACATCATTAAGTTCAACTA
ATCTTATTGATAAAAAGTTCATTCAGTTATCCGACTGTGGCGGGAACATAGCGAGGCGGAACAATACACGGATTTTTTGTAG
CGCGATGAGAAGTAGCAACGCCTCTTGAGATAAATTATCGTCACCTTTTTTACAAAATTAATGAGGCAACAAGCTCAGAAA
TTAGAGTTATCTTTTTGTTCTATAAGCAAATGGGCATAGGAAACCTATATGTAAGTATGAATGAGATTAACAATTAATT
TGGAATGGTGAAGTCAATGTACTAGTGTGATCGATCCTTCATTTTTGATGAAAGGAAGTCCGAGAGAAATGGCGGTGCTA
CGAATAAGAGTGCCAAGGGAAACGTATTTAATTAATTATATGCCTTTTCATTTGGGGTAAAATTTCAAACCTCCTTTCTTTT
GACCCATTGAACGACAATGAGAAGTATTTCTGGTTTGAACATAATAACATGCCAATCCCATGGAATTATCCAGTTGGTGTT
TTGTTTGACGGCCTAGTTGAAAGGAGCACAAATTTATTACCTCATTGAGGACCAGGTAAAAGATGTGATTACCATTTTG
AGAATTCGTTTAGTCAAGGCGATTTCGTTACCACCAACTATAATTCCTATCACAGCAAGCAAAACGCAAGCGGAGAAGTTC
TGGTCCACCAATGGAACAAGTTTGTCTCATATTAATGGCTCCTCAAAGGGCATCATGTCCTTGTGAGTGAACGAATCT
CGAAAATTTTGGGGCAGTGTCTTACGAGGAATTTCCAAGATTTTGTGAAATTTCTAACAGATTAGTTCATCAAGACCG
CGACATATACCGCTCATCATTCAAACCTTAGAGCTTCAGGAGCTTCCGGAATATCACAACCAACTATCCGTTTGACTGGA
GTCAATCCTACATTGAAGGATGTCGAAGGTGATTTTTGAACGCTGAGGAAGGAATCAACGCCAATAATTTTCATGGTCATA
TGCCAGGGAATTGAAATTCCTT
59. >N forward primer
60. CGATACGAACCCGGCCATTA
61. >N reverse primer
62. TGGAACCCAGAACTTCTCCGC

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Onur Erk KAVLAK

Doğum Yeri: Adana

Doğum Tarihi: 05.09.1993

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde), İspanyolca (Orta seviye)

Eğitim Durumu

Lise: Piri Reis Anadolu Lisesi (2007-2011)

Lisans: Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik (2012-2017)

İş Tecrübesi

Kurumu: Max Planck Enstitüsü Evrimsel Biyoloji Bölümü, *'The fitness consequences of inbreeding and outcrossing on wild yeasts'*

