

**KALORİK SINIRLAMANIN TATLI SU ROTİFERİ
(*Brachionus calyciflorus*)'NDE ISI STRES GEN
(HSP70) EKPREZYONU ve POPÜLASYON
YOĞUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİ**

Nilgün ÖZDEMİR

**Doktora Tezi
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Doç. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ
2009
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KALORİK SINIRLAMANIN TATLI SU ROTİFERİ (*Brachionus calyciflorus*)'NDE ISI STRES GEN (HSP70) EKPREZYONU ve POPÜLASYON YOĞUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİ

Nilgün ÖZDEMİR

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

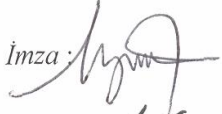
ERZURUM


2009


Her hakkı saklıdır


Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından Hızlı destek Proje kapsamında desteklenmiştir.

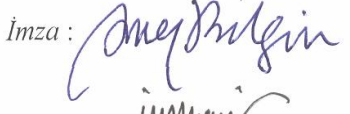
Doç. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ ve Doç. Dr. Ahmet Adem TEKİNAY danışmanlığında, Nilgün ÖZDEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma **12/05/2009** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

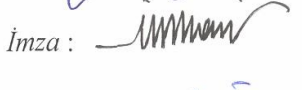
Başkan : Prof. Dr. Telat **YANIK**..... İmza : 


Üye : Doç. Dr. Abdulkadir **ÇİLTAŞ**..... İmza : 

Üye : Doç. Dr. A. Adem **TEKİNAY**..... İmza : 

Üye : Doç. Dr. Muhammed **ATAMANALP**..... İmza : 

Üye : Doç. Dr. Ö. Cevdet **BİLGİN**..... İmza : 

Üye : Doç. Dr. İlhami **GÜLÇİN**..... İmza : 

Üye : Doç. Dr. Şükrü **BEYDEMİR**..... İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ömer **AKBULUT**
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KALORİK SINIRLAMAMANIN TATLI SU ROTİFERİ (*Brachionus calyciflorus*)'NDE ISI STRES GEN (HSP70) EKSPRESYONU VE POPÜLASYON YOĞUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİ*

Nilgün ÖZDEMİR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ
Ortak Danışman: Doç. Dr. A. Adem TEKİNAY

Bu çalışmada, kalorik sınırlamanın (KS) tatlı su rotiferi (*Brachionus calyciflorus*)'nde HSP70 ekspresyonu ve popülasyon yoğunluğu üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen dizilim bilgilerinden HSP70 genine ait herhangi bir homoloji saptanamamış ve KS'nin bu genin ekspresyonu üzerine etkisi belirlenememiştir.

KS deneyleri 12, 24, 36, 48, 60, 72 saat aralıklarla $1,5 \times 10^6$ hücre/mL *Chlorella sp.* ile beslenen ve tamamen aç bırakılan rotifer gruplarından oluşturulmuştur. Uygulanan KS şartlarında en yüksek popülasyon yoğunluğu denemenin 5. günü itibariyle 12 saat aralıklarla beslenen grupta ($269 \pm 40,12$ birey mL⁻¹), en düşük yoğunluk ise 72 saat aralıklarla beslenen grup ile ($40,75 \pm 7,22$ birey mL⁻¹) tamamen aç bırakılan grupta elde edilmiştir ($15,0 \pm 0,816$ birey mL⁻¹). Popülasyon artış oranları (r) arasında en yüksek r değeri $0,608 \pm 0,73$ ile 12 saatte bir beslenen grupta kaydedilirken en düşük değer $-0,239 \pm 0,050$ ile tamamen aç bırakılan grupta elde edilmiştir. Deneme gruplarına ait tekrarlanan ölçümlerin varyans analiz sonuçlarına göre zaman ve zaman x grup interaksyonları $p < 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Deneme gruplarına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre gruplar istatistiksel olarak farklı çıkmıştır ($p < 0.05$). KS şartlarında tamamen aç bırakılan grupta maksimum ömür 26 gün iken 24, 36, 48, 60 ve 72 saat aralıklarla beslenen gruplarda sırasıyla 14, 15, 8, 8 ve 5 gün ve kontrol grubunda ise 11 gün olarak belirlenmiştir.

2009, 74 sayfa

Anahtar Kelimeler: Rotifer, *Brachionus calyciflorus*, Kalorik sınırlama, Isı stres proteinleri, HSP70, Popülasyon yoğunluğu

* Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından Hızlı destek Proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE EFFECTS OF CALORIC RESTRICTION ON THE HEAT SHOCK PROTEIN (HSP70) AND POPULATION DENSITY OF FRESH WATER ROTIFER (*Brachionus calyciflorus*)*

Nilgün ÖZDEMİR

Atatürk University
Graduate School of Agriculture Faculty
Department of Fishery Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ
Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr.A. Adem TEKİNAY

The effect of caloric restriction (CR) on HSP70 expression and population density in freshwater rotifer (*Brachionus calyciflorus*) was investigated in this study. There wasn't any homology observed between hold sequence and HSP70 gene and the effect of CR on the expression of this gene wasn't determined.

CR groups consisted of 12, 24, 36, 48, 60, 72 hour intervals fed with 1.5×10^6 cells/mL *Chlorella* sp and starved rotifers. Under CR conditions, highest population density was observed in the group fed at 12-hour intervals (269 ± 40.12 individual mL^{-1}), while the lowest population densities were observed in the group fed at 72-hour intervals and in the group that starved (40.75 ± 7.22 ind. mL^{-1} and $15 \pm 0,816$ ind. mL^{-1} , respectively) at day 5 of the experiment. Highest population growth rate (r) was recorded in the group fed at 12-hour intervals (0.608 ± 0.73), the lowest r was recorded in starved group ($-0,239 \pm 0,050$). The variance analysis of the repeated measurements tests were showed that time and time x group interactions were found to be statistically significant ($p < 0.01$). The Duncan test have showed that the groups were statistically different ($p < 0.05$). Under CR conditions, maximum lifespan of starved group was recorded as 26 days whereas it was 14, 15, 8, 8 and 5 days in groups fed at 24, 36, 48, 60 and 72-hour intervals, respectively, and 11 days in the control group.

2009, 74 pages

Keywords: Rotifera, *Brachionus calyciflorus*, Caloric restriction, Heat shock proteins, HSP70, Population density

* This study was supported with Short-Term R&D Funding Programme by TÜBİTAK-TOVAG.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Sayın Doç. Dr. Abdulkadir ÇILTAŞ, Sayın Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN ve Sayın Doç. Dr.A. Adem TEKİNAY'a minnetlerimi sunarım.

Çalışmayı destekleyen TUBİTAK ve Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Tez izleme komite üyelerinden Sayın Doç. Dr. Ö. Cevdet BİLGİN ve Sayın Doç. Dr. Muhammed ATAMANALP'e teşekkür ederim.

Elemanı olmaktan gurur duyduğum Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul ve Sayın Doç. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve tüm personele, Ziraat Fakültesi Dekanlığına ve idari personeline ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Engin tecrübelerinden yararlandığım Su Ürünleri Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Telat YANIK'a, Su Ürünleri Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. E. Mahmut KOCAMAN ve Sayın Doç. Dr. H. İbrahim HALİLOĞLU'na, istatistik analizlerde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Nurinisa ESENBUĞA'ya, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Serap SALER'e, Postdam Üniversitesi Ekoloji ve Ekosistem Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Dr. Guntram Weithoff'a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmaları esnasında özverili yardımlarından dolayı Sayın Gıda Yük. Müh. Engin GÜNDOĞDU, Sayın Ars. Gor. Ercüment AKSAKAL ve Sayın Ars. Gor. Gonca ALAK'a, çalışma boyunca manevi desteklerini esirgemeyen dostlarım Sayın Okt. Nuray DEMİR, Sayın Meltem HOPOĞLU, Sayın Kimya Yük. Müh. Julide ERKMEN ve Sayın Kimya Yük. Müh. Esra EDECAN'a ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında dualarını eksik etmeyen anne ve babama, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli eşim Sayın Av. Fatih ÖZDEMİR'e ve tüm aileme minnettarlığımı bildiririm.

Bu tezi rahatsızlığına rağmen annesine hiç yük olmayan ve bana şans getirdiğine inandığım, oğlum A. Faruk'a ithaf ediyorum.

Nilgün ÖZDEMİR

Mayıs, 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Araştırma ünitesi	14
3.1.2. Su	15
3.1.3. Rotifer	15
3.1.4. Besin	15
3.1.5. Primerler.....	16
3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler.....	16
3.1.6.a. Total RNA ekstraksiyonunda kullanılan kimyasallar	16
3.1.6.b. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar	17
3.1.6.c. PCR uygulamasında kullanılan kimyasallar.....	17
3.1.6.d. Elektroforez uygulamasında kullanılan kimyasallar.....	17
3.1.6.e. Klonlama için katı ve sıvı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar	17
3.1.6.f. Klonlamada kullanılan kimyasallar.....	17
3.1.7. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	18
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Mikroalg üretimi.....	18
3.2.2. Rotifer üretimi	21
3.2.3. Rotiferlerin hasadı	22
3.2.4. Fitoplankton sayımı	23
3.2.5. Rotifer sayımı	23
3.2.6. Total RNA izolasyonu	24
3.2.7. RNA'nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü.....	24
3.2.8. cDNA kütüphanesinin hazırlanması	25
3.2.9. Primer dizaynı	26
3.2.10. PCR uygulaması	27
3.2.10.1. Primer Tm sıcaklığının hesaplanması	27
3.2.10.2. PCR programı	27
3.2.10.3. PCR solüsyonu	28
3.2.11. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez kontrolü	28
3.2.12. Gen klonlanması için katı ve sıvı besiyerinin hazırlanması.....	29
3.2.13. Genin vektöre klonlanması.....	30
3.2.14. Kalorik sınırlandırma (KS) deney dizaynı	32
3.2.15. İstatistiksel analizler	34

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	35
4.1. Rotifer Üretimine Ait Sonuęlar	35
4.2. HSP70 Gen Diziliminin Belirlenmesine Yönelik Bulgular	37
4.2.1. Total RNA izolasyon sonuęları	37
4.2.2. cDNA kütüphanesine yönelik sonuęlar	39
4.2.3. Genin vektöre klonlanmasına yönelik sonuęlar	41
4.2.4. Gen diziliminin ait sonuęlar	45
4.3. KS'nin Popölasyon Yoğunluğuna Etkisine Yönelik Sonuęlar.....	52
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat Derece
gr	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
sn	Saniye
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol

Kısaltmalar

AP	Adaptör Primer
AUAP	Abridged Universal Amplification Primer
BFB	Brom Fenol Mavisı
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Dietil pirokarbonat
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
ddH ₂ O	Double Distile H ₂ O
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DS	Diyetsel Sınırlama
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit disodyum tuzu
EtBr	Etidyum Bromür

F	Forward
GRP	Glukoz Regüle Protein
GSP	Gene Spesifik Primer
HSC	Isı Stres (Cognate) Protein
HSP	Isı Stres Protein
IGF	İnsülin/insülin-benzeri Büyüme Faktörü
IPTG	İsopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
KS	Kalorik Sınırlama
LB	Luria Bertani
MOPS	Morfolinopropansülfonik asit
mRNA	Haberci RNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Reverse
RACE	Random Amplification cDNA End
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
rot	Rotifer
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptaz
SD	Serbestlik Derecesi
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
UV	Ultraviöle
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopiranosid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.2. Tatlı Su Rotiferinin beslenmesinde kullanılan mikroalg (<i>Chlorella sp.</i>)	16
Şekil 3.3. Mikroalgin tüplere ekimi	19
Şekil 3.4. Mikroalg üretim sistemi	20
Şekil 3.5. Rotifer üretim sistemi	22
Şekil 3.6. Rotifer hasadında kullanılan süzgeç (Aquatik-Eko Sistem, Florida, USA) ...	23
Şekil 3.7. 3' RACE sisteminin özeti (İnvitrogen)	25
Şekil 3.8. 96'lık plate	33
Şekil 4.1. <i>B. calyciflorus</i> 'a ait L ve S tipi yumurta.....	36
Şekil 4.2. Üretim aşamasında görüntülenen 2 ve 12 yumurtalı L tipi Tatlı Su Rotiferi (<i>B. calyciflorus</i>).....	37
Şekil 4.3. rRNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	38
Şekil 4.4. PCR ürününün %1'lik agaroz jel elektroforez'de ayrıştırılması sonucu oluşan cDNA bandı (EtBr ile boyanarak).....	40
Şekil 4.5. Klonlama işlemi sonrası elde edilen mavi-beyaz koloniler	42
Şekil 4.6. Vektöre klonlanmış genin kontrolüne yönelik yapılan elektroforez görüntüsü	43
Şekil 4.7. Vektor izolasyon kitiyle bakteriden izole edilen rekombinant DNA elektroforez görüntüsü.....	44
Şekil 4.8. Vektöre ait primerlerle genin kontrolüne yönelik yapılan elektroforez görüntüsü	45
Şekil 4.9. Dizileme bilgisine ait pik görüntüsü (18 Nolu Örnek).....	51
Şekil 4.10. KS şartlarında popülasyon yoğunluğunda gözlenen değişim	54
Şekil 4.11. Uygulanan KS şartlarında hayatta kalan bireylere ait eğri.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.2. Mikroalg Üretiminde Kullanılan Bold 1NV Ortamı	20
Çizelge 3.3. HSP70'in PCR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin baz dizilimi ...	26
Çizelge 3.4. Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı	28
Çizelge 3.5. Katı besiyer içeriği	29
Çizelge 3.6. Sıvı besiyer (LB) içeriği	29
Çizelge 3.7. Plazmit izolasyon kit içeriği (Sigma)	31
Çizelge 3.8. KS deneylerinde kullanılan EPA ortamı	33
Çizelge 4.1. Klonlanan örneklerin baz dizilimi.....	46
Çizelge 4.1. (devam)	47
Çizelge 4.1. (devam)	48
Çizelge 4.1. (devam)	49
Çizelge 4.2. KS şartlarında elde edilen max. popülasyon yoğunluğu ve pik günleri	53
Çizelge 4.3. Bazı rotifer türlerinin besin konsantrasyonuna bağlı olarak değişen popülasyon yoğunlukları (birey/mL ⁻¹)	55
Çizelge 4.5. Brachionidae familyasına ait bazı rotifer türlerinin popülasyon artış oranları (r)	58
Çizelge 4.6. Uygulanan KS şartlarında deneme gruplarına ait tekrarlanan deneylerin varyans analiz sonuçları	59
Çizelge 4.7. Uygulanan KS şartlarında deneme gruplarına ait ortalama ve duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları (t=26)	59
Çizelge 4.8. KS şartlarında <i>B. calyciflorus</i> 'a ait maksimum ve ortalama ömür uzunlukları.....	60
Çizelge 4.9. KS şartlarında <i>B. calyciflorus</i> üreme tepkisi.....	64

1. GİRİŞ

Karasal ve sucul organizmaların pek çoğu yaşadıkları çevrede sürekli değişen bir besin ortamı ile karşı karşıyadırlar. Hem bireysel hem de popülasyon seviyesinde organizmaların besin azlığı ya da yokluğu ile nasıl başa çıktıkları ve bu olumsuz şartları nasıl atlatabildiklerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu konudaki yaygın olgu, organizmaların besin ortamının bozulmasıyla ya ömür uzunluklarını ya da üremelerini artırdıkları şeklindedir (Ricci and Perletti 2006; Weithoff 2007). Bu nedenle beslenmenin popülasyon yoğunluğunu nasıl etkilediği ekolojideki en önemli konulardan biridir (Yoshinaga *et al.* 2003 a,b).

Popülasyon dinamiği çalışmaları genel olarak hayvanlar üzerine odaklanmış ve popülasyon büyüklüğünü belirleyen faktörlerden biri olan beslenmenin etkisini açıklamada iklimsel ve biyolojik hipotezler öne sürülmüştür. Fakat Yoshinaga *et al.* (2003 a) bu iki hipotezin de tek başına yeterli olamayacağını bildirmiştir.

Teoride organizmalar, normal şartlar altında besin kaynaklarını hayatta kalma, büyüme ve üreme olmak üzere üç amaç için kullanmaktadırlar (Ricci and Perletti 2006). Bununla birlikte Harrison (1989) ve Holliday (1989)'a göre popülasyon artışı esnasında besin azlığı ya da yokluğuna adapte olma yeteneği artarak üreme geciktirilmekte ve hayatta kalma sağlanmaktadır (Koubova and Guarente 2006).

Ekolojide hayvanların ömürlerini uzatmaları, besin azlığını tolere ederek şartlar düzeldiğinde yeniden üreyebilmek için geliştirdikleri bir stratejidir ve besin şartlarındaki bu durum diyetsel sınırlandırma olarak adlandırılmaktadır (Weithoff 2007).

Diyetsel sınırlandırma (DS) aslında yetersiz beslenmeye neden olmayacak şekilde düşük kalorili bir beslenme şekli (Koubova and Guarente 2006) olduğundan kalorik

sınırlandırma (KS) olarak da tanımlanabilmektedir (Astagimath and Rao 2004; Walker *et al.* 2005).

Yaklaşık 70 yıl önce McCay *et al.* (1935) KS gibi toplam gıda alımındaki azalmanın denek farelerinin ortalama ve maksimum ömürlerini önemli bir şekilde uzattığını göstermiştir. O yıldan bu yana benzer çalışmalarla McCay'in gözlemleri başarılı bir şekilde tekrar edilerek KS'nin ömür uzunluğu, dolayısıyla popülasyon üzerine etkisi maya, rotifer, su piresi, nematod, meyve sineği, örümcek, sıçan ve fareler gibi kısa ömürlü organizmalar üzerinde kanıtlanmıştır (Lane *et al.* 2002; Masoro 2002).

Diğer taraftan deneysel bir manipülasyon olan KS'nin (Heydari *et al.* 1996) yaşla birlikte baş gösteren patolojik değişimleri ve hastalıkların tekrarlanma oranını azalttığı veya geciktirdiği (Yu *et al.* 1982; Weindruch and Walford 1988; Masoro 1988; Masoro *et al.* 1991; Masoro 2002; Lane *et al.* 2002), yaşlanmayı geciktirerek hayatta kalma süresini artırdığı bildirilmektedir (Masoro 1985, 1988; Yu *et al.* 1985; Kubo *et al.* 1987).

Ayrıca DS metabolik enzimlerin etkinliğini artırarak gıdadan yararlanma yeteneğini geliştirmekte, çoğu ilaç ve kimyasal maddelerin neden olduğu toksisite ve ölümleri azaltmada doku tamirini stimüle ederek de önemli bir rol oynamaktadır (Astagimath and Rao 2004). Bu nedenlerle KS, ömür uzunluğu ve popülasyon dinamiği gibi konuları moleküler düzeyde çalışan araştırmacılar için güçlü bir araç olarak görülmektedir (Heydari *et al.* 1996).

KS'nin moleküler mekanizmasını açıklamada çeşitli hipotezler öne sürülmüştür (Masoro 1988, 1990; Heydari and Richardson 1992). Başlangıçta McCay ve Crowell (1934) KS'nin büyümeyi ve gelişmeyi geciktirmek suretiyle ömür uzunluğunu ya da hayatta kalma süresini etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte Yu *et al.* (1985), Weindruch ve Walford (1988) tarafından yapılan çalışmalar sıçan ve farelerde ergin bireylere, gelişim ve olgunlaşma sonrası KS uygulamasının da hem ortalama hem de maksimum hayatta kalma sürelerini artırdığını göstermiştir. Berg ve Simms (1960)

KS'li diyetle beslenen sıçanların hayatta kalma sürelerinin uzamasının fizyolojik temelli olduğunu ve bunun vücut yağı içeriğinin azalmasından kaynaklandığını bildirmiştir. Bununla birlikte Bertrand *et al.* (1980) KS'li diyetle beslenen sıçanların vücut yağı içeriği ve ömür uzunlukları arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Oysa Harrison *et al.* (1984) vücut yağı içeriği normal farelerden 2-3 kat daha fazla olan ve KS'li diyetle beslenen obez farelerin KS'li diyet ile beslenen normal farelerden daha uzun yaşadıklarını bildirmişlerdir. Bu yüzden KS mekanizmasında vücut yağının önemli bir faktör olmadığı düşünülmektedir. Diğer bir hipotez ise KS'nin sıçanlarda metabolik hızı azaltarak hayatta kalma süresini artırdığına yöneliktir (Sacher 1977). Bu hipotez 1980'li yıllarda kabul görse de daha sonra yapılan araştırmalarda KS'nin metabolik hızı azaltmadığı görülmüştür (McCarter and Masoro 1985; McCarter and McGee 1989).

KS'nin yararlarına rağmen halen mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Fakat bu konuda ortaya atılan en önemli teorilerden biri yaşlanma ile baş gösteren ve solunum esnasında üretilen reaktif oksijen türleri (ROS)'nin meydana getirdiği kümülatif oksidatif hasar ve protein döngüsünde ki azalmadır. Bu proseste farklı türlere ait karaciğer, beynin bazı bölgeleri, kalp ve iskelet kası gibi çeşitli organ ve dokularda yapılan araştırmalarda özellikle daha ileri yaşlarda KS'nin proteinlerin oksidatif hasarını önlemede oldukça etkili olduğu görülmüştür (Colotti *et al.* 2005). Maillard hipotezine göre organizma yaşlandıkça dokularda akümüle olan gliksidasyon ürünlerinin proteinlerin kimyasal modifikasyonuna neden olduğu ve DS'nin protein döngüsünü hızlandırmak suretiyle söz konusu akümülyasyonu yavaşlatarak etkisini gösterdiği düşünülmektedir (Cefalu *et al.* 1995; Fisher 2004). Gerçekte de okside proteinlerin yaşa bağlı akümülyasyonu KS ile azalmaktadır (Aksenova *et al.* 1998; Dhahbi *et al.* 1999). Örneğin fare iskelet kas sisteminde yapılan mikroarray çalışmaları, KS esnasında protein sentezinde artış ve degradasyon olduğunu göstermiştir (Lee *et al.* 1999).

Diğer taraftan DS uygulanan hayvanlarda artan antioksidant enzimlerin ROS'un ayrışmasını katalizleyerek oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Kaneko *et al.* 2005). Örneğin *Drosophila* (Parkes *et al.* 1998) ve sabit fazdaki maya hücrelerinde (Longo *et*

al. 1999) süperoksit dismutaz (SOD) enziminin fazla miktarda eksprese edilmesiyle ROS azalmış ve bu canlılarda ömür uzunluğu artmıştır. Bu durum KS'nin metabolizmayı yavaşlatmak suretiyle ROS üretimini azaltması şeklinde açıklanmaktadır. Oysa McCarter ve Masoro (1985) KS uygulanan sıçanlarda metabolik oranın yavaşlamadığını bildirmiştir.

Diğer yandan KS'nin strese karşı kontrol mekanizması olan ısı stres proteinlerinin (HSP) sentezini indüklediği (Astagimath and Rao 2004) ve hayatta kalma süresini uzattığı ileri sürülmektedir (Heydari *et al.* 1993, 1996; Masoro 2000; Fisher 2004). Bakterilerden insanlara kadar hemen hemen tüm organizmalarda bulunan stres proteinleri, ısı stresine maruz kalma sonucunda indüklenen bir grup proteindir. Fakat zamanla bu proteinlerin sadece ısıdan değil başka faktörler (etanol, amino asit analogları, ağır metaller, serbest radikaller vb.) tarafından da indüklendiği görülmüştür (Yoshinaga *et al.* 2003 a). Isı stres proteinleri sayı ve miktar olarak organizmadan organizmaya hatta bir organizmada hücre tipleri arasında dahi farklılık göstermektedir (Craig 1985). Bununla birlikte HSP ailesine ait moleküler büyüklüğü 15-104 kDa arasında değişen bu proteinleri tüm organizmalar sentezlemektedirler. Günümüzde ısı stres proteinleri ailesini oluşturan en az dört grup gen olduğu bilinmektedir. Bunlardan biri strese maruz kalmamış hücrelerde çok düşük seviyede bulunan ve hipertermia ile seviyesi ani bir şekilde yükselen HSP70; diğeri sadece ısı ile hafif bir şekilde indüklenen HSC70 (HSP72 veya HSC73); bir diğeri glukoz yokluğunda sentezlenen GRP78 ve mitokondride bulunan GRP75'dir (Mizzen *et al.* 1989).

