

PAPER DETAILS

TITLE: Ordu İli'nde *Urtica* türlerinin kloroplast DNA trnL-F gen bölgelerini kullanarak genetik çeşitliliğinin belirlenmesi

AUTHORS: Onur Kolören,Seçil Eker

PAGES: 202-208

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/553599>

Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 33 (2018)
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)
doi: 10.7161/omuanajas.395875

Ordu İli'nde *Urtica* türlerinin kloroplast DNA trnL-F gen bölgelerini kullanarak genetik çeşitliliğinin belirlenmesi

Onur Kolören, Seçil Eker*

Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ordu-Türkiye
*Sorumlu yazar/corresponding author: secileker@odu.edu.tr

Geliş/Received 16/02/2018 Kabul/Accepted 04/10/2018

ÖZET

Urtica spp., Karadeniz Bölgesi Ordu ilinde fındık alanlarında ve boş arazilerde en yaygın olan yabancı ot türlerinden biridir. Bu çalışmada, *Urtica* spp.'nin genetik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla Ordu ilinden 20 adet *Urtica* spp. örnekleri toplanmış ve kloroplast trnL-F gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak analiz edilmiştir. DNA izolasyonu, CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammoniumbromide) protokolü modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kloroplast DNA trnL-F gen bölgeleri için, GenBank'tan temin edilen referans sekans dizileri ile çalışmada elde edilen sekans sonuçları karşılaştırılmıştır. Dizilerin genetik uzaklıkları MEGA6 paket programı kullanılarak hesaplanmış ve bu veri setleri yardımıyla filogenetik ağaç çizimi sağlanmıştır. Bölgede *Urtica* cinsine ait 4 örnek (Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4) seçilmiş ve genetik analizlerde kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, bu örneklerin hepsinin *Urtica dioica* ile aynı soyda yer aldığı belirlenmiştir. Fatsa 1-U1 ve Ulubey-U2 örnekleri sırasıyla % 99.2 ve % 99.7 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *U. dioica*'nın (KF138424) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan % 100, % 100 ve % 99 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4 örnekleri ile *U. dioica* (AY208725) arasındaki nükleotid dizisi benzerlikleri sırasıyla % 99.5 ve % 100 bulunmuştur. Bu türün algoritma değerleri ise NJ, MP ve ML'de sırasıyla % 67, % 64 ve % 64 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler:
Karadeniz Bölgesi
PCR
Urtica dioica
Yabancı Ot

Genetic Diversity of *Urtica* species in Ordu Province of Turkey based on chloroplast DNA trnL- F intergenic spacer regions

ABSTRACT

The main goal of this study is to determine genetic differences of *Urtica* spp. which are one of the most common weed species in the hazelnut and uncultivated areas of Ordu province in the Black Sea Region, by using primers specific to chloroplast trnL-F intergenic spacer. Twenty *Urtica* spp. samples were collected from hazelnut gardens and uncultivated areas in Ordu province. DNA extraction was made by modifying the CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protocol. The sequence data of these samples were compared with the reference sequences retrieved from GenBank for the chloroplast DNA trnL-F intergenic spacer region. Genetic distances among the sequences were calculated using MEGA6 packet program, and phylogeny trees were drawn using these data sets. Four *Urtica* samples (Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 and Altınordu 3-U4) among our samples were selected and used in phylogenetic analysis. Our species were placed in the same lineage group with *Urtica dioica*. Fatsa 1-U1 and Ulubey-U2 appeared to have close to *U. dioica* (KF138424) with 99.2 % and 99.7 % nucleotide sequence similarity. This relations were supported with 100 %, 100 % and 99 % bootstrap values in the NJ, MP and ML trees, respectively. The nucleotide sequence similarities of Perşembe 1-U3 and Altınordu 3-U4 with *U. dioica* (AY208725) were 99.5 % and 100 %, and bootstrap values of this species were 67 %, 64 % and 64 % in the NJ, MP and ML.

