

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Botanika
Studijní obor: Cévnaté rostliny



Bc. Barbora Schmiedlová

Vliv polyploidie na sekundární metabolity v agregátu *Urtica dioica*

Impact of polyploidy on secondary metabolites in *Urtica dioica* agg.

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jindřich Chrtěk, CSc.

Praha, 2024

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 dne: 12.12.2024

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména mému školiteli Tomášovi Urfusovi a mému konzultantovi Jindřichovi Chrtkovi za trpělivost, velikou podporu, cenné rady, ochotu a v neposlední řadě za pomoc se sběrem rostlinného materiálu. Za poskytnutí rostlinného materiálu z předchozích studií děkuji též Ludmile Rejlové a Michaele Pekařové. Také bych chtěla poděkovat Pavlovi Trávníčkovi, Kristýně Šemberové a ostatním za pomoc s měřením v cytometrické laboratoři, ochotu a milý přístup. Dále děkuji Ladislavě Paštové a ostatním za pomoc s prací v cytogenetické laboratoři a projevenou vstřícnost. Také chci moc poděkovat zahradníkům Miroslavovi Chmelařovi a Davidovi Cmíralovi za důslednou péči o sesbírané rostliny. Mé velké díky patří specializované skupině Tomáše Pluskala z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, zvláště Laně Mutabdžija, za vstřícnou pomoc s přípravou, zpracováním a analýzou rostlinných vzorků. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, za trpělivost a podporu.

Abstrakt

O vlivu polyploidie na celou řadu biologických vlastností rostlin vzniklo již velké množství prací, nicméně stále se neví mnoho o jejím vlivu na obsah sekundárních metabolitů. K objasnění této problematiky byl vybrán intenzivně chemicky studovaný okruh *Urtica dioica*, který je zároveň polyploidním komplexem, zahrnujícím hojně rozšířený tetraploidní poddruh *U. dioica* subsp. *dioica* a několik diploidních poddruhů s menšími a často vikariantními areály (*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica*), a příbuzný druh *U. atrovirens*, sloužící zde jako „outgroup“. Práce byla doplněna o kontrolu v podobě syntetických tetraploidů. Cílem diplomové práce bylo také přispět k objasnění stále nedořešené fylogeneze tohoto agregátu.

Ke zjištění vlivu samotné polyploidie na obsah sekundárních metabolitů v rostlinách byli z diploidních rostlin *U. dioica* subsp. *subinermis* vytvořeni pomocí kolchicinu syntetičtí neotetraploidí. Obsah metabolitů v listech 83 rostlin *Urtica dioica* agg., včetně neotetraploidů, byl analyzován prostřednictvím kombinované metody kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC–MS).

Vliv polyploidie na obsah sekundárních metabolitů byl potvrzen na úrovni syntetických neotetraploidů v rámci odlišení skupiny diploidních rostlin rodičovské generace *U. dioica* subsp. *subinermis* od neotetraploidů. Vliv polyploidie na úrovni přirozené variability tetraploidního cytotypu spolehlivě potvrzen nebyl, ačkoliv náznak odlišení mezi diploidními a tetraploidními rostlinami pozorovatelný v rámci analýz byl.

Výsledky této práce také naznačují, že taxony zahrnuté do hlavní sesterské skupiny (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica*) okruhu *U. dioica* agg. jsou si zjevně blíže příbuzné, neboť ani na metabolomické úrovni se je mezi sebou nepodařilo nijak významně odlišit. Jelikož dosavadní fylogenetické studie, včetně této metabolomické, naznačují, že současný taxonomický koncept neodpovídá reálné struktuře tohoto široce pojatého agregátu, je pravděpodobné, že by měl být znovu revidován.

Klíčová slova: *Urtica dioica*, *Urtica dioica* agg., polyploidie, sekundární metabolity, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, LC–MS, syntetická kontrola, kolchicin, průtoková cytometrie

Abstract

A large number of papers have been published on the effect of polyploidy on a wide range of biological traits of plants, but still not much is known about its effect on the content of secondary metabolites. To elucidate this issue, the intensively chemically studied *Urtica dioica* agg. was selected. It is also a polyploid complex including the widely distributed tetraploid subspecies *U. dioica* subsp. *dioica* and several diploid subspecies with smaller and often vicariant ranges (*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens* and *U. dioica* subsp. *kurdistanica*), and the closely related species *U. atrovirens*, serving here as an "outgroup". The work was supplemented with a control in the form of synthetic tetraploids. The thesis also aimed to contribute to the still unresolved evolutionary relationships in this aggregate.

To detect the effect of polyploidy on the content of secondary metabolites in plants, synthetic neotetraploids were generated from diploid *U. dioica* subsp. *subinermis* plants using colchicine. The content of metabolites in the leaves of 83 *Urtica dioica* agg. plants, including neotetraploids, was analysed by a combined liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method.

The effect of polyploidy on the content of secondary metabolites was confirmed at the level of synthetic neotetraploids in the context of differentiating a group of diploid plants of the parental generation of *U. dioica* subsp. *subinermis* from neotetraploids. The effect of polyploidy at the level of natural variation in tetraploid cytotype was not reliably confirmed, although a hint of differentiation between diploid and tetraploid plants was observable in the analyses.

The results of this work also suggest that the taxa included in the main sister group (i.e. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* and *U. dioica* subsp. *dioica*) of the *U. dioica* agg. are apparently closely related to each other, as they could not be significantly distinguished from each other even at the metabolomic level. Since the recent phylogenetic studies, including this metabolomic one, suggest that the current taxonomic concept does not correspond to the real structure of this broadly defined aggregate, it is likely that this concept should perhaps be revised again.

Key words: *Urtica dioica*, *Urtica dioica* agg., *polyploidy*, *secondary metabolites*, *liquid chromatography*, *mass spectrometry*, *LC-MS*, *synthetic control*, *colchicine*, *flow cytometry*

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	1
2. Úvod	2
3. Polyploidie	3
3.1. Obecné a biologické vlastnosti polyploidů	3
3.2. Fyziologické vlastnosti polyploidů	5
4. <i>Urtica dioica</i> agg.	9
4.1. <i>Urtica</i>	9
4.2. <i>Urtica dioica</i> agg.	10
5. Metodika	13
5.1. Sběry a rostlinný materiál	13
5.2. Průtoková cytometrie	16
5.3. Příprava syntetických polyploidů	17
5.4. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC–MS)	20
5.4.1. Příprava vzorků	20
5.4.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	21
5.4.3. Zpracování dat	22
6. Výsledky	26
6.1. Průtoková cytometrie	26
6.2. Příprava syntetických polyploidů	28
6.3. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC–MS)	29
6.3.1. Analýza hlavních komponent (PCA)	29
6.3.2. Diskriminační analýza	36
7. Diskuze	46
7.1. Úvod k diskuzi	46
7.2. Synteticky vytvořený tetraploidní cytotyp	46
7.3. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC–MS)	49
7.4. <i>Urtica dioica</i> agg.	52
7.5. Budoucí směry	53
8. Závěr	54
9. Seznam použité literatury	55
10. Příloha	66

1. Seznam použitých zkratk

DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol, β -mercaptoethanol
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LDA	Lineární diskriminační analýza
MeOH	Methanol
OTTO I	0,1M monohydrát kyseliny citronové a 0,5 % Tween 20
OTTO II	0,4 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
PCA	Analýza hlavních komponent

2. Úvod

Polyploidie je dlouhodobě intenzivně studovaným tématem. Je považována za jednu z nejdůležitějších evolučních sil u krytosemenných rostlin (např. Soltis *et al.*, 2015; Čertner *et al.*, 2017) a její vliv na celou řadu biologických vlastností rostlin je dobře prozkoumán. Polyploidi mají typicky větší buňky než jejich diploidní předci a díky tomu jsou často celkově mohutnější (Müntzing, 1936). Mají pomalejší metabolismus a rostou pomaleji (Cavalier-Smith, 1978). Ve srovnání s diploidy je u polyploidů častější autogamie, v některých čeledích i apomixe (agamospermie; Comai, 2005). Předpokládá se také, že jsou odolnější vůči abiotickému stresu. Celkově jsou polyploidi lepšími kolonizátory, a jsou proto také často invazní (te Beest *et al.*, 2012; Baduel *et al.*, 2018). Také byl prokázán vliv polyploidie na fyziologické vlastnosti rostlin, jako například na respiraci, hormonální změny či změny v aktivitě enzymů (te Beest *et al.*, 2012; Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020). Překvapivě však stále nebyl s jistotou prokázán vliv polyploidie na obsah sekundárních metabolitů u rostlin (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020).

Předpokládá se, že by polyploidie mohla navýšit množství (vliv polyploidie na genovou expresi a enzymatickou činnost) či dokonce dát vzniknout zcela novým strukturám sekundárních metabolitů v rostlinách (neofunkcionalizace, subfunkcionalizace) (Lavania *et al.*, 2012; Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020; Lichman, Godden & Buell, 2020). O vlivu polyploidie na obsah sekundárních metabolitů byla již napsána celá řada prací, většina se však soustředila na synteticky vytvořené a kulturní rostliny. Obecně se dá říct, že v laboratorních podmínkách opravdu polyploidie často navyšuje množství sekundárních metabolitů v rostlině, ačkoliv je nutné zmínit určitou metabolitovou specifikou – navyšují se typicky jen určité skupiny metabolitů a jiné se snižují (Caruso *et al.*, 2011; Parida & Misra, 2015; Vergara, Kikuchi & Breuer, 2016; Homaidan Shmeit *et al.*, 2020). O volně rostoucích rostlinách vzniklo na toto téma méně studií a jejich výsledky jsou poměrně nejednoznačné (existují jak názory, že polyploidie navyšuje množství sekundárních metabolitů v rostlině, tak i opačně – snižuje) a nelze proto s jistotou potvrdit vliv polyploidie na sekundární metabolity (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020).