Görevi: Proje Bursiyeri

Tarih: 11/2018- 05/2019

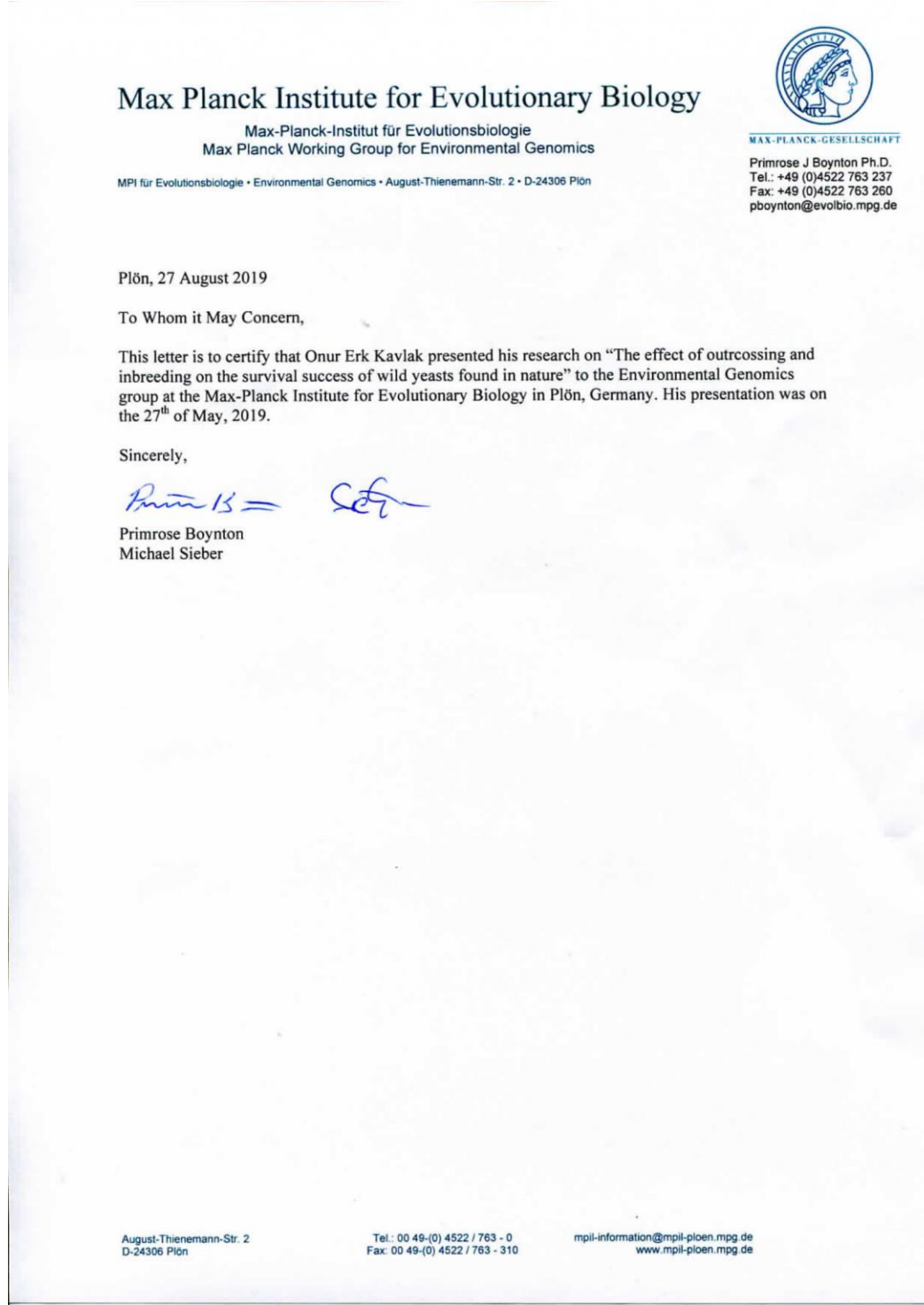
Kurumu: Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik, *'In-vitro Adaptation of Actinobacillus succinogenes to Weak Acid Stress for Improved yield'*

Görevi: Proje Öğrencisi

Tarih: 06/2016-06/2017

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

- Bu tez çalışması 27 Mayıs 2019 tarihinde Max Planck Enstitüsü Evrimsel Biyoloji Bölümünde sunulmuştur. İlgili belge aşağıdadır.



- 5-7 Ekim 2017 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresinde 'peer review' sisteminden geçerek '*A. succinogenes*'in (ATCC 55618), Ardışık Kesikli Reaktör Sistemi ve Uzun Süreli Kültür Yöntemi Kullanılarak Geliştirilmiş Biyokütle Verimi İçin Zayıf Asit Stresine In vitro Adaptasyonu' adıyla sunulmuş olan bir çalışmam bulunmaktadır. İlgili belgeler aşığıdadır.





05-07 Ekim

2017

**6. Ulusal
Ulusal Moleküler Biyoloji ve
Biyoteknoloji
Kongresi**

www.biyoloji.gen.tr

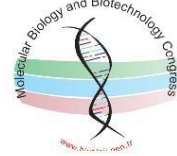
ÖZET KİTABI



Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi



6. ULUSAL
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE BİYOTEKNOLOJİ
KONGRESİ
05-07 Ekim 2017
www.biyoloji.gen.tr



Özet 83

***A. succinogenes*'in (ATCC 55618), Ardışık Kesikli Reaktör Sistemi ve Uzun Süreli Kültür Yöntemi Kullanılarak Geliştirilmiş Biyokütle Verimi İçin Zayıf Asit Stresine *In vitro* Adaptasyonu**

Onur Erk KAVLAK, Burcu ŞİRİN, Emrah NIKEREL
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Yeditepe Üniversitesi, Ataşehir, İstanbul
Sunum: Poster

Özet

Ardışık Kesikli Reaktör (AKR), mikroorganizmaların yinelenen çevresel koşullara adaptasyon sürecinin gözlemlenebilmesini sağlayan bir fermentasyon tekniğidir. Bu teknik, belirli zaman aralıklarında fermentasyon kültürünün taze, tercihen seçici besiyeri ortamı ile seyreltilmesi işlemine dayanır. Adaptasyon, seçici ortamda mikroorganizmaların büyüme kabiliyetine ve hızına göre gerçekleşir.