Isı stres proteinleri ailesinin en bilinen üyesi HSP70'dir ve HSP70 hipertermia, ağır metal kirliliği, beslenme gibi biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı hücreyi korumada ve ömür uzunluğunu ayarlama da önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra çevresel faktörlerle indüklenen stres proteinleri, olgunlaşmamış ve denatüre proteinlerin ayrışımına da katılmaktadır (Kaneko *et al.* 2002). Yapılan çalışmalar strese maruz kalan hücre hassasiyetinin HSP70 seviyesinin artması yada azalmasıyla değiştiğini göstermiştir (Iwama *et al.* 1998). Örneğin *Saccharomyces cerevisiae* mayasında HSP70'in öldürücü olmayan sıcaklıkta ömür uzunluğuna etkili proteinlerden

biri olduğu düşünölmektedir (Shama *et al.* 1998). Dahası ısı şoku ile transgenik *D. melanogaster*'de HSP70 gen ekspresyonu arttığı ve doğal tiplerine nazaran %30 daha uzun yaşadığı görölmüştür (Tatar *et al.* 1997). Buna ilaveten Ehrenfried *et al.* (1996) akut KS'nin fare bağırsağında HSP70 mRNA seviyesini artırarak yaşlanmanın zararlı etkilerini azalttığını ve ömrü uzattığını bildirmişlerdir.

KS üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan meyve sineği, nematod, fare ve maya gibi organizmaların yanı sıra laboratuvar şartları altında kültürlerinin uygunluğu, rejenerasyon aralığının kısa olması ve kısa ömürlerinden dolayı rotiferler en kullanışlı organizmalardan biridir. Ayrıca yetiştiricilikte özellikle de deniz balığı larvası kültürü için vazgeçilmez bir canlı yemdir. Rotiferlerin ömür uzunluğunun ve dolayısıyla popölasyon yoğunluklarının çeşitli muamelelerle (DS, Vitamin E, nifedipin v.s.) çarpıcı bir şekilde değıştiğı görölmüştür. Örneğin çeşitli besin seviyelerinin rotiferde (*Brachionus plicatilis*) üremenin baskılanması sonucu ömür uzunluklarını artırarak popölasyon yoğunluklarını değıştirdiğı görölmüştür. (Yoshinaga *et al.* 2000). Yine DS şartlarında rotiferin (*Asplanchna brightwelli*) ömür uzunluğunun önemli bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Verdone-Smith and Enesco 1982).

Ayrıca *B. plicatilis* kısıtlı besin ortamında ürediğinde yavrularının açlığa daha dayanıklı olduğı tespit edilmiş ve böylesi bir ortamın yavru kalitesini artırdığı sonucuna varılmıştır (Yoshinaga *et al.* 2003 b).

Sonuç itibariyle KS, ortalama ve maksimum ömür uzunluğunu artırmakta, oksidatif stresi azaltmakta, protein metabolizmasının yavaşlamasını engellemekte, çekirdek DNA hasarını önlemede hücrel koruma fonksiyonunu artırmakta ve yaşlanmayla birlikte HSP seviyesinde meydana gelen kısmi azalmayı engellemektedir (Colotti *et al.* 2005).

Bu çalışma ile tatlı su rotiferinin (*Brachionus calyciflorus*) KS şartlarında popölasyon yoğunluğunun ve HSP70 gen ekspresyonunun nasıl etkilendiğı saptanmaya çalışılarak, rotifer kültürüne katkıda bulunulması ve yetiştiriciliğinde sürdürülebilirliğin sağlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Verdone-Smith ve Enesco (1982) farklı sıcaklıkların ve diyetsel sınırlandırmanın rotifer (*Asplanchna brightwelli*)'nin ömür uzunluğu, üreme döngüsü ve yumurta verimliliği üzerine etkisini inceledikleri araştırmalarında çevresel sıcaklık azaldıkça ortalama ömür uzunluğunun ve üreme siklüsünün başlama-bitiş zamanlarının değiştiğini gözlemlemişlerdir. Diyetsel sınırlandırma deneyleri ise 12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat aralıklarla yemleme yapılarak uygulanmıştır. Özellikle 12, 24 ve 36 saat aralıklarla yapılan diyetsel sınırlama hem ortalama ömür uzunluğunu hem de üreme periyodunu artırmış, 48, 60 ve 72 saat aralıkla yapılan sınırlama ortalama ömürünü kısaltmıştır. Sonuç olarak rotifer gibi kısa ömürlü türlerde hem sıcaklığın hem de diyetsel sınırlamanın yaşama oranını etkileyebileceğini ve üreme periyodunun uzatılarak yaşlanmanın geciktirilebileceğini savunmuşlardır.

Heydari *et al.* (1993) genç (4-7 aylık) ve yaşlı (22-28 aylık) Fischer F344 sıçanlarının erkek bireylerini kalorik olarak sınırlandırılmış (ad libitum diyetin %60'ı) diyetle yemleyip 42,5°C'de 30 dk ısı stresine maruz bıraktıktan sonra karaciğer hücrelerindeki HSP70 ekspresyonuna bakmışlardır. Deneylerinde yaşlı farelerden izole edilen karaciğer hücrelerinde ısı stresi ile HSP70 sentezi ve mRNA seviyesinin genç farelerden izole edilen karaciğer hücrelerinden %40-50 oranında daha düşük çıktığını görmüşlerdir. Esasen genç/yetişkin ve yaşlı farelerden izole edilen karaciğer hücrelerinin ısı stresine karşı HSP70'i eksprese ettiklerini bu nedenle HSP70'in indüklenmesinde yaşa bağlı azalışın nedeninin ısı stresine tepki göstermeyen hücrelerin yaşa bağlı akümülyasyonu olmayıp, HSP70 transkripsiyonundaki gerilemeden ortaya çıktığını bulmuşlardır. Diğer taraftan HSP70 ekspresyonunun yaşa bağlı azalışı kalorik sınırlandırma ile ters etki yapmıştır. Örneğin HSP70 sentezi, mRNA seviyesi ve nükleer transkripsiyon indüksiyonu kalorik olarak sınırlandırılmış diyetle beslenen yaşlı farelerden izole edilen karaciğer hücrelerinde ad libitum diyetle beslenen yaşlı farelerinkinden daha yüksek çıkmıştır. Karaciğer hücrelerinin hipertermiye tepkisi ve HSP70 ekspresyonundaki azalma önemli bir şekilde yaşla ilgili olduğunu ve bu azalmanın transkripsiyonel seviyede meydana geldiğini, buna ilaveten yaşlanmayı

geciktiren kalorik sınırlamanın karaciğer hücrelerinde HSP70 transkripsiyonunun indüklenmesinde yaşa bağlı azalmayla ters etki yaptığını bildirmişlerdir.

Ehrenfried *et al.* (1996) kalorik sınırlamanın (KS), hem akut hem de kronik bir şekilde, ısı şok protein 70 (HSP70)'in bağırsakta ki ekspresyonunu değiştirip değiştirmediğini iki farklı deneyle fareler üzerinde incelemişlerdir. İlk deneylerinde 4 aylık 3 grup fareyi 6, 24 ve 48 saat aralıklarla besledikten sonra, 3 fareyi de herhangi bir muameleye tabi tutmadan kontrol grubu olarak öldürmüşlerdir. Mideleri alınarak HSP70 gen ekspresyonu için RNA ekstrakte edilmiştir. İkinci deneyde ise 22-26 aylık 6 grup yaşlı fareler 8 hafta süreyle ad libitum (AL) ve KS diyetle (ad libitum diyetin %60'ı) beslendikten sonra öldürülmüş ve HSP70 gen ekspresyonunu belirlemek üzere mide ve on iki parmak bağırsağından RNA ekstrakte edilmiştir. İlk deneyde HSP70 mRNA seviyesi 48 saat boyunca beslenen fare midesinde 6 ve 24 saat beslenenlere göre yaklaşık 3 kat artış göstermiştir. İkinci deneyde ise HSP70 mRNA seviyesi KS diyetle beslenen yaşlı farelerin hem mide hem de on iki parmak bağırsağında AL diyetle beslenenlere göre önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Böylece hem aç bırakılmış hem de KS diyetle beslenen genç ve yaşlı farelerin bağırsaklarında artan HSP70 mRNA seviyesinin hücre içi yararlı bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir.

Colotti *et al.* (2005) kalorik olarak sınırlandırılmış (toplam diyetin %60'ı) iki farklı diyetin genç (3 aylık) ve yaşlı (24 aylık) sıçanların kalp dokusunda protein karbonil ve HSP seviyeleri üzerine etkisini inceledikleri araştırmalarında yaşlanmanın kalbin sol ve sağ ventriküllerinde ki HSP27, HSP60, HSP72 and HSC70 seviyelerini önemli oranda azalttığını ve sonuç olarak kalorik sınırlamanın sıçanlarda ömür uzunluğunu belirlemede anahtar rol oynayabileceğini göstermişlerdir.

Kirk (2001) diyetsel sınırlandırmanın (DS) etkisini kantitatif olarak küçük çok hücreli sucül hayvanlar olan rotifer (*Brachionus calyciflorus* ve *Synchaeta pectinata*) türünde incelemiştir. Çalışmasında türlerin DS'ye karşı olan davranışlarını araştırmak ve DS ile ilgili evrimsel hipotezleri test etmek için orijinal verilerle temeli ekolojik literatürlere dayanan ve farklı rotifer türlerini esas alan önceki verileri karşılaştırmıştır. Pek çok

türün ortalama, maksimum ömür uzunluğu, üreme ömrü, ölüm oranı ikilenme zamanı ve başlangıç ölüm oranını artırarak DS'ye tepki verdiklerini bildirmektedir. Fakat orijinal verilerinde tür içi karşılaştırmalarda DS'ye verilen tepkide ne üreme ömrü, ne ilk üreme yaşı ne de total üreme arasında tahmin edilen korelasyonu gözleyememiştir. Bununla birlikte türlerin kronik DS'ye olan tepkilerinin üremeleriyle ilişkili olduğunu öyle ki kısa dönemli açlık periyodu sırasında üremelerini azaltan türlerin ömürlerini uzattıkları, DS şartlarında üremeye devam eden türlerin aç kalmaları halinde ömürlerinin kısaldığını bildirmiştir.

Xi *et al.* (2001a) *Brachionus calyciflorus* dişi tiplerinin (amiktik, döllenmemiş miktik ve döllenmiş miktik) hayat sıklusları üzerine 25°C'de 4 farklı fitoplankton (*Scenedesmus obliquus*) konsantrasyonunun (1,5, 3, 6 ve 9×10^6 hücre/mL⁻¹) etkisini incelemiştir. Grupların tümünde döllenmemiş miktik dişilerin juvenil periyodunun 9×10^6 hücre mL⁻¹ gıda konsantrasyonunda en uzun değere sahip olduğunu, hem gıda konsantrasyonunun hem de dişi tiplerinin üreme periyodunu ve toplam yumurta sayısını önemli bir şekilde etkilediğini bildirmiştir. Bununla birlikte gıda seviyesi ve dişi tipi arasında önemli bir interaksiyon bulunamamıştır. Ayrıca 3 tip dişi arasında döllenmemiş miktik dişiler tarafından üretilen yumurta sayısının döllenmiş miktik dişilerinkinden daha fazla olduğunu gözlemlemiştir.

Ayrıca 0,1 mg mL⁻¹ gıda konsantrasyonunda ve 27°C'de iki farklı alg tipiyle (*Chlorella pyrenoidosa* Chick ve *Scenedesmus obliquus* Kütz) beslenen *Brachionus calyciflorus* amiktik, döllenmemiş miktik ve döllenmiş miktik dişi tiplerinden *Chlorella pyrenoidosa* ile beslenen amiktik dişilerin juvenil periyodunun önemli bir şekilde kısaldığı, döllenmemiş miktik dişilerde ise daha uzun olduğu bildirilmiştir (Xi *et al.* 2001b). Aynı çalışmada amiktik dişilerin verdiği yumurta sayısı *Chlorella pyrenoidosa* ile beslenen grupta daha yüksek bulunmuş, alg tipinin üreme periyodu ve ömür uzunluğu üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Sonuç itibariyle amiktik, döllenmemiş miktik ve miktik dişilerin hayat sıkluslarını tanıtan yumurta verimliliğinin deney sıcaklığına, gıda tipine ve konsantrasyonuna ve rotifer suşuna bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Sarma ve Nandini (2001a) farklı gıda seviyelerinin rotifer türleri üzerindeki etkisinde demografik ve popülasyon büyüklüğü çalışmalarının birlikte ele alınması gerektiğini savunmuşlardır. Bu amaç doğrultusunda *Brachionus variabilis*'i 25°C'de, pH 7,5 ve 12:12 ışık/karanlık foto periyot şartları altında *Chlorella*'nın 5 farklı konsantrasyonuyla (0,25, 0,5, 1, 2 ve 4×10^6 hücre mL^{-1}) beslemiş ve demografik ve popülasyon özelliklerini belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmada gıda yoğunluğunun tahmini yaşam süresi, ortalama ömür, brüt ve net üreme oranı, generasyon zamanı ve popülasyon büyüme oranı üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Buna göre yoğunluğa bağlı olarak ortalama ömür 3-6 gün, net üreme oranı 2-7 neonat/dişi/gün, popülasyon artış oranı günlük 0,14-0,35 arasında değişmiştir. Bu tür için en yüksek üreme oranı, ortalama ömür ve tahmini yaşam süresinin 1×10^6 ile 2×10^6 *Chlorella* yoğunluğunda gerçekleştiğini ve artan *Chlorella* yoğunluğunun rotifer (*B. variabilis*)'de yumurta sayısını azalttığını bildirmişlerdir.

Diğer taraftan Halbach (1973)'e göre sıcaklık, rotifer gibi ektotermik organizmalarda metabolizmayı etkilemekte, özellikle yüksek sıcaklık üreme yaşını, kuluçka süresini ve üreme oranını hızlandırırken ömrü kısaltmaktadır (Lucía Pavón-Meza *et al.* 2005). Dolayısıyla *Brachionus*'ların da dahil olduğu birkaç rotifer cinsinin yaşam özellikleri incelenirken gıda ve sıcaklığın birlikte düşünülmesi gerekmektedir (Edmondson 1965). Pérez-Legaspi ve Rico-Martínez (1998) littoral rotiferlerden *Lecane luna* ve *Lecane quadridentata* üzerinde 3 farklı sıcaklık (20, 25 and 30°C) ve *Nannochloris oculata*'nın 3 farklı konsantrasyonunda (1×10^7 , 5×10^6 ve 1×10^6 hücre/mL) her iki tür için döl verimine ilişkin kuluçkalanma yüzdesi, ömür ve üreme oranı arasında önemli farklılıklar bulmuşlardır. Bu türlerin aseksüel yumurta kuluçka süresi için optimal sıcaklık 20-25°C olarak tespit edilmiştir.

Genel olarak sıcaklık, tuzluluk ve yem konsantrasyonu rotiferlerin büyüme oranını tümüyle etkilemekte, ancak sıcaklık en kritik faktör olarak ele alınmaktadır. Treece ve Davis (2000) hemen hemen tüm suşlar için optimum sıcaklığın 28-32°C (82,4-89,6°F) arasında değiştiğini fakat 28°C'nin üzerinde besin yoğunluğunun çok önemli olduğunu ve 26-28°C arasında daha büyük cüsseli suşların küçük olanlara nazaran hızlı büyüme

eğiliminde olduklarını belirtmişlerdir. Bununla birlikte Park *et al.* (2001) tatlı su rotiferinin (*B. calyciflorus*) yüksek yoğunluktaki kültür çalışmalarında denedikleri 3 farklı sıcaklık (24, 28 ve 32°C) içerisinde sırasıyla 6500, 8600 ve 8100 birey/mL rotifer yoğunluğu elde etmişler, sıcaklık artışına paralel olarak rotifer yoğunluğunda da artma olduğunu bildirmişlerdir.

Lucía Pavón-Meza *et al.* (2005) tatlı su rotiferlerinden *Brachionus havanaensis*'in hayatta kalma ve üreme performansı üzerine 3 farklı sıcaklık (15, 20 ve 25°C) ve üç farklı *Chlorella vulgaris* konsantrasyonunun ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 ve 2×10^6 hücre/mL) etkisini birlikte denemiş ve hem gıda seviyesinin hem de sıcaklığın bu türe ait feküdüte değerini etkilediğini, yüksek sıcaklıkta ve gıda konsantrasyonunda hayatta kalma süresinin kısalacağını fakat döl veriminin arttığını bildirmişlerdir.

Yine 3 farklı *Chlorella* yoğunluğu ($1,5 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$ ve $4,5 \times 10^6$ hücre/mL) ve iki farklı sıcaklığın (22 ve 28°C) 4 farklı rotifer türü (*B. calyciflorus*, *B. havanaensis*, *B. patulus* ve *B. rubens*) üzerinde yapılan çalışmada türlerin hepsinde en yüksek büyüme oranı $4,5 \times 10^6$ hücre/mL *Chlorella* konsantrasyonunda elde edilmiştir (Fernández-Araiza *et al.* 2005).

Sarma *et al.* (1996)'ya göre gıda yoğunluğuna ek olarak inokülasyon yoğunluğu ve türler arası rekabet, popülasyon büyüme oranını etkileyen önemli faktörler arasındadır (Sarma *et al.* 1999, Nandini and Sarma 2001). Mesela *B. calyciflorus* ve *B. patulus* arasında düşük ($1,5 \times 10^6$ hücre/mL) ve yüksek ($3,0 \times 10^6$ hücre/mL) *Chlorella vulgaris* konsantrasyonunda ve 4 farklı inokülasyon yoğunluğunda (%100 *B. calyciflorus*, %75 *B. calyciflorus* + %25 *B. patulus*, %50 her iki tür, %25 *B. calyciflorus* + %75 *B. patulus*) yapılan çalışmada her iki tür için de yumurta oranı ve popülasyon yoğunluğu arasında ters bir ilişki görülmüş olup maksimum popülasyon yoğunluğunun gıda ve inokülasyon yoğunluğundan önemli derecede etkilendiği saptanmıştır (Sarma *et al.* 1999).

Zooplankton türlerinde özellikle planktonik rotiferlerin ve kladoseranların popülasyon büyüklüğünü anlamada önemli bir değişken olan yumurta/dişi oranının (Edmondson

1965) çeşitli faktörler tarafından etkilendiği bilinmesine rağmen yumurta oranının farklı gıda tiplerinden nasıl etkilendiği halen net olarak bilinmemektedir (Peña-Aguado *et al.* 2005). Sarma *et al.* (2001 b) iki farklı konsantrasyonda (1×10^6 ve 3×10^6 hücre/mL) yeşil alg (*Chlorella vulgaris*), maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve bunların karışımından oluşan üç farklı diyetin tatlı su rotiferleri (*B. calyciflorus* ve *B. patulus*)'un popülasyon yoğunluğuna olan etkilerini incelemiştir. Araştırmalarında her iki rotifer türünün de 3×10^6 hücre/mL *Chlorella* konsantrasyonunda maksimum yoğunluğa ulaştıklarını (103 ± 8 ve 296 ± 20 birey/mL), 1×10^6 hücre/mL konsantrasyondaki karışık diyetle ise yine her iki türün büyüme performanslarının iyi olduğunu, ancak her iki konsantrasyonda sadece maya içeren diyetin uygun olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte rotifer (*Brachionus calyciflorus*) ve (*B. rubens*) ile kladosera (*Moina macrocopa* ve *Ceriodaphnia dubia*)'nın popülasyon büyümeleri üzerine maya ilave edilmiş algal diyetin popülasyon büyüme oranını önemli derecede etkilediği fakat popülasyon artışı ile yumurta oranını azalttığı görülmüştür (Peña-Aguado *et al.* 2005).

Yoshinaga *et al.*, (2003 a) popülasyon dinamiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan rotifer *B. plicatilis*'in üreme ve ömür uzunluğu gibi popülasyon parametrelerinin HSP70 ve GRP94 gibi iki stres proteini tarafından etkilendiğini ve bu iki proteinin popülasyon büyümesi esnasında ekspresyonlarının değiştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada rotifer popülasyonunun gelişmesi sırasında stres proteini ekspresyonunu tanımlayarak gelecekte popülasyon dinamiği çalışmalarında kullanılabilme imkanlarını tartışmışlardır. Buna ilaveten başka bir çalışmada nematodlarda üreme ve ömür uzunluğunu düzenleyen insülin/insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)'nin rotifer (*B. plicatilis*)'de ömür uzunluğunu %30 oranında artırdığını, ölüm ve doğum oranları arasındaki dengeyi belirlediklerini PI3-kinaz inhibitörü ile yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (Yoshinaga *et al.* 2005).

Yoshinaga *et al.* (2003 b) rotiferlerde popülasyon değişim mekanizmasını anlamada açlığın en önemli faktörlerden biri olabileceğini belirtmiştir. Bu amaçla rotifer *B. plicatilis* kültürlerini periyodik olarak aç bırakarak ömür, yaşa özgü fekundite, toplam fekundite ve üreme periyodu gibi parametreleri incelemiştir. İlk deneylerinde 40

rotifer (1 saatten az) biri kontrol grubu olmak üzere 5'e bölünmüş, ilk 4 grup 1-4 gün yaş itibariyle yemlendikten sonra büyümenin sabit fazında aç bırakılmışlardır. Kontrol grubu ise deney süresince beslemeye devam edilmiştir. Bu grupta açlığın başlamasının hemen ardından rotiferlerin üreme aktiviteleri durmuş, ilerleyen yaşlarında ise hayatta kalma süreleri kısalmıştır. Bununla birlikte açlık öncesi büyük sayıda döl verdikleri gözlenmiştir. İkinci deneylerinde ise 56 yeni doğan rotifer biri tamamen aç diğeri deney süresince yemlenen 2 kontrol grubu olmak üzere 7 gruba bölünmüş ve geri kalan 5 grup 1-5 yaş itibariyle aç bırakıldıktan sonra yemlenmelerine devam edilmiştir. Üç günün üzerinde aç bırakılan rotiferlerin ömür süreleri istatistikî olarak diğer gruplardan farklı bulunmazken, 1-2 günlük dönemlerde aç bırakılan rotiferlerin yaklaşık 16 gün hayatta kalabildiklerini, toplam fekunditede ise önemli düzeyde azalma görüldüğünü, sonuç itibariyle açlığın üretkenliği baskılayarak rotiferlerin bir sonraki generasyon için ömürlerinin uzamasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Astagimath ve Rao (2004) diyetsel kontrol veya kalorik sınırlandırma olarakda adlandırılan diyetsel sınırlandırmanın yararlarını derledikleri çalışmalarında, kalorik sınırlamanın obesiteyi baskıladığını, serbest radikalleri azalttığını, antioksidantları artırdığını ve strese karşı kontrol mekanizması olarak ısı stres proteinleri sentezini indüklediğini bildirmişlerdir.