Proto byl k objasnění těchto nejasností vybrán jako ideální model okruh kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica* agg.). Tato volně a téměř všude se vyskytující skupina žahavých nitrofilních rostlin je známým polyploidním komplexem zahrnujícím převažující (auto)tetraploidní poddruh *U. dioica* subsp. *dioica* a několik vzácnějších blízkce příbuzných diploidních poddruhů (*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*) (Rejlová *et al.*, 2019). Ty se kromě morfologických znaků liší i svými geografickými areály (Weigend, 2005). Do agregátu se na základě některých fylogenezí (Henning *et al.*, 2014; Grosse-Veldmann *et al.*, 2016; Rejlová *et al.*, 2019) také řadí blízkce příbuzné druhy, jako *U. atrovirens* či *U. kioviensis*. Fylogeneze této početné skupiny je však stále nedořešená a existují proto různé názory, které taxony do agregátu zařadit (Rejlová *et al.*, 2021). Zástupci *U. dioica* agg. navíc obsahují širokou škálu sekundárních metabolitů a jedná se proto o intenzivně chemicky studovanou skupinu. Díky svým léčivým účinkům, přisuzovaným zejména fenolickým látkám (flavonoidy, fenolové kyseliny aj.) je *U. dioica* využívána zejména ve farmacii či medicíně (Upton, 2013; Rajput, Chaudhary & Sharma, 2018). Navzdory velkému množství studií zabývajících se sekundárními metabolity stále překvapivě neexistuje mnoho

informací o vlivu polyploidie na obsah těchto látek. Navíc by studium metabolitů mohlo chemotaxonomicky přispět k objasnění příbuzenských vztahů v agregátu.

3. Polyploidie

3.1. Obecné a biologické vlastnosti polyploidů

Polyploidie, jako výsledek celogenomové multiplikace, je považována za jednu z nejdůležitějších evolučních sil, které přispěly k diverzifikaci kvetoucích rostlin (např. Soltis *et al.*, 2015; Čertner *et al.*, 2017). Odhaduje se, že 30 až 70 % krytosemenných rostlin prošlo celogenomovou duplikací (Soltis *et al.*, 2015; Baduel *et al.*, 2018). Někteří autoři se domnívají, že paleopolyploidizací prošly téměř všechny krytosemenné rostliny (např. Jiao *et al.*, 2011; Wendel, 2015; Heslop-Harrison, Schwarzacher & Liu, 2023).

Dlouho se předpokládalo, že v přírodě převažují alopolyloidní druhy, tedy druhy, které jsou výsledkem hybridizace dvou nebo více genomů různých druhů a následné polyploidizace, a autopolyploidních druhů, vzniklých pomnožením jednoho genomu nebo genomů téhož druhu, je méně (Soltis & Soltis, 2000; Osborn *et al.*, 2003). Nicméně dnes se přistupuje k názoru, že oba typy polyploidie jsou víceméně rovnoměrně zastoupené (Barker *et al.*, 2016). Kromě složení genomu se autopolyploidie a alopolyloidie odlišují také typem dědičnosti. Alopolyloidie mají disomickou dědičnost, zatímco autopolyploidie multisomickou (Ramsey & Schemske, 2002).

Navzdory vysoké míře polyploidizace u kvetoucích rostlin, není vznik a zejména etablování polyploidů v populaci zdaleka jednoduchý proces. Polyploidie vznikají v přírodních populacích nejčastěji prostřednictvím neredukovaných gamet (Parisod, Holderegger & Brochmann, 2010). Vznik neredukované gamety je ovlivněn geneticky, ale může být často i výsledkem abiotického stresu (např. klimatické výkyvy, poranění rostliny) (Bretagnolle & Thompson, 1995). Neredukované gamety se buď spojují s redukovanými, čímž vzniká triploidní potomstvo (tzv. triploidní most), nebo s jinými neredukovanými gametami, čímž vznikají tetraploidní embrya (Schinkel *et al.*, 2017). Teoreticky může polyploid vzniknout i po oplození, tzv. somatickou polyploidizací, která je často opět způsobena abiotickým stresem (Plomion *et al.*, 2018; Schoen & Schultz, 2019). Spíše než u přírodních populací, dochází k somatické polyploidizaci uměle, v laboratorních podmínkách (týká se především okrasných a užitkových rostlin) (Hahn, Bai & Asiedu, 1992; Dhooghe *et al.*, 2011) (viz dále – tvorba syntetických polyploidů).

Změny organizace a funkce genomu na genetické i epigenetické úrovni doprovázející vznik polyploida způsobují zprvu nestabilitu, která může být pro rostlinu obtížně překonatelná (Comai, 2005). Výsledkem neúspěchu pak může být snížená životaschopnost nebo sterilita nově vzniklých jedinců. O tomto fenoménu hovoříme také jako o triploidním bloku (Marks, 1966). V souvislosti s polyploidizací však často dochází i k tzv. heteroznímu efektu (heteroze), kdy zkřížením dvou druhů naopak vzniká jedinec s vyšší fitness než jeho rodiče (Shull, 1948).

Aby byl nový cytotyp schopný evoluce, musí se také úspěšně etablovat. Pravděpodobnost, že se nový polyploid úspěšně usadí v místě svého původu je obecně velmi nízká (Van De Peer,

Mizrachi & Marchal, 2017). Zda toho bude polyploid schopný, záleží na jeho životaschopnosti, plodnosti, fenotypových vlastnostech a zdatnosti v různých prostředích (Ramsey & Schemske, 2002). Obecně se u nově vzniklých polyploidů očekává nevýhoda při rozmnožování, jelikož jsou v populaci relativně vzácní (Husband, 2000). Levin (1975) tento typ nevýhody závislé na frekvenci popsal jako vyloučení minoritního cytotypu. Nicméně polyploidi dokážou díky zvýšené genetické variabilitě, plasticitě a heterozii tuto překážku obejít pomocí morfologických, fyziologických i ekologických změn (Comai, 2005; Soltis *et al.*, 2015). Například divergence ve vlastnostech atraktivních pro opylovače nebo jiná doba kvetení může vést k úspěšnému opylení, navzdory tomu, že jde o minoritní cytotyp (Soltis *et al.*, 2015; Van De Peer, Mizrachi & Marchal, 2017). Také vyvinutí nových rozmnožovacích strategií může přinést selektivní výhody novému polyploidnímu jedinci (Comai, 2005; Van De Peer, Mizrachi & Marchal, 2017). Zejména schopnost autogamie je výhodná strategie v prostředí, kde je málo partnerů (Xu, 2023) a polyploidi ji hojně využívají, protože jsou schopni překonat inbrední depresi díky nadbytečnosti genů a vyšší míře heterozygotnosti (Osborn *et al.*, 2003; Comai, 2005). To je výhodné jak k etablování se, tak k zakládání nových populací. Také asexuální rozmnožování (vegetativní rozmnožování např. pomocí nadzemních nebo podzemních výběžků nebo cibulek; agamospermie) je u polyploidů častá strategie stabilizace a případného rozšiřování areálu (Comai, 2005; te Beest *et al.*, 2012; Baduel *et al.*, 2018).

Jakmile se nový polyploid úspěšně etabluje, může využívat celou řadu výhod, díky kterým je potom často úspěšný v evoluci. Bylo dokázáno, že polyploidi mohou mít výhodnější vlastnosti než jejich diploidní rodiče (te Beest *et al.*, 2012). Díky znásobenému počtu chromozomů mají polyploidi typicky větší jádra buněk a tím pádem i větší buňky celé (Müntzing, 1936; Comai, 2005). To může vést ke zpomalení metabolismu a rychlosti růstu (Cavalier-Smith, 1978), ale také to může pozitivně ovlivnit velikost rostliny, včetně jejích orgánů. Polyploidní rostliny jsou obecně často robustnější, vyšší a mají celkově větší množství biomasy oproti diploidům (Müntzing, 1936; Kim *et al.*, 2012). Nicméně existuje optimum pro nárůst chromozomů, po jehož překročení se jedinec stává méně vitálním, pokud je vůbec životaschopný (Müntzing, 1936). Například Baack a Stanton (2005) nepozorovali výrazné rozdíly mezi velikostí diploidů a tetraploidů *Ranunculus adoneus*. Obecně, větší rostlinné orgány a tělo mohou být pro polyploida kompetiční výhodou. Zejména v raných fázích kolonizace může být velmi užitečný rychlý nárůst biomasy zajištěný obvykle větší velikostí semen polyploidů (Bretagnolle, Thompson & Lumaret, 1995; te Beest *et al.*, 2012). Robustnější a celkově větší polyploidní rostliny mohou mít výhodu oproti drobnějším diploidům posléze v dalších fázích osidlování a to zejména v kompetici o světlo, živiny a prostor (te Beest *et al.*, 2012). Například u polyploidních rostlin rodu *Fallopia* je jejich invazní úspěch připisován ohromnému množství biomasy, velikosti těla a většímu dosahu rhizomů (Schnitzler & Muller, 1998). Výhodou je často také vytrvalá životní forma, která u polyploidů převažuje a pomáhá tak udržet populaci (Müntzing, 1936). Předpokládá se, že polyploidi mohou být také odolnější vůči patogenům (Kulkarni & Ravindra, 1988; Oswald & Nuismer, 2007) či abiotickému stresu, jako je například sucho nebo chlad (Liu *et al.*, 2011; te Beest *et al.*, 2012). Díky mnohým výhodám jsou polyploidi často lepšími kolonizátory než diploidi a mnohdy osidlují také větší území (Pandit, Pockock & Kunin, 2011; te Beest *et al.*, 2012). Obvykle se vyskytují v oblastech větších nadmořských výšek a zeměpisných šířek (Grant, 1981), což bývá připisováno především jejich lepším kolonizačním schopnostem postglaciálních území v porovnání s diploidy (Brochmann *et al.*, 2004; te Beest *et al.*, 2012). V současné době se však může výskyt polyploidů ve velké míře vázat na antropogenní činnost, kdy nové prostory k osídlení člověk vytváří například