Actinobacillus succinogenes, çeşitli yenilenebilir, biyolojik tabanlı kimyasalların üretimi için bir başlangıç malzemesi olarak kullanılabilen süksinik asidin doğal üreticilerinden biridir. Zayıf asit stresi, mikrobiyelsüksinik asit üretiminde karşılaşılan, doğrudan mikroorganizma metabolizmasını etkileyip üretim verimi düşüren, önemli bir biyolojik darboğazdır. Zayıf asit stresinden dolayı hücreler büyüyemez, glikoz tüketimi azaldıkça süksinik asit üretimi de azalır. Bu durum, üretici koşullar altında zayıf asit stresine karşı daha yüksek direnç gösteren hücrelere olan ilgiyi artırmaktadır. Bu amaçla, süksinik asit verimini artırmak için, AKR tekniği kullanılarak geliştirme yapılmıştır. *Actinobacillus succinogenes* yaklaşık 1000 nesil boyunca kültürlenmiş, her nesilde artacak şekilde adaptasyon (daha yüksek büyüme ve asit üretim hızı ile şeker kullanım hızı) göstermiştir. Sonuçlarımız, kuşaklar boyunca *Actinobacillus succinogenes*'in, pH düşerken glikoz tüketimini, süksinik asit üretimini ve büyüme oranını arttırarak çevreye adapte olduğunu nicel biçimde göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Actinobacillus succinogenes*, *In vitro* adaptasyon, Seri ardışık reaktör, süksinik asit, Zayıf asit stresi

***In vitro* Adaptation of *A. succinogenes*(ATCC 55618) to Weak Acid Stress for Improved Biomass Yield, Using Sequential Batch Reactor (SBR) System and Prolonged Cultivation**

Abstract

Sequential batch reactor (SBR) is a fermentation technique that allows the microorganisms to observe the adaptation process to recurrent environmental conditions. This technique is based on the dilution of the fermentation culture with fresh, preferably selective medium, at specific time intervals. Adaptation occurs according to the growth ability and the rate of microorganisms in the selective environment.

Actinobacillus succinogenes is one of the natural producers of succinic acid which can be used as a starting material for the production of a variety of renewable, biologically based chemicals. Weak acid stress is an important biological bottleneck in microbial succinic acid production, directly affecting microbial metabolism and reducing production efficiency. Cells cannot grow because of weak acid stress, and succinic acid production decreases as glucose consumption decreases. This increases the concern for cells that are more resistant to weak acid stress under conditions of production. For this purpose, an improvement was made by using the SBR technique to increase succinic acid yield. *Actinobacillus succinogenes* has been cultured for about 1000 generations and has been shown to be adaptable (increased growth and acid production rate and sugar utilization rate) in each generation. Our results demonstrate quantitatively that during the generations, *Actinobacillus succinogenes* adapts to the environment by increasing glucose consumption, succinic acid production, and growth rate as the pH drops.

Keywords: *Actinobacillus succinogenes*, *In vitro* adaptation, Sequential batch reactor, Succinic acid, Weak acid stress

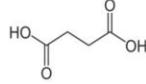
A.succinogenes'in, Seri Ardışık Reaktör Sistemi ve Uzun Süreli Kültür Yöntemi Kullanılarak Geliştirilmiş Biyokütle Verimi için Zayıf Asit Stresine *In vitro* Adaptasyonu

Onur Erk Kavlak, Burcu Şirin, Emrah Nikerel
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Yeditepe Üniversitesi, Ataşehir, İstanbul



1. GİRİŞ

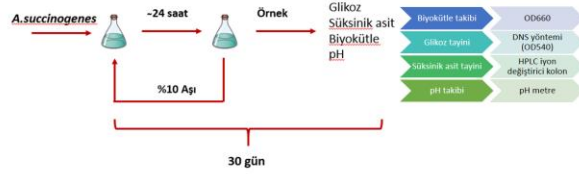
Süksinik asit aynı zamanda 1-4 bütandioik asit veya amber asit olarak bilinen, dört karbonlu bir dikarboksilik asittir. Son zamanlarda, endüstriyel alanda kimyasal yollarla üretilmesinin meydana getirdiği ekonomik ve çevresel sorunlar biyoteknolojik yollarla süksinik asit üretimine dikkatleri çekmiştir.[1]



Şekil 1. Süksinik asitin moleküler formülü[1]

2. YÖNTEM

Bu çalışmada, doğal bir süksinik asit üreticisi olan *Actinobacillus succinogenes*'in mikrobiyal süksinik asit üretiminde verimi artırma noktasında önemli bir dar boğaz olan zayıf asit stresine karşı *in vitro* adaptasyonu, ardışık kesikli reaktör sistemi ve uzun süreli kültür yöntemi kullanılarak amaçlanmıştır.