Tatlı su rotiferlerinin kültürü, beslenmesi ve popülasyon yoğunluğu hakkında çok az şey bilindiğinden ve bu bilgiler iç sular biyolojisi ile ilgilenen araştırmacılar için çok önemli olduğundan Arimoro ve Ofojekwu (2004) tatlı su rotiferini (*Brachionus calyciflorus*) 18 günlük kültür periyodunda *Chlorella sp.*, karışık alg, yeşil yaprak ve ekmek mayası ile beslemek suretiyle yem çeşidinin popülasyon dinamiği ve üreme oranı üzerine olan etkilerini değerlendirmeye çalışmışlardır. Çalışmalarında maksimum popülasyon yoğunluğuna kültürün 10. günü itibariyle tatlı su *Chlorella* + ekmek mayası ile beslenen rotifer grubunda 562 birey/mL⁻¹, yeşil salata+ekmek mayası ve karışık alg+ekmek mayası verilen gruplarda ise sırasıyla 486 birey mL⁻¹ ve 401 birey mL⁻¹ ile ulaşılmıştır. Sadece yeşil salata verilen grupta ise maksimum yoğunluğa (152 birey mL⁻¹) kültürün 6. günü itibariyle erişilmiştir. Üreme oranı besin kaynağına bağlı olarak 0,27-0,52 arasında

değişmiştir. En yüksek ikilenme zamanı (2,89 gün) ve en düşük üreme oranı (0,27) karışık alg ile beslenen grupta görülmüş ve distile su içerisinde bulunan (kontrol grubu) rotiferlerde üreme gerçekleşmemiştir. Sonuç itibariyle *Chlorella* ve yeşil salata yaprağına eklemek mayasının eklenmesiyle tatlı su rotiferi (*B. calyciflorus*)'un yığın kültürünün yapılabilceği bildirilmiştir.

Bazı rotifer popülasyonları uzun süreli besin yokluğuna ömür uzunluklarını artırarak direnç gösterebilmektedirler. Örneğin Weithoff (2007) iki rotifer türü (*Cephalodella sp.* ve *Elosa worallii*) üzerinde diyetsel sınırlandırmanın ömür uzunluğu ve üreme üzerine etkisini incelediği araştırmasında, sadece *E. worallii*'nin diyetsel sınırlandırma şartlarında ortalama ömür uzunluklarından çok daha uzun bir süre (15 güne kadar) canlı kalabildiklerini, bu sırada üremesini azaltarak ömür uzunluğunu artırdığını, normal besin ortamı sağlandığında ise 1 gün içerisinde tekrar üremeye başladığını bildirmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma ünitesi

Araştırma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Akvaryum Balıkları Yetiřtirme Ünitesi Canlı Yem Üretim Laboratuvarı'nda yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Canlı yem üretim laboratuvarı

3.1.2. Su

Yetiştiricilik için kullanılan su çeşme suyu olup 1 litrelik kaplarda 121°C'de 20 dk süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Araştırmada kullanılan suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Oksijen, pH ve iletkenlik değerleri Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde WTW Multiline P4 Universal tip cihazla sülfat, fosfat, nitrat ve nitrit değerleri ise Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü'nde titrimetrik yöntemle ölçülmüştür.

Çizelge 3.1. Tatlı Su Rotiferi (*B. calyciflorus*) yetiştiriciliği'nde kullanılan suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri

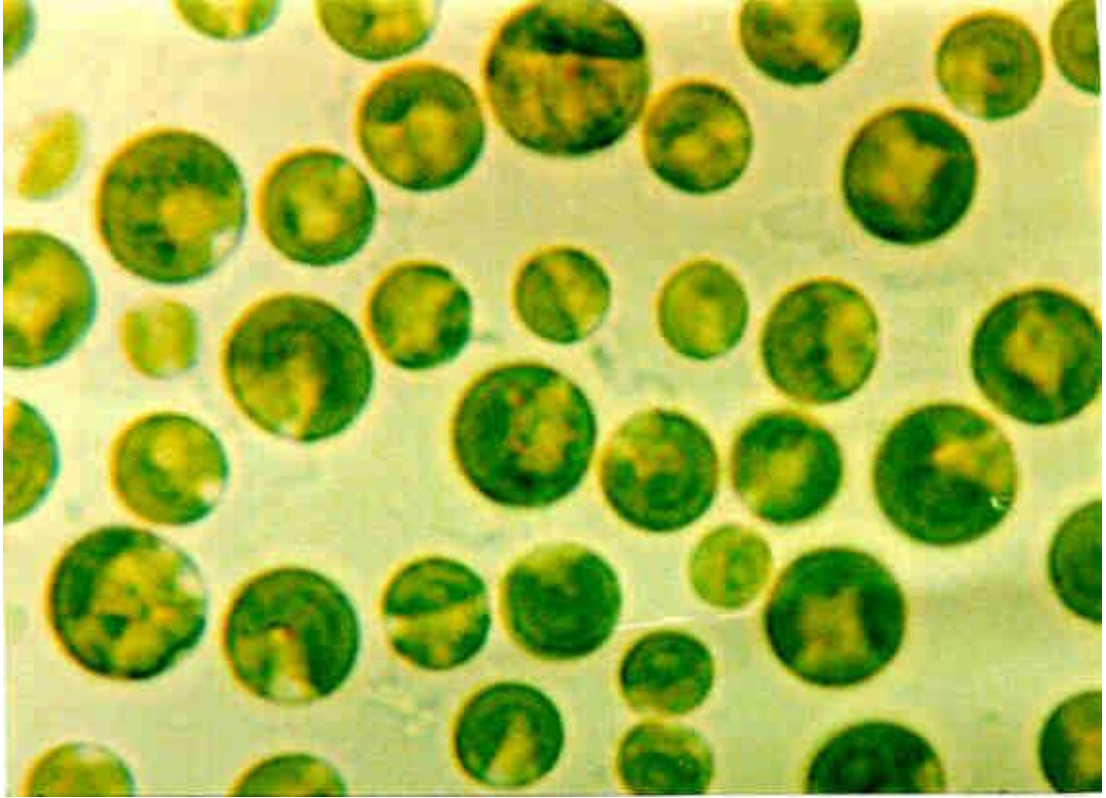
Parametre	Değer
Sıcaklık	25±1°C
Oksijen	5,30 mg/L
Ph	8,25
SO ₄	0,33 mg/L
PO ₄	Eser
NO ₃	3,45 mg/L
NO ₂	Eser
İletkenlik	306 µs/cm

3.1.3. Rotifer

Araştırmada kullanılan tatlı su rotiferi (*Brachionus calyciflorus*)'un S ve L tipi olmak üzere yumurta halinde Florida Aquatic Eco-Systems Firması'ndan ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.4. Besin

Rotiferlerin beslenmesinde kullanılan mikroalg (*Chlorella sp.*) Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden sağlanmıştır.



Şekil 3.2. Tatlı Su Rotiferinin beslenmesinde kullanılan mikroalg (*Chlorella sp.*) (http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/16labman05/lb1pg7_files/Chlorella2.jpg)

3.1.5. Primerler

HSP70 genine ait spesifik primerler kullanılmıştır.

3.1.6. Kullanılan kimyasal maddeler

3.1.6.a. Total RNA ekstraksiyonunda kullanılan kimyasallar

Trizol, kloroform, izopropilalkol, etanol ve DEPC (Dietyl pirokarbonat)'li su kullanılmıştır.

3.1.6.b. cDNA kütüphanesinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

DEPC'li su, adaptör primer, PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) tamponu, MgCl₂, dNTP, DTT, Super Script™ II RT ve RNase-H kullanılmıştır.

3.1.6.c. PCR uygulamasında kullanılan kimyasallar

Taq DNA polimeraz, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), PCR tamponu, MgCl₂, DMSO (Dimetilsülfoksit) kullanılmıştır.

3.1.6.d. Elektroforez uygulamasında kullanılan kimyasallar

Agaroz, EtBr (Etidyum Bromür) boyası solüsyonu (10mg/mL), Formamid, TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu, MOPS (morfolinopropansülfonik asit) elektroforez tamponu, Markır (50 bp-2.000 bp) ve BFB (Brom fenol mavisi) yükleme tamponu kullanılmıştır.

3.1.6.e. Klonlama için katı ve sıvı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Tripton, maya ekstraktı, NaCl, D (+) Glukoz, 5 N NaOH, Agar, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside), IPTG (isopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid), Ampisilin.

3.1.6.f. Klonlamada kullanılan kimyasallar

PCR ürünü, ligaz tamponu, pGEM®-T Easy Vektör, ligaz.

3.1.7. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

1. **50x TAE Tamponu:** 242 gr Tris, 57,1 mL Asetik asit, 100 mL EDTA (0,5 M'lık ve pH:8) alınmış, 950 mL ddH₂O'da çözündürülerek son hacim 1 L'ye tamamlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.
2. **%1'lik Agaroz Jeli:** 10x TAE'den 30 mL alınıp üzerine 0,3 gr agaroz konulmuş ve mikrodalga fırında 1 dk ısıtılmıştır.
3. **DEPC (Diethyl pirokarbonat)'li su:** 1 mL DEPC 1 L ddH₂O içerisinde 4 saat karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.
4. **20x MOPS Solüsyonu:** 41,9 gr MOPS, 6,8 gr Sodyum asetat, 2,6 gr EDTA 400 mL DEPC'li su içerisinde çözündürüldükten sonra NaOH ile pH 7'ye ayarlanmış ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroalg üretimi

Üretim aşamasında *Chlorella sp.* türü yarı sürekli kültür yöntemiyle (Richmond 1986) ilk önce deney tüplerine ekilmiş, daha sonra sırasıyla 250, 500 ve 1000 mL'lik erlenlere aktarılmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4). Kültürlerin bulunduğu ortam sıcaklığı duvar tipi ve biyofiltreli klima ile 27±1°C olarak ayarlanmış ve 40 W'lık 1000 lux değerinde gün ışığı tipi floresan lamba ile sürekli aydınlatma yapılmıştır. Kültürler için besin ortamı olarak Bold 1NV ortamı kullanılmış olup içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Mikroalgin tüplere ekimi



Şekil 3.4. Mikroalg üretim sistemi

Çizelge 3.2. Mikroalg Üretiminde Kullanılan Bold 1NV Ortamı
(<http://www.sbs.utexas.edu/utex/media.aspx>)

mL	Stok Solüsyon	gr/400 mL H ₂ O
10	NaNO ₃	10.0
10	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0
10	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0
10	K ₂ HPO ₄	3.0
10	KH ₂ PO ₄	7.0
10	NaCl	1.0
940	Distile su	

mL	Stok Solüsyon	gr/400 mL H ₂ O
1	thiamine	0.1
1	Biotin	25.0 x 10 ⁻⁶
1	Vitamin B ₁₂	15.0 x 10 ⁻⁶
6	PIV metal solüsyonu	0.1

Çizelge 3.2. (devam)**PIV metal solüsyonu:**

Stok Solüsyon	gr/400 mL H₂O
FeCl ₃ ·6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4 mg
Distile su	1000 mL

3.2.2. Rotifer üretimi

Çalışmada L tipi rotifer (*Brachionus calyciflorus*) yumurtaları kullanılmış olup, üretiminde yukarıda sözü edilen mikroalg türü kullanılmıştır. Ortam sıcaklığı 27±1°C'de tutulmuş ve 40 W'lık 4 floresan lamba ile sürekli bir aydınlatma yapılmıştır. Üretime 6 adet 10 mL'lik deney tüpünde 0,5 mL steril su içerisinde yumurtalar hidratize edilerek başlanmıştır. 12 saat sonra açılmaya başlayan yumurtalara çok az miktarda *Chlorella* verilmiştir. Rotifer yoğunluğunu arttırmak üzere beslemeye devam edilmiş ve yoğunluk 100 birey/mL'ye ulaştığında 250 mL'lik erlenlere aşılama yapılmıştır. Daha sonra 1 L'lik steril serum şişelerine ve buradan da 8 L'lik kavanozlarda üretime geçilmiştir (Şekil 3.5). Üretimde firma tarafından verilen protokol ile birlikte Hoff ve Snell (2001), tarafından bildirilen tekniklere uygun olarak üretimi yapılmıştır.



Şekil 3.5. Rotifer üretim sistemi

3.2.3. Rotiferlerin hasadı

Rotiferler üssel büyüme fazının gerçekleştiği 10. gün itibariyle 8 L'lik 5 adet kavanozda üretilen kültürlerin tamamı 44 mikron göz açıklığına sahip elekten (Şekil 3.6) geçirilerek süzölmüştür. Süzme işlemi sonrasında kirlere ve yem atıklarından temizlemek için su ile 2 kez yıkanmıştır. Elek üzerinde kalan rotiferler bir spatul yardımıyla hemen 1,5 mL'lik tüplere alınmıştır.



Şekil 3.6. Rotifer hasadında kullanılan süzgeç (Aquatik-Eco Sistem, Florida, USA)

3.2.4. Fitoplankton sayımı

Denemelerde besin olarak kullanılan *Chlorella sp.* hücrelerinin sayımı NEUBAUER sayma kamarasında yapılmıştır (Cirik ve Gökpınar 1999). Sayım için kamera ataçmanlı Novex WF 10x model trinoküler mikroskop kullanılmıştır.

3.2.5. Rotifer sayımı

Rotifer sayımında Palmer Maloney sayma kamarası, 96'lık doku kültür kapları ve Ependorf marka otomatik pipet kullanılmıştır. Sayım için Novex WF 10x model trinoküler mikroskop ile Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen stereomikroskopdan yararlanılmıştır.

Rotifer ve yumurta ölçümleri kamera ataçmanlı Novex WF 10x model mikroskopta 10x'lik mikrometrik oküler ile yapılmıştır. Rotifer ve yumurta fotoğrafları Novex WF marka mikroskoba monte edilmiş Nikon Coolpix 4500 dijital kamera ile elde edilmiştir.

3.2.6. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonunda Trizol® Reagent (İnvitrogen) kiti kullanılmıştır. 1.5 mL'lik tüplere alınan rotifer örneğine (200 mg) 4 mL Trizol konularak homojenize edilmiş, homojenizasyonun ardından 4°C'de 10 dk 11000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrı bir tüpe alınmıştır. 800 µL kloroform eklenmiş ve 15 sn elle çok güçlü bir şekilde çalkalanarak oda sıcaklığında 2-3 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben 4°C'de 15 dk 11000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant tekrar ayrı bir tüpe alınmıştır. Alınan kısma 2 mL izopropil alkol eklenerek oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 4°C'de 15 dk 11000 rpm'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmış, altta kalan kısma %70'lik etanol'den 4 mL ilave edilerek hafifçe vortekslenerek 4°C'de 5 dk 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası etanol uzaklaştırılmış ve kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutulmuştur. Örneğe 40 µL DEPC'li su ilave edilerek -80°C'de stoklanmıştır.

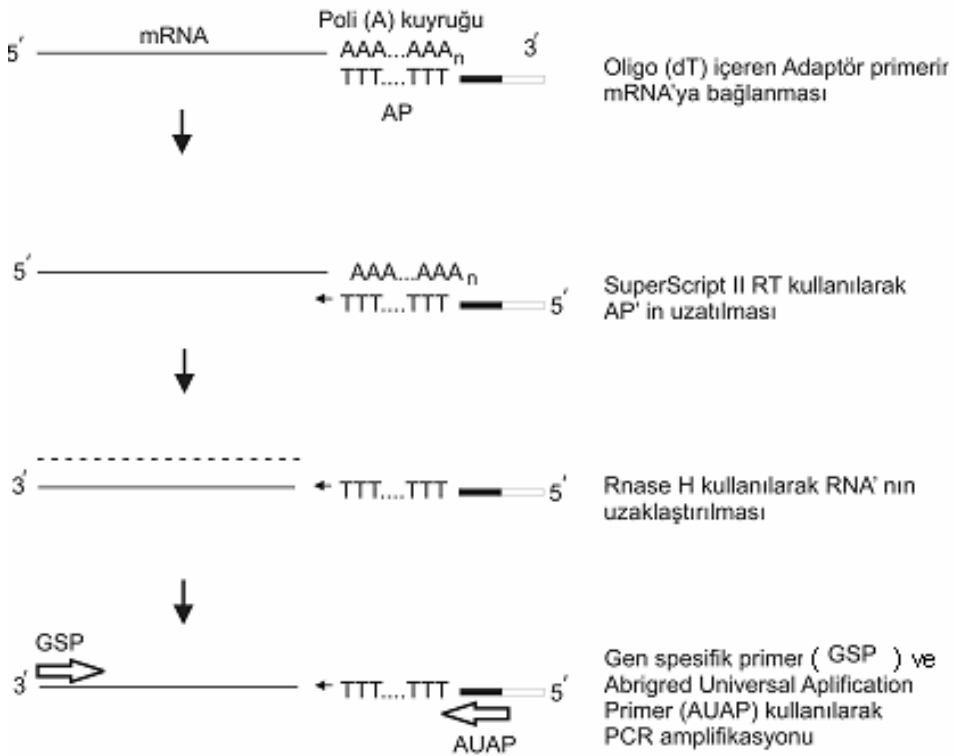
3.2.7. RNA'nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü

Elde edilen RNA'dan 1µL alınarak üzerine sırasıyla 3,5 µL ddH₂O, 0,5 µL 20x MOPS solüsyonu, 5 µL formamid konularak 65°C'de 15 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Jel için 0,3 gr agaroz 1,88 mL 20x MOPS ve 28,5 mL ddH₂O ile kaynatılıp biraz soğutulduktan sonra üzerine 6,68 µL Formamid ve 5,5 µL EtBr eklenerek hazırlanmıştır. Elektroforez küvetine 1x MOPS solüsyonundan yeter miktarda konularak elektroforez işlemi 116 V'da 20 dk elektrik akımı verilerek yapılmış ve UV (ultraviole) ışığında bant gözlemlenmesi yapılarak görüntülenmiştir.

3.2.8. cDNA kütüphanesinin hazırlanması

cDNA kütüphanesi 3' RACE (Rapid Amplification cDNA End) sistemiyle (İnvitrogen, Kat. No. 18373-019) hazırlanmıştır. RACE yönteminde mRNA' ların 3' uçlarından istenilen genin amplifikasyonu amacıyla birçok organizmanın HSP genleri kullanılarak bir konsensüs primer elde edildikten sonra forward primer olarak kullanılır. Revers primer ise RACE kitinde mevcut olan AP (adaptör primer)'e spesifik olan AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) primerdir. Böylece konsensüs primerin tanıdığı tüm cDNA'lar ve AUAP primer ile istenilen genin yakalanmasına çalışılır. Bu yöntemin ayrıntısı Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. 3' RACE sisteminin özeti (İnvitrogen)

cDNA kütühanesi için total RNA'dan 5 µg alınarak üzerine 1 µL ve 10 mM adaptör primer (5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') eklenmiştir. Toplam hacim 11 µL olacak şekilde üzerine DPEC'li su konulmuş ve 70°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1 dk kar üzerinde bekletildikten sonra kısa bir süre santrifüjlenerek üzerine 2 µL 10xPCR buffer (200 mM Tris-HCl pH: 8.4, 500 mM KCl), 2 µL 25 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM dNTP mix, 2 µL 0,1 M DTT ilave edilmiştir. Elde edilen karışım kısa bir süre santrifüjlendikten sonra 42°C'de 5 dk su banyosunda bekletilmiş ve üzerine 1 µL SuperScript™ II RT eklenerek tekrar 42°C'de 50 dk su banyosunda bekletilmiştir. Kısa bir süre daha santrifüjlenerek 70°C'de 15 dk PCR yapılmış 1 dk buz üzerinde bırakılarak tekrar santrifüjlenmiştir. 1 µL RNase-H ilavesini takiben 37°C'de 20 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra -20°C'de saklanmıştır.

3.2.9. Primer dizayını

PCR için forward (F) ve reverse (R) primerlerin kombinasyonu Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. HSP70-F1 ve HSP70-R1 Kaneko *et al.* (2002)'den, HSP70-F2 internet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *Brachionus plicatilis* HSP70 genine ait AB076052 kod numaralı mRNA baz dizilimi alınmış ve HSP70-R2 (reverse) için AUAP primer kullanılmıştır. Oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kullanılarak kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.3. HSP70'in PCR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin baz dizilimi

No	Primer	Sekans
1	HSP70-F1 (Kaneko <i>et al.</i> 2002)	5'-GGATCATCAA(C/T)GAGCCCACGGC-3'
2	HSP70-F2	5'-TCCATCCTGACCATCGGAGAG-3'
3	HSP70-R1(Kaneko <i>et al.</i> 2002)	5'-AACAAGAGCATCAACCC(C/A/G)GACGAGGC-3'
4	HSP70-R2 (AUAP)	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC -3'

3.2.10. PCR uygulaması

3.2.10.1. Primer Tm sıcaklığının hesaplanması

Kullanılacak primerlerin Tm sıcaklıkları Oligo analyzer 3.0 programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) kullanılarak hesaplanmış ve aşağıdaki Tm sıcaklıkları elde edilmiştir.

$$Tm_{F,HSP70} = 61,7$$

$$Tm_{R,HSP70} = 60,1$$

$$Tm_{Ort} = (TmF+TmR)/2=(61,7+60,1)/2=60,9\sim 61$$

Hesaplanan bu Tm sıcaklıklarından istenen sonuç elde edilemediğinden farklı sıcaklıklar denenmiş ve en uygun Tm sıcaklığı HSP70 için 56°C olarak belirlenmiştir.

3.2.10.2. PCR programı

LID 105°C NOWAIT AUTO

PAUSE PRESS ENTER

1. T=80°C 1 dk
2. PAUSE PRESS ENTER
3. T=94°C 3 dk
4. T=94°C 25 sn
5. T=56°C 25 sn
6. T=72°C 35 sn
7. GO TO 5 REP 40
8. T=72°C 5 dk
9. HOLD 4°C
10. END

3.2.10.3. PCR solüsyonu

PCR amplifikasyon işlemi için Çizelge 3.4'de verilen PCR solüsyonu hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı

İçerik	Miktar
Distile su	5 µL
cDNA	2 µL
Taq Buffer	2 µL
dNTP (10 mM'lık solüsyondan)	0.5 µL
Primer (F) (10 pmol/µL)	1 µL
Primer (R) (10 pmol/µL)	1 µL
MgCl ₂ (25 mM'lık solüsyondan)	1 µL
DMSO (Toplam miktarın %5'i)	1 µL

Hazırlanan bu karışım (15 µL) PCR tüplerine (0,5 mL) alınmıştır. PCR işlemi için ilk önce PCR cihazının kapak sıcaklığı 105°C'ye ayarlanmış ve reaksiyon karışımı PCR cihazına yerleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının denatürasyonu için 80°C'de 1 dk bekletildikten sonra Amplifiye Taq (0,5 µL) ilave edilmiş ve yukarıda adı geçen PCR programı çalıştırılmıştır. PCR için amplifikasyon programı 40 döngü olacak şekilde programlanmıştır. Her döngü 94°C'de 3 dk, 94°C'de 25 sn denatürasyon, 56°C'de 25 sn primerin yapışması ve 72°C'de 35 sn cDNA'nın uzaması olarak gerçekleştirilmiş, son döngüde örnekler 72°C'de 5 dk bekletilmiştir. PCR'dan sonra örnekler 4°C'ye alınmıştır.

3.2.11. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez kontrolü

PCR işlemi bittikten sonra genin sentezlenip sentezlenmediğine bakmak için PCR ürünü %1,5'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforez bufferı olarak 1x TAE, jel içeriği olarak da 0,45 gr agaroz, 30 mL 1x TAE bufferı ve 4 µL EtBr kullanılmıştır. Örnek üzerine 2 µL yükleme tamponu eklendikten sonra jele yüklenmiş ve elektroforez

işlemi 100V 90 mA’de 20 dk elektrik akımı verilerek yapılmıştır. Sonuçlar UV ışığında bant gözlemlenmesi yapılarak görüntülenmiştir.