odlesňováním (Papp, 1987). Díky mnohým vlastnostem, jako je například rychlá adaptace na nové niky, větší fenotypová plasticita či mnohdy větší biomasa se polyploidie také často stávají invazními druhy (Comai, 2005; te Beest *et al.*, 2012; Baduel *et al.*, 2018). Příkladem může být tetraploidní druh *Solidago gigantea*, který byl zavlečen do Evropy a východní Asie a stal se zde silně invazní (Schlaepfer *et al.*, 2008).

Doposud bylo psáno o stabilizovaných přirozených polyploidech. Nicméně slabinou výše uvedených vlastností může být, že není jasné, do jaké míry jsou tyto odlišné vlastnosti vázány přímo na polyploidii, anebo na nějaké další vlastnosti, které vznikly postupem času adaptacemi polyploidů – tzv. diploidizací. Procesem diploidizace dochází u polyploidů postupně ke změnám na úrovni genomu, jako je například utišování genů, ztráta duplikovaných genů a chromozomů nebo změny párování chromozomů (Wolfe, 2001; Soltis *et al.*, 2015). Z polyploidního genomu tak časem vzniká funkčně opět diploidní genom (Mandáková & Lysak, 2018). Z tohoto důvodu se často, především v posledních ca 15 letech, přistupuje k vytvoření syntetických polyploidů, což nám umožní srovnání s přirozenými polyploidy (Pavlíková, Paštová & Münzbergová, 2017). K vytvoření syntetického polyploidního jedince se přistupuje postembryonálně, většinou pomocí mitotického jedu kolchicinu (Blakeslee, 1941; Münzbergová, 2017) nebo jeho alternativy – herbicidu oryzalinu (Wan *et al.*, 1991; Homaidan Shmeit *et al.*, 2020). Tyto látky se vážou na mikrotubuly dělicího vřeténka, a tak narušují správný rozchod chromozomů při mitóze. Z původně diploidní rostliny tak vznikne polyploidní jedinec (Castro, Castro & Loureiro, 2018). Tato metoda má však řadu úskalí, například v podobě aneuploidie, a její úspěšnost je často velmi malá (Pavlíková, Paštová & Münzbergová, 2017).

Polyploidie může mít také vliv na fyziologii rostlin a je diskutována i vazba na obsah sekundárních metabolitů.

3.2. Fyziologické vlastnosti polyploidů

Rostliny obsahují ve svém těle nepřeberné množství chemických látek. Tyto látky se podle původu vzniku v metabolických procesech (fotosyntéza, respirace aj.) dají rozdělit na primární a sekundární (Nováček, 1986). Jelikož je ale sekundární i primární metabolismus těsně spjatý, nelze mezi těmito dvěma skupinami látek vést ostrou hranici (Luštinec & Žárský, 2003).

Soubor primárních metabolitů se běžně vyskytuje ve většině rostlinných druhů (Dixon & Dickinson, 2024) a jsou životně důležité pro růst a vývoj rostlin (Erb & Kliebenstein, 2020). Řadí se sem zejména sacharidy, dále například bílkoviny, lipidy, vitamíny, nukleotidy nebo aminokyseliny (Nováček, 1986; Goyal *et al.*, 2019). Z metabolismu některých primárních metabolitů, jako jsou aminokyseliny, acetylkoenzym A, mevalonová kyselina a meziproducty biosyntézy šikimové kyseliny, vznikají jako terminální produkt sekundární metabolity. U některých z těchto specializovaných látek (např. alkaloidy) biogeneze postupuje oběma cestami (Jahodář, 2022).

Na rozdíl od primárních metabolitů, sekundární nebo také specializované metabolity jsou specifické jen pro určité rostliny, respektive taxony (Dixon & Dickinson, 2024) a jelikož je jejich výskyt vázán zejména na vyšší diferenciaci pletiv (žlaznaté trichomy, mléčnice aj.),

najdeme je především u vyšších rostlin (*Embryophyta*). U daného taxonu obecně platí, že v něm dominuje jedna skupina chemicky příbuzných látek a ostatní sloučeniny jsou zastoupeny minoritně (Jahodář, 2022). Taxonomicky specifické metabolity byly využívány v chemotaxonomii (zejm. 60–80. léta minulého století; Venkataraman, 1972). Později bylo však od tohoto směru upuštěno, protože bylo zjištěno, že na obsah těchto látek v těle rostliny má vliv její ontogeneze, typ orgánu i podmínky vnějšího prostředí – sekundární metabolity se evolučně neustále vyvíjejí (vliv selekce, adaptace) a není proto možné je spolehlivě využívat jako důležitý systematický znak (skupiny některých metabolitů se mohou vyskytovat ve vícero taxonech) (Jahodář, 2022). V současnosti (posledních ca 20 let) se taxonomické specifiky sekundárních metabolitů opět začíná využívat, ale výzkum je oproti první éře chemotaxonomie obohacen o genomické znalosti s vazbou na další metody (např. průtokovou cytometrii; Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020).

Sekundární metabolity, navzdory svému názvu, tvoří pro rostlinu z fyziologického hlediska skupinu velmi důležitých látek (tj. druhotné biosynteticky, nikoliv významem). Fytohormony, purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin, porfyriny, koenzymy nebo třeba lignin jsou pro rostlinný organismus dokonce životně důležité (Nováček, 1986). Funkce specializovaných metabolitů je většinou obranná (abiotický stres; flavonoidy aj.) a/nebo signální (atraktanty pro opylovače; karotenoidy aj.) (Jahodář, 2022; Dixon & Dickinson, 2024). U některých metabolitů jejich funkce spočívá pouze v odlehčení syntetických cest rostlin (odpadní produkt; silice aj.). Často však úloha sekundárních metabolitů není známá (Nováček, 1986). Sekundární metabolity se mohou v těle rostliny vyskytovat v aktivní formě, ale také ve formě pasivní, kdy k jejich aktivaci dochází až po nějaké formě abiotického stresu (např. poranění, infekce). Někdy dochází vlivem napadení patogeny k vytvoření zcela nových látek - tzv. fytoalexiny (Jahodář, 2022). Převážně se jedná o fenolické látky (fenylpropanoidy a flavonoidy), popřípadě isoprenoidy (Luštinec & Žárský, 2003). Sekundární metabolity tvoří celá řada různorodých látek a mnohé z nich jsou člověkem hojně využívané, zejména ve farmacii (Jahodář, 2022). Mezi hlavní skupiny obsahující specializované metabolity patří: terpenoidy (isoprenoidy), fenolické látky a alkaloidy (Luštinec & Žárský, 2003).

Terpenoidy neboli isoprenoidy tvoří rozsáhlou skupinu rostlinných látek, obecně charakterizovanou rozpustností v tucích (Harborne, 1998). Podle počtu isoprenových jednotek je lze rozdělit na sedm skupin: hemiterpeny (isopren, geranylpyrofosfát aj.), monoterpeny (eterické oleje - silice a těkavé vonné látky), seskviterpeny (eterické oleje, kyselina abscisová), diterpeny (pryskyřice, gibbereliny, fytol), triterpeny (steroidy, saponiny), tetraterpeny (karotenoidy) a polyterpeny (kaučuk) (Nováček, 1986; Luštinec & Žárský, 2003). Tato skupina metabolitů má různé fyziologické funkce, slouží například jako ochrana fotosyntetického aparátu před přehřátím (isopren) nebo jako růstové regulátory (gibbereliny). Jejich uplatnění je například v potravinářství (aromatické látky), zdravotnictví (vitaminy A, D, E) nebo třeba v zemědělství (přírodní insekticidy) (Harborne, 1998; Luštinec & Žárský, 2003).

Fenolické látky neboli polyfenoly, početnou skupinu chemických sloučenin obvykle rozpustných ve vodě (Harborne, 1998; Brahmachari, 2019), lze dělit na čtyři hlavní skupiny: jednoduché fenoly (hydrochinon, pyrokatechin aj.), fenolkarboxylové kyseliny (pyrokatechová, galová kyselina, polymery kyseliny galové tj. třísloviny), fenylpropanoidy (kumarin, lignin aj.) a flavonoidy (flavany, flavonoly a anthokyany) (Nováček, 1986; Luštinec & Žárský, 2003). Fenolické látky jsou z hlediska fyziologické funkce pro rostlinu velmi významné. Slouží například jako ochrana před UV zářením (flavonoidy), jako atraktanty pro

opylovače (flavonoidy) či jako důležitá stavební látka rostlin (lignin) (Luštinec & Žárský, 2003; Dixon & Dickinson, 2024). Využívají se například v potravinářském průmyslu kvůli svým antioxidačním vlastnostem (Balasundram, Sundram & Samman, 2006).