Keywords:
Black Sea Region
PCR
Urtica dioica
Weed

© OMU ANAJAS 2018

1. Giriş

Urtica spp., Urticaceae (ısırganotugiller) familyası

Urticales takımı içerisinde, dünyanın her iki yarım küresinin tropikal ve subtropikal alanlarında geniş yayılış alanına sahip bir bitki grubudur. Isırganotu (*Urtica* spp.) ülkemizde tarla, yol ve orman kıyılarında

bulunan ve ağdalak, dalagan, ısırgı gibi yöresel adlara sahip tek veya çok yıllık otsu bir bitkidir. Türkiye’de başta Karadeniz Bölgesi olmak üzere her bölgede yetişir. Özellikle Karadeniz Bölgesi’nde fındık tarımı yapılan yörelerde iklimin yağışlı ve nemli olması nedeniyle Isırgan (*Urtica* spp.), Böğürtlen (*Rubus* spp.), Labada (*Rumex* spp.) gibi yabancı otların yoğunluğu artmakta ve bu türlerle mücadelede ihtiyaç duyulmaktadır. Ülkemizde bulunan ısırgan türleri; *Urtica pilulifera*, *Urtica membranacea*, *Urtica urens*, *Urtica haussknechtii* ve *Urtica dioica*’dır (Seçmen ve ark., 2004). Bitki kimyasal içerikleri yönünden de çok zengin olup yüzyıllardan bu yana; ilaç, gıda, lif, boya ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır (Ayan ve ark., 2006). 2001-2007 yılları arasında kanser ile ilgili yapılan çalışmaların sonucuna göre Türkiye’de en yaygın olarak kullanılan bitkinin Isırgan otu olduğu belirtilmiştir (Kav ve ark., 2008). Böylesine yaygın kullanım alanları olan bu türlerle yapılacak olan moleküler çalışmalar genetik materyallerin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Çünkü, ampirik sınıflandırma, yani morfolojik yapılarına göre yapılan sınıflandırma şekli günümüzde geçerliliğini yüksek oranda kaybetmiştir (Hoffmann ve Frodsham, 1993). Çeşitli bitki gruplarındaki filogenetik ilişkilerin tespit edilmesinde iki gen bölgesi (Kloroplast trnL-F ve ITS) çok sık olarak kullanılmaktadır (Brouat ve ark., 2001; Soejima ve Nagamasu, 2004).

Bu çalışmanın amacı; Karadeniz Bölgesi Ordu ilinin fındık ve boş alanlarında en yaygın yabancı ot türlerinden biri olan *Urtica* spp.’nin aralarındaki filogenetik farklılıkları trnL-F gen bölgeleri analizine dayalı olarak belirlemektir. Ayrıca türler arasındaki akrabalıkları belirlemek; genetik karakterizasyon, ıslah çalışmaları ve aynı zamanda genetik materyallerin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. *Urtica* türleri ile ilgili trnL-F gen bölgeleri kullanılarak yapılan bu moleküler çalışmanın, ileride yapılacak olan daha geniş kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı düşünülmüştür.

2. Materyal ve Metod

2.1. Bitki Materyali

Ordu ili ve ilçelerinde tarım alanlarında sorun olan *Urtica* türlerinin genetik farklılıklarının trnL-F primerleri yardımıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği kullanılarak belirlenmesi amaçlanan bu çalışma için, Ordu ili ve ilçelerinin fındık bahçeleri ve boş alanlarından 20 populasyon örneği toplanmıştır. Toplanan bitki örneklerinin genç yaprakları DNA izolasyonu için küçük poşetlere alınarak buz kapları ile laboratuvara taşınmış ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Örnek alınan alanların konumları GPS cihazı ile kaydedilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Bitki örneklerinin Ordu ilinden toplandığı yerlere ait coğrafik bilgileri

