

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



Michaela Pekařová

**Sekundární metabolity a jejich využití
u *Urtica dioica* agg.**

Secondary metabolites and their use in *Urtica dioica* agg.

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, PhD.

Konzultant: Mgr. Jindřich Chrtek, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2020

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli Tomášovi Urfusovi za ochotu, vstřícnost a přínosné konzultace. Dále bych chtěla poděkovat Jindřichovi Chrtkovi za připomínky k mé práci a pomoc při hledání odborné literatury.

Abstrakt

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) je obecně známým zástupcem rodu *Urtica*, i přesto není její vnitrodruhová taxonomie uspokojivě vyřešena. Důvodem k neustálenému taxonomickému pojetí celého agregátu je značná morfologická variabilita. Zásadní podíl na této variabilitě má jednoznačně polyploidizace. Polyploidie pravděpodobně stojí i za úspěšností tetraploidního cytotypu při osidlování široké škály synantropních stanovišť. Pletiva kopřivy dvoudomé jsou bohatá na sekundární metabolity, z nich největší zastoupení mají mastné kyseliny, fenolové kyseliny a flavonoidy. Sekundární metabolity se získávají k různým účelům. Značné užití mají zejména ve farmacii, kde slouží k léčbě různých onemocněních. Přesto však dosud nebyl studován vztah mezi složením sekundárních metabolitů a ploidními úrovněmi.

Klíčová slova: *Urtica dioica*, polyploidie, průtoková cytometrie, sekundární metabolity, kapalinová chromatografie, fenolické látky, flavonoidy

Abstract

Stinging nettle (*Urtica dioica*) is a very well-known taxon of genus *Urtica*, but still its taxonomy is not satisfactory resolved. An obvious reason of taxonomic obscurity of entire aggregate is enormous morphological variation. Polyploidization significantly contributes to this variability. Polyploidy probably is a reason of successful expansion of tetraploid cytotype in synanthropic habitats. *Urtica dioica* is rich in secondary metabolites, especially fatty acids, phenolic acids and flavonoids. Secondary metabolites are isolated for various purposes. They are widely applied especially in pharmacy and subsequently used for various medications. Despite the undoubtful economic importance a linkage between secondary metabolites composition and polyploidy has not been studied yet.

Key words: *Urtica dioica*, polyploidy, flow cytometry, secondary metabolites, liquid chromatography, phenolic compounds, flavonoids

Obsah

1	Úvod	1
2	Čeleď Urticaceae	2
2.1	TRIBUS URTICEAE.....	3
3	Rod <i>Urtica</i>	4
3.1	<i>URTICA DIOICA</i>	4
3.2	<i>URTICA KIOVENSIS</i>	8
3.3	<i>URTICA ATROVIRENS</i>	8
3.4	<i>URTICA BIANORII</i>	9
3.5	<i>URTICA RUPESTRIS</i>	9
4	Polyploidie	10
4.1	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE V BOTANICKÉM POJETÍ.....	14
5	Sekundární metabolity	16
5.1	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	21
6	Závěr	23
7	Použitá literatura	24

1 Úvod

Urtica dioica L. (kopřiva dvoudomá) je velmi známá rostlina, která má díky člověku téměř kosmopolitní rozšíření (Grosse-Veldmann et al. 2016). Roste především v synantropním prostředí a mezi lidmi proslula díky žahavým trichomům. Na její komplikované evoluci se podílela zejména polyploidie (Rejlová et al. 2019).

Z kopřivy dvoudomé se získávají sekundární metabolity, které mají široké využití. Můžeme se s nimi setkat v potravinářství (polévky, saláty atd.), v zemědělství se používá jako hnojivo (vysoký obsah éterických olejů) a nachází se i v krmných směsích pro hospodářská zvířata (vysoké nutriční hodnoty). Z kopřiv se vytváří i textilní vlákna, hlavně během válek, kdy byl nedostatek bavlny.

Nejčastěji se se sekundárními metabolity setkáváme ve farmacii a kosmetice. Mimoto má *Urtica dioica* dlouhou historii v lidovém léčitelství.

Cílem této bakalářské práce je stručné shrnutí zástupců *U. dioica* agg. a příbuzných taxonů a příčin jejich speciace. Zvláštní důraz je také kladen na představení významných sekundárních metabolitů u *Urtica dioica* a shrnutí dosavadních poznatků o jejich účincích zaměřených na medicínské využití.

2 Čeleď Urticaceae

Urticaceae je čeleď spadající mezi Rosidy, velký klád vyšších dvouděložných rostlin (Rosopsida). Rosidy zahrnují řád Rosales, který obsahuje 9 čeledí a jednu z nich tvoří právě Urticaceae (Simpson, 2010).

Uvnitř Rosales se nachází monofyletická skupina, která se skládá ze 4 čeledí: Ulmaceae, Cannabaceae, Moraceae a Urticaceae. Jsou pro ně typické drobné a redukované květy s 5 nebo méně tyčinkami a cystolity nacházející se ve specializovaných buňkách (lithocysty; Judd, 2016).

Čeleď Urticaceae obsahuje více než 2000 druhů a 54 rodů v 6 tribech: Boehmerieae, Elatostemateae, Forsskaoleae, Parietarieae, Urticeae a Cecropieae (Kim et al., 2015, Wu et al., 2013). Jsou rozděleny do 3 evolučních linií, první linie se skládá z tribů Boehmerieae, Forsskaoleae, Parietarieae, Cecropieae, druhou linii tvoří tribus Elatostemateae a poslední linií tribus Urticeae (Kim et al., 2015).

V Evropě se nachází pouze triby Urticeae a Parietarieae (Tutin et al., 1993).

Čeleď Urticaceae je značně rozmanitá z hlediska životních forem, patří sem jak byliny, tak malé keře, stromy, liány nebo dokonce epifyty se vzdušnými kořeny (Dostál, 1988). Zároveň zahrnuje jednoleté i vytrvalé druhy (Dostál, 1988).

Jejich rozšíření je celosvětové, nachází se na jižní i severní polokouli v mírném a tropickém pásmu (Kim et al., 2015).

Název čeledi pochází z latinského jazyka, je odvozen ze slova „urere“, které v překladu znamená „hořet“ (Esposito et al., 2019, De Vico et al., 2018). To souvisí se žahavými trichomy přítomnými u některých rodů. Žahavé trichomy jsou inkrustované křemíkem, proto jsou tak křehké. Při dotyku dojde k ulomení kulaté špičky, tím vzniká ostrý hrot. Následně se vylijí toxické látky, které jsou zodpovědné za podráždění pokožky. (Simpson, 2010) Jako toxické látky byly izolovány acetylcholin a 5-hydroxytryptamin, které stimulují hladkou svalovinu. Za podráždění pokožky je též zodpovědný histamin a serotonin vyvolávající bolest, protože aktivují nociceptivní receptory neuronů (receptory bolesti). Již 1/10000 mg těchto toxinů vyvolá zánětlivou reakci (Collier & Chesher, 1956, Fu et al., 2006, Hegi, 1990, Martínez-Aledo et al., 2020, McMahon, 1996) .

2.1 Tribus Urticeae

Tribus Urticeae obsahuje přibližně 220 druhů ve 12 rodech, které se rozdělují do 5 kladů, označených velkým písmenem podle abecedy. Klad A tvoří rody *Urtica* + *Hesperocnide*, *Zhengyia*, *Laportea I* a *Nanocnide*, klad B se skládá z rodů *Dendrocnide* a *Discocnide*, klad C obsahuje pouze rod *Girardinia*, klad D tvoří jen část rodu *Laportea* (*Laportea II*) a poslední klad E se skládá z rodů *Obetia*, *Urera* a *Poikilospermum* (Deng et al., 2013, Kim et al., 2015). Mezi hlavní znaky tribu Urticeae a jeho sesterské skupiny Elatostemateae patří bylinný habitus. Předek byl nejspíše dřevinný a u Urticeae došlo k přechodu na byliny. Zpětný přechod z bylin na dřeviny je u dvou kladů (B a E) rozšířených v jihovýchodní Asii, Africe a střední Americe. Vstříčné postavení listů na stonku se považuje za další evolučně významný znak. Je poměrně vzácné u Urticeae (omezené na rod *Urtica* v kladu A), proto bude nejspíše odvozené. Souvisí to s trendem kvetoucích rostlin, vstříčné postavení listů je důsledkem fylotaxe k většímu ozáření plochy listu. Žahavé trichomy jsou synapomorfií čeledi Urticeae. Výjimku tvoří rod *Poikilospermum*, který o žahavé chloupky přišel, jelikož se jedná o epifytní rostlinu (Kim et al., 2015)

3 Rod *Urtica*

Rod *Urtica* zahrnuje 30-80 druhů rozšířených na všech kontinentech kromě Antarktidy. Jde o rostliny většinou vázané na půdy bohaté na živiny, zejména dusičnany a fosfáty. Dávají přednost vlhkým stanovištím s neutrálním pH, jsou ale schopné růst i na suchých, bazických (vápnitých) nebo kyselých půdách (Grosse-Veldmann et al., 2016).

Kopřivy jsou jednoleté nebo vytrvalé byliny, zároveň mohou být jednodomé či dvoudomé. Mají přímé nebo vystoupavé lodyhy, u většiny druhů čtyřhranné. Žahavé trichomy pokrývají lodyhy a listy. Listy jsou vstřícné, jednoduché, zubaté až pilovité, vzácně celokrajné. V nodech se nachází palisty, které mohou být jak srostlé v páru, tak volné. Květy jsou jednopohlavné, nazelenalé a vytváří chudokvětá klubíčka, která dále skládají složená květenství, nejčastěji laty, hrozny nebo klasy, vyrůstá v úžlabí listenů. Okvětní lístky jsou 4, liší se u samičích a samčích květů. Samčí květy mají všechny okvětní lístky téměř stejné, u samičích květů jsou dva vnitřní lístky delší, než dva lístky vnější za plodu se zvětšují, později zasychají nebo dužnatí a obalují plod. V samičích květech se nachází pouze jeden pestík s velmi krátkou až nezřetelnou čnělkou a hlavatou bliznou, ze které vyrůstají štětiny. Plodem je v obrysu podlouhlá, zploštělá, hnědá až černá, lesklá nebo matná nažka (Dostál, 1988, Kaplan et al., 2019, Hegi, 1990, Tutin et al., 1993).