A třetí skupinou jsou alkaloidy, látky zásaditého charakteru (dusíkaté sloučeniny), často silně jedovaté. Mohou se vyskytovat volně, ale většinou jsou součástí solí a jsou pak snadno rozpustné ve vodě. K významným skupinám alkaloidů patří: fenylalkylaminy (kapsaicin, kolchicin aj.), pyridinové a piperidinové (nikotin, piperin aj.), tropanové (atropin, kokain aj.), chinolové a isochinolové (morfin, papaverin aj.), indolové (psilocybin, strychnin aj.) a purinové alkaloidy (kofein, theobromin aj.) (Nováček, 1986). Ačkoliv je tato skupina chemických látek v říši rostlin velmi rozšířená (zejména u dvouděložných bylin), její fyziologická funkce není příliš známá. Předpokládá se, že jsou odpadním produktem metabolismu jiných látek, avšak některé metabolity zřejmě pomáhají také chránit rostlinu před okusem býložravců (velmi hořká chuť). Vykazují silné účinky na lidskou nervovou soustavu a využívají se proto v medicíně (morfin, kodein) nebo třeba také v potravinářství (kofein, theobromin) (; Nováček, 1986; Luštinec & Žárský, 2003).

Je prokázáno, že polyploidie může mít vliv na fyziologii a ekologické interakce rostlin (te Beest *et al.*, 2012; Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020). Řada morfologických změn vzniklých celogenomovou duplikací, zejména typicky větší velikost polyploidních buněk ovlivňuje různé fyziologické vlastnosti rostliny, které jí pak odlišují od jejích diploidních příbuzných a způsobuje též mezi cytotypy ekologickou diferenciaci (te Beest *et al.*, 2012). Například typicky větší průduchy zajišťují polyploidům nižší ztráty vody při respiraci a tak vyšší odolnost vůči suchu (Li, Berlyn & Ashton, 1996). Vlivem polyploidizace může také dojít k hormonálním změnám či jiné aktivitě enzymů. Bylo zjištěno, že některé polyploidní rostliny (např. *Brassica oleracea* var. *capitata*) mají nižší hladinu růstového hormonu auxinu, což může přispívat k pomalejšímu růstu typickému pro polyploidy v porovnání s jejich diploidními příbuznými (Avery & Pottorf, 1945). To může vést například k odlišné době kvetení, tj. posunuté fenologii, mezi diploidy a polyploidy v populaci či jiné ekologické diferenciaci (Gross & Schiestl, 2015). Pozměněná enzymatická aktivita může vést u polyploidů k dalším morfologickým změnám (Lavana *et al.*, 2012) a vytváření tak nových fenotypů, například atraktivnějších pro opylovače (Mccarthy *et al.*, 2015). Diskutuje se také o vazbě polyploidie na obsah sekundárních chemických látek v rostlině. Větší množství specializovaných metabolitů by mohlo přispět k vyšší odolnosti vůči abiotickému stresu (patogeny, okus býložravci aj.) často pozorované u polyploidů, a poskytnout tak výhodu v řadě ekologických interakcí (Münzbergová, 2006; Segraves & Anneberg, 2016; Van De Peer, Mizrachi & Marchal, 2017).

Předpokládá se, že by polyploidie mohla vést k navýšení koncentrace důležitých specializovaných metabolitů či dokonce ke vzniku zcela nových chemických struktur. Duplikace genů nabízí polyploidním rostlinám možnost zvýšené metabolické aktivity či exprese genů a tím pádem zvýšené koncentrace sekundárních metabolitů v pletivech a orgánech (Lavana *et al.*, 2012). Některé skupiny duplikovaných genů jsou navíc v organismu prioritně zadržovány a nejsou tak vystaveny přirozeným evolučním očišťovacím procesům genomu (ztráta či utišení genů; tzv. diploidizace), pokud se účastní některých důležitých biosyntetických cest (např. jimi vznikají primární metabolity, nebo specializované chemické látky chránící rostlinu před abiotickým stresem). Toto zadržování důležitých genů není náhodný jev, nýbrž jde o zaběhnuté mechanismy, které lze pozorovat u krytosemenných rostlin opakovaně (Li *et al.*, 2016; Geiser *et al.*, 2016). V důsledku polyploidie může dojít také k jinému využití

biosyntetických cest, a dokonce i k ovlivnění činnosti samotných enzymů, které vedou k tvorbě sekundárních metabolitů. Koncentrace chemických látek tak může být v organismu navýšena anebo snížena, podle typu biosyntetického produktu. Kromě navýšení koncentrace sekundárních metabolitů by mohla polyploidie mít vliv i na vznik zcela nových či strukturně jiných látek (oproti diploidnímu předkovi) a to buď v důsledku neofunkcionalizace (kopie genů získají novou funkci) nebo subfunkcionalizace (kopie genů ztratí funkci a vrací se do předchozí funkce) (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020; Lichman, Godden & Buell, 2020). Například u čeledi *Brassicaceae* je zvýšená diverzita specializovaných metabolitů spojována s celogenomovou duplikací (Edger *et al.*, 2015).

Na téma vlivu polyploidie na obsah sekundárních metabolitů v rostlinách vznikla již celá řada prací, zejména zaměřených na pěstované rostliny včetně synteticky vytvořených polyploidů (te Beest *et al.*, 2012). Populacemi vyskytujícími se volně v přírodě se zatím tolik studií nezabývalo (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020), přestože se sekundární metabolity podílí na řadě důležitých ekologických interakcí rostlin (Jahodář, 2022).

U volných populací rostlin nebyl pozorován konzistentní vliv celogenomové duplikace na koncentrace nebo profily specializovaných metabolitů (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020). U některých rostlinných populací polyploidie navyšuje množství (jen některých nebo všech) sekundárních metabolitů, jako je tomu například u rodu *Rumex* (Jeelani *et al.*, 2017) nebo u některých zástupců čeledi *Orchidaceae* (Gross & Schiestl, 2015), ale existují i případy, kde s nárůstem polyploidie klesá množství metabolitů (jen některých nebo všech), což je pozorovatelné například u rodu *Fagopyrum* (Liu, Zeller & Chen, 2013) nebo u *Phragmites australis* (Meyerson *et al.*, 2016). Polyploidie může mít také efekt na diverzitu specializovaných metabolitů (jen některých nebo všech), jsou známy případy, kdy polyploidní rostliny měly některé sekundární metabolity navíc oproti jejich diploidním předkům (Mccarthy *et al.*, 2017; Vergara *et al.*, 2017). Nicméně existují i případy, kdy polyploidie mají naopak nižší diverzitu těchto látek (jen některých nebo všech) a diploidie vyšší. Také existují studie, kdy nebyl pozorován žádný rozdíl v obsahu sekundárních metabolitů, kvantitativní ani kvalitativní mezi polyploidy a diploidy (ploidy neměla vliv na obsah těchto látek) (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020).

Někteří autoři také zmiňují efekt polyploidie na obsah sekundárních metabolitů v závislosti, zda jde o autopolyploidii nebo alopolyploidii. U autopolyploidů bylo pozorováno navýšení koncentrace těchto látek, pravděpodobně v důsledku navýšení dávky genů (Lavania *et al.*, 2012), zatímco u alopolyploidů se předpokládá, že kombinace biosyntetických komplementů ze dvou rodičovských druhů zvyšuje variabilitu specializovaných metabolitů (Parida & Misra, 2015).

Samostatnou kapitolou je srovnávání se synteticky vytvořenými polyploidy kultivovaných rostlin. Autopolyploidie se běžně uměle navozuje u mnohých kultivovaných a užitkových rostlin, často právě za účelem navýšení koncentrace prospěšných látek (Gantait & Mukherjee, 2021; Neenu M. G., Aswathi A., Prasath D. 2024). Nicméně tento nárůst je látkově specifický, často se jedná jen o určité látky z některých skupin metabolitů, jako jsou například terpenoidy, alkaloidy či produkty fenylypropanoidů (včetně flavonoidů) (Parida & Misra, 2015). Například u *Solanum commersonii*, byl obecně výrazně vyšší obsah fenylypropanoidů u uměle vytvořených tetraploidů (prostřednictvím oryzalinu) než u diploidů. Minoritní glykoalkaloidy sice také převažovaly u autotetraploidů, ale majoritní glykoalkaloidy naopak ukazovaly vyšší

koncentrace u diploidních předků. Kvalitativní vliv zde zjištěn nebyl (Caruso *et al.*, 2011). Podobně, i další studie ukazují látkově specifický vliv na obsah sekundárních metabolitů – např. u *Arabidopsis thaliana* (Vergara, Kikuchi & Breuer, 2016) nebo u *Thymus vulgaris* (Homaidan Shmeit *et al.*, 2020).

Zvýšené koncentrace specializovaných metabolitů mohou být pro šlechtitele žádoucí kvůli lepším fenotypovým vlastnostem, a proto jsou nepřímo selektovány. Ve volně žijících populacích však může plošné zvýšení sekundárních metabolitů být pro rostlinu energeticky příliš nákladné a je proto po generaci selektováno proti (Gaynor, Lim-Hing & Mason, 2020).