Populasyon No	Yer	Enlem	Boylam
1	Çamaş	45°, 30', 33.26"	37°, 59', 55.42"
2	Çatalpınar	40°, 88', 61.16"	37°, 45', 87.28"
3	Ünye 1	41°, 14', 28.30"	37°, 23', 24.65"
4	Altınordu 1	40°, 97', 69.91"	37°, 94', 46.55"
5	Gülyalı	40°, 97', 65.45"	38°, 00', 66.06"
6	Perşembe 1	41°, 08', 25.38"	37°, 63', 54.69"
7	Kabadüz	40°, 75', 81.53"	37°, 93', 78.89"
8	Korgan	40°, 83', 07.45"	37°, 34', 66.99"
9	Ulubey	40°, 53', 04.91"	37°, 43', 21.22"
10	Gölköy 1	40°, 37', 45.63"	37°, 32', 48.99"
11	Gürgentepe	40°, 48', 09.23"	37°, 36', 47.07"
12	Gölköy 2	40°, 68', 72.73"	37°, 61', 93.71"
13	Fatsa 1	41°, 02', 07.65"	37°, 53', 89.14"
14	Fatsa 2	40°, 95', 34.07"	37°, 33', 20.97"
15	Gölköy 3	40°, 41', 47.51"	37°, 37', 19.01"
16	Altınordu 2	40°, 97', 52.48"	37°, 96', 67.69"
17	Kumru	40°, 87', 29.38"	37°, 26', 36.94"
18	Perşembe 2	41°, 03', 30.93"	37°, 75', 77.09"
19	Ünye 2	41°, 28', 04.86"	37°, 00', 09.92"
20	Altınordu 3	40°, 98', 26.41"	37°, 90', 38.87"

2.2. DNA İzolasyonu ve PCR Çalışmaları

DNA izolasyon prosedürü olarak Haymes (1996) CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolü kullanılmış ve daha önce de Kolören ve Eker (2016) tarafından yapılan çalışmada modifiye edilen

şekliyle uygulanmıştır. Muhafaza edilen bitki örneklerinden DNA elde etmek için sıvı nitrojen ile fiziksel olarak öğütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bitkiyi ezme işleminden sonra Haymes’in CTAB protokolünde olduğu gibi ekstraksiyon tampon çözeltisi, kloroform/izoamil alkol (24/1) ve etanol/asetat (96/4)

sırasıyla ilave edilmiştir. Karışımın üzerine 50 µl NFW (nükleaz içermeyen su) ve 1 µl RNase (100mg/ml) ekledikten sonra 37 °C'de 1 saat tutulmuştur. Elde edilen DNA daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir. PCR reaksiyon hacmi 25 µl ve içindeki maddeler şu şekildedir; 16.6 µl NFW, 2.5 µl 1×PCR buffer, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 3 µl 2.5 mM MgCl₂, 0.5'er µl 10 mM trnL-c, 10 mM rnl-d, 10 mM trnT-e ve 10 mM trnF-f primeri (Çizelge 2), 0.5 µl 5U Taq polymerase (Thermo Scientific, Maxima Hot Start) ve 1 µl DNA. PCR döngü parametreleri ise; 95°C'de 15 dk, sonrasında 35 döngü; 94°C'de 1 dk, 51°C'de 1 dk ve 72°C'de 2 dk şeklinde uygulanmıştır. En sonunda reaksiyon 72°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen DNA'ların PCR çalışmaları için kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 2'de verilmiştir. PCR ürünlerinin

elektroforezinde % 1.5'lük agaroz jel TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 1 mM EDTA, Ph=8) kullanılmıştır. Jel için; 1.5 gr agaroz ile 100 ml 1×TAE birleştirilerek 2 dk mikrodalgada eritilmiştir. Karışım mikrodalgadan çıkartıldıktan sonra boya olarak Ethidium Bromür (0.2 µg/ml) ilave edilmiş ve yatay tipteki elektroforez cihazının jel hazırlama tabağına dökülmüştür. PCR tüpleri içindeki reaksiyon karışımından 5 µl, 2 µl yükleme tamponuna (Loading Dye Solution) eklenerek karıştırılmış ve bu karışım 7 µl olarak jeldeki kuyucuklara yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa 1 kb'lık DNA marker yüklendikten sonra cihaz 100 V'da 60 dk boyunca elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Jelde oluşan DNA bantları Quantum ST5 (Vilber Lourmat) jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

Çizelge 2. PCR çalışmalarında kullanılan trnL-F primerlerine ait bilgiler

Primer	Baz dizisi	Kaynak	Beklenen Bant Büyüklüğü
trnL-c	5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'	Taberlet, 1991	~1000 bp
rnl-d	5' TGGGGATAGAGGGACTTGAAC 3'	Taberlet, 1991	~500 bp
trnT-e	5' GGTTCAGTCCCTCTATCCC 3'	Taberlet, 1991	~500 bp
trnF-f	5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3'	Taberlet, 1991	~1000 bp