3.1 *Urtica dioica*

Urtica dioica je vytrvalá bylina s přímou, 30–150(–250) cm vysokou a výrazně hranatou lodyhou. Oddenek bývá dlouhý a plazivý se žlutavým zbarvením, někdy dřevnatí. Listy jsou vždy vstřícné, na okraji zubaté, na bázi zaokrouhlená až srdčitá. Na lodyze se v každém nodu nachází 4 palisty, které mají kopinatý tvar a nejsou srostlé. *Urtica dioica* je dvoudomý druh, jednopohlavné květy skládají jednopohlavná květenství. Vzácně se objevuje tzv. subdioecie, kdy se občas tvoří menší množství květu opačného pohlaví v květenství. Samčí květenství jsou laty, přímé a oproti samičím řidší a delší. Samičí květenství jsou hrozny nebo klasy. Samičí květenství jsou zprvu přímo až šikmo odstálá, po opylení rovnovážně odstálá a později převislá. Nažky jsou vejcovité. Žahavé a nežahavé trichomy pokrývají stonek, listy i okvětní lístky (Dellaporta & Calderon-Urrea, 1993, Dostál, 1988, Hegi, 1990, Kaplan et al., 2019, Renner, 2014, Tutin et al., 1993)

Urtica dioica je velmi známá plevelná rostlina. Roste poblíž lidských sídel, okolo cest, ale i v krajině člověkem přímo neovlivněné, např. podél řek a v lužních lesích, převážně na vlhkých a živinami bohatých půdách (Hegi, 1990).

Kopřiva dvoudomá je značně proměnlivá, zejména v odění lodyh a listů, tvaru a velikost listů. Plasticita se tedy týká zejména vegetativních znaků, ale dochází i k přechodům k jednodomosti či naopak (Dostál, 1988).

Morfologické rozdíly mezi poddruhy jsou malé. Nejčastěji se porovnává odění, u kterého se sleduje hustota jednoduchých trichomů a počet žahavých trichomů (Henning et al., 2014). Poddruhy se navzájem odlišují také velikostí listů, tvarem čepele listů (kopinatá až široce vejčitá, na bázi zaokrouhlená až srdčitá) a velikostí a tvarem zubů na jejím okraji (Grosse-Veldmann & Weigend, 2015).

Výraznou plasticitu můžeme pozorovat u stinných forem, ty jsou vyšší a značně se snižuje hustota žahavých trichomů na listech (Pollard & Briggs, 1982).

Pravě tato variabilita se odráží ve velmi problematické a dosud ne zcela vyřešené intraspecifické klasifikaci (Dostál, 1988).

V Evropě jsou obvykle uznávány 4 poddruhy: subsp. *dioica*, subsp. *sondenii*, subsp. *pubescens*, subsp. *sondenii* a subsp. *subinermis* (Weigend, 2006).

Urtica dioica* subsp. *dioica je zřejmě nejrozšířenější poddruh, existují nálezy z celé Eurasie, Severní Ameriky, Chile a Afriky. Ve střední Evropě se vyskytuje na živinami bohatých, vlhkých půdách a často v člověkem pozmeněném prostředí. Můžeme se s ní setkat i v horách, nebo na pobřežních skálách (Weigend, 2005)

Jedná se o tetraploidy, v jejichž populacích jsou výjimečně přítomní i pentaploidi (vznikají pravděpodobně splnutím neredukované gamety tetraploida s redukovanou gametou od diploidní jedince; Rejlová et al., 2019).

Rostliny z Blízkého východu (Turecko, Libanon, Sýrie, Írán) s malými listy, řídkým pokrytí trichomy a bohatým větvením byly někdy oddělovány do samostatného druhu *Urtica haussknechtii* Boiss. Jedná se však pouze o pozdějšího stadia ontogenetického vývoje *Urtica dioica* subsp. *dioica* (Weigend 2006).

Pozdní formy se objevují na konci léta a během podzimu. Často bývaly popisovány jako nové druhy či poddruhy, což způsobuje značné zmatky v taxonomii (Weigend, 2006). Například jiné malolisté pozdní formy byly pojmenovány jako *Urtica dioica* var. *montana* Schur (Rumunsko), *Urtica dioica* var. *androgyna* Beck (Rakousko), *Urtica dioica* var. *mitissima* Hausskn. (Německo), *Urtica dioica* var. *sarmatica* Zapał. (Polsko; Grosse-Veldmann & Weigend, 2015). Nesprávně byly také popsány jednodomé formy např. *Urtica dioica* var. *ramosissima* L.Richt. (Maďarsko) a již výše zmíněná *Urtica haussknechtii*. Došlo i k mylnému popisu samičích rostlin třeba u *Urtica intermedia* Guss. (Itálie; Grosse-Veldmann & Weigend, 2015).

Urtica dioica* subsp. *sondenii (Simmons) Hylander je diploidní poddruh, který se vyskytuje zejména ve Skandinávii a její areál pravděpodobně pokračuje až na jižní Sibiř (Geltman, 1988). Od ostatních poddruhů se liší pouze ojedinělými žahavými trichomy a zároveň absencí nežahavých jednoduchých trichomů (Tutin, et al., 1993).

Objevil se i názor zpochybňující rozdíl mezi *Urtica dioica* subsp. *sondenii* a severoamerickým poddruhem *Urtica dioica* subsp. *gracilis* (Aiton) Selander. Byl však vyvrácen zejména několika fylogenetickými studii (Grosse-Veldmann & Weigend, 2015, Rejlová et al., 2020), naopak *Urtica dioica* subsp. *gracilis* je v dnešní době obvykle hodnocena jako samostatný druh (*U. gracilis* Aiton; Henning et al. 2014). Nicméně stále není jasné, do jaké míry dochází ke kontaktu s *U. dioica* subsp. *subinermis*, ať už v centrálním evropském areálu (Rejlová et al., 2019) nebo v ruské okrajové části (Geltman, 1988).

Urtica dioica* subsp. *pubescens Ledeb. je diploidní poddruh (Rejlová et al., 2019). Vyskytuje se ve východní a jihovýchodní Evropě (Maďarsko, Itálie, Řecko, Turecko, Bulharsko, Ukrajina, Rusko; Weigend, 2006).

Může se vyskytovat na typických stanovištích kopřiv (Obr.1), ale převážně roste v suchých oblastech. Weigend udává, že jde o taxon s největší tolerancí k suchu v porovnání s ostatními evropskými poddruhy, avšak výsledky Rejlové et al. takovou charakteristiku spíše vylučují (Weigend, 2005).

Je zřejmě blízkce příbuzná s *Urtica dioica* subsp. *subinermis*, odlišují se zejména na základě délky nežahavých trichomů (delší u subsp. *subinermis*) a mají i odlišné rozšíření (Weigend, 2005).

Nežahavé trichomy jsou krátké a tvoří hustou pokrývku, která může na první pohled působit jako bělavé zbarvení (Pignatti, 2017).

Urtica dioica* subsp. *subinermis (R.Uechtr.) Weigend je diploidní poddruh střední a východní Evropy (Rejlová et al., 2019). Na úrovni ekologických preferencí má nejmenší toleranci k suchu. Vyskytuje se vždy výhradně v okolí velkých řek (Dunaj, Labe, Rýn, Mohan, Odra; Obr.1). Typické jsou pro ni i lužní lesy, kde může docházet k záměně s kopřivou lužní (Weigend, 2005).

Urtica dioica* subsp. *kurdistanica Chrtek je známá z východního Turecka a západního Íránu (tj. z Kurdistánu) a byla vyčleněna z poddruhu *Urtica dioica* subsp. *pubescens* (Chrtek, 1974).

Vyznačuje se hustými žahavými trichomy na bázi stonku a na listech v dolní části rostliny. V horní části rostliny se počet žahavých trichomů snižuje, na adaxiální straně horních listů jsou jen ojedinělé (Weigend, 2006). Nápadné jsou také hrubě zubaté listy s výrazně zúženou bází (Weigend, 2006).

Urtica dioica* subsp. *afghanica Chrtek se vyskytuje v Íránu, Iráku a Afghánistánu (Grosse-Veldmann, 2016). Roste převážně na stinných a vlhkých místech (lesy, houštiny, pastviny, Jiauriu et al., 2003). Jedná se o blízce příbuzný poddruh *Urtica dioica* subsp. *kurdistanica* (Weigend, 2006).

Vyznačuje se řídkým oděním (jednoduché i žahavé trichomy). Čepel listů je kopinatá, na bázi zaokrouhlená (Jiauriu et al., 2003), na okraji zubatá s hlubokými zářezy (Weigend, 2006), nápadný je dlouhý vrchol čepele listu (Jiauriu et al., 2003).

Urtica dioica* subsp. *gansuensis C.J.Chen je asijský poddruh rostoucí v lesích a v blízkosti potoků. Vyznačuje se hustým oděním, které tvoří žahavé a jednoduché trichomy. Listy mají vejčité-srdčítý tvar, srdčitá je také báze listu (Jiauriu et al., 2003).

Urtica dioica* subsp. *cypria H.Lindb. je ostrovní endemit západní části Kypru (Weigend, 2006). Je to menší rostlina, délka listů nepřesahuje 8 cm (jiné taxony mají listy často přes 10 cm dlouhé) a maximální výška se pohybuje okolo 80 cm (Weigend, 2006). Nežahavé trichomy jsou četné, žahavé jsou naopak pouze řídce roztroušené. Květy skládají jednopohlavná květenství, samčí vyrůstají z bazálních nodů a samičí z horních nodů, to znamená že *Urtica dioica* subsp. *cypria* je jednodomá rostlina (Weigend, 2006). Fylogenetické studie (Grosse-Veldmann & Weigend, 2015, Rejlová et al., 2020) ale ukazují samostatné postavení tohoto taxonu mimo okruh *U. dioica*; významným znakem podporujícím toho oddělení je i rozdíl ve velikosti jaderného genomu.