3.2.12. Gen klonlanması için katı ve sıvı besiyerinin hazırlanması

Katı ve sıvı besiyerleri Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da verildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Katı besiyer içeriği

İçerik	Miktar
Saf su	400 mL
Tripton	4 gr
Maya ekstraktı	2 gr
NaCl	2 gr
D(+) Glukose	0.4 gr
NaOH (5 N)	600 µl
Stok: 200 g/1000 mL	
Agar	6 gr
20 dk 121 °C Otoklav ve 50 °C ye kadar Soğutulduktan sonra aşağıdakiler katılmıştır	
X-Gal (50 mg/mL)	200 µl
IPTG (1M)	80 µl
Stok: 0,178 g/0,750 mL saf su	
Ampisilin	
Stok: 50 mg/mL	400 µl

Çizelge 3.6. Sıvı besiyer (LB) içeriği

İçerik	Miktar
Saf su	400 mL
Tripton	4 gr
Maya ekstraktı	2 gr
NaCl	2 gr
D(+) Glukose	0.4 gr
NaOH (5 N)	600 µl
Stok: 200 g/1000 mL	

3.2.13. Genin vektöre klonlanması

Gene spesifik primer ve AUAP primerle yapılan PCR ürününden 3 µL, 5 µL Ligase Buffer, 1 µL pGEM®-T Easy Vektör ve 1 µL Ligaz alınarak karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30-45 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 100 µL *E. coli* ilave edilerek buz üzerinde 20 dk bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 42°C’de 30 sn ısı şoku uygulanmış ve 3-5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 900 µL LB ilave edilmiştir. 37°C’de 20-30 dk inkübasyona bırakılmış, ardından 12000 rpm’de 30 sn santrifüj edildikten sonra sıvı kısımdan az bir miktar kalacak şekilde süpernetant atılmış ve geri kalan kısım pipetaj yapılarak IPTG ve X-Gal içeren ve kullanım öncesi etüvde 10-15 dk bekletilen petrilere yayılarak yaklaşık 16 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petrilere beyaz (klonlanmış) ve mavi (klonlanmamış) koloniler elde edilmiştir. Beyaz koloniler numaralandırılmış ve bir kürdanla seçilen kolonilere dokundurmak suretiyle önce yeni bir petriye sonra hazırlanan PCR solüsyonuna dokundurularak vektördeki genin kontrolüne yönelik olarak elektroforez yapılmıştır. Uygulanan PCR programı aşağıda sunulmuştur.

PCR Programı

LID 105°C NOWAIT AUTO

PAUSE PRESS ENTER

1. T=80°C 1 dk
2. PAUSE PRESS ENTER
3. T=94°C 3 dk
4. T=94°C 30 sn
5. T=56°C 30 sn
6. T=72°C 1:30 sn
7. GO TO 5 REP 30
8. T=72°C 5 dk
9. HOLD 4°C
10. END

Elektroforez sonrası güçlü bant veren örnekler seçilerek steril çubuklar ile 10 mL LB besi ortamı içeren tüplere aktarılmış ve 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün tüplerden alınan bakteriler santrifüjlenerek GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma PLN10) ile izole edilmiştir. Plazmit izolasyon kit içeriği Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Plazmit izolasyon kit içeriği (Sigma)

İçerik	Miktar
Resüspanسیون solüsyonu	2.5 mL
RNase A solüsyonu	0.1 mL
Lysis solüsyonu	2.5 mL
Nötralizasyon/Bağlanma solüsyonu	4 mL
Kolon hazırlama solüsyonu	7 mL
Opsiyonel yıkama solüsyonu	5.5 mL
Konsantre yıkama solüsyonu	2.5 mL
Elüsyon solüsyonu (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, Ph=8.0)	1.5 mL
GenElute bağlama sütunu	10 adet
2 mL Toplama Tüpleri	20 adet

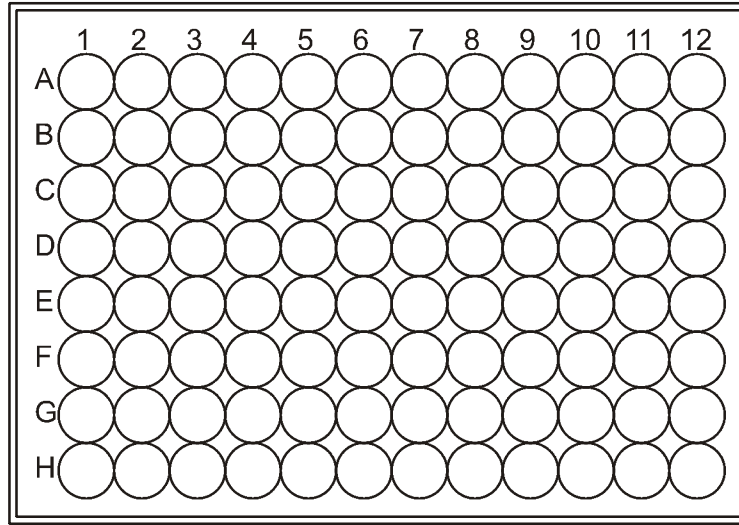
Bir gece bekleyen rekombinant *E. coli* kültüründen 1,5 mL (ependorf tüpünü dolduracak kadar) mikrosantrifüj tüpüne transfer edilerek 13000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiş ve süpernetant atılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan pelet üzerine 200 µL Resüspanسیون solüsyonundan eklenmiş ve tam bir homojenite sağlanıncaya kadar parmakla vurularak karıştırılmış ve daha sonra vortekslenmiştir. Süspanse edilmiş hücreler üzerine 200 µL Lysis (parçalama) solüsyonundan eklenmiş ve hassas bir şekilde (6-8 kez) karıştırıldıktan sonra (kesinlikle vortekslenmez) 2-3 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Parçalama işleminden sonra 350 µL nötralizasyon solüsyonundan eklenerek tüpler hassas bir şekilde (4-6 kez) karıştırılmış ve oda sıcaklığında maksimum hızda (13000 rpm) 10 dk santrifüjlenmiştir. Ayrı mikrosantrifüj tüplerine bağlama kolonu yerleştirilmiş ve her bir kolona Kolon Bağlama Solüsyonundan (column preparation) 500 µL eklenerek 12000 rpm’de 1 dk santrifüjlenmiş ve sıvı kısım atılmıştır. Hazırlanan bağlama kolonuna nötrale edilmiş

tüplerden elde edilen ürünün sıvı kısmı yüklenmiş (peletli tüp atılır) ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 1.5 dk santrifüjlenerek dipteki sıvı kısım atılmıştır. Kolon içine Opsiyonel Yıkama Solüsyonundan 500 µL eklenmiş ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 1.5 dk santrifüjlenerek sıvı kısım atılmıştır. Kolona sulandırılmış yıkama solüsyonundan 750 µL eklenmiş, 12000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra akışkan kısım atılmış ve maksimum hızda herhangi bir yıkama solüsyonu olmaksızın etanolü uzaklaştırmak için 1-2 dk tekrar santrifüjlenmiştir. Kolon yeni bir tüpe transfer edilerek üzerine 100 µL Elüsyon solüsyonundan eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında beklenmiştir (DNA dizilimi ve diğer enzimatik uygulamalar için su veya 5mM pH=8 olan Tris-HCl de kullanılabilir). Daha sonra 12000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra, kolon atılarak alta geçen sıvı kısım izole edilen vektör içerdiğinden -20°C'de muhafaza edilmiştir. Vektörün başarılı bir şekilde izole edilip edilmediğine bakmak için elektroforez uygulanmıştır. Bu işlemden sonra vektöre ait T7 (TAATACGACTCACTATAGGGAGA) ve SP6 (ATTTAGGTGACACTATAGAAGNG) primerlerle genin varlığı kontrol edilmiştir.

3.2.14. Kalorik sınırlandırma (KS) deney dizaynı

KS deneyleri tek tip besin için 12, 24, 36, 48, 60, 72 saat aralıkla yemlenen ve tamamen aç bırakılan rotifer gruplarından oluşturulmuştur. Popülasyon yoğunluğunu belirlemek üzere oluşturulan gruplara 1 mL $1,5 \times 10^6$ hücre/mL *Chlorella sp.* verilmiştir. Her 12 saatte bir yemlenen grup kontrol grubu olarak düşünülmüştür. Deneylere 5 mL EPA ortamı (Lavens and Sorgeloos 1996) (Çizelge 3.8) içeren toplam 28 adet 10 mL'lik deney tüplerinde her bir tüpe <6 saat'lik 4 rot/mL rotifer yoğunluğu olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak başlanmış ve tüm bireyler ölünceye kadar devam edilmiştir (26 gün). Kültür ortamları 12 saatte bir değiştirilmiştir.

Ömür uzunluğunun tespit edilmesinde ise numaralandırılmış ve harflendirilmiş 96'lık plate kullanılmıştır (Şekil 3.8). Bu deney için her bir kuyucuğa <6 saat'lik bir rotifer konulmuş ve KS şartları uygulanmıştır. Anne bireyler yavrulamayı takiben otomatik pipet ile yeni kuyucuğa aktarılarak kaç gün yaşadığı tespit edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.8. 96'lık plate

Sayımlar stereo mikroskop altında, hayatta kalan amiktik dişilerin sayımı şeklinde yapılmıştır. Sayımların ardından yoğunluğa bağlı olarak bireyler taze EPA içeren yeni ortamlarına otomatik pipet vasıtasıyla transfer edilmişlerdir. Yoğunluğu fazla olan gruplarda ise kültür ortamı 2/3 oranında yenilenmiştir. Deneyle ortamda alg üremesini engellemek için karanlık ortamda sürdürülmüştür (Yoshinaga *et al.* 2000; Weithoff 2007).

Popülasyon yoğunluğu büyüme fazı esnasında 6-7 değerinin ortalamasından $r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$ (Krebs 1985) eşitliği kullanılarak elde edilmiştir. Burada r =popülasyon artış oranını, N_0 =başlangıç popülasyon yoğunluğunu, N_t = t gün sonra erişilen popülasyon yoğunluğunu ifade etmektedir.

Çizelge 3.8. KS deneylerinde kullanılan EPA ortamı

İçerik	Miktar
NaHCO ₃	96 mg
CaSO ₄	60 mg
MgSO ₄	60 mg
KCl	4 mg
Distile su	1000 mL

3.2.15. İstatistik analizler

Araştırmada elde edilen veriler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak ‘Tekrarlanan Ölçümlerin Varyans Analizi’ne tabi tutulmuştur (SPSS 2002). Önemli bulunan varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar ise Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır (Yıldız vd. 1994, Yıldız vd. 1998).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Rotifer Üretimine Ait Sonuçlar

Rotifer üretiminde Florida Aquatik Eco-Sistem Inc. firmasından satın alınan S (small) ve L (large) tipi olmak üzere 2 tip tatlı su rotiferi (*B. calyciflorus*) yumurtası kullanılmıştır. Üretim aşamasında L tipi yumurtalardan çıkan bireylerin S tipine nazaran daha fazla yumurta verdikleri ve rejenerasyon aralığının daha kısa olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Diğer taraftan rotiferlerde maximum popülasyon artışı bazen tür içi farklılıklardan da etkilenebilmekte (Stemberger and Gilbert 1987) ve vücut oranı bu artışta etkili olabilmektedir. Muhtemel nedeni büyük türlerin vücutlarına oranla daha küçük yumurtaları daha hızlı bir şekilde üretmelerinden dolayıdır. Bu durum büyük vücut oranının önemli bir avantajı olmakla beraber aynı zamanda bazı omurgasız predatörlere karşı bir savunma oluşturmaktadır. Diğer taraftan besin eşik seviyesinin ($r=0$) üzerindeki bir yem konsantrasyonunda büyük türler üreme ve rekabet avantajına sahip olabilmektedirler. Ayrıca besin yokluğunda daha küçük türler yüksek metabolik oranlarından dolayı açlığa daha fazla maruz kalmaktadırlar (Stemberger and Gilbert 1987). Benzer sonuçlar üretim aşamasında L ve S tipi rotifer yumurtaları arasında da gözlenmiş olup söz konusu avantajlardan dolayı L tipi rotiferler deney için kullanılmıştır.

Oküler mikrometre ile yapılan ölçümlerde L tipi yumurtaların 15-20 μ boy 10-15 μ en, S tipi yumurtaların 8-10 μ boy 10-12 μ en, erginlerin ise sırasıyla 250-280 μ ve 150-200 μ boya sahip oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *B. calyciflorus*'a ait L ve S tipi yumurta

Martinez ve Dodson (1992), rotifer (*B. calyciflorus*) yetiştiriciliğinde en uygun koşulları belirlemek üzere yaptıkları çalışmada 30°C sıcaklık ve 107 hücre/mL *Chlorella vulgaris* yoğunluğunu en uygun sıcaklık ve alg yoğunluğu olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise üretim aşamasında optimum sıcaklık $27\pm 1^\circ\text{C}$, pH 6-8, ışık 40 W 1000'lux olarak belirlenmiştir. Yaklaşık 6 saat sonra açılan yumurtalar 12. saat itibariyle erginleşmişlerdir. Ergin bireylerin amiktik dişi oldukları ve 1-15 arasında yumurta taşıdıkları görülmüştür. Sürekli üretim esnasında dişi ferden eş zamanlı olarak ortalama 10 yumurta verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Üretim aşamasında görüntülenen 2 ve 12 yumurtalı L tipi Tatlı Su Rotiferi (*B. calyciflorus*)

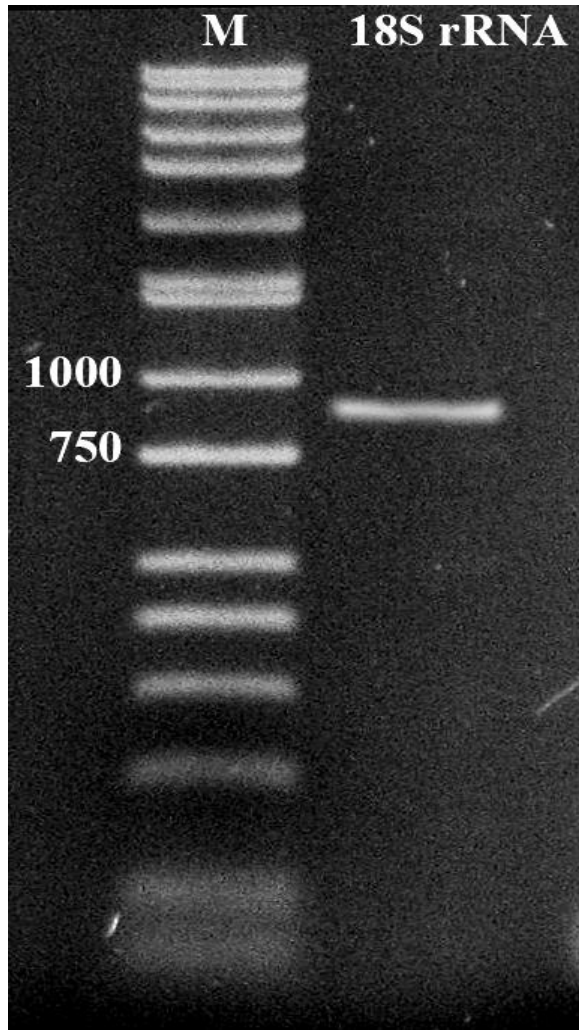
4.2. HSP70 Gen Diziliminin Belirlenmesine Yönelik Bulgular

Kalorik sınırlandırmanın etkisine bakılmadan önce hedeflenen gen (HSP70) diziliminin spesifik olarak belirlenmesi amacıyla total RNA izolasyonunda gerekli miktarı sağlamak için, kurulan canlı yem ünitesinde 8 L'lik 5 adet cam kavonazda üretilen rotifer kültürlerinin tamamı süzölmüş ve total RNA izole edilmiştir.

4.2.1. Total RNA izolasyon sonuçları

Çalışmada rotifer örneklerinden RNA izole edilerek PCR yapılmıştır. PCR için spesifik primer olarak Kaneko *et al.* (2002) tarafından kullanılan HSP70'in F (Forward) primer dizaynı kullanılmıştır.

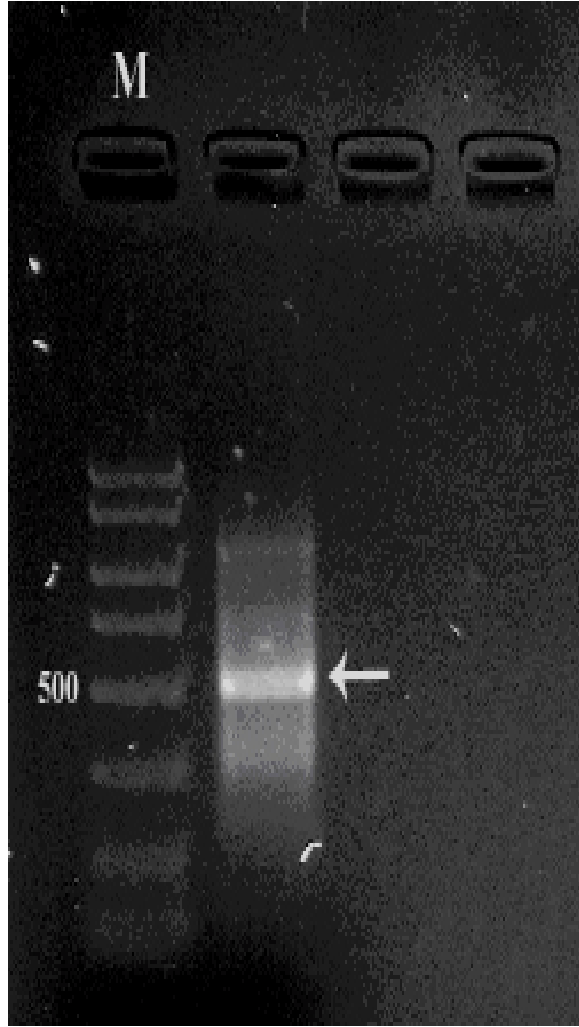
Trizol® Reagent (İnvitrogen) kiti ile elde edilen total RNA %1'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüş ve görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir. PCR sonucunda 18S rRNA'ya ait tek bant gözlenmiş, 28S rRNA ise görülmemiştir. 28S rRNA'nın görüntülenememesinin nedeni tam olarak bilinmemekle beraber inkübasyon esnasında bozulduğu ve aynı inkübasyon şartlarında 18S rRNA'nın stabil kaldığı Collier (1983) tarafından bildirilmiştir.



Şekil 4.3. rRNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.2.2. cDNA kütüphanesine yönelik sonuçlar

3' RACE Yöntemiyle oluşturulan cDNA kütüphanesinden elde edilen PCR ürünün %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.4'de verilmiş olup 494 bp uzunluğunda tek bant elde edilmiştir. Yapılan ilk PCR işlemlerinde Kaneko *et al.* (2002)'den alınan forward (1) ve reverse primer (3) ve internet ortamındaki gen bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'da AB076052 kod numaralı *Brachionus plicatilis*'e ait HSP70 mRNA baz diziliminden dizayn edilen bir adet forward primer (2) ile reverse primer olarak kullanılan AUAP (4) primer farklı kombinasyonlarda eşleştirilerek yaklaşık 4 ay boyunca uygun primer çiftinin ve Tm sıcaklığının bulunmasına çalışılmış ve 1-3, 2-3 ve 2-4 nolu primer çiftlerinden negatif sonuç alınmıştır. Tm sıcaklığı için ise 55°C ile 62°C arasında ki tüm sıcaklık değerleri denenmiş ve sonuç itibariyle HSP70 geninin spesifik olarak elde edilmesi için kullanılan 4 farklı primer çiftinden (2 forward 2 reverse) 1-4 nolu primer çiftinden 56°C'de pozitif sonuç alınmıştır.



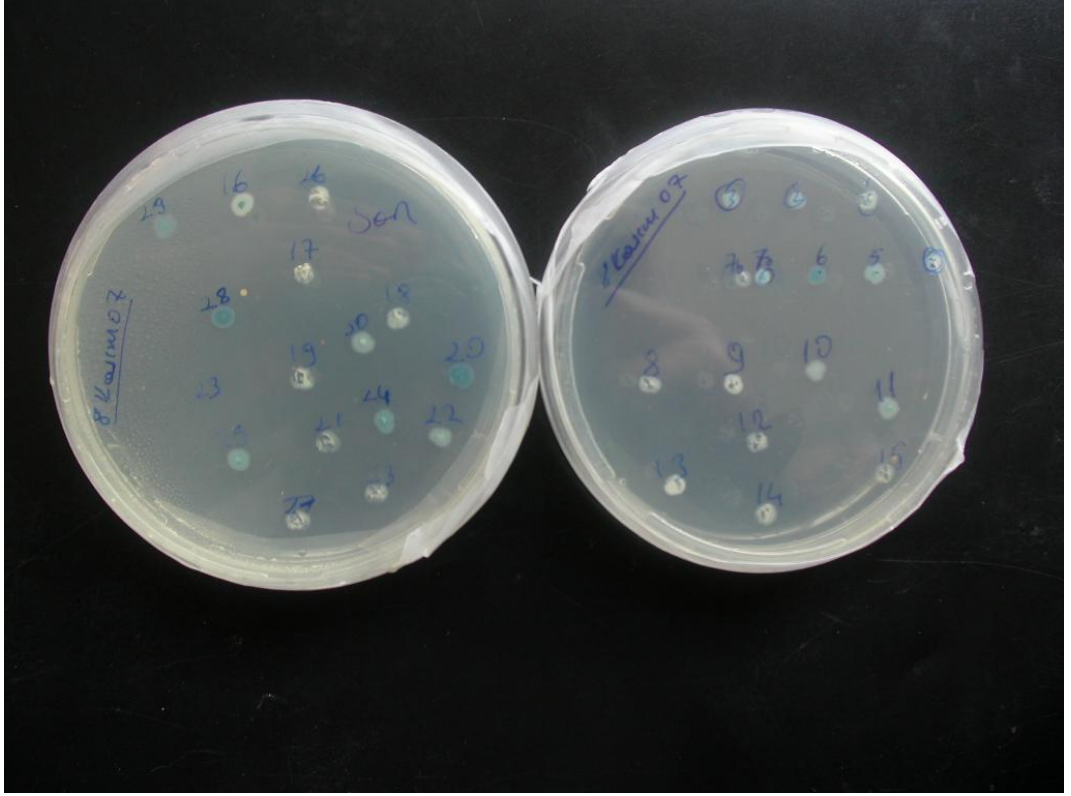
Şekil 4.4. PCR ürününün %1'lik agaroz jel elektroforez'de ayrıştırılması sonucu oluşan cDNA bandı (EtBr ile boyanarak)

Elde edilen PCR ürününe ticari bir firmada dizileme yaptırılmıştır. İlk dizilemeden herhangi bir sonuç alınmadığından PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra GenElute™ Jel Ekstraksiyon Kiti (Sigma, NA1111) ile kit protokülü aynen uygulanarak saflaştırma yoluna gidilmiş ve elde edilen ürün baz dizilemesi için ticari firmaya gönderilmiştir. Gelen dizileme bilgileri gen bankasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kontrol edilmiş fakat tanımlanamamıştır. Kontaminasyon olabileceği düşünülerek klonlamaya geçilmiştir.