2.3. Sekans Analizi ve Filogeni Ağacı

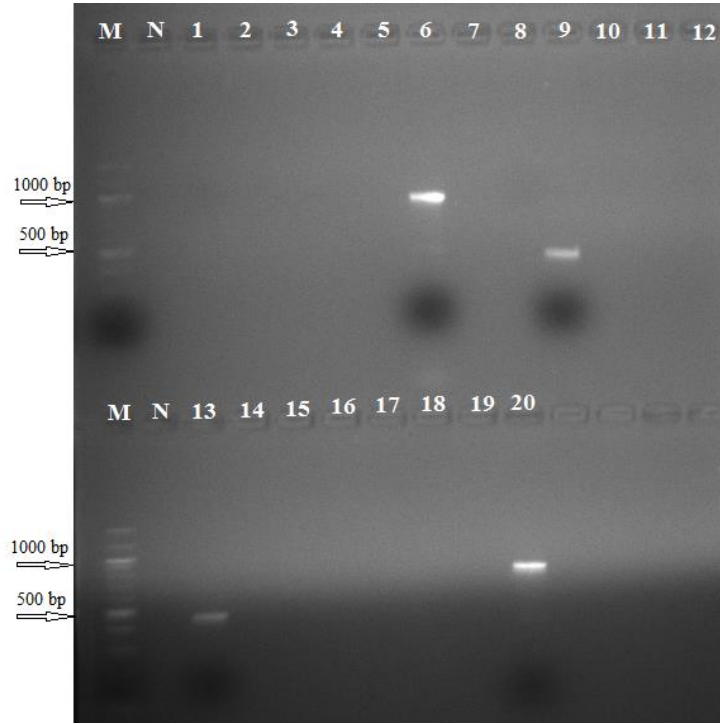
Türkiye'nin Ordu ilinden toplanan *Urtica* spp. örneklerinin PCR ürünleri ve trnL-c, rnl-d, trnT-e, trnF-f primerleri sekans analizi için Macrogen'e (Amsterdam, Hollanda) gönderilmiştir. Sekans analizine gönderilen trnL-F gen bölgesi PCR ürünlerinin sekans verileri, BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak düzenlenmiştir. Daha sonra trnL-F gen bölgesi için GenBank'tan temin edilen referans türlerin (Çizelge 3) sekans dizileri ve çalışmada elde edilen sekans sonuçları ClustalW (Thompson ve ark., 1997) modülü kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen hizalanmış baz dizileri MEGA6 version (Tamura ve ark., 2013) paket programı kullanılarak, Neighbor-Joining (NJ; Saitou ve Nei 1987), Maximum-Parsimony (MP; Eck ve Dayhoff 1966; Fitch 1977) ve Maximum-Likelihood (ML) algoritmalarından oluşan filogeni ağacının çizimi sağlanmıştır. Ayrıca tüm sekans dizilerinin % nükleotid benzerlik oranları ve evrimsel genetik uzaklıkları hesaplanmıştır.

Çizelge 3. GenBank'tan elde edilen *Urtica* spp.'nin referans numaraları

Referans No	Tür Adı
KF138424	<i>Urtica dioica</i>
AY208725	<i>Urtica dioica</i>
KX271440	<i>Urtica urens</i>
KX271442	<i>Urtica membranacea</i>
KF971223	<i>Nanocnide japonica</i>

3. Bulgular ve Tartışma

Ordu ilinin fındık ve boş alanlarında en yaygın yabancı ot türlerinden biri olan *Urtica* spp.'nin filogenetik farklılıklarını trnL-F gen bölgeleri kullanarak belirlenmesi amaçlanan çalışmada Ordu ili ve ilçelerinden 20 adet *Urtica* spp. örnekleri toplanmıştır. Çalışmada kullanılan primerler universal primerlerdir. Jel görüntülerine bakıldığında 6. kuyucukta Perşembe 1-U3, 9. kuyucukta Ulubey-U2, 13. kuyucukta Fatsa 1-U1 ve 20. kuyucukta Altınordu 3-U4 örneklerinden beklenen büyüklükte pozitif bant elde edilmiştir. Elde edilen bu pozitif PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda ve oluşturulan soy ağacı ile bu türlerin hepsinin *Urtica dioica* ile yakın ilişkili olduğu görülmüştür. Fatsa 1-U1 ve Ulubey-U2 örnekleri, nükleotid dizisi bakımından *U. dioica* (KF138424) ile sırasıyla % 99.2 ve % 99.7 oranlarında benzer bulunmuştur. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan % 100, % 100 ve % 99 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4 örneklerinin ise *U. dioica* (AY208725) ile arasındaki nükleotid dizisi benzerlikleri, sırasıyla % 99.5 ve % 100 bulunmuştur. Bu türün algoritma değerleri ise NJ, MP ve ML'de sırasıyla % 67, % 64 ve % 64 olarak bulunmuştur. GenBank'ta yer alan referans *Urtica* türleri ile çalışmada elde edilen Haplotipler (Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4) arasındaki filogenetik ilişki (Çizelge 4) ve genetik mesafeler (Şekil 2) verilmiştir.