Recentní fylogeneze se shodují, že do vrcholového kládu *U. dioica* agg. náleží i *U. kioviensis* Rogow. a *U. atrovirens* Req. ex Loisel. Navíc se v některých fylogenezích ve vrcholovém kládu nachází ještě druhy *U. bianorii* (Knoche) Pavia a *U. rupestris* Guss. (Rejlová et al., 2020).

3.2 *Urtica kiovensis*

Urtica kiovensis (kopřiva lužní) se vyskytuje ve střední a východní Evropě, častá je např. v povodí Dunaje, Tisy a Sávy. V České republice se s ní můžeme setkat v mělkých tůních v mokřadních olšínách nebo méně často v mokřadních vrbinách na jižní Moravě (soutok Moravy a Dyje a Plačkův les na dolní Svatce; Danihelka & Lepší, 2004)

Vytváří dlouhé, tlusté a plazivé oddenky přecházející ve stonek, který je zaoblený v důsledku volně distribuovaných cévních svazků (Hegi, 1990). V nodech lodyhy se v dolní části vytváří adventivní kořeny a v horní části se větví (Tutin, et al., 1993).

Je to vytrvalá bylina s dlouhými, tlustými a plazivými oddenky přecházejícími ve stonek, který je oblý v důsledku volně distribuovaných cévních svazků. V nodech stonku se v dolní části vytváří adventivní kořeny a v horní části se větví; v zimě jí zůstávají plazivé lodyhy olistěné a listy opadají až na jaře během záplav. Listy jsou na okaji zubaté, palisty v párech srůstají, zcela jí chybí nežahavé trichomy a žahavých trichomů má málo. Jednopohlavné květy vytváří hroznovitá, jednopohlavná nebo oboupohlavná, odzola rozkvétající květenství. Jako první v dolní části kvetou samčí květenství, v tuto dobu se může zaměnit se samčí rostlinou *Urtica dioica*. Ve střední polovině se nachází květenství oboupohlavná. Na podzim naopak kvetou jen samičí květenství, zde je možná záměna se samičí rostlinou *Urtica dioica* (Danihelka & Lepší, 2004, Hegi, 1990, Kaplan et al., 2019, Tutin et al., 1993).

3.3 *Urtica atrovirens*

Urtica atrovirens je jeden z endemitů apeninské části Středozeří. Vyskytuje se zejména na Korsice, Sardinii, Elbě a v pobřežní části Toskánska (Pignatti, 2017).

Jedná se o vytrvalou a jednodomou bylinu s nachově zbarvenou lodyhou. Samčí a samičí květy se společně nachází v jednom hroznu (Tutin et al., 1993).

Oproti *Urtica dioica* má *Urtica atrovirens* řapík delší než listovou čepel. Okraj listu tvoří nápadné a hluboké zuby (Pignatti, 2017).

3.4 *Urtica bianorii*

Urtica bianorii je ostrovním endemitem Středozeší, je známá pouze z ostrova Mallorca (Paiva, 1993).

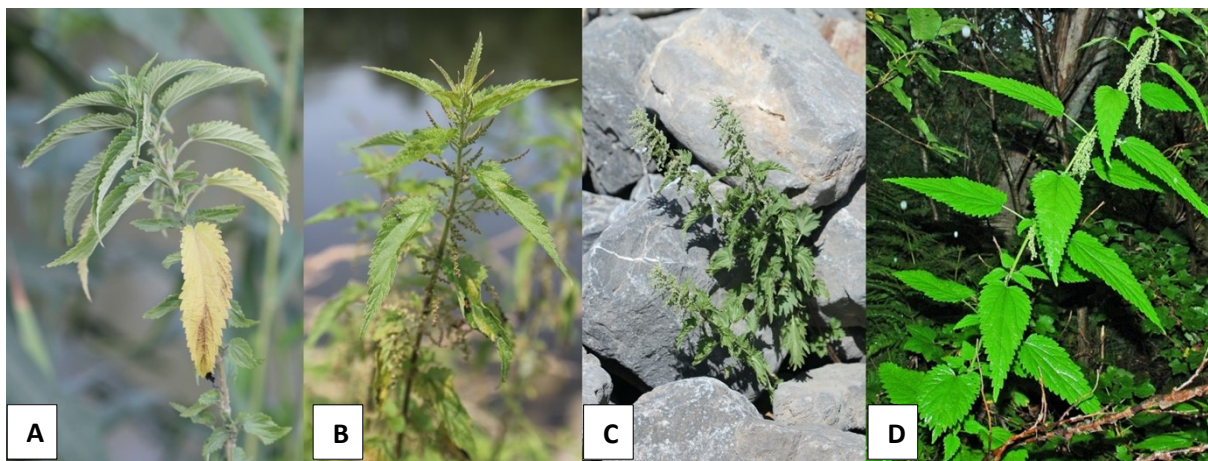
Jednodomá, diploidní kopřiva dosahující výšky 30–100 cm. Žahavé trichomy pokrývají nevětvenou lodyhu a listy. Čepel listů je vejčitá se srdčitou bází a ostrým vrcholem a na okraji zubatá. Květenství tvoří oboupohlavné hrozny (Paiva, 1993).

3.5 *Urtica rupestris*

Urtica rupestris je dalším ostrovním endemitem Středozeší. Roste jen na Sicílii (Weigend, 2006).

Ve většině případů je dvoudomá, ale může vytvářet i jednodomé rostliny, kde jsou od sebe oddělené samčí a samičí hrozny (Tutin et al., 1993).

Urtica rupestris je hodně podobná *Urtica dioica*, liší se délkou řapíku, který není delší než 1/2 listové čepele. Na rostlině se nachází velmi málo jednoduchých trichomů či dokonce žádné (Pignatti, 2017).



Obr. 1: Příklad různé morfologie a odlišných stanovišť diploidních poddruhů *Urtica dioica* agg. – A) *U. dioica* subsp. *pubescens* (lužní lesy), B) *U. dioica* subsp. *subinermis* (lužní lesy), C) *U. dioica* subsp. *kurdistanica* (horské sutě) D) *U. dioica* subsp. *sondenii* (lesotundra; foto: Tomáš Urfus)

4 Polyploidie

Polyploidie nastává, když jsou v somatických buňkách více než dvě sady chromozomů. Podle jejich počtu se označují, např. triploid – 3 sady chromozomů, tetraploid – 4 sady chromozomů, pentaploid – 5 sad chromozomů atd. (Ramsey & Schemske, 1998, Suda, 2009).

Nejčastěji se s polyploidizací setkáváme u rostlin, kde je považována za jeden z hlavních evolučních mechanismů. Je ale známá i u živočichů – zejména ryb a obojživelníků. Původně se předpokládalo, že u savců je neslučitelná se životem, ale byla objevena i u hlodavců a v lidském těle jsou polyploidní jaterní buňky (Gallardo et al., 1999, Suda, 2009).

Podle způsobu vzniku rozlišujeme alopolyploidii a autopolyploidii. Autopolyploidie znamená znásobení chromozomální sady jednoho druhu, opakem je alopolyploidie, kdy se kombinuje genetický materiál dvou a více druhů (Suda 2009).

Polyploidizace je také pravděpodobně nejvýznamnějším typem sympatrické speciace, při které dochází ke vzniku nového druhu na území obývaném původním druhem (nebo v případě alopolyploidizace původními druhy; Flégr, 2007).

Polyploid může vzniknout více způsoby. Splynutím dvou neredukovaných gamet, tj. gamet s diploidním jádrem, se vytváří tetraploid z diploida. Ovšem tento způsob není obvyklý, jelikož pravděpodobnost setkání dvou neredukovaných gamet je velmi nízká. Běžným případem je splynutí redukované gamety s neredukovanou, čímž dochází k tvorbě triploida. Označuje se jako intermediální polyploid nebo triploidní most, jelikož zprostředkovává vznik tetraploida z diploida (Kolář et al., 2017, Petit et al., 1999).

Polyploidii vznikají často opakovaně na různých místech (polytopně; Soltis & Soltis, 1999). Nově vzniklé polyploidní rostliny ale musí obvykle čelit tzv. minority cytotype exclusion. Jejich počet je totiž ve srovnání s diploidními rostlinami mnohem menší a při neexistující bariéře je tudíž velká frekvence zpětných křížení (Kolář et al., 2017).

Polyploidizace způsobuje změny, které pak potažmo mohou přispívat k tomu, že se neopolyploidi vysvobodí z pasti vyloučením minoritního cytotypu. Mezi takové změny patří zvýšení konkurence schopnosti pomocí ekologických kompromisů, zvýšená plodnost či fenologický posun doby kvetení (Te Beest et al., 2012).

Nepohlavní rozmnožování je jedním z mechanismů obcházení vyloučení minoritních cytotypů. U polyploidů se také občas vyskytuje vegetativní rozmnožování nebo apomixie tzn. vývoj jedince ze semen vzniklých bez oplození. Typická pro polyploidy je i samosprašnost. Minimalizuje se jejich nevýhoda frekvenčně závislého křížení (Kolář et al., 2017, Stebbins, 1971, Suda, 2009).

Nový polyploid se etabluje tehdy, když míra vzniku nových polyploidů přesáhne míru jejich vymírání. Z pasti zpětného křížení s diploidy se může dostat ekologickou diferenciací. Má jinou ekologii a obsadí tudíž jiná stanoviště, tím často zabrání přenosu pylu mezi různými cytotypy, protože hmyz moc daleko nedoletí (Kolář et al., 2017).

Po polyploidizaci dochází k přestavbám na úrovni genomu, které lze považovat za zdroj variability a zrychlení evolučních procesů (Soltis & Soltis, 1999). Genomová reorganizace zahrnuje hlavně umlčování ("silencing") a ztrátu některých duplikovaných genů (= proces diploidizace; Te Beest et al., 2012). Důvodem může být zachování rozumného počtu genů. Duplikované geny přežijí, pokud přinášejí selekčně výhodné, popř. nové vlastnosti organismu (Adams & Wendel, 2005).