Druhem, který je intenzivně studovaný na úrovni sekundárních metabolitů (Gautam, Datta & Baldi, 2019; Merah, Djazouli & Zebib, 2021; Semwal *et al.*, 2023), v přírodě volně rostoucím a současně se o něm dobře ví, že je polyploidním komplexem je *Urtica dioica*.

4. *Urtica dioica* agg.

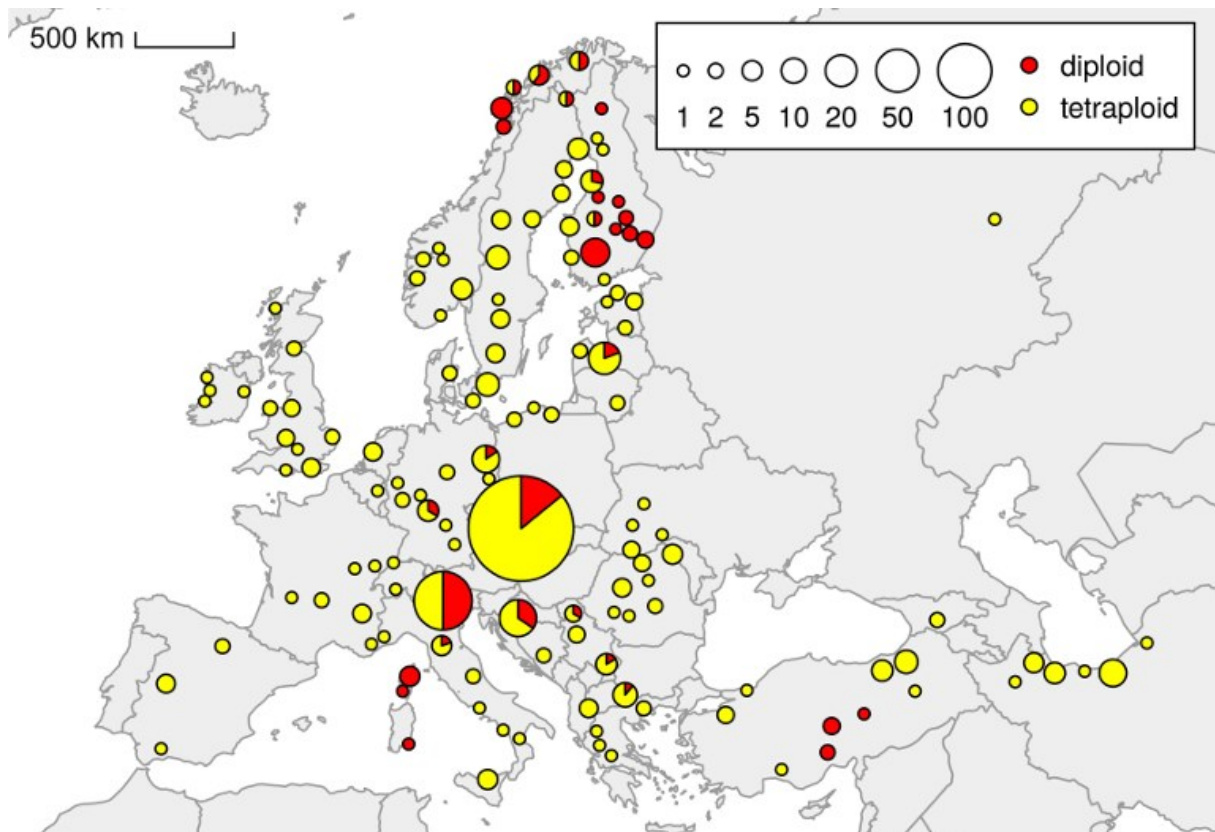
4.1. *Urtica*

Rod *Urtica* L. (*Urticaceae*) zahrnuje velké množství (Grosse-Veldmann *et al.*, 2016) bylinných druhů a jak název vypovídá (z latiny *urere* - pálit), je pro ně typická přítomnost žahavých trichomů. Trichomy jsou přirozeně určeny k ochraně rostlin před herbivory, u člověka při kontaktu s kůží mohou způsobit alergickou reakci ve formě pálení či svědění. To způsobují chemické látky obsažené v tekutině trichomů jako např. histamin, acetylcholin, serotonin nebo kyselina mravenčí (Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018; Rajput, Chaudhary & Sharma, 2018). Dalšími společnými morfologickými znaky jsou například vstříčné listy s palisty s nejčastěji pilovitými až zubatými okraji (Kaplan *et al.*, 2021) nebo květenství s malými, nevýraznými květy (větrosnubnost) (Grosse-Veldmann *et al.*, 2016). Kopřivy jsou rozšířeny téměř po celém světě, zejména v mírném a subtropickém podnebném pásu. Běžně se vyskytují jako plevel antropogenních stanovišť (půdy bohaté na živiny), ale mohou obsadit i celou řadu přírodních biotopů (Grosse-Veldmann *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2023). Jsou také intenzivně studované z hlediska obsahových látek, zejména kvůli léčivému potenciálu a jiným užitečným vlastnostem, díky nimž jsou využívány člověkem ve farmacii či medicíně (*U. dioica*, *U. urens*, *U. pilulifera* aj.) (Frag *et al.*, 2013; Rajput, Chaudhary & Sharma, 2018), nebo také (především *U. dioica*) v zemědělství, potravinářství či v textilním průmyslu (Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018). Taxonomie i systematika tohoto rodu zůstává poměrně problematická, navzdory hojnosti i ekonomickému významu. Z morfologického hlediska kopřivy nedisponují příliš taxonomicky užitečnými znaky (drobnokvětost, poměrně homogenní morfologie plodů) a zároveň mají pozoruhodnou fenotypovou plasticitu (Grosse-Veldmann *et al.*, 2016). Existují tak různé názory ohledně počtu druhů tohoto rodu. V závislosti na taxonomickém konceptu se uvádí přibližně 30 až 70 druhů (Cheeseman, 1925; Chrtek, 1979; Friis, 1993; Geltman, 1998).

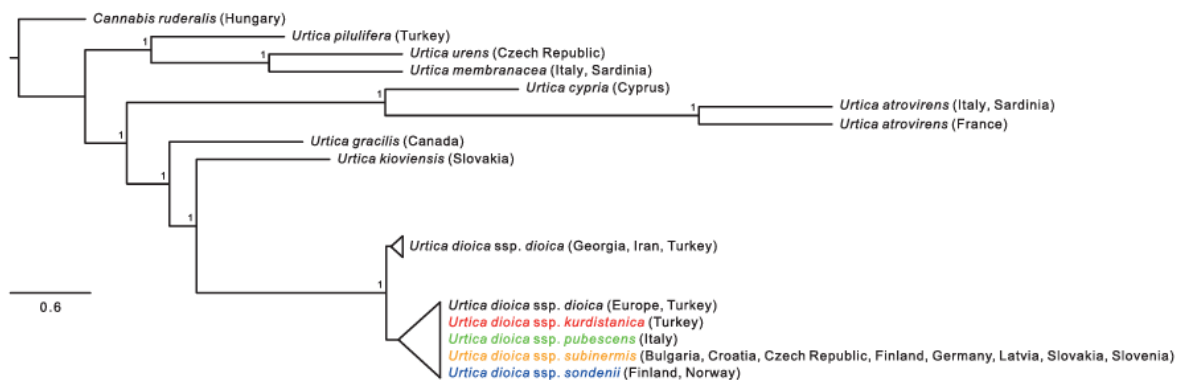
Nejvýznamnějším druhem rodu *Urtica* je pravděpodobně *U. dioica*, která je člověkem asi nejvíce využívaná, zejména kvůli svému chemickému potenciálu (Frag *et al.*, 2013; Upton, 2013; Semwal *et al.*, 2023).

4.2. *Urtica dioica* agg.

Urtica dioica L., volně rostoucí vytrvalá bylina s výběžky a žahavými trichomy se vyskytuje téměř ve všech oblastech světa a je často vázaná na půdy bohaté dusíkem (Hegi, 1990; Kaplan *et al.*, 2021; Urfus *et al.*, 2021). Tvoří polyploidní komplex (*Urtica dioica* agg.), který zahrnuje jak diploidní, tak tetraploidní cytotypy/taxony (minoritně i triploidní a pentaploidní). Polyploidie pravděpodobně přispívá k vysoké variabilitě tohoto druhu, která se pak odráží i v množství vnitrodruhových taxonů. Ty se od sebe kromě ploidie liší také morfologickými znaky (např. zastoupení jednoduchých a žahavých trichomů, tvar listové čepele, přítomnost samčích a samičích květů (dioecie versus monoecie) a také odlišnou geografii (Weigend, 2005; Weigend, 2006; Rejlová *et al.*, 2019; Rejlová *et al.*, 2021). Většinu poddruhů *Urtica dioica* agg. tvoří diploidní cytotypy ($2n=2x=26$), tetraploidi spadají do *U. dioica* subsp. *dioica* ($2n=4x=52$) (Rejlová *et al.*, 2019). Diploidi se často vyskytují v přirozenějších habitatech a jsou vzácnější – *U. dioica* subsp. *sondenii* se vyskytuje v oblastech tundry a lesotundry, zejména ve Skandinávii; *U. dioica* subsp. *subinermis* v lužních lesích střední a západní Evropy; *U. dioica* subsp. *pubescens* roztroušeně v nížinách od Itálie přes Balkánský poloostrov až po deltu řeky Volhy a *U. dioica* subsp. *kurdistanica* v alpských sutích Anatólie a blízkých pohoří (Rejlová *et al.*, 2019; Rejlová *et al.*, 2021; Obr. 1). Mezi diploidní poddruhy kopřivy dvoudomé se řadí i stenoendemický poddruh *U. dioica* subsp. *cypria*, s výskytem pouze na Kypru, má však odlišnou morfologii a absolutní velikost genomu od ostatních poddruhů a jeho řazení do agregátu je proto diskutabilní (Weigend, 2006; Rejlová *et al.*, 2021). Tetraploidní poddruh *U. dioica* subsp. *dioica* geograficky zcela převládá a často se vyskytuje v synantropních habitatech (Rejlová *et al.*, 2019, Obr. 1). Pomocí molekulárních analýz (Hyb-Seq) bylo zjištěno, že jak mezi jednotlivými diploidními poddruhy samostatně, tak mezi diploidními poddruhy a tetraploidními (pravděpodobně autotetraploidními) poddruhy existuje patrně silná příbuznost (nešly od sebe molekulárními analýzami odlišit; Rejlová *et al.*, 2021; Obr. 2). Fylogeneze *Urtica dioica* agg. je stále z velké části nedořešená a zařazení infraspecifických taxonů kopřivy dvoudomé zůstává sporné. Některé fylogeneze řadí do agregátu kopřivy dvoudomé i blíže příbuzné druhy, jako je: *U. atrovirens*, *U. bianorii*, *U. kioviensis* a *U. simensis* aj. (Henning *et al.*, 2014; Grosse-Veldmann *et al.*, 2016; Rejlová *et al.*, 2019).