Şekil 1. Karadeniz Bölgesi'nin Ordu ili'nden toplanan *Urtica* spp. örneklerinin trnL-F gen bölgesinin agaroz jel içindeki görüntüsü. Kuyucuk M: 100bp (Base Pair) ladder, Kuyucuk N: Negatif kontrol (steril su), Kuyucuk 1: Çamaş, Kuyucuk 2: Çatalpınar, Kuyucuk 3: Ünye 1, Kuyucuk 4: Altınordu 1, Kuyucuk 5: Gülyalı, Kuyucuk 6: Perşembe 1, Kuyucuk 7: Kabadüz, Kuyucuk 8: Korgan, Kuyucuk 9: Ulubey, Kuyucuk 10: Gölköy 1, Kuyucuk 11: Gürgentepe, Kuyucuk 12: Gölköy 2, Kuyucuk 13: Fatsa 1, Kuyucuk 14: Fatsa 2, Kuyucuk 15: Gölköy 3, Kuyucuk 16: Altınordu 2, Kuyucuk 17: Kumru, Kuyucuk 18: Perşembe 2, Kuyucuk 19: Ünye 2, Kuyucuk 20: Altınordu 3.

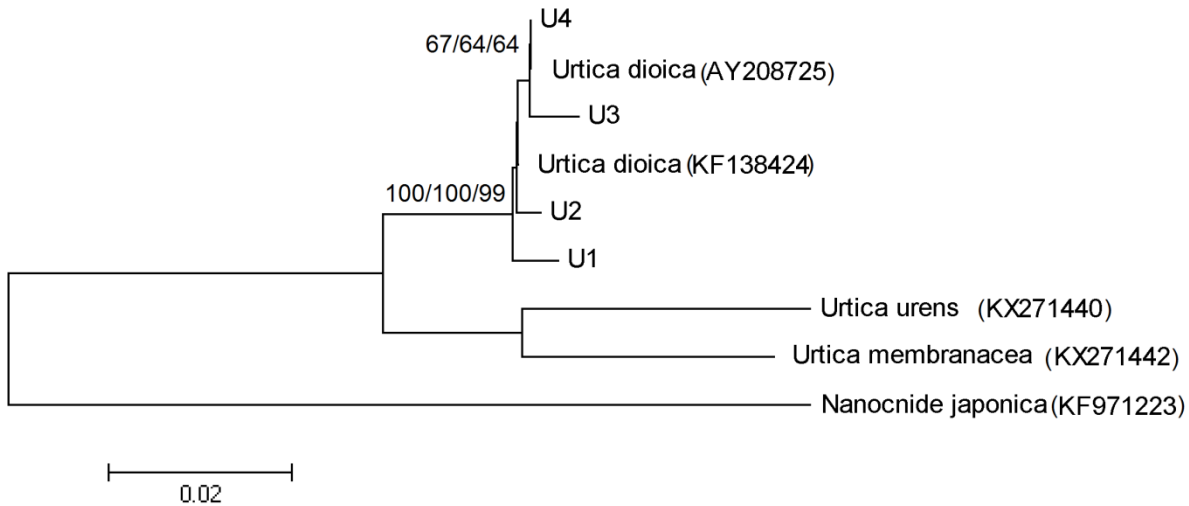
Urtica spp. farklı ve benzer morfolojik özelliklere sahip olan büyük bir taksondur. Bu yüzden, taksonomistler hala pek çok farklı türün sınıflandırılması ile ilgili problemlerle karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu durum karşısında moleküler yöntemler farklı türler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için kullanılmaktadır. Bothmer ve ark. (1991), doğadaki yabani tür ve varyetelerin toplanması ve moleküler düzeyde tanımlanmasının ekonomik değeri olan çeşitlere yeni ve üstün özellikler kazandırılması açısından önemli olduğunu bildirmiştir. Bharmauria ve ark. (2009), *Urtica dioica*'nın şifalı bir bitki olduğunu ve orta ve alt Himalaya dağlarındaki bitki dağılımının genetik açıdan farklı olduğunu bulmuşlardır. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) sonuçlarının incelenmesi sonucunda, genetik değişkenliğe yükseklik farkının sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin 500-2800 bp arasında, polimorfizm oranının ise % 4-50 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Uzunur ve ark. (2013)'larına göre; *Urtica dioica* Türkiye'de ve Dünya'da etnobotanik ve tıbbi bakımdan önemli tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) bitkisidir. Türkiye üç fitocoğrafik bölgede (Avrupa-Sibirya, İran-Turan,