Umlčování genů může probíhat více mechanismy. Během strukturálních změn zahrnující inzerci, delecii atd., dochází k vytvoření nefunkčních genů. Jiný způsob počítá s epigenetickými mechanismy, přičemž je pravděpodobně významnější, jelikož po polyploidizaci není dostatek času na bodové mutace (Leitch & Bennett, 1997).

Duplikované geny jsou pro organismus výhodou, část genů zajišťuje nezbytné funkce pro přežití a v duplikovaných genech může docházet k bodovým mutacím, čímž můžou získat novou funkci a specializovat se (Suda, 2009).

Výhodné pro polyploidy je také snížení tvorby homozygotů, tím podporují genetickou diverzitu při příbuzenském křížení (Te Beest et al., 2012). Při srovnání samoopylení diploidního a tetraploidního heterozygota, bude mít tetraploid menší zastoupení homozygotů mezi potomky (Suda, 2009).

Rozdíl mezi polyploidní a diploidní rostlinou bývá často znát na první pohled, jelikož polyploidní druhy mohou být robustnější v důsledku zvětšení buněk (Te Beest et al., 2012). Velikost buněk ovlivňuje i intenzitu metabolismu. Větší buňka má i větší objem a povrch, tím pádem se zvětšuje i prostor pro chemické reakce (Suda, 2009). Polyploidi se vyznačují pomalejším ontogenetickým vývojem, zapříčiněným déle trvající mitózou, a proto často později kvetou. (tj. mají posunutou fenologii, Rejlová et al., 2019).

Asi nejpodstatnější výhodou polyploidů je jejich odolnost a zdatnost. Projevuje se zejména v rozšíření polyploidů, které bývá mnohem rozsáhlejší než u diploidů. Mohou osidlovat různé klimatické pásy, vyskytují se přednostně i v nehostinných oblastech. Pronikají do vyšších zeměpisných šířek na severní polokouli a větší tolerance vůči chladu jim umožňuje osídlení vyšších nadmořských výšek (Te Beest et al., 2012).

Dříve se vědci domnívali, že jeden druh je tvořen jen jednou ploidní úrovní a více cytotypů se vyskytuje jen výjimečně. Ale postupně se ukazuje, že druhy sestávající z většího množství

ploidních úrovní jsou běžné a dokonce častější. Cytotypy jsou u jednotlivých druhů zastoupeny nerovnoměrně, tj. dominantní a vzácné. Velmi zřídka jsou populace dominantních izolované (alopatrie). Častěji se objevuje parapatrie. Pokud tvoří kontaktní zóny, jedná se o rozsáhlou parapatrii. Další je mozaiková parapatrie, kdy dochází k prolínání populací. Nejběžnější je sympatrie, což znamená koexistenci různých cytotypů (Obr. 2, Petit et al., 1999).

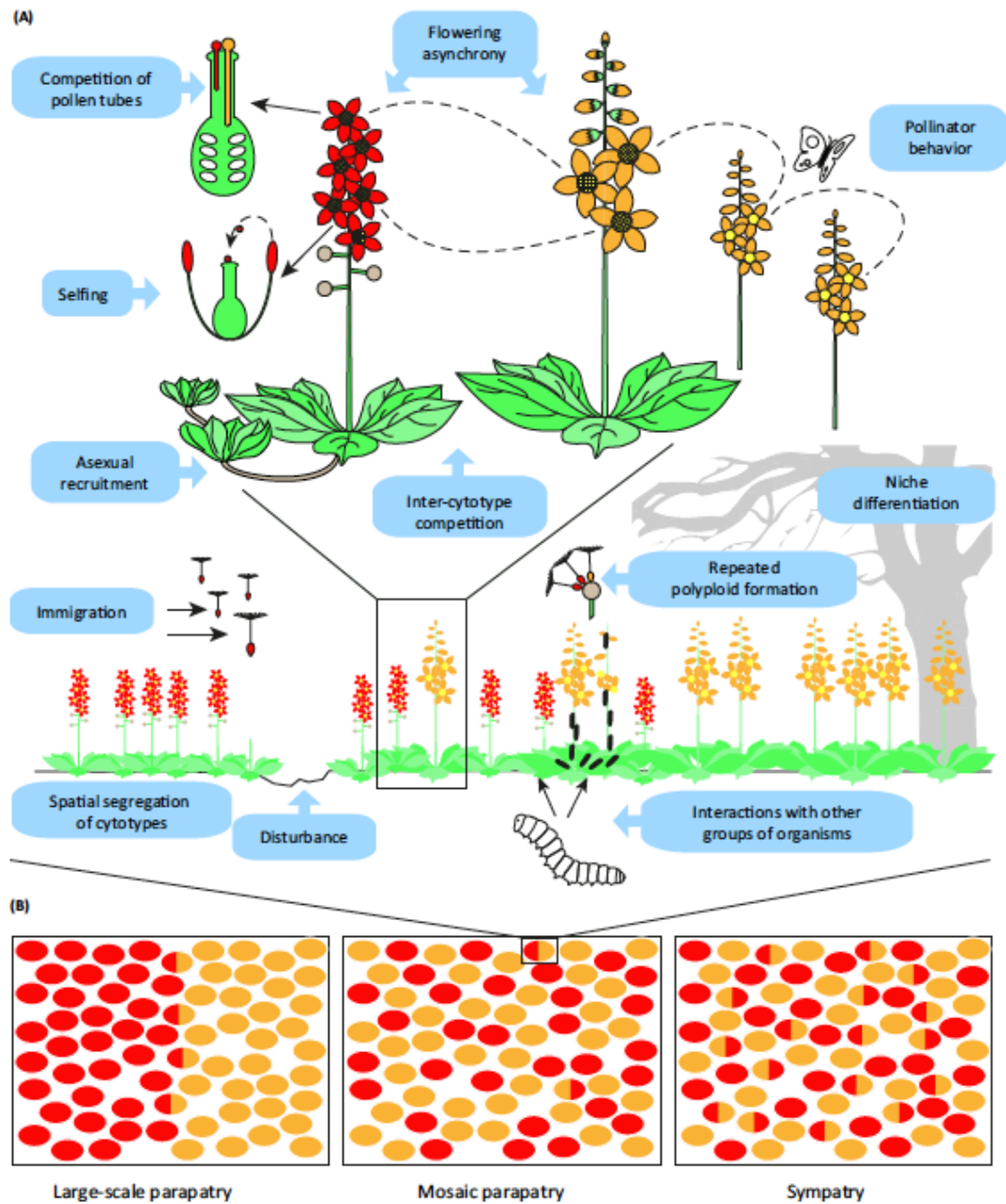
V každé populaci je alespoň jeden vzácný či lichý (minoritní) cytotyp. Buď má nový polyploidní původ nebo byl původně běžný a jen se snížila frekvence jeho výskytu. U těchto druhů by bylo logické, kdyby docházelo k tzv. vyloučení minoritních cytotypů, protože hůře hledají partnery, to ovlivňuje jejich životaschopnost, která je mnohem nižší než u dominantních druhů. Příkladem může být srovnání kondice potomků u diploidů, tetraploidů a triploidů, kde nejhůřší kondici mají triploidi, můžeme o nich hovořit jako o triploidním bloku. Obecně ale může společný výskyt více ploidii představovat buď primární nebo sekundární kontaktní zónu. Primární kontaktní zónou se myslí geografická oblast, kde vznikl nový polyploid a koexistuje zde se svým přímým předchůdcem. Sekundární kontaktní zóna je geografická oblast výskytu polyploida v těsné blízkosti svého přímého předchůdce s rozdílem, že polyploid vznikl na jiném místě (Kolář et al., 2017).

Existuje mnoho hypotéz vysvětlujících obrovskou diversifikaci krytosemenných rostlin a patří mezi ně i hypotéza, kde je jako hlavní příčina uváděna polyploidizace (Soltis & Soltis, 1999). Je podpořena důkazy, že většina genů v regulačních a signalizačních drahách má původ ve starobylé polyploidizaci (tzv. paleopolyploidie). Polyploidie způsobuje rychlé genetické, morfologické, fyziologické a ekologické změny. Duplikované geny zvyšují složitost struktur a metabolismu, tím došlo i k nárůstu biologické komplexity (Soltis & Soltis, 1999, Suda, 2009, Te Beest et al., 2012).

U kopřiv obecně platí vše doposud zmíněné, navíc bylo zjištěno, že *Urtica dioica* se vyskytuje ve dvou převládajících ploidiiích – diploidní a tetraploidní (Rejlová et al., 2020). Překvapující je, že právě tetraploidi převažují nad diploidy a zároveň se diploidi zřídka vyskytují samostatně. Ve většině tvoří smíšené populace s tetraploidy. Heteroploidní hybridizace je pravděpodobně velmi vzácná, jelikož triploidní cytotyp se u *U. dioica* vyskytuje v zanedbatelném množství (Rejlová et al., 2019).

Ploidní úrovně *U. dioica* pravděpodobně nejsou rozšířeny náhodně. Tetraploidní cytotyp se má tendenci vyskytovat ve vyšších nadmořských výškách než diploidní. Z hlediska rozšíření lze také sledovat míru vazby na synantropní typy stanovišť, tetraploidy můžeme označit jako synantropní rostliny, zatímco diploidi se vyskytují spíše ve společenstvech méně ovlivněných člověkem (Rejlová et al., 2019). Zmíněné ploidní úrovně lze ztotožnit s výše uváděnými

poddruhy, nicméně ani molekulární markery ani morfometrika neprokázaly mezi poddruhy žádné rozdíly (Rejlová et al., 2020).



Obr.2: Koexistence cytotypů v ploidně smíšených populacích– A: koexistence diploidů (červená) a tetraploidů (oranžová), B: prostorové uspořádání smíšených ploidních populací (převzato z Kolář et al., 2017)

4.1 Průtoková cytometrie v botanickém pojetí

Průtoková cytometrie je nejčastější metoda pro zjištění ploidní úrovně. Používá se například ke zjištění zeměpisného rozšíření jednotlivých cytotypů u ploidně diferencovaných druhů, příbuzenských vztahů mezi druhy nebo poddruhy případně k identifikaci kryptických taxonů. V případě rozdílů v ploidii nebo velikosti jaderného genomu rodičovských taxonů je také rychlou a jednoduchou metodou umožňující prokázat nebo vyvrátit původ domnělých hybridních rostlin (Suda, 2011).