Şekil 4. SBR tekniği ile *A.succinogenes* fermentasyonu

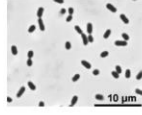
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Actinobacillus succinogenes üretiminde verimi artırmak amacıyla zayıf asit stresine karşı *in vitro* adaptasyonu yaklaşık 800 nesil SBR tekniği kullanılarak gözlemlenmiştir. **Adapte olan popülasyon, zayıf asit stresinde ata popülasyona göre daha fazla büyüme göstererek, daha fazla glikoz tüketmiştir. yüksek büyüme hızında asidik çevreye adapte olması SBR tekniği ile gözlemlenmiştir.**

Actinobacillus succinogenes(ATCC 55618), büyükbaş hayvanların rumeninden elde edilen kemoheterotrofik mikroorganizmadır. Süksinik asidin temel üreticilerinden biridir. Süksinik asit metabolizması karbon kaynağı ve ortamdaki karbon dioksit oranına göre ilerler. *A. succinogenes* karbondioksit ve farklı şeker molekülleri kullanılarak- yarım Krebs çemberine sahip olduklarından dolayı- süksinik asit üretirler. [2]



Şekil 2. Rumen [işkembe][3]



Şekil 3. *Actinobacillus succinogenes*[2]

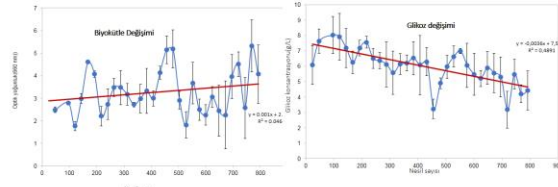
Zayıf asit stresi süksinik asit üretiminde karşılaşılan darboğazlardandır. Asit ortamı doğrudan *Actinobacillus succinogenes* metabolizmasını etkiler. Asit stresinden dolayı hücreler büyüyemez, glikoz tüketimi azaldıkça süksinik asit üretimi de azalır. Bu durum, üretici koşullar altında zayıf asit stresine karşı daha yüksek direnç gösteren hücrelere olan ilgiyi artırmaktadır.

Mikrobiyal adaptasyon, özellikle endüstriyel suşların fenotipik özelliklerini genetik müdahale olmaksızın geliştirmeyi hedefleyen bir laboratuvar yöntemidir. Uzun süreli kültür yöntemi de [seçilmiş özellikteki hücrelerin adaptasyon sürecini gözlemlemek için kullanılır.4]

Tablo 1. Mikrobiyal adaptasyonda kullanılan fermentasyon teknikleri

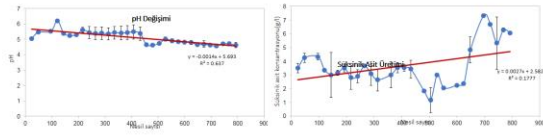
Sürekli karıştırılmı reaktör	Seri ardışık reaktör sistemi
Süstrata bağlı biyokütle verimini artırmak	Spesifik büyüme hızını artırmak
Hücre sürdürülebilirliği zor	Hücre sürdürülebilirliği kolay

Seri ardışık reaktör (SBR), mikroorganizmaların adaptif evrim sürecinin gözlemlenebilmesini sağlayan bir tekniktir. Belli zaman aralıklarında popülasyonun taze ortam ile seyreltilmesi işlemine dayanır. Seçilim, mikroorganizmaların büyüme kabiliyetine ve taze ortama hızlı tepki vermelerine göre gerçekleşir. [4]



Şekil 5. Biyokütle değişimi

Şekil 6. Ortamda kalan glikoz konsantrasyonu



Şekil 7. 24 saat sonu ortam pH

Şekil 8. Süksinik asit miktarı

4. KAYNAKÇA

- Cucalovic, A. ve ark. (2008). Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(6), 505-529.
- Guettler, M. V. (1999). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 207-216.
- Rumen Papillae. <https://www.fda.gov/animalveterinary/resourcesforyou/animalhealthliteracy/ucm255500.htm>
- Bachmann, H. ve ark. (2015). Evolutionary engineering to enhance starter culture performance in food fermentations. *Current opinion in biotechnology*, 32, 1-7.