Akdeniz) bulunur. Çalışmalarında, *U. dioica*'nın güçlü ekotiplerini ve genetik çeşitliliğini Türkiye'nin farklı fitocoğrafik bölgelerinden (Avrupa-Sibirya ve Akdeniz) ortaya çıkarmak için bazı ön deneyler yapmışlar ve rastgele primerler kullanarak RAPD-PCR yöntemini uygulamışlardır. Genomda doğal ve edinilmiş değişiklikler nedeniyle türlerin etkinliği, genetik altyapısı ve bitki coğrafyası ile ilgili morfolojik parametreler değerlendirilmiştir. Bu araştırma, bu alanla ilgili pek çok belirsiz ve tartışmalı konunun çözülmesine yardımcı olacak ekotipi tanımlamayı mümkün kılmıştır. Wu ve ark. (2013)'ları araştırmalarında *Urticaceae*'nin moleküler filogenisini incelemişler ve filogeni ağaçlarının çiziminde Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) ve Bayesian Inference (BI) algoritmalarından yararlanmışlardır. Çalışmada; 2 nüklear (ITS, 18S), 4 kloroplast (matK, rbcL, rpl14-rps8-infA-rpl36, trnL-trnF) ve 1 mitokondriyal (matR) gen bölgesi kullanılmıştır. Araştırmacılar, toplam 169 örnekten 122 tanesinin *Urticaceae* familyasında olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmalar sonucunda, *Cecropiaceae* isimli familyanın *Urticaceae* familyası içinde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile cinsler arasındaki sınırlar

belirlenmiş ve bazı morfolojik karakterlerin abartıldığı ve bazılarının ise sınıflandırmada sindirildiği kararına varılmıştır. Ayrıca karakter gelişimine ilişkin gelecekteki çalışmalara bu çalışmanın güçlü bir temel olacağı düşünülmüştür. Hadiah ve ark. (2015)'ları *Urticales*'in filogenisi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında *Cecropiaceae*'yı kısmen *Urticaceae* familyasına dahil etmişlerdir. Bu çalışmada, *rbcL* ve *trnL-F* gen bölgeleri kullanılarak bu iki takson arasındaki filogenetik ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda ise *Urticaceae* familyasının üç adet soyu belirlenmiştir; (1) *Boehmeria*–*Cecropieae*–*Forsskaoleae*–*Parietariae*, (2) *Urticeae* ve (3) *Elatostemeae*. Henning ve ark. (2014)'ları çalışmalarında *Urtica dioica*'yı morfolojik ve moleküler verilere dayanarak sınıflandırmışlardır. *Urtica dioica*'yı, *U. mollis* ve *U. aquatica*'ya çok benzer bulmuşlardır. Ayrıca, *U. dioica*'yı *U. gracilis*'in alt türüne yerleştirmenin mümkün olacağını bildirmişlerdir.