Principem průtokové cytometrie je zaznamenání optických vlastností jednotlivých částic (Suda, 2005). Jedná se o intenzitu fluorescence, rozptyl a odraz světla (Cibiček & Vacek, 2014).

Měřené částice jsou obarvené. Pokud se barvivo ozáří světlem o správné vlnové délce, dojde k jeho excitaci. Excitovaný stav je nestabilní, proto se vrací do původního stavu. Během přechodu do normálního stavu dochází k uvolnění energie ve formě tepla a světla. Tento proces nazýváme fluorescence (Suda, 2011).

U analýzy rostlinného materiálu se využívají 3 skupiny barviv. Rozlišujeme je podle vazby k nukleové kyselině. Neselektivní se váží k DNA kdekoliv, báze DNA zde nemají vliv. Další skupinou jsou barviva selektivní s vazbou k DNA v místech bohatých na adenin a thymin (barvivo DAPI). Poslední a méně rozšířená skupina selektivních barviv má vazbu k DNA v místech bohatých na cytosin a guanin (Suda, 2005).

Přístroj, který se používá k tomu měření, nazýváme průtokový cytometr. Skládá se ze 3 hlavních systémů - systém fluidiky, optický a výpočetní systém (Roubalová, 2012).

Fluidika transportuje částice do měřicí komůrky. Aby mohla proběhnout analýza, musí být zajištěn průchod částic komůrkou jednotlivě, tedy jedna za druhou (Roubalová, 2012). Správnou pozici částic zajišťuje hydrodynamická fokuse. Vzorek obklopuje nosná kapalina, která proudí rychleji a tím stlačuje vzorek v centru. Díky zúžení kapiláry projde do měřicí komůrky jen jedna částice za druhou. Nosná kapalina se se vzorkem nemísí kvůli laminárnímu proudění (Cibiček & Vacek, 2014).

U optického systému rozlišujeme excitační optiku, která je zdrojem světla a zároveň ostří a směřuje paprsek do průtokové komůrky (Šinkorová & Zárybnická 2008). Zdrojem světla mohou být lasery, diody či výbojky (Suda, 2011). Druhou optickou soustavou jsou sběrné cesty. Tvoří je čočky, zrcadla, filtry vedoucí světlo do detektorů (Šinkorová & Zárybnická 2008).

Signály získané pomocí sběrné optiky zesilují fotonásobiče a měniče je přetvářejí na elektrické impulsy. Elektrické impulsy zaznamenává počítač. Výsledkem měření je histogram, kde osa x znázorňuje intenzitu signálu a osa y počet měřených částic (Suda, 2011).

V ideálním případě by byla intenzita fluorescence stejná pro všechny jádra v totožné růstové fázi. Ale ve skutečnosti dochází k rozptylu hodnot. Tuto situaci řeší variační koeficient, který vyjadřuje rozlišovací schopnost konkrétního měření. Čím je variační koeficient nižší, tím je větší přesnost měření. Ve většině případů se pohybuje v rozmezí 1-10 % (Suda, 2005).

Vlastní stanovení velikosti genomu probíhá prostřednictvím interní standardizace. Standardem se rozumí materiál se známým počtem chromozomů a známou velikostí genomu. Pozice měřeného vzorku se porovnává s pozicí standardu (Suda, 2011).

Výhodou průtokové cytometrie je snadná příprava vzorků a následná rychlost měření, která spočívá ve vysoké frekvenci analýzy jednotlivých částí. Zároveň není potřeba velkého množství pletiva, tudíž nedochází k poškození zkoumaných jedinců (Roubalová, 2012).

Nevýhodou je kromě vysoké pořizovací ceny je potřeba čerstvého materiálu. V některých případech lze ale s úspěchem zpracovat vzorky usušené v silikagelu či recentní herbářové položky (Suda, 2011)

5 Sekundární metabolity

Urtica dioica se využívá v mnoha odvětvích jako je textilní, barvířský, kosmetický průmysl, ale nejčastěji se s ní setkáváme v medicíně a potravinářství. V potravinářství se používá v různých podobách – sušená, čerstvá do salátů, vařená či dušená v polévkách a omáčkách. Vysokou teplotou, anebo sušením ztrácí žahavé vlastnosti (Esposito et al., 2019, Dhouibi et al., 2020, Di Virgilio et al., 2015).

Výhodou pro organismus jsou její nutriční hodnoty. Má vysoký obsah vlákniny a bílkovin a je dobrým zdrojem jedlých olejů a vitaminů (Jafari, Samani & Jafari, 2020).

O druhu *Urtica dioica* se uvažuje jako o funkčním jídle, což znamená, že může sloužit jako prevence před chronickými a degenerativními chorobami (Esposito et al., 2019, Sarkar, 2013). Léčivé účinky jejích sekundárních metabolitů znali již ve starověku a v lidovém léčitelství se využívá dodnes k léčbě běžných onemocnění, jako je např. ekzém, diabetes, revmatismus a mnohé další (Esposito et al., 2019, Chrubasik et al., 1997, Upton, 2013).

Rostlinné látky podle vzniku v metabolických dráhách rozlišujeme na primární a sekundární. Mezi primární prvky řadíme sacharidy, lipidy, bílkoviny a vitamíny. Sekundární látky jsou odvozené z metabolismu primárních látek. Jejich funkce je různá, mohou být životně nezbytné pro rostlinu např. pyrimidové a purinové báze nukleových kyselin nesoucích genetickou informaci, nebo fytohormony v signální dráze (Nováček, 2009). Důležitou roli hrají také v rostlinných interakcích, kde mají ochrannou funkci před herbivory popř. slouží jako atraktant. Lákají barvou a vůní opylovače a jiné živočichy potřebné k rozšíření semen (Jahodář, 2012). Řada sekundárních metabolitů však představuje odpadní látky, neboť jejich funkce není dosud známá (Nováček, 2009).

V rostlinách však převažuje skupina látek, která se mění v závislosti na ontogenetické fázi, typu orgánu nebo podmínkách prostředí rostliny. Sekundární metabolity se ve většině tvoří indukovaně tzn. dané látky se vytvářejí v závislosti na působení predátora, invazní rostliny a podmínek prostředí (teplota, dostatek vody,...). Sekundární metabolity mohou mít vazbu na taxonomii, ale zejména odráží strategii přežití rostliny (Jahodář, 2012).

Urtica dioica je na sekundární metabolity velmi bohatá (fytoosteroly, karotenoidy, třísloviny, fenolové kyseliny, flavonoidy, mastné kyseliny). Byla u ní prokázána přítomnost fytoosterolů (beta-sitosterol, sitostanol,...), jejichž biologická aktivita snižuje hladinu cholesterolu v krevním séru. Steroly inhibují aromatické enzymy, které jsou důležité v metabolismu steroidních hormonů, jelikož umožňují přeměnu androgenů na estrogenery (Asgarpanah & Mohajerani, 2012, Durak et al., 2004, Valitova et al., 2016).

Urtica dioica obsahuje i karotenoidy, rostlinné hnědočervené pigmenty. Konkrétně byl prokázán beta-karoten, lutein a lykopen (Guil-Guerrero et al., 2003). Beta-karoten je pro člověka významný, protože se metabolizuje na retinol (vitamin A). Karotenoidy mají antioxidační účinek, likvidují toxické volné radikály. Tímto účinkem se vyznačuje zejména lykopen, jež je zároveň významnou měrou zastoupen v krvi. Lykopen se transportuje na LDL cholesterolu a snižuje jeho syntézu (Opletal, 2016).

Urtica dioica se vyznačuje i vysokou koncentrací mastných kyselin, zejména v mladých listech a semenech (Guil-Guerrero et al., 2003). Jednoznačně dominují nenasycené mastné kyseliny (kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina linolenová; Obr.3), méně zastoupeny jsou nasycené mastné kyseliny (kyselina palmitová, kyselina stearová; Jafari et al. 2020). Mají vliv na modulaci lidského metabolismu a pozitivní účinek při léčbě srdečních chorob (Guil-Guerrero et al., 2003).

Nejvýznamnější sekundární metabolity u *Urtica dioica* tvoří fenolové sloučeniny (Pinelli et al., 2008).

Fenolické látky zahrnují velké množství sloučenin, které jsou tvořeny benzenovým kruhem (aromatické jádro) s minimálně jednou hydroxylovou skupinou (Nováček, 2009).

Jednoduché fenoly mají benzenový kruh s nejméně jednou hydroxylovou skupinou, zároveň mohou nést i jiné substituenty, nejčastěji metylovou skupinu (Nováček, 2009).

Z jednoduchých fenolů jsou odvozeny fenolkarboxylové kyseliny, obsahující navíc karboxylovou skupinu (Opletal, 2016).

Pod pojmem fenolkarboxylové kyseliny (nebo fenolové kyseliny) se rozumí hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny, které mohou být volné, nebo se vyskytují jako jejich deriváty (Opletal, 2016).

Jedním z derivátů jsou estery s aromatickými kyselinami. Nejčastěji se tvoří estery mezi kyselinou chinovou a kávovou. Příkladem spojení kyseliny chinové a kávové je kyselina chlorogenová (Obr. 3), která byla u *Urtica dioica* prokázána a zároveň je i nejčastějším esterem aromatických kyselin vyskytujícím se téměř ve všech rostlinných tkáních (Opletal, 2016).

Další estery mezi kyselinou chinovou a kávovou prokázané u druhu *Urtica dioica* jsou kyseliny kryptochlorogenová a neochlorogenová (Frag et al., 2013).

Deriváty kyseliny kávové inhibují biosyntézu kyseliny arachidonové a částečně potlačují syntézu 5-lipooxygeny a leukotrienu B₄, čímž zamezují vytvoření zánětu (Dhouibi et al., 2020).