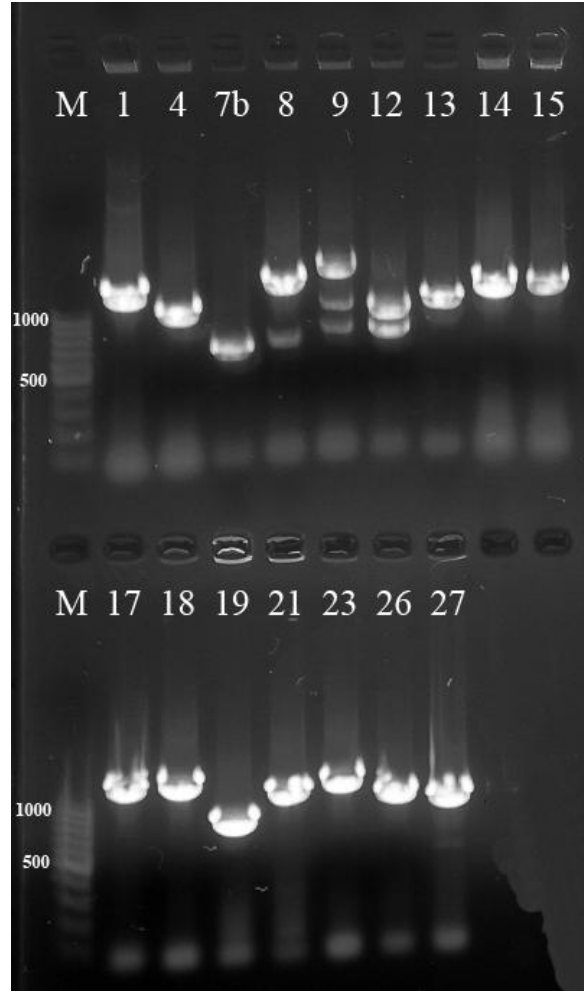
4.2.3. Genin vektöre klonlanmasına yönelik sonuçlar

Gen diziliminin belirlenmesi amacıyla gene spesifik primer ve AUAP primerle elde edilen PCR ürünü pGEM®-T Easy vektörüne A-T klonlama yapılmış ve klonlanan ürün *Escherichia coli*'ye aktarılmıştır.

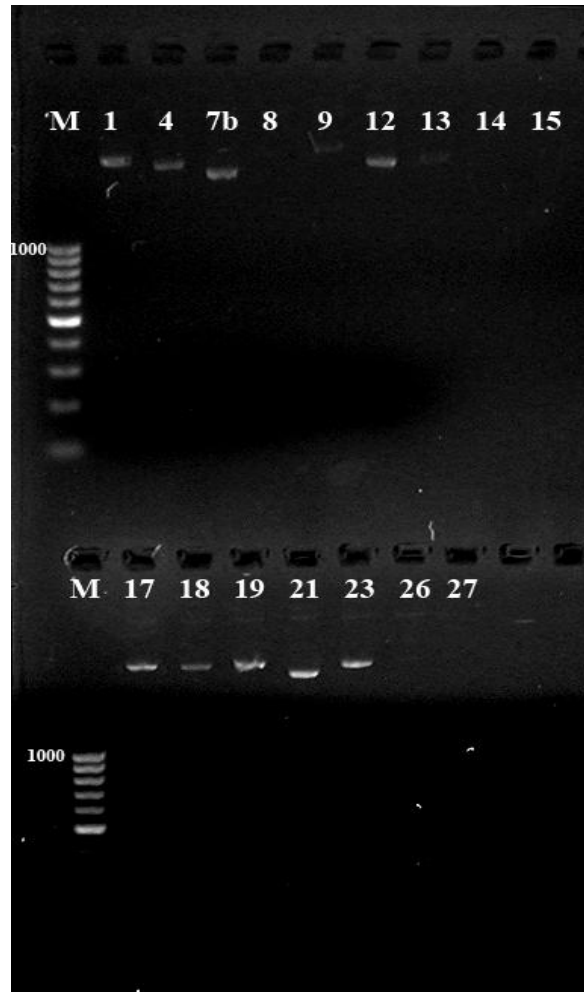
Yapılan ilk klonlamada seçilen 6 örneğe ait dizileme sonuçları internet ortamındaki gen bankasında tanımlanamadığından ikinci bir klonlama yapılmış ve inkübasyon sonrası petrielerde beyaz (klonlanmış) ve mavi (klonlanmamış) koloniler elde edilmiştir (Şekil 4.5). Tüm koloniler petri üzerinde numaralandırılmış olup (27 koloni) klonlanmış örnekler (16 koloni) seçilerek PCR yapılmış ve elektroforezde yürütülmüştür. Seçilen kolonilerde vektördeki genin kontrolüne yönelik olarak yapılan elektroforez görüntüsü Şekil 4.6'da, sonrasında yapılan plazmit izolasyon kiti ile elde edilen rekombinant DNA elektroforez görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir. Elektroforez sonrası iyi bant veren 13 örnek (1,4,7b,8,9,12,14,17,18,19,21,23,26) seçilmiş ve vektöre ait primerlerle genin kontrolüne yönelik olarak elektroforez yapılmıştır. Yapılan elektroforez sonucunda elde edilen görüntü Şekil 4.8'de verilmiştir. Daha sonra seçilen bu 13 örnek SP6 ve T7 universal primerlerle ticari bir firma aracılığı ile dizilenmiştir. Sonuçta bu organizmaya ait 13 adet dizilim bilgisi elde edilmiştir



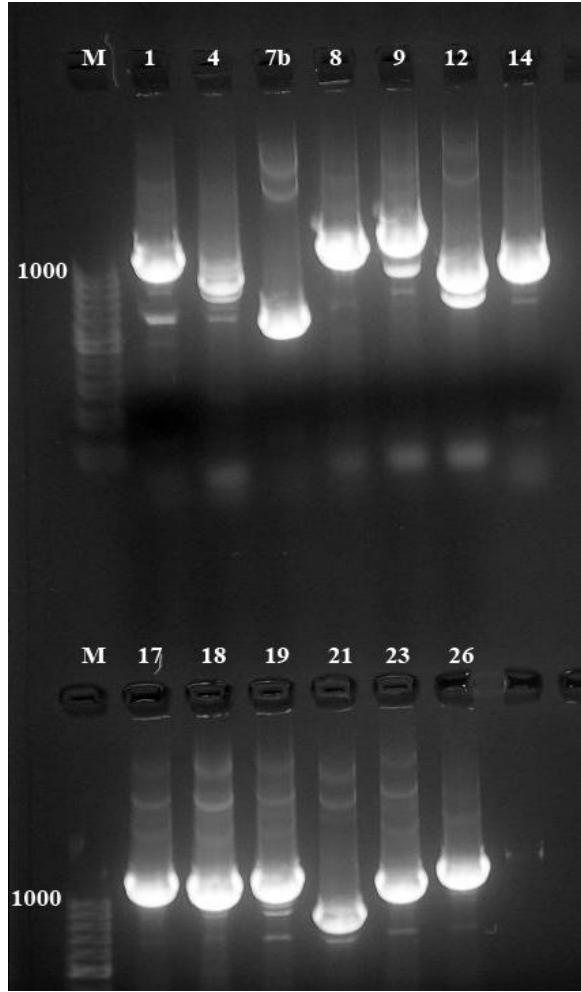
Şekil 4.5. Klonlama işlemi sonrası elde edilen mavi (klonlanmamış)-beyaz (klonlanmış) koloniler



Şekil 4.6. Vektöre klonlanmış genin kontrolüne yönelik yapılan elektroforez görüntüsü



Şekil 4.7. Vektor izolasyon kitiyle bakteriden izole edilen rekombinant DNA elektroforez görüntüsü



Şekil 4.8. Vektöre ait primerlerle genin kontrolüne yönelik yapılan elektroforez görüntüsü

4.2.4. Gen diziliminin ait sonuçlar

Klonlanan örnekler baz dizilimini belirlemek üzere ticari bir firmaya gönderilmiş olup dizilim bilgileri Çizelge 4.1’de, ayrıca elde edilen dizilemelerin pik görüntüsüne dair bir örnek (18 nolu örnek) Şekil 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.1. Klonlanan örneklerin baz dizilimi

Örnek No	Baz Dizilimi
1	<p>ATTGTCTAGCGTGGGGCTCTCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCCTAGTGATTGCATC ATCTACGAGCCCACGGCGTTTACCTGTGTGACAGCGAAGGCAACAAGATTCTCGACGGCTTGGCCGG CCTGTGGTGCCTGGCTATCGGTTACGGTTCACGATGAAGTGGTTGATGCCGCCCAAGCAAATGAAA GAGCTGCCTTACTACAACCTGTTCTTCCAGACCGCCACCCTTCGGTGTGCTGGAAGTGGCCAAAGCCAT CTTCGATATCGCCCCGCAAGGCATGAACCATGTGTTCTTACCTGTTCCAGATCCGAATGCAACAACA CCCTTCTGCGTATGGGCCGCCACTACTGGGCGATCAAAGGCCACCCAAACAATAAAACCTTCTTCATC CGCAGCAATGGCTACCACGGTTCAACCGTGTCCGGCGCCAGCCTGGGCGGCATGACCTATATGCATG AACAGGGCGACTTGCCTATCCCTGGCATCGTCCACATCGCCACTCTTACTGGTTCGGCGAAGGCGGC GACATGAGCCCAGAAGAGCTTCGGCGTGTGGGCCGGAACCACCTGGAAGAGAATATTCTGGAGCTG GGCATGGACAACGTCCGGCGCTTTATTGCCAGCCATCCTTGGTGCCAGTGGCGTGATCATAACGCC TGCAACCTACTGGCCGCGCATCAAGGATATCCTCTCCAAGTACGACATCCTGTTCTGGCCGATGAAA AGATCTGCGGCTTTGGCCGTACCGGTGAGAGGTTCCGGTAGCGATTTCTACTACCTCAAGCCCGACATG AAGACCATCTCCAAGGGCCTGACCTCCG</p>
4	<p>AGGTTACGCGTTGGGGCTCTCCATATGGGCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCCTAGTGAGTGGA TCATCAATGAGCCCACGGCCGCCGGGTCTGGCTCAGGTGCCGGGCGGGTTCAGAAAAGCTGTCATC CTCGGGGCTGCGCTCAATGTATACGATACTGCCAACCTTTCCTTGTGCTCCATTATATAATTTGGTT CACAGTGAATATAGAAATCGCGGTCTACCGACGGTGCCTTTTGAGGTAGAACTCAACTCCAACCTA ATTTGCGCTTTGGAGATCTACATGACCACACATAACCTCAGCTTAAAGACACCTGGATCCACAGCAG GGCCTTCCATATCGGCGCCGCCATTTGCGAGTTGCCTGGCCACCCACAGAGGTTCCAACCTCTTTACC TAGAGCACATCGGCCGCCAAGGACGAAGCCTTGTGCAACATCTTGATCAGCTTAGGCAGCATGCCCC TCGATTATCCAGGTCTACTGGTTTCGAGGATAAACATCATACTTCTCCTTCAACACCAGTGAAAAA TTCTCCCCGTCTTTGAAAAACCTAAAAAACATCGACAAGCTGATAAACAACAATACTCTGGAGGGT GTCAGACTGAAATAAATTCAATCATAATCATCCCTAGTACCCTCTTTGCCGAGTTTGTTCACAAA AAATCTCCGAAAACATTTGGGTTTGACGCCAGCAATTTTTTTTTCCATCACAACTCCAACCCTTCTT TCGAGCCGATTGGCCTGG</p>
7b	<p>NTTATATAATCACGCGCTGGGAGCTCTCCATAGGCGGCGACCTGCATGACGGGCGCTCAATTCACCT TGAGATTCTATTGTCTTTGCAATTAATGGAGCTATCCTTTCATGCTGGCTATGATAGCAGCTGTAGAAC ATCTTCTTGCTTGCCGACAGCTTCGTTTCTATAACGACGGGACACCCGAGTAGTTGATCTCTTGAAT AAAAATCGCTACATGCCCTATGGGACTAGGTGTTGCAAACGCTTAACGCTTTGCTATAGCAGCAAAA AAAGATCAAAAATTTGCTAGGCACTGATTAATCAATCTAAAAATTTATTGTCTTTACTGAGATGGGGA TTTACAATAAGGCCTTTCATATGAAGCGTGTCTTTACCTGGGCTTCTCAAACCTGAAAATTCATACT TATTTATGATAGCAACAAGATCTCCGTACAAGGCAATTTAAGTTAAGCCTTAACTACTGATGAAAAAA TGCTTTTTGAATCACAATGATTTGACTTTCTTGCTATCAATGGACAACCTTATGAAGACATTATTAGAG CCTGACCACCCGCTTAAACATCCACAAAACCTTGCCATAACTTCGAAAAACCACTATTTCCAAGGGT GCATGAGATCTAAAAAGTAGTCATAAAAGCCATGGCGCACCTTTGGCGATAATTGATCTAAATCTC AAACAACAAGCTTGATTTGATCCAACAACAATTTTTTCATAACCCCAAGCCATAAAAAATCCACTGAT GAAGTGCTGTAGACCTTGGCGGATTTAGAACAACCAACTGGCAAAAGATAAACTTGCAAAAATGCGA</p>

Çizelge 4.1. (devam)

8	<p>GTTAGTACACCACACGGCTTAAAGGACAATTTGGGGCGAAAGGTTATAGTAACTTGGGTGTTAACC GCTCGGGGCAACTTTACTATGCCTATGTGAAGAATGGAGGTAGAGTGTTATCATATCACGGCGGAAC TTAGACCTATCTGAGAGAGAAAGAACTTTTCTGTATTTTCCAGCGCGGCATTTTCGGTTCTTAAGAGG GCGCGAGAGGACACCACCTGATTAGTGTGCATCTTCTCTGAGAGAAGAAAAGGACAGACCTGCGCCG CCTCCACTCAAGGAATAGCGCTGGGCGCCGTAATGGCTGTTCTGTCTTCTGCCTGAGAGACAGCCGAA AGAATATCCACCACAATGTTGGTTGGCGCCACGCGAACTTAAGTACCAATGCGGACGATCTTTAAAT GGACCTTTCTAGAACAAAAGCGGAGGTTATACAAGAAGAGCACTTTCTGTACGTGAGCGCGGTATCT TATAGTGCTGGCACTGTACAACCAATAATGCGCTAGCTTGGCGACATCTTTGTGTGGCGAGAGCAAC CACAGAGCCGCCATAACGAATTGTCGATAGGCAAGTATCTCAGCCCACTAGCTACAAGACTGTGAT AAAAGTGCCGCTTTCTGAATATCATAGAAGTATATTGATAGCTTTTTCAAGATATAAAAATCGTGCAAC CCCTCTTCTTATTTAAGATCGCAAAGTAGACACTCTAGAAACCCAGCATCTATACACAAATCCCAAC TAACTTTGTGTCTTGACACTCACGACGAATATCAACATCATTGACCTAAGGGGGTGTCAAGAAGT ATCCTAACAAATCCTTGTACTCCAAAAAACCACGGTCGCTACCTCTTCTGGCGTACCAAGTTTTCC AAGAAAAATCTCAACAAGACCACTCTTAGCGTTTTAGTACCACCCACTAAACAAGTATTTCTTCCA TCTCTCACAAACAAAAGCAAAGAAAATCAGCTCTTGAATATGTGCTTGTAA</p>
9	<p>AGGGTTTTAATACCCACGGCGGCATATCCCATATGGGGACGACCCGGCATTGCGGACCTGCGCAACT TCACTTGGNTGNTAGGGCGCTCTCTACTCATACCAAGCGCACACATGTAGCGGAGGATATACACAG TACTCCGTGGGAAATTGACACGCGTCGCGCGAGNTAGAAACAAGCCTCTGTATCATAGTGACAACG CAGAGCACGTTGCCTATCTCTTGAAGCGCCGAGAGAGACACCACGAACAAGAAGGTGGCATCTTCTC GCAAGACAACACAGGCACACGAAGATGCNAGCCCTGTCATCACAGCAATTACCGTCCCTGGCGGCCAT ATTCTAACACATCTGGCGCTCTATCAGAATAAGCAGCTCAAGAGAAGAAGCCACGCAAGAAGTATGG GTGAGGCCACCGCGGAGTATACAGACGACAAGCGGACCGTGTAATCAAAGAGCATGCTTCCCATGGA CACCTGCGCCGTATATGCACCAACCATCGCATGGCTCTGTTGATATGAAGGAGAGTCGAGAACATTTA ATGCTGCGCCGTACAAACATAACAAACCCCATACATTGTGCGGACACTCTTTTGTATGCAGAGACCAA ACAACAGGAGCGTGCCATCAAGTACTTTTCGATATGCACAGGTCTCCAACCACTCTAGAACACTAAG ATACGCAAAAGAGTCCATCTTTATGCAACATGTGGGTGTCTATCTGAATGTTCTTTCCAAAATACAAA ACGTCACACCCTATCTACTTATAGTAACAACCTGCACAGTACAACCCTATCCACCCGGCATCCTTTCC CAACACCACATACTCAACCTGTTGGGCTAATAAGCACTACACGCATTCTAGACAGTTA</p>
12	<p>NCACTATCACGCGTGGGACTCTCCATATGGTGCACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTGATTTCA CTCTATGAGCCCACGGCCACCGAATGAGCACTCCTGTTGACCATCCCTATCAACGACTTATCCTGAAA GGCGCTTACCGATACTTTCTTCATGTGGCTGCGTAAGCCCAGTCGCAGGAAGCCTTCCCTGCCACGC GCTCATCCTCACCATCGTTCAGGCTGTGTACGGCGGCATCAAAGCTCCTCGCTGCACGCCCATCGTTG TTTTCCATTTGTGCCGTTTGGCACTGACAGCAAAAGGAGTGGCGTCTTGGAGCATGCCGGGATC ACGCATCGGGACAAACTTTGAGCCCCTTATCGCAGTGGCCAGTTCATGTTTTTCAAGTCCAGCCTGA ATCCGTCCCGCATCACGACGTGATAACCGTACCTACGGCTTGAACAGACCTGAAAATATCGGTCCG GCTCTGCCCGAATTCATCATCGCCGCTTGATCGCCGAAATGGTCACGCAATTGCCGTCCGGGCCTT GGCGAAATCCATTCCATATATTGTGGGCTTGGCGCCATTGCGCTTATCCGACAGATCAGGAAGCCGC TGTGGCGTTGGAGCAGGTAGTGGTGGTCCGGCTTGGGCACCACAGTGGTTTGGGGCGCAGGCGTTA CCCGAGTCGGAACGATGTTCTGTCTGCTCCTTGCCTGTGAGCAGACTTTGCAACTGCGTAAAAAACTGG GTGAACAGTTCAAGGAGCTTCGTAATACCGGGGCGTGCCTGACTGTATTACCAACGCTACCCTTGAC TTTATTACCGAGTGATGAGGGGGGCTGCCTATCTAC</p>

Çizelge 4.1. (devam)

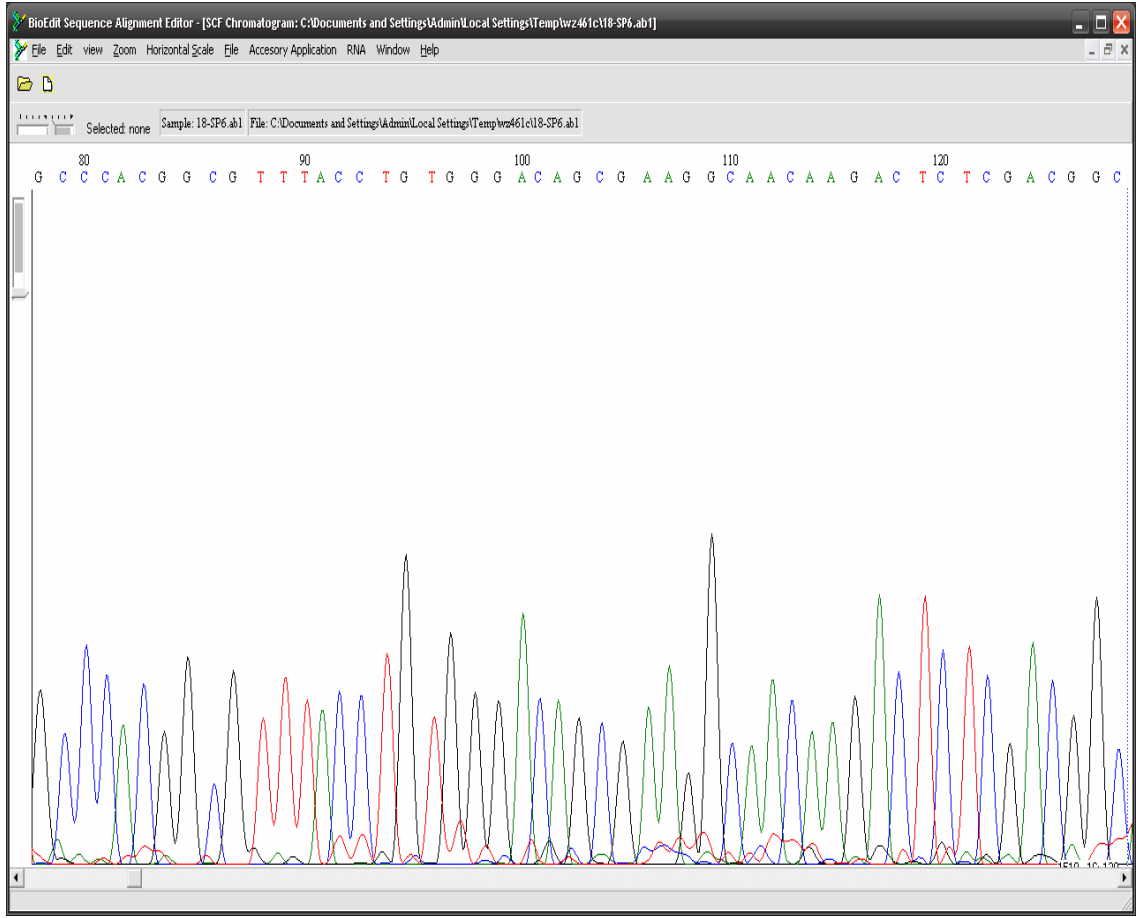
14	<p>NTTAGATGACAGCGTGGGACTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTG CATCATCAACGAGCCACGGCGCGCATGATCAGGCCATTCTCCAAGCAGAACGTGCGGCATATCATG CCAACACCACGGTCTTCATAACGCTTGCGCGTTGCTTGTCTGAACCAACTCGATCGCACCGAGCAT GCCCACACCGCAAACCTCACCCACCAACGGGTGATCAGCCTGTTCCCTCAAACGCTTTTGCAAATAGG GTGCCGTTTCGTCGTGCACGCGCTTAACAATTTGTTTCATCGCGCATGATACGGATGTTTTCCAGGGCT ACCGCTGCGCCACCGGGTGACCGGAATAGGTGAAGCAAGGTTGAAATCACCGCCTTCGTTCAATA CTGCGACCACTTCGTCGCGCACGATCAGGCCACCCATCGGGATGTAGCCGGAGGACAGGCCCTTGCC GATGGTCATCATGTGCGGCTTGAGGTATAGAAATCGCTACCGAACCACTCACCGGTACGGCCAAAG CCGCAGATCACTTCATCGGCCACGAACAGGATGTCGTAAGGCGAGGATTCCTTGATGCGCGGCCA GTAGCTGGCATGCGGTACGATCACGCCACCGGCACCCTGGATCGGCTCGGCAATAAAGGCGCCGACG TTGTCCACGCCAGCTCCAGAATCTTCTTCCAAGTGGTTCGCGGCCACACCCGAACCTTTTCGGG CTCATGGCGCCACCTTCGCCAAACCAATACGGCTGGGTGAAAGTGACCATGCCCGGGATCGGCAA GTCGCCCTGTTCTGCAT</p>
17	<p>AGGTGTAATCTCACGACGCCNTGCGCGNAGCAATCNTACCATTANTGGGNNCCTGAAACACGTGT CATGAGGCTGAGACCCGTGCGTATTTCTACATCCCACGCTGGANTCATGTGCACCTCTTTCGCATTT TATGNCNCTCTATCGAGTGCGGTAGTGTCGTACNGCATTGCACGTCGTCGNAAGTGTGTCTAAATCGT CGCACATGTGCGTGTGACACAGCGATATCTTCTCNGCCTTCACTCNGATCGACTGCACAGCATTTTGN ATATAANTAGTTACAGTCGCGGACGGACCCTCTTCTTATCTCAGTGTGAGATAGCATCTCGATTG GAATCATCAGATAANTCTGTCTCTCACTTCGACCGCATCTTGATTGGATCTAGGGTCCGAGTGGCTC CAGATAACCTCATCACAGATCTTCTAGTGTAGTAGGACTGCGAGAAACAACAGCCCTCATTGAAT GCTTACCTCAGCCGCTACGGTACTCTTGAAGTACCACTCGAGTACTACGCTTGATATTAGTTCTGTA GTACAGATAACAATTGTGGGGATATGTACGGCACTACAGCACTACTATGTGAGAGTCTAGAGACGT TGCTATTCTATGTAGTCTCGTGTACACCCTACGATTAGCAATCGAACAGAATATACTGCAACAGCTT TATATGATACTCGAGACAAGTCAANACCAACGCATGACTGCTCTATTACGCAATACTGCCTGCAGC ACTTATATGGTCGTCTGACTCCTTAGATAAATCAGCGAAAGTGTGANCACAGAGACATGCCCTC TCGTTTTCCGAATAATCTACACTGAAGATACTTTTTCTGTGATGTCTTTAGCACNGATACTTAGTATC CTTGAGACGAACCTCGTCTTGCTCTCAAGAGTACTACACTGTGTGTTAAGAGAGCTACTGTGTTCTCC ACACCATGGTTGTATATTATGACAACCCTCCCAAAAATTCCGCTATGGCGTGGATATATGTATAC CAGNCGACAATAACAACAATATACATTTCTATCACAAGAGCGCTGAGCCTTTGAGCCTAGAGATC ACACAAGAACCCGCTGCTCGGACTGAATTCATGTAATCCTAATGCCGGGCTCCCACTTTTCTTGC CGGTCAATTCTTTTTATTTGTATATAATCAAGAAANAGCCTCGACGTAAGAAACACATTTACGGA GTTCTTGTGCGCCCTTAAAGAACTAATGAGACTTTGCTTTTGTACACTCCCGAGCCACCCCAATA CGACAATACTTCTCAGATTCTTCTCCGAGGTGGCTGGTACTTGGCACATATGTGT</p>
18	<p>GCGACTTGCCGATCCCGGCATCGTCCACATCGCCCAGCCGACTGGTTCGGCGAAGGCGGCGACAT GAGCCCGGAAGAGTTCCGGCGTGTGGGCCGGAACCAGCTGGAAGAGAAGATTTCGCGACATGAGCCC GGAAGAGTTCGGCGTGTGGGCCGCGACCCAGCTGGAAGAGAAGATTCTGGAGCTGGGCGTGGACAA CGTCGGCGCCTTTATTGCCGAGCCGATCCAGGGTGCCGGTGGCGTGATCGTACCGCCTGCCAGCTACT GGCCGCGCATCAAGGAAATCCTCGCCAAGTACGACATCCTGTTCTGTTGGCCGATGAAGTGATCTGCGG CTTTGGCCGTACCGGTGAGTGGTTCCGGTAGCGATTTCTACGACCTCAAGCCCGACATGATGACCATCG CCAAGGCCTGACCTCCG</p>