Karadeniz Bölgesi Ordu ili'nden toplanan 20 adet *Urtica* spp. örneklerinin *trnL-F* gen bölgelerinin agaroz jel içindeki görüntüsüne bakıldığında; 6., 9., 13. ve 20. kuyucuklarda pozitif bant görülmektedir. Bunlar; 6. kuyucuk Perşembe 1, 9. kuyucuk Ulubey, 13. kuyucuk

Fatsa 1 ve 20. kuyucuk Altınordu 3 DNA'sıdır. Kullanılan primerlere bakıldığında ise; Perşembe 1 örneğinde *trnL-c* ve *trnF-f*, Ulubey örneğinde *trnT-e* ve *trnF-f*, Fatsa 1 örneğinde *trnL-c* ve *trnL-d*, Altınordu 3 örneğinde *trnL-c* ve *trnF-f* primerleri kullanılmıştır. Bu jel görüntüsü toplanan *Urtica* spp. örneklerinin DNA'larının *trnL-F* gen bölgeleri ile başarılı bir şekilde çoğaltılabildiği anlamına gelmektedir (Şekil 1). Kullanılan primerler farklı olduğu için pozitif gözlenen bantlarında bp'leri farklı elde edilmiştir. Pozitif bant veren bu 4 adet *Urtica* spp. örneklerinin sekans analizleri sonucunda; bu türlerin hepsinin *Urtica dioica* ile benzer olduğu belirlenmiştir. Örneklerden Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4 *Urtica* türleri arasındaki DNA dizilerinin yüzde (%) nükleotid benzerlikleri ve tahmini evrimsel genetik uzaklıkları Çizelge 4'de verilmiştir. GenBank'ta referans olarak bulunan *Urtica* türleri ile çalışmada elde edilen Haplotipler (Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren NJ, ML, MP Filogeni ağacı Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. GenBank'tan alınan *Urtica* türleri ile çalışmada elde edilen Haplotipler (Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren NJ, ML, MP Filogeni ağacı

4. Sonuç

Bu çalışma ile Karadeniz Bölgesi Ordu ili'nde bulunan *Urtica* türlerinin kloroplast DNA *trnL-F* gen bölgeleri kullanılarak genetik çeşitliliği belirlenmiştir. Çalışmada, Fatsa 1-U1 ve Ulubey-U2 örneklerinin filogenetik olarak *U. dioica*'nın (KF138424) ile yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan % 100, % 100 ve % 99 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4 örneklerinin ise *U. dioica*

(AY208725) ile benzer olduğu saptanmıştır. Bu türün algoritma değerleri ise NJ, MP ve ML'de sırasıyla % 67, % 64 ve % 64 olarak belirlenmiştir. Netice olarak, örnekler arasından seçilen 4 haplotipin hepsinin *Urtica dioica* ile aynı soydan oldukları saptanmıştır. Türler arasındaki akrabalıkları belirlemek genetik karakterizasyon çalışmalarına ve bu genetik materyallerin değerlendirilmesine büyük oranda katkı sağlamaktadır. Ayrıca *trnL-F* gen bölgelerini kullanarak yapılan çalışmaların diğer gen bölgeleri kullanılarak yapılan çalışmalara nazaran türler arasındaki

farklılıkları daha net belirlediği düşünülmektedir. Bu çalışma; *Urtica* spp.'ye ait moleküler düzeyde ileride yapılacak olan daha geniş kapsamlı çalışmalara yol gösterici olabilir. Ayrıca yabancı otların zararlı yönlerine bakıldığında ise; hangi bölgede hangi türün yaygınlık gösterdiğinin belirlenmesi ve genetik

haritalamasının tamamlanması, uygulanacak mücadele şeklinin doğru seçilmesine yardımcı olacaktır. Bu çalışma ile Karadeniz Bölgesi'nin fındık alanlarında ısırgan türlerinden *Urtica dioica*'nın daha yaygın olduğu ve sonuç olarak bu türe uygun bir mücadele şeklinin seçilmesinin gerektiği kanısına varılmıştır.

Çizelge 4. Fatsa 1-U1, Ulubey-U2, Perşembe 1-U3 ve Altınordu 3-U4 kodlu *Urtica* örneklerinin ve diğer *Urtica* türleri arasındaki DNA dizilerinin yüzde nükleotit (%) benzerlikleri ve tahmini evrimsel genetik uzaklıkları