Obr. 1 – Rozšíření diploidního a tetraploidního cytotypu *U. dioica* agg. v Evropě a západní Asii (převzato z Rejlová *et al.*, 2019). Tetraploidní cytotyp je velmi rozšířený (žluté body), zatímco diploidní rostliny jsou vzácnější (červené body). Velikost bodů odpovídá množství populací na dané lokalitě.



Obr. 2 – Fylogenetická rekonstrukce evolučních vztahů mezi druhy *Urtica* na základě koalescenční analýzy (ASTRAL; převzato z Rejlová *et al.*, 2021)

Řešením, jak lépe objasnit vnitřní strukturu *U. dioica* agg., by mohla být chemotaxonomie. *Urtica dioica* obsahuje celou řadu významných sekundárních metabolitů a jiných chemických látek, které byly člověkem zkoumány již od pradávna, zejména kvůli jejich léčivým účinkům (Upton, 2013). Rostlina je užívána za mnoha různými účely - např. k detoxikaci organismu či k léčbě různých onemocnění (revma, artróza aj.; Bräutigam, 2019). Kopřiva dvoudomá je

dokonce jediným druhem z čeledi *Urticaceae*, který je dnes komerčně pěstován pro farmaceutické účely (Exarchou *et al.*, 2006; El Haouari *et al.*, 2006; Nahata & Dixit, 2012) a je uznána jako léčivá rostlina Komisí E (německá Odborná komise pro rostlinné léčivé přípravky Spolkového institut pro léčiva a medicínské produkty) (Bräutigam, 2019). Mezi nejvýznamnější bioaktivní látky obsažené v *U. dioica* patří terpenoidy (těkavé látky, steroidy), mastné kyseliny, fenolické látky (lignany, fenoly, trísloviny, flavonoidy) a alkaloidy (Farang *et al.*, 2013; Rajput, Chaudhary & Sharma, 2018; Semwal *et al.*, 2023). Pro studium vazby polyploidie na obsah sekundárních metabolitů v rostlinách jsou vhodné látky, které vykazují jistou variabilitu mezi druhy. Takovou skupinou v *U. dioica* by mohly být flavonoidy (Farang *et al.*, 2013).

Ačkoliv je kopřiva dvoudomá, zejména v posledních 20 letech intenzivně zkoumaným druhem (Topic *Urtica dioica* 2004 až 2024 – 2275 záznamů; Web of Science, 2024) a disponuje velkým množstvím sekundárních metabolitů, první a zároveň jediná strukturovaná chemotaxonomie rodu *Urtica* vznikla teprve nedávno. Tato studie (Farang *et al.*, 2013) opravdu může pomoci k objasnění některých systematických nejasností i uvnitř druhu *U. dioica*. Fylogenetická příbuznost v agregátu kopřivy dvoudomé se pak odráží v podobnosti metabolických profilů. Bylo zjištěno, že taxony kladu *Urtica dioica* spojuje vysoký obsah fenolických kyselin, a naopak ostatní druhy rodu *Urtica* (např. většina andsko-amerických taxonů) charakterizuje vysoký obsah hydroxymastných kyselin.

Navzdory rostoucí popularitě na úrovni studia metabolomiky a dalších aplikovaných chemicko-farmaceutických specializací u *Urtica dioica*, neexistuje kromě zmíněné chemotaxonomické studie (Farang *et al.*, 2013) žádná další publikace, která by se zabývala sekundárními metabolity této skupiny ve vztahu k taxonomii a zcela neznámou oblastí je i vazba na polyploidii.

Cíle:

Polyploidie má vliv na celou řadu vlastností u rostlin, včetně jejich fyziologie. K zodpovězení otázek byl vybrán, jakožto ideální model, který disponuje bohatstvím na sekundární metabolity a zároveň je známým polyploidním komplexem, *Urtica dioica* agg. Navzdory veliké chemické probádanosti stále chybějí studie, které by ve vztahu k sekundárním metabolitům kopřivy dvoudomé zohledňovaly také ploidii či geografické rozšíření velkého množství jejich vnitrodruhových taxonů.

Cílem této práce je zodpovědět následující otázky:

1. Liší se cytotypy *Urtica dioica* agg. na úrovni složení sekundárních metabolitů?
2. Má syntetický neotetraploidní cytotyp srovnatelné složení sekundárních metabolitů s přirozenými tetraploidy?
3. Souvisí složení sekundárních metabolitů s odlišnou geografíí a/nebo taxonomií?

5. Metodika

5.1. Sběry a rostlinný materiál

Výběr taxonů z okruhu *Urtica dioica* pro vlastní experimentální část odrážel současná taxonomická pojetí (Weigend, 2005; Rejlová *et al.*, 2019; Rejlová *et al.*, 2021; Tab. 1). Byla použita i část materiálu z předchozích studií (iránská *U. dioica* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica*; Rejlová *et al.*, 2019).

Rostliny byly sbírány na šesti lokalitách v Evropě a Asii – ve Finsku, na jižní Moravě (Česká republika), v Itálii, Anatolii, Íránu a na Korsice (Francie), které reprezentují rozsáhlý geografický areál jednotlivých cytotypů a taxonů okruhu *Urtica dioica* (Tab. 1; Obr. 3). Rostliny z Íránu (*U. dioica* subsp. *dioica*) a z Korsiky (*U. atrovirens*) byly fylogeneticky odlišeny od hlavní sesterské skupiny (tj. *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *dioica*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica*; Rejlová *et al.*, 2021) a byly proto použity ke kontrole jako blízké příbuzné taxony, tzv. outgroups. Aby se podařilo plnohodnotně zodpovědět kladené otázky, byly v hlavních třech oblastech výskytu (Skandinávie, střední a jižní Evropa) cíleně sbírány oba cytotypy z populací blízko sebe (do 10 km). Pouze u populace z Finska byla vzdálenost cytotypů větší (ca 65 km) kvůli celkově menší početnosti populací v regionu.

Tab. 1 - Přehled lokalit analyzovaného materiálu

Lokalita	Cytotyp	Název	Zkratka	Souřadnice
jihozápadní Finsko (Jižní Pohjanmaa)	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>sondenii</i>	P7 FIN M2	62,7575764N, 23,7076608E
	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	P7 FIN M1	63,3452781N, 23,5307039E
jižní Morava (Křivé jezero)	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>subinermis</i>	CZM 1; KJM	48,8458908N, 16,7261653E
	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	CZM 2	48,8428689N, 16,7262297E
severní Itálie (Tridentsko-Horní Adiže)	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>pubescens</i>	IT M1	46,3840442N, 11,2737269E
	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	IT M2	46,3786708N, 11,3660594E
jihovýchodní Anatolie (Mersinská provincie)	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>kurdistanica</i>	kurd.	37,3583200N, 34,6903400E
severozápadní Írán (Ardabíl)	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	IR	38,1117800N, 47,9462400E
Korsika (Corte)	2x	<i>U. atrovirens</i>	U. atrov. U2920	42,3047700N, 9,1502700E

Sběr rostlinného materiálu probíhal v letech 2017–2022. Lokality byly vybrány na základě předešlých studií (Rejlová *et al.*, 2019; Obr. 1) uvádějících výskyt jednotlivých cytotypů. Sbírané byly rostliny s oddenky a u některých rostlin také semena, kvůli případnému dosévání

materiálu. Semena byla usušena při pokojové teplotě a živé rostliny zasazeny do květináčů (kompost, písek a ornice v poměru 1:1:1) v experimentální zahradě Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích, kde o ně dále bylo pečováno s užitím stejných kultivačních postupů.