Çizelge 4.1. (devam)

19	<p>GCCCGAATATCAGACAAGACGCCCTCACGCAGCGCGGCATCGCGCCCGGCGAAGGTCACATCTTTAA AGGTAAAGTGCCAACAACTGTCCGAAGTGCATTCACAACTTTGCACCGCCTGACTAATGCGCTCT TGCTCGGCTACGGGTCGGTTTTTAAGCATAGTGTCTCCAGGCTCGAAATCCCTGCTCATAACCCCA CTTGATTCATCGACTGGATCGGTAGGAGCCAAGCCTTTGAAGATGCCAACTCCGGCGAGAAGTTG GTCTTGAAAGGCGGAGCTACCTGACTATATGAGGCCGACAGGGAAGACGCGCTGCCAGCAAGGCG GCCCCAGTAAAGACACCATTTTTAACAAATGTTCCGGCGGTGCATAGTAGTAGAAATTGGCGATTAGC GGAGTATAGCCCGATCGGTTTCAGGGTCTGATCCTGACCTAGCAAAAACGCCATCAGGTCCGGCCATT TCTTCTTGGTCAGGAGTTGATCTAGTCCCTGCGGCATCATTGAGGTATTCTGCATTTCCATCGACACA ACATCGGCGCGGGGAATCCGACCGAGGTGGTCTGCGACGTACCCAGCACAAAGGGCCGT</p>
21	<p>CTAATATCACGCGTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTGC GATCATCAACGAGCCCACGGAGATCCAGGTAAGCCCAGGCCAGCTTCAGGCGGTACAACATGTTGG TCCATATCGCGGCCTTCAATTTCAAGCGTGAAAGACTTCTGAAGGTCCTCGTCTGGAGAAAAGACTC GCGACCCGACCAGCATGAACAAGGCGGAGCCGAGGCTGATCATTGCTATGCCAGCAAAAAAGCT CAAAATTTGCTACCTGCCGATTTAATCAATGATAAAGTACTGTGTCTTTGCCGAGACGGGGATTTGCC CTAAGGCCTTTCAATGAAGCGTGTCTTTAAGCTGACTTCACAAAATATAAAAGTTAATACTTATTT CTGACAAGCAAAAAGAACTCCAAAACATGCGACTTAGGTCACTCCTTAAACTATTGAAGAGCTGT TCTTTGAATTCGGATATTTAGCTTTCAAACATATAAATGGAAGACTTCTGTGAAAAAATTTGTAGA TCCTTATACCCAGCTTAAACAGCCACTAAAACTTGTGTATAGTCCGCTCATACCAACTATTTTCAA AGGTGCATAACATTTTACAACGTAGAGAAAAAATACATAGGCGGTCTCTTTTGGCGAAAACCTGTATC TAAAAATTGCCTAACAAAAACTATGATTTGAACCACAAAATATATTCTCCTAATCCAAAACTCCAT AAAAAATCCGTGTGCTGAGAGTGCTTTTACAACCATGGGGGATATCTAACCAAGCTAATTC</p>
23	<p>GTTTAAACCAGGTGCAAAAACCTTGGAGACAGCGATCAGCTCTCCAGCTCTCTTCGCGGACATTTAAT ATTGTCGAGAAAAAGGCGGGTAAGGTGTGAGGCCTCGCCACAGTAGCAGAGGGGGGATTTTTTTCTT CAGAGGCGTTTCCACTTAAACTGCGAGAGACCCCTCACGAGAGCTTCCCAAGGGGTATATACACTG GCAATAACATATGGACCTGCTCGCCGTCAACAGAAACATCCGTCGGCGTCCAAAAAAGTAGCACA TATTTATGCTCCGCCAGTCTGCAACGACAAAGCGACAGGACGTCTTGACAACGCGGTATATACCG GACGCCTTCATTACAAAAGATTGGCACACTCGTTAAATGACTAACATCCAGATTTGCATACATAGTCTG CTGCCATACCAAGACCAACTAGCATTGCTAACACCGCTGTCCCTTTGCGACAAAACAACACACCTAA CTTCCCATGAAGTTGCAAAAACAAAAGGCTCGTGCAGCGTCTACGCAGAAATCCAACTACCTTAAGA GGAACCTCAATAAAACCTTGAAGGGCAGGAGAAACACTAACCCACTATTAAGTGGTGGAAAATAC CAGCTCCACGTTTTAAAGCAACTACTGCCGTCCAATGGCCCGACCAAAAATATACCTAAGATCCTATGT TCAACATATAAACCCGAGGTGGGCAAGCCATTCATTGACACACGTGCGTACCAGTGAATCACATTT</p>

Çizelge 4.1. (devam)

26	<p>TTGTATATTAACCAAGGTTTGCCACTACAACCCTTTGTGGAAGACANGNCGCATTCTAGTAGTCGTCCG AGAGCCTCTCCTTGCTGTGTCGGAGCACATTCGCATGATATGTCGCAGTCAATAAGCGACGAGAGTTAT TATGATCGTGATGGTCGTGTCAGCCACAGCATTCCAAGAGAGCAGNGTGACTATGCTTTCTCATATCT ATAACTGCGCCGTTTCGCAATCTTTAGTACATGTCGAGGAGCACACCGCGCTCTTGAAGAGAGCATTCA CCATCGAGGGAGTATGTACTATCAGTCTAGGCGAGATAAGACCGCAATCGAACACCACGCGTCGCGC TGTCCGACTAGGAAGAATCGTCTCGTCTTGCTAGGCCACTAGAAAAAAGTTAGCGACACTAGTATTT GATTGCCCAGGTCGCGAGCTACATAGCAACTACCGACATCAATATCGTTTAGCCCGTTACATAGGACT ATACGACGCGGTTATCACACAGACACGACCGCCTCAATCTACGAGAGAGCATTGTGTCACCGCACTT GCAACTAGAGATCAACATAACTCCATACGCGAGAGACATTGTCGTACACAGTATAGTCTATGCGCAC GCGCAATACGCCACATAACCTCATACTAGTAGANTAGAGCGATAGACCGACGCGCTCGCCACCCATA TGATGCGTACTGAAGCACAAAACACACATCCCGGACCACTCGCTGACATAGCTGTCAGACACTCTC GAAAAGGTTTCGTTGCCCATCGTGTGCTACCTTCGAGAAACTGCACAAGTATCGCAGTGAGAAGAGAT GTCTACATATATGAATTCCTATAGGGCAAGGCATGAGGAGACAAGACTACACTCCCAACCTATCAGA CGTGTGTAGAGCGAATAGCCAAGCTACACAGGCTACGAAAAGCGAGCTTCTGTTGCATATTTATCGCCC TCGAGCGAGAAATATATTTGAGAAACCCTTATTGTACGGGCATATATAACACACAAAAGGCTGGGCGA ATATCAATCTCGGGCGATTTTCAGCAAGTTCGCACACAAAAGTGAAGGACAACGTTTAAGCCAAGCTA GCGCATAAAAAAACCGAGTGCAAGGGCCAAGGATCACACTAAGGAAAAGGTTGACTCCCTTATCGGAT GATACAATGGAACGAAGCTAGAAACAA</p>
-----------	--



Şekil 4.9. Dizileme bilgisine ait pik görüntüsü (18 Nolu Örnek)

Dizileme bilgilerine ait bir örneğin verildiği Şekil 4.10'dan da görülebileceği gibi elde edilen pik bilgileri oldukça belirgindir.

Diğer taraftan hedeflenen gene (HSP70) ait elde edilen 13 adet dizilim bilgisinin internet ortamındaki gen bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)'da herhangi bir organizmaya ait HSP70 ile homolojisi bulunamamıştır.

Bu organizmaya ait bugüne kadar gen bankasında yayınlanmış herhangi bir dizileme mevcut olmadığından, elde edilen dizilemelerden hangisinin HSP70 olabileceği kanısına varılamamıştır. Bu bakımdan elde edilen bulguların doğrulaması ve hedeflenen

genin dizilimi tespit edilememiştir. Buna rağmen elde edilen dizilimler oldukça başarılı pikler vermiştir. Dolayısıyla bu gen dizilimlerinin yeni olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca, dizilemenin kontaminasyon olabileceği dikkate alındığında herhangi bir organizmaya uymaması dikkat çekicidir. Diğer taraftan dizileme bilgisinin klonlanan vektöre de ait olmadığı görülmüştür. Elde edilen tüm veriler bu dizilimin bu türe ait ilk veriler olduğunu göstermektedir. Bu bakımdan bu dizilimlerin, bu tür üzerinde yapılacak gen dizileme çalışmalarına kaynak teşkil edebileceği düşünülmektedir.

4.3. KS'nin Popülasyon Yoğunluğuna Etkisine Yönelik Sonuçlar

Bu çalışmada KS'nin tatlı su rotiferi (*B.calyciflorus*)'un yetiştiriciliğinde popülasyon yoğunluğunu nasıl etkilediği araştırılmaya çalışılmıştır. Literatürlerde KS'nin tatlı su rotiferlerinde popülasyon yoğunluğundan ziyade genellikle ömür uzunluğu, doğum ve ölüm oranı, fekümdite gibi demografik parametreler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Ayrıca bu alanda yapılan çalışmalar rotiferlerin acı su türleri özellikle de *B. plicatilis* üzerine olup gıda olarak kullanılan besin tipleri ve konsantrasyonları da farklılık göstermektedir. Fakat özellikle besin konusunda Sarma *et al.* (2001a,b; Flores-Burgos *et al.* 2005) alg türlerinin, bunlar içerisinde de *Chlorella sp.* türünün hem büyüklük hem de besleyici yönden rotifer kültürleri için mükemmel bir gıda olduğunu bildirmektedir. Deneysel *Chlorella* yoğunluğu $1,5 \times 10^6$ hücre mL^{-1} olarak sağlanmıştır. Rotifer türleriyle yapılan deneysel çalışmalarda (Sarma and Rao 1991; Sarma *et al.* 1999) genellikle bu yoğunluk tercih edilmiştir. Çünkü bu miktarın rotifer türlerinin bulunduğu doğal ortamlarda başlangıç besin seviyesinin üzerinde olduğu Nandini *et al.* (2005) tarafından bildirilmektedir.

Diğer taraftan çalışmada *B.calyciflorus* ticari bir şekilde elde edilen dormansi yumurtaların kuluçkalanması yoluyla kültüre alınmıştır. Jensen ve Verschoor (2004) bu şekildeki bir kültürün yumurta kalitesini artıracaklarını ve yumurtadan çıkan yavruların benzer büyüklükte olacağını belirtmektedir. Ayrıca rotifer türlerinin popülasyon yoğunluğu ve demografik parametreleri üzerine yapılan pek çok çalışmada sayısal

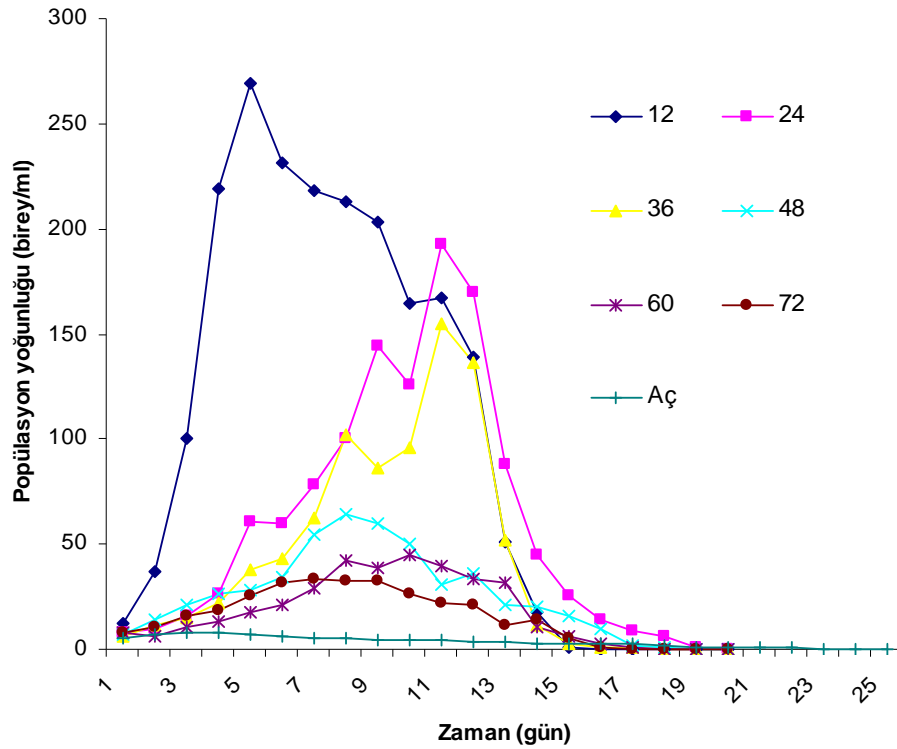
değerlerin kültür şartlarına göre (fitoplankton tipi ve yoğunluğu, sıcaklık vb.) değiştiği görülmüştür. Bu nedenle elde edilen sonuçlar bu faktörler dikkate alınarak tartışılmıştır.

Araştırmada KS aynı miktar hücre içeren tek tip besinin (*Chlorella sp.*) rotifer gruplarına yemleme aralığının uzatılması şeklinde uygulanmıştır. Uygulanan KS şartlarında tatlı su toriferine (*B. calyciflorus*) ait maksimum popülasyon yoğunluğu (birey mL⁻¹) ve yoğunluğun pik yaptığı günler Çizelge 4.2’de ve zamana bağlı olarak popülasyon yoğunluğunda gözlenen değişim Şekil 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.2. KS şartlarında elde edilen max. ve ortalama popülasyon yoğunlukları ile pik günleri

Gruplar	Yemleme aralığı (saat)	Popülasyon yoğunluğu (birey mL ⁻¹)		Pik günü
		Maksimum	Ortalama±SD	
A	12	334	269,0±40,12 ^a	5
B	24	251	193,0±48,26 ^b	11
C	36	181	154,5±17,69 ^b	11
D	48	77	64,25±9,21 ^c	8
E	60	58	45,25±10,21 ^d	10
F	72	47	40,75±7,22 ^d	8
G	Tamamen aç	16	15,0±0,816 ^e	4

a-e: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistikî olarak önemli bir fark yoktur. (p>0.05)



Şekil 4.10. KS şartlarında popülasyon yoğunluğunda gözlenen değişim

Çizelge 4.2. ve Şekil 4.11'den de görüleceği üzere en yüksek popülasyon yoğunluğu ($269,0 \pm 40,12$ birey mL^{-1}) 5. gün itibariyle 12 saat aralıkla beslenen grupta elde edilmiştir. 24 ve 36 saat aralıkla beslenen gruplarda ise en yüksek popülasyon yoğunluğu 11. günde sırasıyla $193,0 \pm 48,26$ birey mL^{-1} ve $154,5 \pm 17,69$ birey mL^{-1} şeklinde gerçekleşmiştir. 60 ve 72 saat aralıkla beslenen gruplar birbirine yakın değerler gösterirken tamamen aç bırakılan grupta en düşük popülasyon yoğunluğu elde edilmiştir ($15,25 \pm 2,55$ birey mL^{-1}).

Zooplanktonik organizmaların popülasyon büyümesi üzerine yem konsantrasyonunun etkisi hem alan hem de laboratuvar çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (Çizelge 4.3) (Edmondson 1960; Lucia-Pavón *et al.* 2001, 2005). Dolayısıyla popülasyon büyüklüğünü belirleyen en önemli faktörlerden biri besin yoğunluğu ve besin tipidir (Yoshinaga *et al.* 2003 a,b; Enríquez-García *et al.* 2003). Bu konuda yapılan çalışmalar içerisinde Rad (1992) *B. calyciflorus* için en yüksek popülasyon yoğunluğunu $2-3 \times 10^6$

hücre/mL yoğunlukta tek hücreli yeşil alg (*Ankistrodesmus spp.*) ile denemenin 8. gününde $101,17 \pm 1,56$ olarak saptamıştır. Martinez ve Dodson (1992) $107 \text{ hücre mL}^{-1}$ *Chlorella vulgaris* yoğunluğunda en yüksek rotifer üretimine ($81080 \text{ rotifer/L/gün}$) ulaşmışlardır. Sarma *et al.* (2001b) $3 \times 10^6 \text{ hücre mL}^{-1}$ *Chlorella* ile *B. calyciflorus* ve *B. patulus* için en yüksek yoğunluğu $103 \pm 8 \text{ birey mL}^{-1}$ ve $296 \pm 20 \text{ birey mL}^{-1}$ olarak elde etmişlerdir. Arimoro ve Ofejekwu (2004) *B. calyciflorus* üzerinde yaptıkları çalışmalarında maksimum popülasyon yoğunluğunu kültürün 10. günü itibariyle tatlı su *Chlorella*'sı ve ekme mayası ile beslenen rotifer grubunda $562 \text{ birey mL}^{-1}$ olarak elde ederken, yeşil salata+ekme mayası ve karışık alg+ekme mayası verilen gruplarda ise sırasıyla $486 \text{ birey mL}^{-1}$ ve $401 \text{ birey mL}^{-1}$ olarak saptamışlardır. Sadece yeşil salata verilen grupta ise maksimum yoğunluğa ($152 \text{ birey mL}^{-1}$) kültürün 6. günü itibariyle erişilmiştir.

Çizelge 4.3. Bazı rotifer türlerinin besin konsantrasyonuna bağlı olarak değişen popülasyon yoğunlukları (birey/mL^{-1})

Rotifer türleri	Yem tipi	Yem seviyesi (hücre mL^{-1})	Popülasyon yoğunluğu (birey mL^{-1})	Literatür
<i>Anuraeopsis fissa</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	$0,5-8 \times 10^6$	361 ± 62 2312 ± 226 238 ± 50	Dumont <i>et al.</i> 1995 Stevenson <i>et al.</i> 1998
<i>Brachionus calyciflorus</i>	<i>Chlorella</i>	2×10^6	$55 \pm 1-471 \pm 72$	Lucía-Pavón <i>et al.</i> 2001
<i>B. calyciflorus</i>	<i>C. vulgaris</i>	$0,5- 4,5 \times 10^6$	1227 ± 83	Sarma ve Nandini 2001a
<i>B. patulus</i>	<i>C. vulgaris</i>	$4,5 \times 10^6$	80 ± 5 397 ± 7	Peredo-Álvarez <i>et al.</i> 2001
<i>B. variabilis</i>	<i>Chlorella</i>	$0,25-4 \times 10^6$	2-9	Peredo-Álvarez <i>et al.</i> 2001
<i>B. calyciflorus</i>	<i>C. vulgaris</i>	$4,5 \times 10^6$	4	Sarma ve Nandini 2002
<i>B. patulus</i>	<i>C. vulgaris</i>	$4,5 \times 10^6$	117±2	Enríquez-García <i>et al.</i> 2003
<i>B. macracanthus</i>	<i>C. vulgaris</i>	$0,25 \times 10^6$	10-75	
<i>Platyias quadricornis</i>	<i>C. vulgaris</i>	4×10^6		
<i>L. quadridentata</i>	<i>Chlorella</i>	$0,9 \times 10^6$		

Treese ve Davis (2000)'e göre besin seviyesi ile birlikte sıcaklık artışının rotifer kültürlerinde popülasyon yoğunluğunu etkilediğini, özellikle $26-28^\circ\text{C}$ arasında daha büyük suşların küçük olanlara nazaran hızlı büyüme eğiliminde olduklarını belirtmişlerdir. Park *et al.* (2001) tatlı su rotiferinin (*B. calyciflorus*) yüksek

yoğunluktaki kültür çalışmalarında denedikleri 3 farklı sıcaklık (24, 28 ve 32°C) içerisinde sırasıyla 6500, 8600 ve 8100 birey/mL rotifer yoğunluğu elde etmişler, sıcaklık artışına paralel olarak rotifer yoğunluğunda da artış olduğunu bildirmişlerdir. Tatlı su rotiferlerinden *Brachionus havanaensis*'in hayatta kalma ve üreme performansı üzerine 3 farklı sıcaklık (15, 20 ve 25°C) ve üç farklı *Chlorella vulgaris* konsantrasyonunun ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 ve 2×10^6 hücre/mL) etkisini birlikte denendiği diğer bir çalışmada ise hem gıda seviyesinin hem de sıcaklığın bu türe ait fekümdite değerini etkilediği, yüksek sıcaklık ve gıda konsantrasyonunda hayatta kalma süresinin kısaldığı fakat döl veriminin arttığı bildirilmektedir (Lucía Pavón-Meza *et al.* 2005). Bununla birlikte Hoff ve Snell (2001)'e göre 30-35'de maksimum artış gösteren bazı termofilik suşlar hariç, genellikle yüksek sıcaklık (>30°C) termal strese düşük sıcaklık (<20°C) ise daha az döl verimine neden olmaktadır.