	U1	U2	U3	U4	<i>U. dioica</i>	<i>U. dioica</i>	<i>U. urens</i>	<i>U. membranacea</i>	<i>N. japonica</i>
U1	ID	0.989	0.933	0.938	0.992	0.938	0.886	0.895	0.756
U2	0.0082	ID	0.938	0.943	0.997	0.943	0.89	0.899	0.758
U3	0.0123	0.0096	ID	0.995	0.941	0.995	0.847	0.856	0.732
U4	0.0068	0.0041	0.0055	ID	0.945	1	0.852	0.86	0.736
<i>Urtica dioica</i> (KF138424)	0.0055	0.0027	0.0068	0.0014	ID	0.945	0.893	0.901	0.759
<i>Urtica dioica</i> (AY208725)	0.0068	0.0041	0.0055	0.0000	0.0014	ID	0.852	0.86	0.736
<i>Urtica urens</i> (KX271440)	0.0656	0.0642	0.0683	0.0628	0.0615	0.0628	ID	0.931	0.737
<i>Urtica membranacea</i> (KX271442)	0.0615	0.0601	0.0628	0.0587	0.0574	0.0587	0.0587	ID	0.744
<i>Nanocnide japonica</i> (KF971223)	0.1475	0.1448	0.1489	0.1448	0.1434	0.1448	0.1735	0.1721	ID

Kaynaklar

- Ayan A.K., Çalışkan Ö., Çırak C., 2006. Isırganotu (*Urtica* spp.)'nın Ekonomik Önemi ve Tarımı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 21(3): 357-363.
- Bharmauria V., Narang N., Verma V., Sharma S., 2009. Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 3(3), pp. 166-170.
- Bothmer R.V., Jacobsen N., Baden C., Jørgensen R.B., Linde-Laursen I., 1991. An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 7, IBPGR. Rome. 126 pp.
- Brouat C., Gielly L., Mckey D., 2001. Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinoideae) inferred from chloroplast trnL intron and trnL-trnF intergenic spacer sequences. American Journal of Botany. 88:143-149.

- Eck R.V., Dayhoff M.O., 1966. Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation. Silver Spring.
- Fitch W., 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. American Naturalist. 111, 223-257.
- Hadijah J.T., Conn B.J., Quinn C.J., 2015. Infra-familial phylogeny of Urticaceae, using chloroplast sequence data. Australian Systematic Botany. 21, 375-385.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41, 95-98.
- Haymes K.M., 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. Plant Molecular Biology Reporter. 14 (3), 280-284.
- Henning T., Quandt D., Grosse-Veldmann B., Monro A., Weigend M., 2014. Weeding the nettles II: a delimitation of '*Urtica dioica* L.' (Urticaceae) based on morphological and molecular data, including a rehabilitation of *Urtica gracilis* ait. Phytotaxa. 162 (2): 61-83.

- Hoffmann M.P., Frodsham A.C., 1993. Natural enemies of vegetable insect pests. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 pp.
- Kav S., Hanoğlu Z., Algier L., 2008. Türkiye’de Kanserli Hastalarda Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Yöntemlerinin Kullanımı (literatür taraması). International Journal Of Hematology And Oncology. 1,18.
- Kolören O., Kolören Z., Eker S., 2016. Molecular phylogeny of *Artemisia* species based on the internal transcribed spacer (ITS) of 18S-26S rDNA in Ordu Province of Turkey. Biotechnology&Biotechnological Equipment. DOI: 10.1080/13102818.2016. 1188674.
- Saitou N., Nei M., 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution. 4, 406-425.
- Seçmen O., Gemici Y., Gök G., Bekat L., Leblebici E., 2004. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Basımevi. 181-182.
- Soejima A., Nagamasu H., 2004. Phylogenetic analysis of Asian *Symplocos* (Symplocaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. Journal of Plant Research. 117(3):199-207.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology. 17: 1105–1109.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology Evolution. 30, 2725-2729.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The Clustal X-windows interface: flexible strategies formul tiple sequence alignmentaided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25, 4876-4882.
- Uzonur I., Akdeniz G., Katmer Z., Karaman Ersoy S., 2013. RAPD-PCR and real-time PCR HRM based genetic variation evaluations of *Urtica dioica* parts, ecotypes and evaluations of morphotypes in Turkey. African Journal Traditional Complement Alternative Medical. 10(2): 232-245.
- Wua Z., Monro A.K., Milne R.Z., Wang H., Yi T., Liu J., Li D., 2013. Molecular phylogeny of the netle family (Urticaceae) inferred from multiple loci of three genomes and extensive generic sampling. Molecular Phylogenetics and Evolution. 69: 814-827.