Kyselina arachidonová patří mezi mastné kyseliny, vzniká z linolové kyseliny. Působení enzymů umožňuje přeměnu kyseliny arachidonové na eikosanoidy, které jsou důležité pro buněčnou signalizaci, a tím vyvolávají zánětlivou reakci. Pokud na kyselinu arachidonovou působily lipooxygenázy, vznikají eikosanoidy nazývané se leukotrieny, jestliže působily cyklooxygenázy, vznikají prostanoidy. Leukotrien B₄ je zásadní pro neutrofilů, podmiňuje jejich pohyb a podílí se na vasokonstrikci (Hughes-Fulford et al., 2005).

Lignany jsou též fenolické látky, jedná se o nízkomolekulární sekundární metabolity rozšířené u cévnatých rostlin. Nejznámější lignan u *Urtica dioica* je neoolivil (Opletal, 2016).

Lignany mají důležitou roli v léčbě benigní hyperplázie prostaty (Farang et al., 2013). Během tohoto onemocnění dochází ke zvětšení žlázy. Jako růstový faktor zde působí testosteron, androgenní pohlavní hormon. Testosteron je transportován k prostatě pomocí SHBG globulinu, plazmatického proteinu, který má silnou afinitu k androgenům a estrogenům (Dhouibi et al., 2020). Lignany se dokáží na tento globulin navázat, tím blokuje transport testosteronu a jeho integraci s cílovou tkání, zde konkrétně s prostatou (Opletal, 2016).

U *Urtica dioica* se vyskytují i kumariny a třísloviny. Třísloviny dokáží srážet bílkoviny, díky tomu se na sliznicích tvoří koagulační membrány a snižuje se bolest, dráždivost a inhibuje se tvorba zánětu (Nováček, 2009).

Obecně polyfenoly mají protizánětlivý účinek. Zamezují aktivitě cyklooxygenáz (COX; Farang et al., 2013). COX jsou enzymy, které též přeměňují kyselinu arachidonovou na aktivní eikosanoidy. Existují ve více izoformech lišící se funkcí a množstvím v organismu. COX1 se nachází ve většině buněčných typů v konstantních množstvích naopak COX 2 jsou omezené pouze na místo zánětu a za normálních podmínek v nepatrných množstvích v organismu (Rocca et al., 2002). Při pozorování inhibice polyfenoly byla zjištěna větší inhibice izoformy COX1. To dokazuje, že čím více polyfenolů, tím slabší zánětlivá reakce (Farang et al., 2013).

Flavonoidy jsou fenolické látky spadající do pyranových barviv. Mají převážně žluté zbarvení, které jim dalo název - "flavus" znamená v latině žlutý (Nováček, 2009).

Flavonoidy označují skupiny derivátů flavanů (Obr.3). Patří mezi ně flavony, isoflavony, flavonoly a antokyaniny. Flavan je tvořen dvěma aromatickými jádry spojenými heterocyklem s kyslíkem (Nováček, 2009).

Fungují jako antioxidanty, zvyšují aktivitu kataláz a superoxidu dismutázy. Tím se sníží počet volných radikálů, které jsou toxické a způsobují oxidativní stres, který může vyvolat onemocnění (Özkol et al., 2012).

Flavonoidy lze použít při léčbě rakoviny, jelikož potlačují oxidativní stres, který zde funguje jako mutagenní činitel (Khanzode et al., 2004).

Pomocí oxidativního stresu může být regulována i apoptóza. Apoptóza je důležitá pro homeostázi. Udržuje přiměřený počet buněk, tedy rovnováhu mezi proliferací a úmrtím buněk (Fernald & Kurokawa, 2013, Martínez-Aledo et al., 2020).

Zvýšení exprese pro-apoptotických kaspáz je další způsob, kterým flavonoidy stimulují apoptózu (Esposito et al., 2019).

Oxidativní stres může též poškodit játra po ischemii. Když se zastaví krevní oběh, má organismus nedostatek kyslíku a tkáň získává energii pomocí anearobní glykolýzy, při které vzniká velké množství volných radikálů. Jejich rozkladem chrání flavonoidy jaterní tkáň (Kandis et al., 2010).

Antioxidační účinky mají vliv i na centrální nervovou soustavu, kde podporují mozkové buňky a tím podporují i učení nebo mohou mít pozitivní účinek na stresové neurologické poruchy (Dhouibi et al., 2020, Patel et al., 2016, Toldy et al., 2005).

Při léčbě rakoviny je výhodná inhibice růstu a proliferace buněk. Flavonoidy buňku uvězní v G2 fázi buněčného cyklu. Buňka je připravená k buněčnému dělení, ale není puštěna do další fáze k mitóze (Frag et al., 2013).

K zastavení buněčného růstu se využívá inhibice topoizomeráz, tento účinek mají i flavonoidy konkrétně na topoizomerázu II (Ilhan et al., 2019).

Flavonoidy ovlivňují neutrofile, buňky imunitního systému, jejichž funkcí je degranulace cizorodých látek. Neutrofile se pohybují díky chemotaxi, tj. směrem k vyšší koncentraci látky podmiňující pohyb. Poté co neutrofile migrují, dochází k rozpoznání infekční agens, která je požitá neutrofilem a následně i degranulována, tím dojde k zničení nežádoucí látky. V této kaskádě působí flavonoidy jako chemoreatraktant a podporují degranulaci. Proto je možné využití při léčbě lidí s nedostatkem neutrofilních funkcí a granulomatózních onemocnění (Akbay et al., 2003).

Dalším účinkem flavonoidů je protizánětlivá reakce, reagují totiž s T-lymfocyty. Flavonoidy ovlivňují zejména pomocné T-lymfocyty (Th1 a Th2). Th1 produkují prozánětlivé cytokiny aktivující makrofágy. Th2 produkují cytokiny způsobující humorální odpověď, aktivují B-lymfocyty. Zároveň tyto typy pomocných T-lymfocytů pracují proti sobě, jsou tzv. antagonisté. Produkty Th1 jsou inhibující pro Th2 a naopak. Právě flavonoidy inhibují syntézu cytokinu Th1, čímž blokuje tvorbu zánětu a umožňují přepnutí na humorální odpověď (Dhouibi et al., 2020).

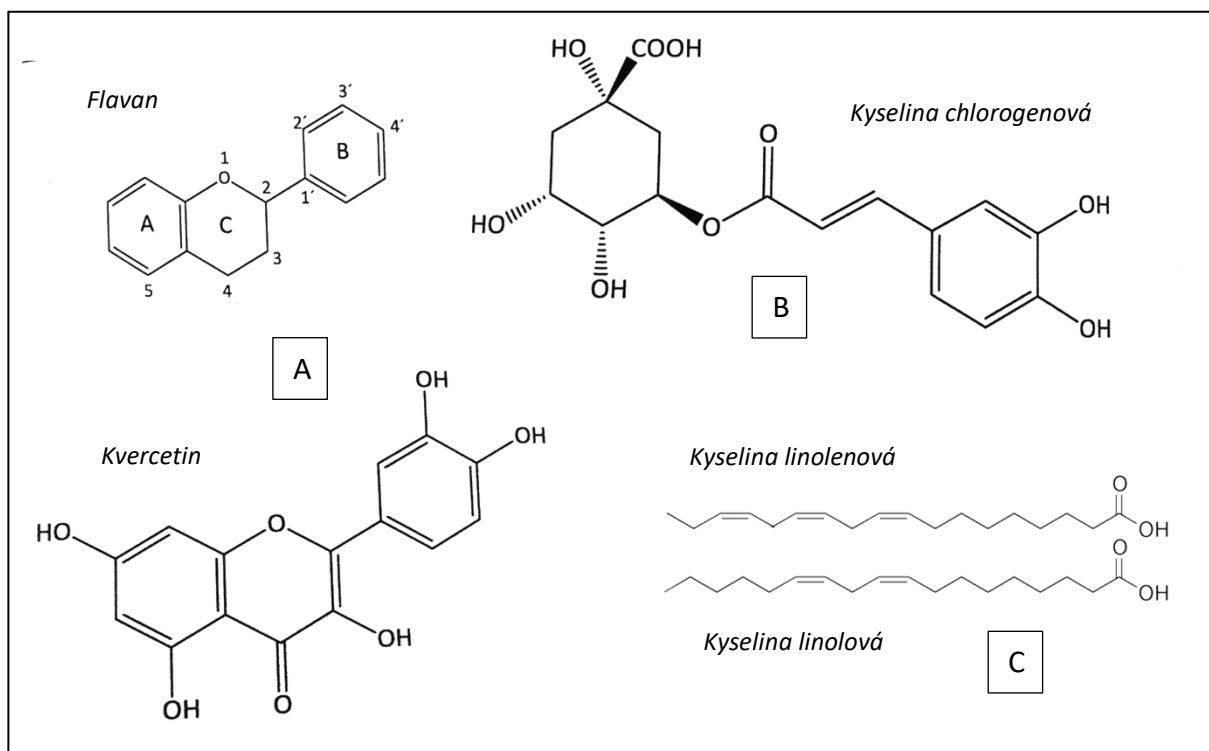
Kvercetin je jeden z nejrozšířenějších flavonoidů (Obr.3). Vyznačuje se imunostimulací neutrofilů, moduluje jejich degranulaci a oxidačního vzplanutí. Podporuje migraci neutrofilů (Akabay et al., 2003). Inhibuje tok vápníku a zároveň 5-lipoxygenázovou dráhu metabolismu kyseliny arachidonové, což má důsledek v potlačování uvolňování oxidantů neutrofilů (Sharma et al., 1996). Má vliv na hormonální systém. Kvercetin je afinitní k estrogeneru a progesteronu. Váže se k jejich receptoru a tím snižují aktivitu estrogeneru. Kvercetin zde figuruje jako fytoestrogen (Ilhan et al., 2019). Další pozitivní účinek kvercetinu je inhibice segregace trombocytů, neboli bránění tvorbě krevních sraženin (Opletal, 2016).

Rutin se řadí mezi běžné flavonoidy, má stejný vliv na vypouštění oxidantů neutrofilů jako kvercetin. Je zapojen v indukci buněčné smrti (Akabay et al., 2003, Esposito et al., 2019).