Diğer taraftan Sarma *et al.* (1996)'ya göre besin tipi ve yoğunluğuna ek olarak kültürde inokülasyon yoğunluğu ve türler arası rekabet de popülasyon büyüme oranını etkilemektedir (Sarma *et al.* 1999, Nandini and Sarma 2001). Mesela *Brachionus calyciflorus* ve *B. patulus* arasında düşük ($1,5 \times 10^6$ hücre/mL) ve yüksek ($3,0 \times 10^6$ hücre/mL) *Chlorella vulgaris* konsantrasyonunda ve 4 farklı inokülasyon yoğunluğunda (%100 *B. calyciflorus*, %75 *B. calyciflorus* + %25 *B. patulus*, %50 her iki tür, %25 *B. calyciflorus* + %75 *B. patulus*) yapılan çalışmada her iki tür için de yumurta oranı ve popülasyon yoğunluğu arasında ters bir ilişki görülmüş olup maksimum popülasyon yoğunluğunun gıda ve inokülasyon yoğunluğundan önemli derecede etkilendiği saptanmıştır (Sarma *et al.* 1999). Yine Hagiwara *et al.* (2001) başlangıç rotifer yoğunluğu 2000-20000 birey mL⁻¹ arasında değişen *B. plicatilis* kültürlerinde 35 L'lik tanklarda 20000 birey mL⁻¹ inokülasyon yoğunluğunun hayatta kalma oranını düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Bununla birlikte laboratuvar çalışmalarında başlangıç birey sayısı ele alınacak parametreler ve deney dizaynına göre değişiklik arz etmektedir. Bu sayı literatürlerde 1 birey mL⁻¹ (Sarma *et al.* 1996) ile 20 birey mL⁻¹ (Flores-Burgos *et al.* 2005) arasında değişmektedir. Yoshinaga *et al.* (2003a,b) demografik parametreler için grup

büyükliğünün 1-8 bireyden oluşmasını istatistik açıdan yeterli görmektedirler. Bu nedenlerle araştırmada başlangıç birey sayısı 4 birey mL⁻¹ olarak ele alınmıştır.

Popülasyon yoğunluğunun belirli bir zaman aralığında ne kadar değiştiğini ve besin miktarı ile olan ilişkisini veren popülasyon artış oranına (r) ait sonuçlar ise Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. KS şartlarında gruplara ait r değerleri

Gruplar	Yemleme aralığı (saat)	r _{ort} ±SD
A	12	0,608±0,073 ^a
B	24	0,396±0,056 ^b
C	36	0,356±0,049 ^b
D	48	0,335±0,075 ^b
E	60	0,259±0,051 ^c
F	72	0,289±0,053 ^c
G	Tamamen aç	-0,239±0,050 ^d

a-d: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistikî olarak önemli bir fark yoktur. (p>0.05)

En yüksek r değeri 0,608±0,073 ile 12 saatte beslenen grupta kaydedilirken en düşük değer -0,239±0,050 ile tamamen aç bırakılan grupta elde edilmiştir. Tamamen aç bırakılan grupta r değeri farklı bulunmuştur (p<0.05). Yem konsantrasyonuyla direkt ilişkili olan r değeri (Kirk 2001) aynı zamanda kültür şartlarından da etkilenebilmekte ve özellikle toksikantlar gibi stres faktörleri altında negatif değer alabilmektedir (Sarma *et al.* 2001b). Sonuçlar arasında negatif r değerine tamamen aç bırakılan gruplarda deneylerin 4. gününden sonra ulaşılmıştır. Bu sonuç açlığın belirli bir günden sonra önemli bir stres faktörü olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte gözlenen r değerleri (kısmen F grubu da) daha önce bazı rotifer türlerinde kaydedilmiş değerler arasında yer almaktadır (Çizelge 4.5)

Çizelge 4.5. Brachionidae familyasına ait bazı rotifer türlerinin popülasyon artış oranları (r)

Rotifer türleri	Deney	Yem tipi	Yem seviyesi (hücre mL ⁻¹)	r değeri	Literatür
<i>Anuraeopsis fissa</i>	Popülasyon artışı	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,5-8x10 ⁶	0,45 – 0,86	Dumont <i>et al.</i> 1995
	Popülasyon artışı	<i>S. acutus</i>	0,5-4,5x10 ⁶	0,44 – 0,88	Sarma <i>et al.</i> 1996
	Demografik	-	-	0,10	Ooms-Wilms 1997
<i>Brachionus angularis</i>	Popülasyon artışı	<i>Stichococcus bacillaris</i>	-	0,58	Walz 1993
<i>B. calyciflorus</i>	Demografik	-	-	2,20	Wang ve Li 1997
	Popülasyon artışı	<i>S. acutus</i>	0,5-4,5x10 ⁶	0,79 -1,49	Sarma <i>et al.</i> 1996
	Popülasyon artışı	Çeşitli algler	-	0,80	Rothhaupt 1990
<i>B. patulus</i>	Demografik	<i>Chlorella</i>	1-4x10 ⁶	0,14-0,61	Sarma ve Rao 1991
	Popülasyon artışı	<i>Chlorella</i>	1-3x10 ⁶	0,12-0,24	Sarma ve Rao 1990
<i>B. plicatilis</i>	Popülasyon artışı	<i>Tetrathelms tetrathele</i>	0,05x10 ⁶	0,24 – 0,49	Okauchi ve Fukusho 1984
	Popülasyon artışı	<i>Chlorella</i>	1,5x10 ⁶	0,16-0,47	Okauchi ve Fukusho 1984
<i>B. rubens</i>	Popülasyon artışı	Çeşitli algler	-	0,80	Rothhaupt 1990
	Popülasyon artışı	<i>Chlorella</i>	3x10 ⁶	0,79	Iyer ve Rao 1993
<i>B. urceolaris</i>	Demografik	-	-	1,32	Wang ve Li 1997
<i>B.havanaensis</i>	Popülasyon artışı	<i>Chlorella</i>	4,5x10 ⁶	0,54	Fernández-Araiza <i>et al.</i> 2005
<i>B. variabilis</i>	Popülasyon artışı	<i>Chlorella</i>	1,0x10 ⁶	0,50	Sarma ve Nandini 2001a
<i>B. variabilis</i>	Popülasyon artışı	<i>Chlorella</i>	0,5x10 ⁶	0,13	Sarma ve Nandini 2001a
<i>Keratella cochlearis</i>	Popülasyon artışı	<i>Cryptomonas erosa</i>	0,005-0,01x10 ⁶	0,28-0,40	Smith ve Gilbert 1995
	Popülasyon artışı	-	-	0,13	Ooms-Wilms 1997
<i>K. crassa</i>	Popülasyon artışı	<i>C. erosa</i>	0,005-0,01x10 ⁶	0,32	Smith ve Gilbert 1995
<i>K. testudo</i>	Demografik	-	-	0,15 -0,39	Stemberger 1988

KS şartlarında deneme gruplarına ait varyans analiz sonuçları ile gruplara ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Uygulanan KS şartlarında deneme gruplarına ait tekrarlanan deneylerin varyans analiz sonuçları

Etki		Değer	F	Hipotez SD	Hata SD	p
zaman	Pillai's Trace	0,994	199,152	23,000	27,000	,000*
	Wilks' Lambda	0,006	199,152	23,000	27,000	,000*
	Hotelling's Trace	169,648	199,152	23,000	27,000	,000*
	Roy's Largest Root	169,648	199,152	23,000	27,000	,000*
zaman*grup	Pillai's Trace	4,466	4,050	138,000	192,000	,000*
	Wilks' Lambda	,000	9,163	138,000	165,238	,000*
	Hotelling's Trace	155,209	28,492	138,000	152,000	,000*
	Roy's Largest Root	120,233	167,280	23,000	32,000	,000*

*p < 0,01 seviyesinde önemli

Çizelge 4.5.'den de görüleceği gibi zaman ve zaman*grup interaksiyonu Tekrarlanan Ölçümlerin Varyans Analizi sonucunda çok önemli (p<0.01) bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Uygulanan KS şartlarında deneme gruplarına ait ortalama ve duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları (t=26 gün)

Grup	Ortalama±SEM	Min.	Max.
A (12)	81,69±100,51 ^a	76,634	86,746
B (24)	47,15±60,03 ^b	42,094	52,206
C (36)	33,59±46,94 ^c	28,534	38,646
D (48)	19,84±21,14 ^d	14,784	24,896
E (60)	13,71±16,03 ^{de}	8,654	18,766
F (72)	12,55±13,30 ^{de}	7,494	17,606
Aç	6,91±4,81 ^e	1,854	11,966

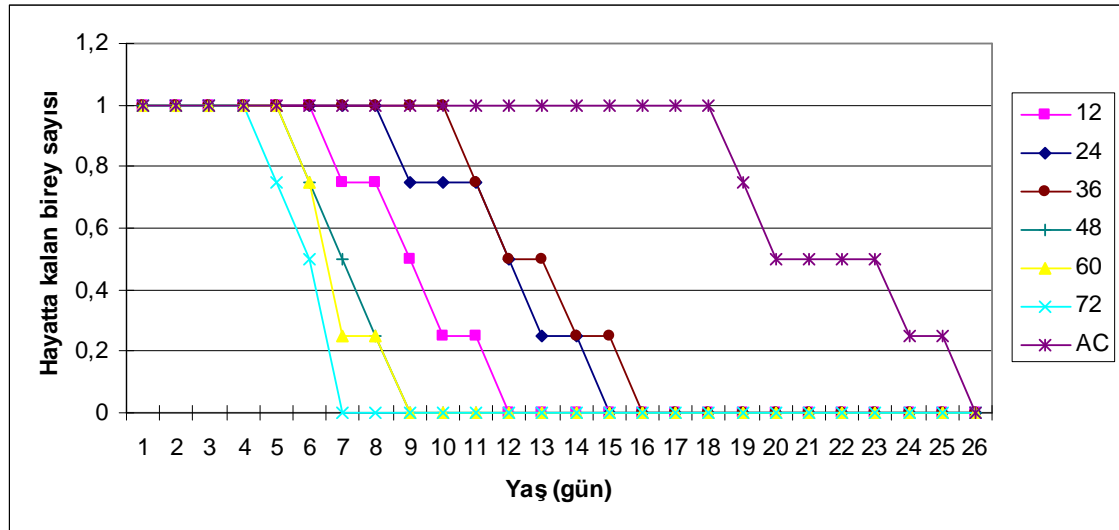
a-f: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistikî olarak önemli bir fark yoktur. (p>0.05) Std. Hata: 2,43

KS deneylerinde deneme gruplarına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre yine E ve F grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmazken (p>0.05) diğer gruplar arasında p<0.05 seviyesinde önemli çıkmıştır. Bu sonuçlar besin konsantrasyonunun düşük ya da hiç olmadığı ortamlarda popülasyon büyüme oranının sınırlandığını göstermektedir (Stemberger and Gilbert 1985, 1987; Kirk 1997a,b, 2001; Sarma and Nandini 2001a,b). Bu nedenle besin azlığı ve açlık rotifer popülasyon dinamiğini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Yoshinaga *et al.* 2003b). Nitekim aç gruplara dair -0,239±0,050 r değeri bu sonuçlarla paraleldir.

KS uygulanan gruplarda elde edilen popülasyon yoğunluğu ve r değerlerine ilaveten bireylerin ömür uzunluğunun önemli bir şekilde değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.8, Şekil 4.11).

Çizelge 4.8. KS şartlarında *B. calyciflorus*'a ait maksimum ve ortalama ömür uzunlukları

Gruplar	Yemleme aralığı (saat)	Maksimum ömür (gün)	Ortalama ömür uzunluğu (gün)
A	12	11	8,5
B	24	14	11,25
C	36	15	12,25
D	48	8	6,5
E	60	8	6,25
F	72	6	5,25
G	Tamamen aç	25	21,25



Şekil 4.11. Uygulanan KS şartlarında hayatta kalan bireylere ait eğri

Çizelge 4.8 ve Şekil 4.11'den görüleceği gibi kontrol grubu olarak düşünülen A grubunda maksimum ömür uzunluğu 11 gün iken B ve C gruplarında 14 ve 15 gün olarak saptanmış, D ve E gruplarında ise değişmemiştir (8 gün). 72 saat aralıklarla yemlenen F grubunda ise 6 gün olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte tamamen aç bırakılan G grubunda ise maksimum ömür uzunluğu 25 gün olarak tespit edilmiştir.

Deneyler sırasında B, C, D, E ve F gruplarında yemleme saatini takiben ilk 6 saatte bireylerin üreme aktivitesi gösterdikleri, ortamda besin yokluğunda ise üremeyi durdurdukları, üreme periyotlarını uzatarak hayatta kalmaya çalıştıkları görülmüştür. Sonuçlar içerisinde özellikle kontrol grubu ile tamamen aç bırakılan gruptan elde edilen değerler Yoshinaga *et al.* (2003 b) ile benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte 48, 60 ve 72 saat aralıkla beslenen rotiferde (*A. brightwelli*) ortalama ömür uzunluğunun (4,41-4,35 gün) 12, 24 ve 36 saat aralıkla beslenenlere göre (5,44-6,08 gün) kısaldığını bildiren Verdone-Smith ve Enesco (1982) çalışmamızı destekler niteliktedir.

Enesco (1993) DR şartlarında rotiferlerde görülen uzun ömürlülüğün bu organizmaların üreme periyotlarını uzatarak sağladıklarını fakat üreme ile uzun ömürlülük arasında direkt bir ilişki olmadığını rapor etmiştir. Normal şartlarda rotiferler çok uzun bir ömüre sahip olmamakla birlikte 25°C’de dişiler yaklaşık 6-8 gün erkekler ise yine yaklaşık olarak 2 gün hayatta kalmakta (Hoff and Snell 2001), besin azalmaya başladığında ise birey başına bir yumurtadan fazla olmamak kaydı ile giderek üremeyi durdurmakta, yeniden yemlenmeye başlanıldığında ise 3-5 gün içerisinde üremeye kaldığı yerden devam etmektedirler (Ricci and Perletti 2006). Bu araştırmada ise uygulanan KS şartlarında rotifer (*B. calyciflorus*) bireylerinin üreme periyotlarını uzatarak hayatta kalmayı tercih ettikleri ve yemlemenin ardından üremeye geçtikleri tespit edilmiştir. En uzun ömür tamamen aç bırakılan grupta (25 gün) gözlenirken yumurta sayısının uzayan ömür ile birlikte azaldığı görülmüştür. Yoshinaga *et al.* (2000) normal ve DS şartlarında *B. plicatilis* yavru sayısının sırasıyla 30 ve 10 adet, ömür uzunluğunun ise sırasıyla yaklaşık 10 ve 30 gün şeklinde gerçekleştiğini bildirmektedir. Dolayısıyla KS’nin rotifer *B. plicatilis* ve *B. calyciflorus* ömür uzunluğunu önemli bir şekilde artırdığı bu çalışmalarla ortaya konmuştur. Kısıtlı bir besin ortamında görülen bu durumun üreme aktivitesinin baskılanması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Yoshinaga *et al.* (2001, 2003 a,b) rotiferlerin üremelerini baskılayarak ömürlerini uzatmalarını, gelecekte normal besin ortamı sağlandığında yeniden üreyebilmek için verdikleri bir tepki olarak ileri sürmektedir.

Ayrıca çeşitli besin seviyelerine gerek bireysel gerekse popülasyon olarak verilen tepki türleri arasında değişmekte örneğin rotifer (*B. plicatilis*) üreme ve ömür uzunluğunu değiştirmede oldukça esnek davranabilmektedir. Dahası *B. plicatilis*'in kısıtlı besin ortamında ürediğinde yavrularının açlığa daha dayanıklı olduğu görülmüş ve böylesi bir ortamın yavru kalitesini artırdığı sonucuna varılmıştır (Yoshinaga *et al.* 2003 b).

Diğer taraftan Gilbert (2003)'e göre monogonont rotiferler besin azlığında enerjilerini hayatta kalma ve üreme aktivitesi arasında paylaştırmada oldukça esnekler. Bununla birlikte besin yokluğunda kaynakların tümünü üreme için harcadıklarından ömür uzunluklarının kısaldığını, dolayısıyla bu türlerin kısa ömürlü olup çevresel şartların kötüleştiği durumlarda seksüel üreme ile kış yumurtası üreterek hayatta kalmaya çalıştıklarını bildirmiştir (Ricci and Perletti 2006). Oysa Kirk *et al.* (1999) besin yönünden kısıtlı ortamda *B. calyciflorus*'un solunum oranını, fekümditeyi ve yumurta büyüklüğünü azalttığını ve enerji tüketimini minimuma indirerek fizyolojik bir tepki verdiğini bildirmektedir. Yine aynı çalışmada *S. pectinata*'nın ise *B. calyciflorus*'un aksine bir tepki verdiğini dolayısıyla sınırlı besin ortamlarına karşı rotifer türleri arasında fizyolojik farklılıklar olduğu belirtilmektedir. Örneğin Weithoff (2007) diyetel sınırlamanın ömür uzunluğu ve üreme üzerine etkisini iki rotifer türü (*Cephalodella sp.* ve *Elosa worallii*) üzerinde incelemiştir. Araştırmada, sadece *E. worallii*'nin ortalama ömür uzunluklarından (7 gün) çok daha uzun bir süre (15 gün) canlı kalabildiğini, bu sırada üremesini azaltarak ömür uzunluğunu artırdığını, normal besin ortamı sağlandığında ise 1 gün içerisinde tekrar üremeye başladığını bildirmektedir. Açlık durumunda rotiferler içinde monogonont türler (*Synchaeta pectinata*) üreme pahasına kısa bir süre yaşamayı tercih ederken, *Keratella cochlearis* gibi türler ise üremeyi erteleyerek nispeten daha uzun süre yaşamaktadırlar (Kirk 1997a). Yoshinaga *et al.* (2003 a,b) normalde 12 gün yaşayan genç *B. plicatilis*'lerin açlık esnasında üremeyi azaltarak 16 günden daha uzun bir süre yaşadıklarını fakat açlık esnasında yaşlanmaya bağlı olarak hayatta kalma oranının azaldığını görmüşlerdir. Bununla birlikte bu çalışmada kontrol grubunun 11 gün, tamamen aç bırakılan grubun ise 20 günden daha uzun bir süre yaşadığı tespit edilmiştir.

Ömür uzunluğunda görülen bu farklılığa besin yoğunluğunun dışında yumurta büyüklüğü ve tipinin de neden olabileceği düşünülmektedir. Nitekim *Synchaeta pectinata* daha büyük yumurtalardan kuluçkalandığında yavruların açlığa daha uzun süre dayandığı görülmüştür (Kirk 1997b). *B. calyciflorus*'a ait yeni doğanlar aç bırakıldığında ise vücutta depo edilen lipid miktarına bağlı olarak birkaç gün yaşayabildikleri (Gilbert 2004), benzer bir şekilde *Daphnia*'ya ait yeni doğanların ise yaklaşık 8-10 gün hayatta kalabildikleri (Tessier *et al.* 1983) ve bunun yumurtada depolanan enerjiden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Yoshinaga *et al.* 2001). Öte yandan Garcia-Roger *et al.* (2006) monogonont rotiferlerin sınırlı besin ortamlarında yumurta tipini değiştirirerek partenogenetik yumurtaların diapoz yumurtalara dönüştüğünü bildirmektedirler. Aynı araştırmada *B. plicatilis*'e ait her iki tip yumurtadan çıkan bireylerin açlık durumunda maksimum ömür uzunluklarının yaklaşık 12 gün olduğu, ortalama ömür uzunluklarının ise partenogenetik yumurtalardan çıkan bireylerin diapoz yumurtalardan çıkanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bununla birlikte araştırmamızda diapoz yumurtalara popülasyon yoğunluğunun yüksek olduğu gruplarda rastlanılmıştır. Gözlenen diapoz yumurtalarından yüksek popülasyon yoğunluğunun miktik üremeyi tetiklediği ve buna da besin rekabetinin sebep olduğu sanılmaktadır. Bu sonuç diapoz yumurtalarının sınırlı besin ortamında görüldüğünü ileri süren Garcia-Roger *et al.* (2006) ile çelişmekte fakat diğer taraftan Sarma *et al.* (2001a,b), Yoshinaga *et al.* (2001) ile benzerlik göstermektedir.

Xi *et al.* (2001a,b) besin konsantrasyonunun ve besin tipinin *B. calyciflorus* amiktik dişilerinin hayat siklusu boyunca ürettiği yumurta sayısını önemli bir şekilde etkilediğini, fakat alg tipinin üreme periyodu ve ömür uzunluğu üzerine etkisinin görülmediğini bildirmişlerdir. Oysa Flores-Burgos *et al.* (2005) iki rotifer türünde (*B. patulus*, *B. calyciflorus*) yaptıkları araştırmada alg tipinin ve konsantrasyonunun ömür uzunluğunu ve üreme oranını etkilediğini görmüşlerdir. Demografik parametrelerde görülen bu farklılığın besin kompozisyonundaki değişime türe özgü adaptasyon yeteneğinden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada tek tip besin kullanıldığından alg tipinin etkisi gözlenmemiştir. Bununla birlikte uygulanan KS

şartlarında *B. calyciflorus*'a ait yumurta sayısı, üreme ömrü (Kirk 2001) ve yumurta oranlarının (Edmonson 1965) önceki çalışmalarda olduğu gibi değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. KS şartlarında *B. calyciflorus* üreme tepkisi

Gruplar	Yemleme aralığı (saat)	İlk üreme yaşı	Üreme ömrü (gün)	Dişi birey başına düşen toplam yumurta sayısı (adet)	Yumurta oranı
A	12	1	10	9	0,81
B	24	1	13	8	0,75
C	36	1	14	8	0,35
D	48	1	7	4	0,34
E	60	1	7	3	0,27
F	72	1	5	2	0,07
G	Tamamen aç	1	24	2	0,40

Çizelge 4.9'dan da anlaşılacağı üzere A, B ve C gruplarında yer alan bireyler üreme periyotları boyunca 8-9 yumurta verirken bu sayı diğer gruplarda 2'ye kadar düşmüş ve yumurta oranı da 0,81 ile 0,07 arasında değişirken C ve D gruplarında birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Tamamen aç bırakılan grupta ise azalan yumurta sayısına karşı üreme ömrünün ve yumurta oranının arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla sınırlı besin ortamlarında elde edilen bu sonuçlar Kirk (1999), Yoshinaga *et al.* (2000, 2003 b), Xi *et al.* (2001 a,b) ve Weithoff (2007) ile benzerdir.

KS'nin rotifer grubu canlıların da dahil olduğu çeşitli organizmaların popülasyon yoğunluğunu etkilediği ve ömür uzunluğunu artırdığı yukarıda verilen araştırmalarla makro düzeyde kanıtlanmıştır. Bununla birlikte KS'nin moleküler düzeyde de değişimlere neden olduğu bilinmektedir (Heydari *et al.* 1996; Ehrenfried *et al.* 1996; Lakowski and Hekimi 1998; Furuyama *et al.* 2002; Kaneko *et al.* 2002; Chen 2004; Kapahi *et al.* 2004; Fisher 2004; Lin *et al.* 2000, 2004; Walker *et al.* 2005).

Popülasyon yoğunluğu ile ömür uzunluğu birbirleriyle yakın ilişkili olup (Yoshinaga *et al.* 2001) çevresel olduğu kadar genetik faktörler tarafından da etkilenmektedir (Zhao *et al.* 2005). Örneğin Lin *et al.* (2000, 2004) KS şartlarında maya (*Saccharomyces cerevisiae*) hücresinde Sir2 geninin inhibitörü olan NADH (nikodinamit adenin dinükleotidin indirgenmiş formu) seviyesinin düştüğünü ve böylece ömrün uzadığını bildirmişlerdir. Weindruch *et al.* (2001) uyguladıkları KS deneylerinde erkek farelerin bacak kaslarında metabolik ve biyosentetik gen ekspresyonunun düştüğünü ve dahası protein döngüsünde zararlı makromoleküler hasarın KS tarafından kısmen ya da tamamen engellendiğini ileri sürmüşlerdir.