Semena na dosévání rostlinného materiálu byla uchovávána v lednici při teplotě ca 4 °C, výjimečně byla do lednice uložena několik dní před výsevem. Před samotným výsevem byla vždy semena vložena na noc do roztoku fungicidu Magnicur Energy (Bayer Garden; 0,1 ml fungicidu na 100 ml vody), aby se zabránilo plísním a jiným chorobám při klíčení. Semena byla umístěna na filtrační papír položený na tenké vrstvě písku (ca 0,5 cm) v Petriho misce a zalita vodou s rostlinným stimulem klíčení Seedbooster plus (Plagron; 2 kapky stimulem na 500 ml vody). Voda na zalití byla převařena a písek i Petriho misky spařeny vařící vodou k vytvoření sterilních podmínek. Klíčení semen v zakrytých Petriho miskách probíhalo v klíčidlech Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Zalévány byly semenáčky poté již nepřevařenou vodou, někdy s přídavkem hnojiva KRISTALON Start (koncentrace dle návodu).

Celkem bylo k pokusu použito a ověřeno průtokovou cytometrií 303 rostlin, zbytek nasbíraného materiálu sloužil pouze jako záloha a nebyl proto ploidně ověřován. Z toho 147 rostlin bylo použito k vytvoření syntetických polyploidů a 156 rostlin pro zkoumání sekundárních metabolitů metodou LC–MS. Pro herbarizování byly použity jen vybrané skupiny exemplářů, kvůli velkému množství rostlinného materiálu. Herbářové doklady budou uloženy v herbářových sbírkách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (PRC).

K pokusu byl vytvořen následující design práce (Tab. 2). Z párových lokalit z Finska (sever Evropy), jižní Moravy (střed Evropy) a Itálie (jih Evropy) bylo vybráno pro každý cytotyp vždy 10 rostlin. Z „outgroupových“ skupin z Korsiky a Íránu byly vybrány skupiny rostlin vždy po 5. Z Anatólie bylo původně také zamýšleno vybrat 5 rostlin, nicméně kvůli špatnému klíčení semen byly vybrány nakonec jen 4 rostliny. Pro syntetickou kontrolu bylo vybráno 10 neotetraploidních rostlin. Celkem tedy 84 rostlin.

Tab. 2 - Design práce vytvořený podle lokalit výskytu jednotlivých cytotypů *U. dioica* agg. použitých na pokus

Lokalita	Cytotyp	Název	Zkratka	Sběr	Počet rostlin
Finsko	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>sondenii</i>	P7 FIN M2	2022	10
	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	P7 FIN M1	2022	10
jižní Morava (Křivé jezero)	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>subinermis</i>	CZM 1	2021	10
	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	CZM 2	2021	10
Itálie	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>pubescens</i>	IT M1	2021	10
	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	IT M2	2021	10
Anatólie	2x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>kurdistanica</i>	kurd.	2017	4
Írán	4x	<i>U. dioica</i> subsp. <i>dioica</i>	IR	2018	5

Korsika	2x	<i>U. atrovirens</i>	U. atrov. U2920	2020	5
vytvořeno synteticky (rodičovská generace z jižní Moravy, Křivé jezero)	neo4x	syntetičtí tetraploidi (rodičovská generace <i>U. dioica</i> subsp. <i>subinermis</i>)	neo4x KJM 49	2022 (vytvořeno synteticky + sběr rodičovské generace)	10



Obr. 3 – Mapa lokalit analyzovaného materiálu (tj. tři párové lokality rostlin diploidního a tetraploidního cytotypu *U. dioica*=Finsko, jižní Morava a Itálie; dvě lokality „outgroupových“ skupin=*U. atrovirens* s výskytem na Korsice a *U. dioica* subsp. *dioica* z Íránu; lokalita výskytu diploidních rostlin *U. dioica* subsp. *kurdistanica*=Anatólie).

5.2. Průtoková cytometrie

U všech jedinců jednotlivých cytotypů/taxonů z okruhu *Urtica dioica* byla stanovena ploidní úroveň pomocí průtokové cytometrie.

Veškerá měření probíhala v Laboratoři průtokové cytometrie Botanického ústavu AV ČR s využitím přístrojů Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Německo) vybaveného UV-LED čipem s vlnovou délkou 365 nm jako zdrojem UV světla pro excitaci barviva DAPI (měřena relativní velikost genomu), a Beckman Coulter CytoFlex S, který jako zdroj světla používá UV laser.

Měření vycházela ze standardní dvoukrokové metodiky (Doležel, Greilhuber & Suda, 2007). Jako standard byla zvolena *Bellis perennis* ($2C=3,38$ pg; (Schönswetter *et al.*, 2007) a byla měřena s každým vzorkem zvlášť. Část čerstvého listu standardu a vzorku byly společně nasekány žiletkou v Petriho misce a zality vychlazeným pufrem Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové a 0,5 % Tween 20). Po přečtení tekutiny s rostlinným materiálem do zkumavky přes nylonové plátýnko o velikosti filtru 42 μm bylo přidáno barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol, β -mercaptoethanol, OTTO II: 0,4 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného), ponecháno ve zkumavce asi 5 minut inkubovat (obarvení) a poté vloženo do přístroje. Většina analýz byla měřena na 3000 částic. Jen v případě prověřování ploidní úrovně u velkých počtů rostlin (zejména juvenilů při přípravě syntetických tetraploidů) byly z časových důvodů akceptovány nižší počty částic (alespoň 1500). Uznány byly pouze analýzy, u nichž nepřesáhl variační koeficient (CV) peaků 5 %. Histogramy byly dále analyzovány v programu FloMax 2.4d (Partec) ke zjištění ploidní úrovně.

U mladých rostlin napadených škůdci bylo možné pozorovat produkci slizovitých polysacharidů, což výrazně narušilo měření (nečitelný histogram). Další komplikací byly občasné kontaminace (např. mšice či prach). Při „screeningu“ syntetických tetraploidů se relativně často vyskytovaly chiméry diploidních a tetraploidních pletiv (viz kapitola Výsledky).

5.3. Příprava syntetických polyploidů

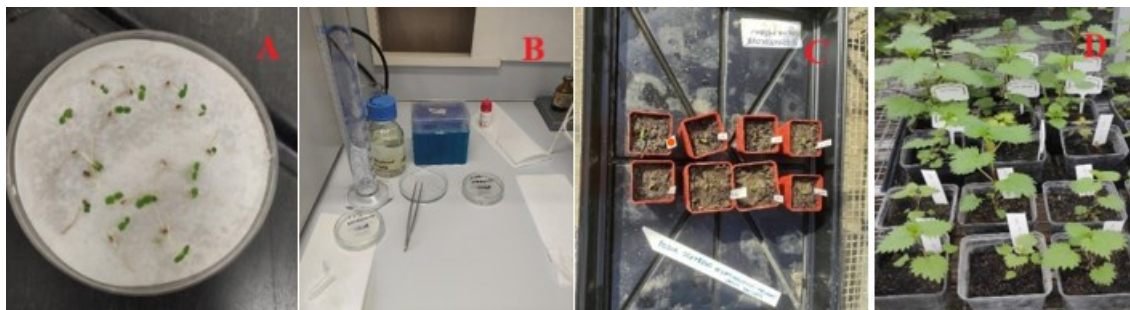
Vytvoření syntetických polyploidů je metoda, která v biologických aplikacích obvykle slouží ke srovnání s přirozenými polyploidy (Husband *et al.*, 2008). Nicméně syntetická polyploidizace je mnohem častěji využívána např. ve šlechtitelství (Neenu M. G., Aswathi A., & Prasath D., 2024). Jako rodičovská generace byly vybrány diploidní rostliny z jižní Moravy (lokalita Křivé jezero, KJM; *U. dioica* subsp. *subinermis*; Tab. 1). Semena z těchto rostlin byla uchovávána v lednici (ca 4°C), aby došlo ke stimulaci klíčení (stratifikace). Vyseta byla na filtrační papír na tenkou vrstvičku písku v Petriho misce a klíčena v klíčidlech (klimaboxech) v BÚ AVČR v Průhonicích při 25 °C přes den a 10 °C přes noc. Během klíčení a růstu byly semenáčky zalévány vodou se stimulatorem růstu (Seedbooster plus, Plagron; 2 kapky stimulatoru na 500 ml vody), aby se urychlil jejich růst.

Metodika vytváření syntetických polyploidů byla volně převzata z Pavlíková *et al.* (2017), některé kroky byly přizpůsobeny pokusu (viz níže).

Semenáčky staré 10 až 12 dní (10 dní staré rostliny, jak uvádí Pavlíková *et al.* (2017) byly příliš drobné a hynuly) byly poté vystaveny kolchicinovému ošetření, které probíhalo v Laboratoři molekulární cytogenetiky a karyologie Botanického ústavu AV ČR (Tab. 3; Obr. 4). K ošetření byl použit 0,2 % roztok kolchicinu s destilovanou vodou a rostliny v něm byly namáčeny po dobu 15 nebo 18 hodin, tj. déle než 12 hodin uvedených v Pavlíková *et al.* (2017) (Tab. 3; Obr. 4). Nejvíce rostlin bylo použito na 15hodinové působení (nejlepší poměr přežití a neopolyploidů – viz též Pavlíková *et al.* (2017)) (Tab. 3; Obr. 4). Poté byly rostliny opláchnuty destilovanou vodou a zasazeny do výsevního substrátu nebo zeminy v květináčích (stejně složení zeminy jako u dospělých rostlin; kompost, písek a ornice v poměru 1:1:1), složení se lišilo od Pavlíková *et al.* (2017) (Obr. 4). K zajištění stabilních podmínek byly poté rostlinky uchovávány ve skleníku, kde byly denně zalévány jemným mlžením.