Jeho nejvýznamnější účinek je však modulace krevních kapilár. Rutin funguje jako vitamin P, ovlivňuje propustnost, křehkost a vodivost kapilár krevního oběhu. Pomáhá při špatném prokrvení končetin. Snižuje křehkost cévních stěn a tím jim dodává pevnost (Nováček, 2009). Umožňuje lepší vstřebávání vitamínu C. Vitamin C a kyselina askorbová, se uplatňuje v oxidoredukčních metabolických procesech. Zároveň dodává pevnost krevním kapilárám, účastní se krvetvorby a srážení krve (Nováček, 2009).

Další prokázané flavonoidy u *Urtica dioica* jsou isokvercitrin, nikotiflorin, narcissin, astragalin. (Farag et al., 2013).

Obsah sekundárních metabolitů se liší i v rámci jedné rostliny kopřivy dvoudomé. Nicméně se jedná o rozdíly kvantitativní, v listech převažují fenolové kyseliny (71–76 % z celkového množství fenolových sloučenin). Z flavonoidů je v listech hlavní rutin, který tvoří podíl 6,7–18,2 % z celkového množství flavonoidů. Naopak ve stoncích je více flavonoidů než fenolových kyselin. Navíc se z kvantitativního hlediska projevují rozdíly i mezi pěstovanými a planě rostoucími rostlinami. Výrazný rozdíl je v obsahu rutinu v listech anebo u flavonoidů ve stoncích. Pěstované rostliny mají 32 % flavonoidů z celkového množství fenolových sloučenin, u planých rostlin je podíl flavonoidů 54 %, tedy mnohem vyšší (Pinelli et al., 2008).



Obr. 3: Příklady sekundárních metabolitů u *Urtica dioica* – Na obrázku jsou chemické látky patřící mezi tři nejvíce zastoupené skupiny sekundárních metabolitů (A: flavonoidy, B: fenolové kyseliny, C: mastné kyseliny; převzato z Opletal, 2016)

5.1 Kapalinová chromatografie

Obsah jednotlivých sekundárních metabolitů můžeme určit pomocí chromatografie. Lze provádět jak kvalitativní (určení složek ve vzorku), tak i kvantitativní analýzu (určení koncentrace složek ve vzorku, Klouda, 2003).

Při chromatografii rozlišujeme dva typy fází. Jedná se o fázi pohyblivou, která se nazývá mobilní a fázi nepohyblivou, tedy fázi stacionární (Kříženecká & Synek, 2014). Analyt je unášen mobilní fází v koloně. Během postupu kolonou dochází k tvorbě rovnovážných stavů mezi fázemi navzájem a mezi jednotlivými fázemi se vzorkem. Zároveň dochází k separaci složek vzorku na základě jejich afinity k stacionární a mobilní fází (Klouda, 2003). Čím je silnější afinita ke stacionární fází, tím je vzorek více zadržován (vyšší retence) a prodlužuje se retenční čas (Cibiček & Vacek, 2014).

Podle mobilní fáze můžeme rozlišit dva základní typy chromatografie – plynovou, kde mobilní fází tvoří plyn a kapalinovou, kde mobilní fází je kapalina (Klouda, 2003).

Kapalinová chromatografie se dále rozlišuje podle typu stacionární fáze - rozdělovací, adsorpční a jiné (Cibiček & Vacek, 2014).

Kapalinová chromatografie rozdělovací má kapalnou stacionární na povrchu tuhé částice. Obě kapaliny musí být nemísitelné (Churáček, 1990). Liší se také jejich polaritou, kdy mobilní fáze je polárnější než stacionární. Mobilní fázi mohou tvořit alkoholy, nitrily či ethery. Jelikož je jejich eluční síla příliš velká, ředí se s jinými rozpouštědly. Se stoupající eluční silou se zkracuje retenční čas (Kříženecká & Synek, 2014).

U **kapalinové chromatografie adsorpční** tvoří stacionární fázi tuhá částice tzv. adsorbent. Adsorbentem je nejčastěji silikagel, obsahující na povrchu hydroxylové skupiny, které tvoří vodíkové můstky. Zároveň povrch silikagelu je kyselý, tudíž zadržuje bazické složky analytu (Klouda, 2003). Ale adsorbentem mohou být i jiné látky jako alumina a florisil. Zpravidla však bývá stacionární fáze silně polární a mobilní nepolární anebo slabě polární. Nejvíce jsou zadržovány silně polární látky a jejich retenční čas je tedy nejdelší (Kříženecká & Synek, 2014). Měření se provádí pomocí chromatografu. Chromatograf se skládá z čerpadel zajišťující neustálý průtok mobilní fáze, nástřikové zóny, kde se dodává vzorku do mobilní fáze. Součástí chromatografu jsou také kolony, v nichž se složky analytu separují, detektory a výpočetní systém (Churáček, 1990).

Výsledkem chromatografie je graf nazývaný se chromatogram. Na ose x je zaznamenán čas a na ose y koncentrace eluované složky v mobilní fázi (Kříženecká & Synek, 2014).

Identifikace vzorku probíhá pomocí retenčních časů. Porovnává se retenční čas neznáme látky s retenčním časem standardy či referenční látky. Koncentrace látky je dána plochou píku v chromatogramu (Kříženecká & Synek, 2014).

6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce shrnuje vnitrodruhovou taxonomii *Urtica dioica* agg. a blízké příbuzných druhů. Zároveň se věnuje zdroji jejich variability, tj. polyploidii. Zvláštní zřetel však také klade na sekundární metabolity, které byly z *Urtica dioica* izolovány.

Vnitrodruhová taxonomie *Urtica dioica* je velmi problematická, hlavním důvodem je značná morfologická plasticita kopřivy dvoudomé. Opakovaně docházelo k mylnému popisování nových variet a poddruhů, přestože se jedná o standardní projevy variability *Urtica dioica*. V současné době se v Evropě uznávají 4 poddruhy: subsp. *dioica*, subsp. *sondenii*, subsp. *pubescens* a subsp. *subinermis*. Dále je akceptován poddruh *Urtica dioica* subsp. *kurdistanica* v oblasti Kurdistánu. Diskutabilní zůstává *Urtica dioica* subsp. *cypria*, jelikož velikost jejího genomu neodpovídá poddruhu *Urtica dioica*.

Za velkým úspěchem *Urtica dioica* stojí nejspíše polyploidie, která tetraploidním jedincům umožňuje snazší šíření, zvyšuje jejich tolerance k různorodým podmínkám prostředí a konkurenceschopnost.

Sekundární metabolity se nachází u *Urtica dioica* ve velkém množství (fytosteroly, mastné kyseliny, fenolové kyseliny, flavonoidy aj.). Mají různá využití, ale nejčastěji se s nimi setkáme ve farmacii, kde se uplatňují zejména kvůli protizánětlivým a antioxidačním účinkům.

Přestože jsou sekundární metabolity *Urtica dioica* hojně studovány a využívány, souvislost mezi jejich obsahem a polyploidii, tedy zásadní příčinou její evoluce nebyla dosud podrobena systematickému studiu.

Právě vztah mezi sekundárními metabolity a polyploidii je budoucí záměr navazující magisterské práce. Polyploidie by mohla mít vliv na obsah, tj. složení i kvantitu, sekundárních metabolitů. Výsledné složení sekundárních metabolitů by navíc mohlo být aplikováno i na vnitrodruhovou taxonomii *Urtica dioica*, čímž by se mohly potvrdit a zpřesnit některé předchozí fylogenetické závěry.

7 Použitá literatura

- Adams K. L. & Wendel J. F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8(2):135–141.
- Akbay P., Basaran A. A., Undeger U. & Basaran N. 2003. In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytotherapy Research* 17(1):34–37.
- Asgarpanah J. & Mohajerani R. 2012. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(46):5714–5719.
- Barnes J., Anderson L. A. & Phillipson J. D. 2003. *Herbal medicines: A guide for healthcare professionals*. London: Pharmaceutical Press.
- Chrtek J. 1974. *Urticaceae*. In: Rechinger K. H. (ed.), *Flora Iranica : Flora des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden Gebirge: Persien, Afganistan, Teile von West-Pakistan, Nord-Iraq, Azerbaidjan, Turkmenistan*. Wien: Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, p. 1–20.
- Chrubasik S., Enderlein W., Bauer R. & Grabner W.. 1997. Evidence for Antirheumatic Effectiveness of Herba *Urticae* Dioicae in Acute Arthritis: A Pilot Study. *Phytomedicine* 4(2):105–8
- Cibiček N. & Vacek J. 2014. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého.
- Collier H. O. & G. B. Chesher. 1956. Identification of 5-Hydroxytryptamine in the Sting of the Nettle (*Urtica Dioica*). *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 11(2):186–89.
- Danihelka J. & Lepší M. 2004. Kopřiva lužní, *Urtica kiovensis*, na soutoku Moravy a Dyje. *Zprávy České Botanické Společnosti* 39:25–35.
- Dellaporta S. L. & Calderon-Urrea M. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5(10):1241–1251.
- Deng T., Kim C., Zhang D. G., Zhang J. W., Li Z. M., Nie Z. L & Sun H. 2013. *Zhengyia shennongensis*: A new bulbiferous genus and species of the nettle family (Urticaceae) from Central China exhibiting parallel evolution of the bulbil Trait. *Taxon* 62(1):89–99.
- Dhouibi R., Affes H., Salem M. B., Hammami S., Sahnoun Z., Zeghal K. M. & Ksouda K. 2020. Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 150:67–77.