Moleküler düzeyde KS'nin etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda özellikle denatüre proteinlerin katlanmasına yardım eden ve hücre içi koruma fonksiyonuna sahip olan stres proteinlerinin (HSP) ve bunlar içerisinde de HSP70 mRNA seviyesinin önemli bir şekilde arttığı bildirilmektedir (Heydari *et al.* 1993, 1996; Ehrenfried *et al.* 1996; Yoshianaga *et al.* 2003a). Buna ilaveten HSP70 ekspresyonundaki artışın maya (*Saccharomyces cerevisiae*) (Shama *et al.* 1998), meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) (Tatar *et al.* 1997) ve rotifer (*Brachionus plicatilis*)'de (Kaneko *et al.* 2002) ömür uzunluğunu artırdığı öne sürülmektedir.

Bu nedenlerle çeşitli stres faktörlerine karşı hücresele seviyede verilen tepki organizmaların fizyolojik şartlarını belirleyeceğinden direkt bir şekilde popülasyon dinamiğini de etkileyebileceği Yoshinaga *et al.* (2003a) tarafından bildirilmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada, günümüzde balık yetiştiriciliğinde canlı yem olarak kullanılan tatlı su rotiferi (*Brachionus calyciflorus*) kültüründe diyetel sınırlamanın bu organizmaların popülasyon yoğunluğu ve moleküler düzeyde HSP70 gen ekspresyonuna etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle bölümümüz Akvaryum Balıkları Üretim ve Araştırma biriminde kurulan canlı yem ünitesinde rotifer kültürlerinde besin olarak tavsiye edilen fitoplankton (*Chlorella sp.*) yetiştirilmiş ardında da Florida Aquatik Eko-Sistem Firması'ndan ticari olarak temin edilen tatlı su rotiferi (*B. calyciflorus*) yumurtaları kuluçkalanarak kültür ortamı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada gerek popülasyon yoğunluğu ve gerekse r değerlerinden elde edilen sonuçlara göre kalorik sınırlamanın rotifer popülasyon dinamiğinde önemli bir rol oynadığı ve rotiferin (*B. calyciflorus*) ömür uzunluğunu artırdığı sonucuna varılmıştır. Ömür uzunluğunda görülen bu değişim KS'ye verilen bir tepki olarak değerlendirilmiştir.

Kalorik sınırlamanın pek çok organizmada ömür uzunluğunu artırmasına yönelik çeşitli hipotezler ortaya atılsa da bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiği halen belirsizliğini korumaktadır.

Bununla birlikte kısıtlı besin ortamında rotifer popülasyon dinamiğinin nasıl etkilendiğini anlamak için ömür uzunluğunun altında yatan moleküler mekanizmanın bilinmesi gerekmektedir. Özellikle HSP70'in de dahil olduğu diğer tip stres proteinlerinin klonlama ve ekspresyon analizleri rotifer popülasyon dinamiğini anlamada ve uygun popülasyon yoğunluğunu elde etmede önemlidir. Çünkü gerek *in vivo* ve gerekse *in vitro* ortamlarda hemen hemen tüm organizmalar için önemli bir stres faktörü olan besin konsantrasyonuna karşı rotifer türlerinin moleküler düzeyde verdiği

tepkinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu konu ayrı bir araştırma konusu olarak daha geniş şekilde çalışılmalıdır.

Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz dizilimler çeşitli blotlama teknikleri kullanılarak spesifik olarak kontrol edilmelidir.

Araştırmamızda özellikle rotifer üretiminde S ve L tipi yumurtalar arasında farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin L tipi yumurtalardan çıkan bireylerin S tipine nazaran daha büyük oldukları ve vücutlarına oranla küçük ama daha fazla sayıda yumurta taşıdıkları görülmüştür. Söz konusu yumurta tipleri arasındaki bu farklılığın rotifer popülasyon yoğunluğu açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan ortamdaki besin miktarının az olması rotifer popülasyonunun artış hızının daha düşük olmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte yetiştiricilikte kısa sürede yoğun miktarda rotifer üretmek amacıyla yüksek konsantrasyonda yem verilmektedir. Bu durum kültür suyunun kısa sürede bozulmasına hatta kültürün çökmesine bile neden olabilmektedir. Oysa az miktar yemle hem rotifer bireylerinde normal bir popülasyon artışı sağlanırken (24 ve 36 saat aralıkla beslemek gibi) yem fazlalığından kaynaklanan olumsuz şartlar (kirlilik, kokuşma vb.) minimuma indirilerek aynı kültür tanklarının uzun süre kullanılmasına imkan verecek, iş gücü ve zamandan tasarruf sağlayacaktır.

Ayrıca yüksek popülasyon yoğunluğu yavru kalitesini düşürebileceğinden popülasyon stabilitesi olumsuz yönde etkilenecektir. Sınırlanmış diyetle beslemek rotifer kültürlerinde kullanılan yem maliyetini azaltacak ve elde edilen verilerle yeniden üreyebilme yeteneğine sahip oldukları belirlenen bu organizmalarda ömür uzunluğunu artırarak kültürün devamını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aksenova, M.V., Aksenov, M.Y., Carney, J.M., and Butterfield, D.A. 1998. Protein oxidation and enzyme activity decline in old brown Norway rats are reduced by dietary restriction. *Mech. Ageing Dev.* 100: 157–168.
- Arimoro, F.O. and Ofojekwu, P.C., 2004. Some aspects of the culture, population dynamics and reproductive rates of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* fed selected diets. *Journal of Aquatic Sciences*, 19 (2): 95-98.
- Astagimath, M.N. and Rao, S.B., 2004. Dietary Restriction (DR) and its advantages. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, Vol. 19, No. 1, pp. 1-5.
- Berg, B.N., Simms, H.S., 1960. Nutrition and longevity in the rat: II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake, *J. Nutr.* 71:255-263.
- Bertrand, H.A., Lynd, F.T., Masoro, E.J., Yu, B.P., 1980. Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet, *J. Gerontol.* 35:827-835.
- Cefalu, W.T., Bell-Farrow, A.D., Wang, Z.Q., Sonntag, W.E., Fu, M.X., Baynes, J.W. and Thorpe, S.R., 1995. Caloric restriction decreases age-dependent accumulation of the glycoxidation products, N^ε-(carboxymethyl) lysine and pentosidine, in rat skin collagen. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 50: 337-341.
- Chen, H., 2004. Gene expression by the anterior pituitary gland: Effects of age and caloric restriction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 222: 21–31.
- Cirik, S., Gökpinar, Ş. 1999. Plankton Bilgisi ve Kültürü. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No: 47, Ders Kitabı Dizini No: 19, Bornova, İzmir.
- Collier, J.R., 1983. The molecular weight of ribosomal ribonucleic acids among the protostomia. *Biol. Bull.*, 164: 428-432.
- Colotti, C., Cavallini, G., Vitale, R.L., Donati, A., Maltinti, M., Ry, S. D., Bergamini, E. and Giannessi, D. 2005. Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology*, 6:397–406.
- Craig, E.A., 1985. The heat shock response. *Crit. Rev. Biochem.* 18:239-280.
- Dhahbi, J.M., Mote, P.L., Wingo, J., Tillman, J.B., Walford, R.L. and Spindler, S.R. 1999. Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes. *Am. J. Physiol.* 277: E352–E360.
- Dumont, H.J., Sarma, S.S.S. and Ali, A. J., 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biology*, 33 (1):39–46.
- Edmondson, W.T., 1960. Reproductive rates of rotifers in natural populations. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 12: 21-77.
- Edmondson, W.T., 1965. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. *Ecological Monographs*, 35 (1): 61-111.
- Ehrenfried, J.A., Evers, B.M., Chu, K.U., Townsend, C.M., Thompson, J.C., 1996. Caloric restriction increases the expression of heat shock protein in the gut. *Ann. Surg.*, 223 (5): 597-9.
- Enesco, H.E., 1993. Rotifers in aging research: use of rotifers to test various theories' of aging. *Hydrobiologia*, 155/156: 59-70.

- Enríquez- García, C., Nandini, S. and Sarma, S. S. S., 2003. Food type effects on the population growth patterns of littoral rotifers and cladocerans. *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 31: (2):120–133.
- Fernández-Araiza, M.A., Sarma, S.S.S. and Nandini, S., 2005. Combined effects of food concentration and temperature on competition among four species of *Brachionus* (Rotifera). *Hydrobiologia*, 546:519–534.
- Fisher, J., 2004. Caloric restriction as a research method for studying the aging process molecular mechanisms of aging. A collection of Union University Biology Seminar Papers, Vol. I.
- Flores-Burgos, J., Sarma, S.S.S., Nandini, S. 2005. Effect of Single Species or Mixed Algal (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*) Diets on the Life Table Demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 33 (6): 614-621.
- Furuyama, T., Yamashita, H., Kitayama, K., Higami, Y., Shimokawa, I. and Mori, N. 2002. Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHL1, and AFX) in the rat skeletal muscles. *Microscopy Research And Technique*, 59:331–334.
- García-Roger, E.M., Martínez, A. and Serra, M., 2006. Starvation tolerance of rotifers produced from parthenogenetic eggs and from diapausing eggs: a life table approach. *Journal of Plankton Research*, 28 (3): 257–265.
- Gilbert, J.J. 2003. Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental and population biology. *Evolution and Development*, 5: 19–24.
- Gilbert, J.J. 2004. Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: lipid droplets, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*, 49: 1505–1515.
- Hagiwara, A., Gallardo, W.G., Assavaaree, M., Kotani, T. and Araujo, A.B., 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200:111–127.
- Harrison, D.E., Archer, J.R., Astole, C.M., 1984. Effects of food restriction on aging: separation of food intakes and adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1835-1838.
- Heydari, A.R. and Richardson, A., 1992. Does gene expression play any role in the mechanism of the antiaging effect of dietary restriction? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Nov. 21;663:384-95.
- Heydari, A.R., Wu, B., Takahashi, R., Strong, R. and Richardson, A., 1993. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 13 (5), 2909-2918.
- Heydari, A. R., You, S., Takahashi, R., Gutschmann, A. Sarge, K. D. and Richardson, A., 1996. effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat shock transcription factor 1. *Developmental Genetics*, 18:11P124.
- Hoff, F.H. and Snell, T.W., 2001. Plankton culture manual. Florida Aqua Farms, Inc. Fifth Edition, ISBN: 0-9662960-0-1, pp: 159.
- Iwama, G. K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B. and Vijayan, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8: 35-56.

- Iyer, N. & Rao, T.R., 1993. Effect of the epizoic rotifer *Brachionus rubens* on the population growth of three cladoceran species. *Hydrobiologia*, 255/256: 325-332.
- Kaneko, G., Kinoshita, S., Yoshinaga, T., Tsukamoto, K. and Watabe, S., 2002. Changes in expression patterns of stress protein genes during population growth of the rotifers *Brachionus plicatilis*. *Fisheries Science*, 68:1317-1323.
- Kaneko, G., Yoshinaga, T., Yanagawa, Y., Kinoshita, S., Tsukamoto, K. and Watabe, S., 2005. Molecular characterization of Mn-superoxide dismutase and gene expression studies in dietary restricted *Brachionus plicatilis* rotifers. *Hydrobiologia*, 546:117-123.
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V. and Benzer, S., 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current Biology*, 14: 885-890.
- Kirk, K.L., 1997a. Life-history responses to variable environments: Starvation and reproduction in planktonic rotifers. *Ecology*, 78 (2):434-441.
- Kirk, K.L., 1997b. Egg size, offspring quality and food level in planktonic rotifers. *Freshwater Biology*, 37: 515-521.
- Kirk, K.L., Ellis, J. and Taylor, J., 1999. Physiology responses to variable environments: Storage and respiration in starving rotifers. *Freshwater Biology*, 42: 637-644.
- Kirk, K.L., 2001. Dietary restriction and aging: Comparative tests of evolutionary hypotheses. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, 56A (3), 123-129.
- Koubova, J. and Guarente L., 2006. How does calorie restriction work? *Genes & Development*, 17:313-321.
- Krebs, C.J., 1985. *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance*. 3. Edn. Harper and Row, New York, 789 pp.
- Kubo, C., Johnson, B.C., Gajar, A., Good, R.A., 1987. Crucial dietary factors in maximizing life span and longevity in autoimmune-prone mice. *J. Nutr.* 117:1129-1135.
- Jensen, T.C. and Verschoor, A.M., 2004. Effects of food quality on life history of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Palas. *Freshwater Biology*, 49: 1138-1151.
- Lakowski, B. and Hekimi, S., 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 13091-13096.
- Lane, M. A., Mattison, J., Ingram, D. K. and Roth, G. S., 2002. Caloric restriction and aging in primates: Relevance to humans and possible CR mimetics. *Microscopy Research and Technique* 59:335-338.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996. *Manual on the production and use of live food aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, 361.
- Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R. and Prolla, T.A., 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 285: 1390-1393.
- Lin, S.-J., Defossez, P.-A., Guarente, L., 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, Vol 289.
- Lin, S.-J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., and Guarente, L., 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes and Development* 18:12-16.

- Longo, V.D., Liou, L.L., Valentine, J.S. and Gralla, E.B., 1999. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365: 131-142.
- Lucía Pavón-Meza, E., Sarma, S.S.S. and Nandini, S., 2001. Effect of different densities of live and dead *Chlorella vulgaris* on the population growth of rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Rev. Biol. Trop.*, 49: 3-4.
- Lucía Pavón-Meza, E., Sarma, S.S.S. and Nandini, S., 2005. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) food level and temperature on the demography of *Brachionus havanaensis* (Rotifera): a life table study. *Hydrobiologia*, 546:353–360.
- McCarter, R.J., Masoro, E.J., 1985. Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *Am. J. Physiol.* 248: 488-490.
- McCarter, R.J., McGee, J.R., 1989. Transient reduction of metabolic rate by food restriction. *Am. J. Physiol.* 257: 175-179.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., 1934. Prolonging the life span. *Sci. Month.* 39:405-414.
- McCay, C.M., Crowell, and Maynard, L., 1935. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. *J. Nutr.*, 10: 63–79.
- Martinez, R.R. and Dodson, I.S., 1992. Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Palls. *Aquaculture*, 105: 191-199.
- Masoro, E. J., 1985. Nutrition and aging: a current assessment. *J. Nutr.* 115:842-848.
- Masoro, E.J., 1988. Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. *J. Gerontol.* 43: 59-64.
- Masoro, E.J., 1990. Assessment of nutritional components in prolongation of life and health by diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193:31-34.
- Masoro, E.J., Shimokawa, I., Yu, B.P., 1991. Retardation of the aging processes in rats by food restriction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 621:337- 352.
- Masoro, E.J., 2000. Caloric restriction and aging: An update. *Experimental Gerontology*, 35: 299–305.
- Masoro, E.J., 2002. Caloric Restriction: A key to understanding and modulating aging. *Research Profiles in Aging*, Vol. 1.
- Mizzen, L.A., Chang, C., Garrels, J.I. and Welch, W. J., 1989. Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp75, a member of hsp70 family and hsp58, a homolog of the bacterial groEL protein. *J. Biol. Chem.* 264:20664-20675.
- Nandini, S. and Sarma, S.S.S., 2001. Population growth of *Lepadella patella* (O. F. Müller, 1786) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roseola* Ehrenberg, 1832. *Hydrobiologia*, 446/447: 63–69.
- Nandini, S., Ramirez-García P., Sarma, S. S. S., 2005. Seasonal variations in the species diversity of planktonic rotifers in Lake Xochimilco, Mexico. *J. Freshwater Ecol.* 20: 287-294.
- Okauchi, M. & Fukusho, K., 1984. Food value of minute alga, *Tetraselmis tetrathele*, for the rotifer *Brachionus plicatilis* culture: 1. Population growth with batch culture. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquacult.*, 5: 13-18.
- Ooms-Wilms, A.L., 1997. Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes? *J. Plankton Res.*, 19: 1125-1141.

- Park, H. G., Lee, K. W., Cho, S. H., Kim H. S., Jung, M.M. and Kim, H.S., 2001. High density culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*. *Hydrobiologia*, 446/447: 369–374.
- Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P. & Boulianne, G.L., 1998. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nature Genetics* 19: 171 – 174.
- Peña-Aguado, F., Nandini, S. and Sarma, S.S.S., 2005. Differences in population growth of rotifers and cladocerans raised on algal diets supplemented with yeast. *Limnologica*, 35: 298–303.
- Peredo-Álvarez, V.M., Sarma, S.S.S., Nandini, S., 2001. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Rev. biol. Trop.*, 51: (2).
- Pérez-Legaspi, I.A. and Rico-Martínez, R., 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia*, 387/388: 341–348.
- Rad, F., 1992. Farklı besin ortamlarının tatlı su rotiferleri üretimi üzerinde etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ricci, C. and Perletti, F., 2006. Starve and survive: stress tolerance and life-history traits of a bdelloid rotifer dormancy, food, life-history schedule, recovery, reproduction. *Functional Ecology*, 20: 340–346.
- Richmond, A., 1986. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 528.
- Rothhaupt, K.O., 1990. Population growth rates of two closely related rotifer species effects of food quantity particle size and nutritional quality. *Freshwater Biol.*, 23: 561-570.
- Sacher, G.A., 1977. Life table modification and life prolongation. In: Finch CE, Haylick L (eds) *Handbook of the Biology of Aging*. Van Nostrand Reinhold, New York, p 582-638.
- Sarma, S.S.S. & Rao, T.R., 1990. Population dynamics of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera) in relation to food and temperature. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)*, 99: 335-343.
- Sarma, S.S.S. & Rao, T.R., 1991. The combined effects of food and temperature on the life history parameters of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera). *Int. Revue ges. Hydrobiologia*, 76: 225-239.
- Sarma, S.S.S., Iyer, N. & Dumont, H.J., 1996. Competitive interactions between herbivorous rotifers: Importance of food concentration and initial population density. *Hydrobiologia*, 331: 1-7.
- Sarma, S.S.S., Fernández-Araiza, M.A. and Nandini, S., 1999. Competition between *Brachionus calyciflorus* Pallas and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. *Aquatic Ecology*, 33: 339–345.
- Sarma, S.S.S. and Nandini, S., 2001a. Life table demography and population growth of *Brachionus variabilis* Hempel, 1896 in relation to *Chlorella vulgaris* densities. *Hydrobiologia*, 446/447: 75–83.

- Sarma, S.S.S., Jurado, P.S.L. and Nandini, S., 2001b. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Revista de Biología Tropical*, Vol. 49, No.1.
- Sarma, S.S.S. and Nandini, S., 2002. Comparative life table demography and population growth of *Brachionus macracanthus* Daday, 1905 and *Platyias quadricornis* EhrenberG, 1832 (Rotifera, Brachionidae) in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) food density. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 30 (2-3): 128-140.
- Shama, S., Lai, C.Y., Antoniazzi, J.M., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M., 1998. Heat stress-induced life span extension in yeast. *Exp. Cell Res.* 245: 379–388.
- Smith, A. D. & Gilbert, J.J., 1995. Relative susceptibilities of rotifers and cladocerans to *Microcystis aeruginosa*. *Arch. Hydrobiol.*, 132: 309-336.
- SPSS, 2002. SPSS for Windows Release 11.5.0. SPSS Inc., Chicago, IL.
- Stemberger, R.S. and Gilbert, J.J., 1985. Body size, food concentration and population growth in planktonic rotifers. *Ecology*, 66 (4): 1151-1159.
- Stemberger, R.S. and Gilbert, J.J., 1987. Rotifer Threshold food concentrations and the size-efficiency hypothesis. *Ecology*, 68 (1): 181-187.
- Stemberger, R. S. 1988. Reproductive costs and hydrodynamic benefits of chemically induced defenses in *Keratella testudo*. *Limnol. Oceanogr.*, 33: 593-606.
- Stevenson, R.A.A., Sarma, S.S.S., Nandini, S., 1998. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae) in waste water from food-processing industry in Mexico. *Rev. Bbiol. Trop*, 46: 3
- Tatar, M., Khazaeli, A.A., Curtsinger, J.W., 1997. Chaperoning extended life. *Nature*, 390: 30.
- Tessier, A.J., Henry, L.L. and Goulden, C.E., 1983. Starvation on *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. *Limnol. Oceanogr.*, 28 (4): 667-676.
- Treece, G. D. and Davis, D. A., 2000. Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication, No. 701.
- Verdone-Smith, C. and Enesco, H.E., 1982. The effect of temperature and of dietary restriction on lifespan and reproduction in the rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Experimental Gerontology*, Vol. 17, pp. 255-262.
- Walker, G., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R., Gems, D., 2005. Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126: 929–937.
- Walz, N., 1993. Model simulations of continuous rotifer cultures. *Hydrobiologia*, 255-256.
- Wang, J. & Li, D., 1997. Comparative studies on principal parameters of population growth of five freshwater rotifers. *Acta Hydrobiol. Sin.*, 21:131-136.
- Weindruch, R. Walford R.L., 1988. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield, IL: Charles C. Thomas.
- Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C.-K. and Prolla, T. A., 2001. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. American Society for Nutritional Sciences, 0022-3166/01.
- Weithoff, G., 2007. Dietary restriction in two rotifer species: the effect of the length of food deprivation on life span and reproduction. *Oecologia*, 153: 303-308.

- Xi, Y.L., Huang, X.F., Jin, H.J. and Liu, J.K., 2001a. The effect of food concentration on the life history of three types of *Brachionus calyciflorus* Females. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 86 (2):211-217.
- Xi, Y.L., Huang, X.F. and Jin, H.J., 2001b. Life history characteristics of three types of females in *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) fed different algae. *Hydrobiologia*, 446/447: 95–98.
- Yıldız, N., Bircan, H., Akbulut, Ö., 1994. Araştırma ve Deneme Metodları. Problemler ve Çözümleri, (II. Baskı). Atatürk Üniv. Yayın No: 724 Ders Kitapları No: 65.Erzurum.
- Yıldız, N., Akbulut, Ö., Bircan H., 1998. İstatistiğe Giriş, Uygulamalı Temel Bilgiler , Çözümlü ve Cevaplı Sorular. (1.-2.-Baskı) Şafak Yayınları Erzurum.
- Yoshinaga, T., Hagiwara, A., Tsukamoto, K., 2000. Effect of periodical starvation on the life history of *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (Rotifera): a possible strategy for population stability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 253:253–260.
- Yoshinaga, T., Hagiwara, A. and Tsukamoto, K., 2001. Why do rotifer populations present a typical sigmoid growth curve? *Hydrobiologia* 446/447: 99–105.
- Yoshinaga, T., Kaneko, G., Kinoshita, S., Tsukamoto, K., Watabe, S., 2003a. The molecular mechanisms of life history alterations in a rotifer: a novel approach in population dynamics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136, 715–722.
- Yoshinaga, T., Hagiwara, A., Tsukamoto, K., 2003b. Life history response and age-specific tolerance to starvation in *Brachionus plicatilis* O.F.Müller (Rotifera). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 287: (2), 261-271.
- Yoshinaga, T., Kaneko, G., Kinoshita, S., Furukawa, S., Tsukamoto, K. & Watabe S., 2005. Insulin-like growth factor signaling pathway involved in regulating longevity of rotifers. *Hydrobiologia*, 546:347–352.
- Yu, B.P., Masoro, E.J., Murata, I., Bertrand, H.A., Lynd, F.T., 1982. Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J.Gerontol. Mar*; 37(2):130-41.
- Yu, B.P., Masoro, E.J., McMahan, C.A., 1985. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats. I. Physical, metabolic and longevity characteristics. *J. Gerontol.* 40:657-70.
- Zhao, Y., Sun, H., Lu, J., Li, X., Chen, X., Tao, D., Huang, W. and Huang, B., 2005. Lifespan extension and elevated hsp gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 697-705.

ÖZGEÇMİŞ

Erzurum'da 1976 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1994 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'nden 1998 yılında mezun oldu. 1998-2002 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl doktora öğrenimine başladı.

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'nde 2001 yılından beri Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.