- Dostál J. 1989. *Květena ČSSR I*. Praha: Academia.
- Durak I., Biri H., Devrim E., Sözen S. & Avcı A., 2004. Aqueous Extract of *Urtica Dioica* Makes Significant Inhibition on Adenosine Deaminase Activity in Prostate Tissue from Patients with Prostate Cancer. *Cancer Biology and Therapy* 3(9):855–57.
- Esposito S., Bianco A., Russo R., Di Maro A., Isernia C. & Pedone P. V. 2019. Therapeutic perspectives of molecules from *Urtica dioica* extracts for cancer treatment. *Molecules* 24(15).
- Farag M. A., Weigend M., Luebert F., Brokamp G. & Wessjohann L. A. 2013. Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC-Q-TOF-MS metabolomic profiles. *Phytochemistry* 96:170–83.
- Fernald K. & Kurokawa M. 2013. Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology* 23(12):620–633.
- Flégr, J. 2007. *Úvod do evoluční biologie*. Praha: Academia.
- Fu H. Y., Chen S. J., Chen R. F., Ding W. H., Kuo-Huang L. L. & Huang R. N. 2006. Identification of Oxalic Acid and Tartaric Acid as Major Persistent Pain-Inducing Toxins in the Stinging Hairs of the Nettle, *Urtica Thunbergiana*. *Annals of Botany* 98(1):57–65.
- Jiauriu Ch., Qi L., Friis I., Wilmot-Dear C. M. & Monro A. K. 2003. *Urticaceae*. In: *Flora of China* 5:76–189. Beijing: Science Press and St. Luis: Missouri Botanical Garden.
- Gallardo M. H., Bickham J. W., Honeycutt R. L., Ojeda R. A. & Köhler N. 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401(6751):341.
- Geltman D. Genus *Urtica* L. (*Urticaceae*) in the URSS. *Nov System Plant Vasc.* 1988; 25:68–80
- Grosse-Veldmann B., Nürk N. M., Smissen R., Breitwieser I., Quandt D. & Weigend M. 2016. Pulling the sting out of nettle systematics - A comprehensive phylogeny of the genus *Urtica* L. (*Urticaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 102:9–19.
- Grosse-Veldmann B. & Weigend M. 2015. Weeding the Nettles III: Named nonsense versus named morphotypes in European *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*). *Phytotaxa* 208(4):239–260.

- Guil-Guerrero J. L., Reboloso-Fuentes M. M. & Torija Isasa M. E. 2003. Fatty acids and carotenoids from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 16(2):111–119.
- Hegi G. 1990. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- 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.
- Hughes-Fulford M., Tjandrawinata R. R., Chai Fei Li & Sayyah S. 2005. Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A2 in prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 26(9):1520–1526.
- Ilhan M., Ali Z., Khan A.I., Taştan H. & Akkol E.K., 2019. Bioactivity-guided isolation of flavonoids from *Urtica dioica* L. and their effect on endometriosis rat model. *Journal of Ethnopharmacology* 243(7).
- Jafari Z., Samani S. A. & Jafari M. 2020. Insights into the bioactive compounds and physico-chemical characteristics of the extracted oils from *Urtica dioica* and *Urtica pilulifera*. *SN Applied Sciences* 2(3):1–8.
- Jahodář L. 2012. *Farmakobotanika - Semenné rostliny*. Praha: Karolinum.
- Judd, W. S. 2016. *Plant Systematic: A Phylogenetic Approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- Kandis H., Karapolat S., Yildirim U., Saritas A., Gezer S. & Memisogullari R. 2010. Effects of *Urtica dioica* on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Clinics* 65(12):1357–1361.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtěk J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds) (2019): *Klíč ke květeně České republiky*. Ed. 2. – Praha: Academia,
- Khantzode S. S., Muddeshwar M. G., Khantzode S. D. & Dakhale G. N. 2004. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radical Research* 38(1):81–85.
- Kim C., Deng T., Chase M., Zhang D. G., Nie Z. L. & Sun H. 2015. Generic phylogeny and character evolution in Urticeae (Urticaceae) inferred from nuclear and plastid DNA regions. *Taxon* 64(1):65–78.
- Klouda P. 2003. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda.

- Kolář F., Čertner M., Suda J., Schönswetter P. & Husband B. C. 2017. Mixed-ploidy species: Progress and opportunities in polyploid research. *Trends in Plant Science* 22(12):1041–1055.
- Kříženecká S. & Synek V. 2014. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem.
- Leitch I. J. & Bennett M. D. 1997. Polyploidy in Angiosperms. *Trends in Plant Science* 2(12):470–476.
- Martínez-Aledo N., Navas-Carrillo D. & Orenes-Piñero E. 2020. Medicinal plants: Active compounds, properties and antiproliferative effects in colorectal cancer. *Phytochemistry Reviews* 19(1):123–137.
- McMahon, S. B. 1996. NGF as a Mediator of Inflammatory Pain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351(1338):431–440.
- Nováček F. 2009. *Fytochemické základy botaniky*. Olomouc: Fontána.
- Opletal L. 2016. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha: Karolinum.
- Özkol H., Musa D., Tuluce Y. & Koyuncu I. 2012. Ameliorative influence of *Urtica dioica* L against cisplatin-induced toxicity in mice bearing Ehrlich Ascites Carcinoma. *Drug and Chemical Toxicology* 35(3):251–257.
- Paiva J. 1993. *Flora Iberica: Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid: Real Jardín Botánico de Madrid.
- Patel S. S., Mahindroo N. & Udayabanu M., 2016. *Urtica Dioica* Leaves Modulates Hippocampal Smoothed-Glioma Associated Oncogene-1 Pathway and Cognitive Dysfunction in Chronically Stressed Mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 83:676–86.
- Petit Ch., Bretagnolle F. & Felber F. 1999. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology and Evolution* 14(8):306–311.
- Pignatti S. 2017. *Flora d'Italia*. Ed. 2. Roma: Edagricola.
- Pinelli P., Ieri F., Vignolini P., Bacci L., Baronti S. 7 A. Romani. 2008. Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:9127–9132.

- Pollard A. J. & Briggs D. 1982. Genecological studies of *Urtica dioica* L. I. the nature of intraspecific variation in *U. dioica*. *New Phytologist* 92(3):453–470.
- Churáček J. a kolektiv. 1990. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL.
- Ramsey J. & Schemske D. W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:467–501.
- Rejlová L., Böhmová A., Chumová Z., Hořčicová Š., Josefiová J., Schmidt P.-A., Trávníček P., Urfus T., Vít P. & Chrtek J. 2020. Disparity between morphology and genetics in *Urtica dioica* (Urticaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, in press.
- Rejlová L., Chrtek J., Trávníček P., Lučanová M., Vít P. & Urfus T. 2019. Polyploid evolution : The ultimate way to grasp the nettle. *PLoS ONE* 14(7): e0218389.
- Renner, S. S. 2014. The Relative and Absolute Frequencies of Angiosperm Sexual Systems: Dioecy, Monoecy, Gynodioecy, and an Updated Online Database. *American Journal of Botany* 101(10):1588–96.
- Rocca B., Secchiero P., Ciabattini G., Ranelletti F. O., Catani L., Guidotti L., Melloni E., Maggiano N., Zauli G. & Patrono C. 2002. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(11):7634–7639.
- Roubalová L. 2012. Průtoková cytometrie. FONS. Informační Bulletin. Česká společnost klinické biochemie. Pardubice: STAPRO, s.r.o. Laboratorní technologie, p. 5–9.
- Sarkar, F. H. 2013. *Nutraceuticals and Cancer*. USA: Taylor & Francis Group
- Sharma M. L., Singh B., Chandan B. K., Khajuria A., Kaul A., Bani S., Banerjee S. K. & Gambhir S. S. 1996. Actions of some flavonoids on specific and non-specific immune mechanisms. *Phytomedicine* 3(2):191–195.
- Simpson M. G. 2010. *Plant Systematic*. USA: Academic Press
- Šinkorová Z. & Zárbybnická L. 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. I. část. *Vojenské Zdravotnické Listy* 77(3):98–103.

- Soltis D. E. & Soltis P. S. 1999. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 14(9):348–352.
- Stebbins, G. L. 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. London: Arnold.
- Suda J. 2005. Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií? *Živa* 53(1):46–48.
- Suda J. 2009. Darwinova ‘Odporná záhada’ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? *Živa* 2009/5:204–208.
- Suda J. 2011. Průtoková Cytometrie a Její Využití v Botanice. *Evoluční aspekty biologie rostlin*. Praha: Česká botanická společnost.
- Te Beest M., Le Roux J. J., Richardson D. M., Brysting A. K., Suda J., Kubešová M. & Pyšek P. 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109(1):19–45.
- Toldy A., Stadler K., Sasvári M., Jakus J., Jung K. J., Chung H. Y., Berkes I., Nyakas C. & Radák Z. 2005. The Effect of Exercise and Nettle Supplementation on Oxidative Stress Markers in the Rat Brain. *Brain Research Bulletin* 65(6):487–93.
- Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Edmondson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. 1993. *Flora Europea*. Ed. 2. New York: Cambridge University Press.
- Upton, R., 2013, Stinging Nettles Leaf (*Urtica Dioica* L.): Extraordinary Vegetable Medicine, *Journal of Herbal Medicine* 3(1):9–38.
- Valitova, J. N., Sulkarnayeva A. G & Minibayeva F. V., 2016. Plant Sterols: Diversity, Biosynthesis, and Physiological Functions. *Biochemistry (Moscow)* 81(8):819–34
- De Vico G., Guida V. & Carella F. 2018. *Urtica dioica* (stinging nettle): A neglected plant with emerging growth promoter/immunostimulant properties for farmed fish. *Frontiers in Physiology* 9:1–5.
- Di Virgilio N., Papazoglou E.G., Jankauskiene Z., Di Lonardo S., Praczyk M., & Wielgusz K. 2015. “The Potential of Stinging Nettle (*Urtica Dioica* L.) as a Crop with Multiple Uses.” *Industrial Crops and Products* 68:42–49.
- Weigend, M., 2005. Die Erben Pokornys - Ein Beitrag Zur Abgrenzung Der

Sippen *Urtica Galeopsifolia* Und *Urtica Pubuscens* in Mittel- Und Osteuropa. Berlin.

- Weigend M. 2006. “*Urtica dioica* subsp. *cypria*, with a re-evaluation of the *U. dioica* group (Urticaceae) in Western Asia. *Willdenowia* 36:811–822.
- Wu Z. Y., Monro A. K., Milne R. I., Wang H., Yi T.S., Liu J. & Li D. Z.. 2013. Molecular Phylogeny of the Nettle Family (Urticaceae) Inferred from Multiple Loci of Three Genomes and Extensive Generic Sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(3):814–27.