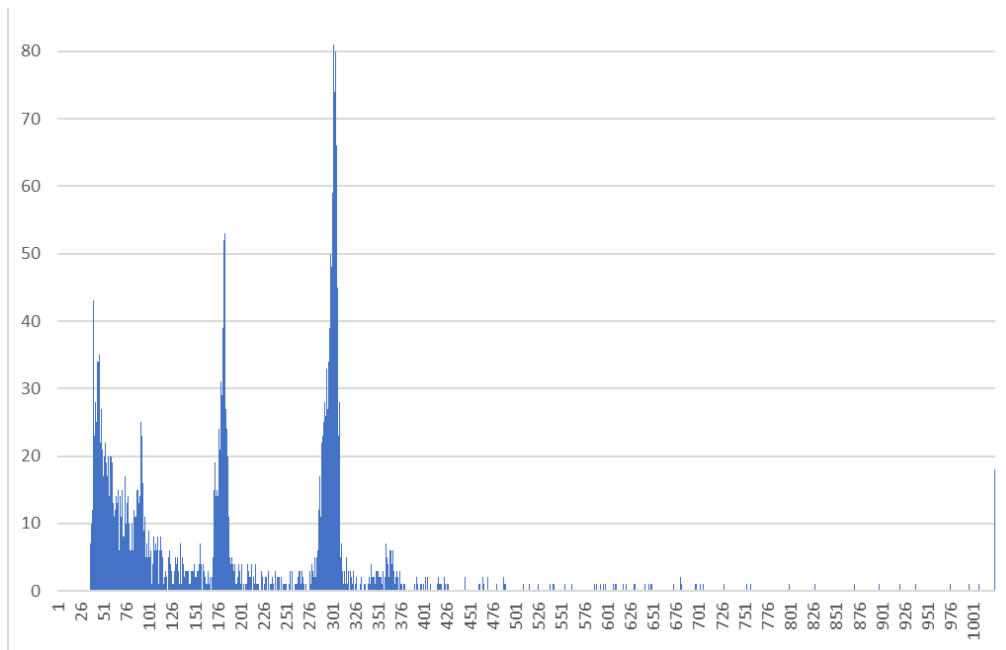
Tab. 3 – Celkové množství semenáčků použité k vytvoření syntetických polyploidů za různých podmínek

Stáří semenáčků (dny)	Doba namáčení v roztoku s kolchicinem (h)	Počet semenáčků
10	15	320
12	15	280
11	15	300
10	18	300
12	18	150
		Celkem: 1350



Obr. 4 – Postup vytváření syntetických polyploidů (A=klíčení semínek *U. dioica* subsp. *subinermis* v Petriho misce; B=ošetření semenáčků kolchicinovým roztokem; C=vysazení ošetřených semenáčků do květináčů; D= F2 generace syntetických neotetraploidů).

Jakmile vyrostly semenáčky do výšky alespoň 10 cm byly podrobeny měření průtokovou cytometrií. Rostliny, které vyšly jako diploidní byly vyřazeny. Ponechány byly pouze chiméry (více ploidních peaků v histogramu, Obr. 5) pro případné další zkoumání a tetraploidní rostliny. K dalšímu ověření (přeměření) tetraploidů byl použit průtokový cytometr Beckman Coulter CytoFlex S, protože umožňuje nastavit oříznutí oblasti měření (prostřednictvím SSC), které je pak přesnější. Pro úplné vyloučení chimér z F1 generace byly ze všech neotetraploidních rostlin použitých posléze jako rodičovská generace přeměřovány tři listy (z horní, střední a dolní části lodyhy). Zbylí neotetraploidi byli kvůli velkému množství rostlinného materiálu ploidně oteřováni pouze jednou a jen z jednoho listu. Pokud byla poté objevena chiméra (Obr. 5), opět byla vyřazena. Dvakrát ověření syntetických tetraploidů, tedy generace F1, byli poté přesazeni do větších květináčů a pohojeni, aby co nejrychleji dosáhli dospělosti. Jakmile rostliny začaly tvořit generativní orgány, byly rozděleny na samčí a samičí jedince. Aby se zabránilo kontaminaci samičích rostlin pylem z kopřiv z okolí, byly uloženy ve vzdálenosti alespoň 10 m od nejbližších kopřiv a navíc ochráněny speciální klecí potaženou prodyšnou fólií s oky o šířce 11 μm (velikost pylových zrn *U. dioica* je ca 14 μm (Taylor, 2009)). Samičí rostliny byly poté opylovány, jednoduše otíráním obou květenství o sebe. Zralá semena byla sesbírána, usušena a vložena do lednice (ca 4°C), aby došlo ke stimulaci klíčení. Výsev probíhal podobně jako u rostlin parentální generace, opět na vrstvičce písku. Obdobně jako u F1 generace, jakmile semenáčky vyrostly do výšky alespoň 10 cm, byly otestovány průtokovou cytometrií. V této F2 generaci již chiméry nevznikaly a ponechány byly pouze tetraploidní rostliny, které byly většinou měřeny rovnou na průtokovém cytometru Beckman Coulter CytoFlex S. Neotetraploidní rostliny byly uchovávány ve skleníku a jakmile narostly, byly přesazovány do větších květináčů (Obr. 4).



Obr. 5 – Histogram analýzy jediného vzorku kolchicinem ovlivněné rostliny zobrazuje 3 maxima relativní intenzity fluorescence. První a třetí pík odpovídá diploidnímu a tetraploidnímu cytotypu *U. dioica* a druhý pík internímu standardu (*Bellis perennis*). Vzorek lze interpretovat jako chiméru diploidních a tetraploidních pletiv.

5.4. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC–MS)

Kombinovaná metoda LC–MS (*Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*; Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) byla zvolena k identifikaci sekundárních metabolitů v okruhu *Urtica dioica* a je garantována specializovanou skupinou Tomáše Pluskala z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (<https://pluskal.group.uochb.cz/cs>).

5.4.1. Příprava vzorků

Odběr vzorků proběhl na základě vytvořeného designu (Tab. 2). Sjednocení kultivačních podmínek bylo provedeno tři měsíce před samotným pokusem. Byly přeneseny do vytápěného skleníku na konci ledna 2024 (světlo 14 hodin denně, denní teplota kolem 20 °C a noční kolem 10 °C, hnojeny [KRISTALON Plod a květ] zpočátku každý týden a pak v pravidelných intervalech), aby stihly narůst do dubna na odběr. Do té doby se místo uskladnění lišilo (vytápěný a nevytápěný skleník, zahrada). Některé z rostlin trpěly na různé škůdce (např. molice, třásněnky, slimáci) a byly proto ošetřovány postřikem (Substral Careo; Vertimec; Limanish). Velké rostliny byly zastříhávány, aby byla sjednocena společná fenofáze (kvetoucí rostliny). Většina rostlin byla v době odběru listů na pokus dospělá, až na 3 rostliny z Anatólie, které kvůli problémům s doséváním byly použity ještě v juvenilním stadiu (ca 10 cm a asi 1–2 měsíce staré; Tab. 4; *kurd junior*). Ve skupině diploidních rostlin z Finska byla použita jedna rostlina (P7_FIN_M2_1-klon) jako klon jiné rostliny z této skupiny, opět kvůli špatnému klíčení semen (Tab. 4). Vlastní odběr vzorků pro LC–MS proběhl 4. dubna 2024.

Příprava rostlinného materiálu k analýze LC–MS vychází z práce Mutabdžija *et al.* (2024), některé kroky byly přizpůsobeny individuálním podmínkám tohoto pokusu (optimalizace viz níže).

Z rostlin (Obr. 6) byly odebírány listy ve střední části lodyhy. Aby nebyla ovlivněna kvantita a složení sekundárních metabolitů, nebyly rostliny týden před sběrem hnojeny a ani nebyl aplikován insekticidní postřik. Části listu z jednotlivých rostlin byly ihned po utržení vloženy do popsaných zkumavek (typ Eppendorf; 2 ml) a vloženy do polystyrenového boxu se suchým ledem (ca –79 °C), aby se zabránilo degradaci sekundárních metabolitů při převozu do laboratoře v ÚOCHB.

Rostlinný materiál byl následně připraven k extrakci sekundárních metabolitů (Obr. 6). Zmražené listy rostlin byly pomocí homogenizátoru rozmělněny na prášek, který byl následně vážen. K ca 50 µg (max. 100 µg kvůli objemu vialek) prášku bylo přidáno 20x více (tj. na 50 µg prášku 1000 µL) univerzálního extrakčního roztoku – 70% MeOH (zvoleno dle Farag *et al.* (2013)) a důkladně promícháno pomocí vortexu (Obr. 6). Po přidání solventu již vzorky nemusely být zmrazeny. Vzorky byly poté zcentrifugovány maximální rychlostí (18 000 RCF) na 15 minut (tedy déle než uvádí Mutabdžija *et al.* (2024)), aby se prášek usadil na dně zkumavky a bylo možné odebrat tekutinu (50 až 150 µL) do vialek, které se poté daly do přístroje (Obr. 6).

Kromě hlavního souboru rostlin na pokus byly ještě použity testovací soubory rostlin (s obsahem pouze některých skupin, které jsou v hlavním souboru). Tyto testovací soubory nebyly použity pro finální zpracování dat, pouze sloužili k ověření, zda dochází ke shlukování dat.



Obr. 6 – Postup přípravy vzorků do LC–MS (A=sběr vzorků před pokusem; B=extrakce sekundárních metabolitů pomocí MeOH; C=analýza sekundárních metabolitů LC–MS)

5.4.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

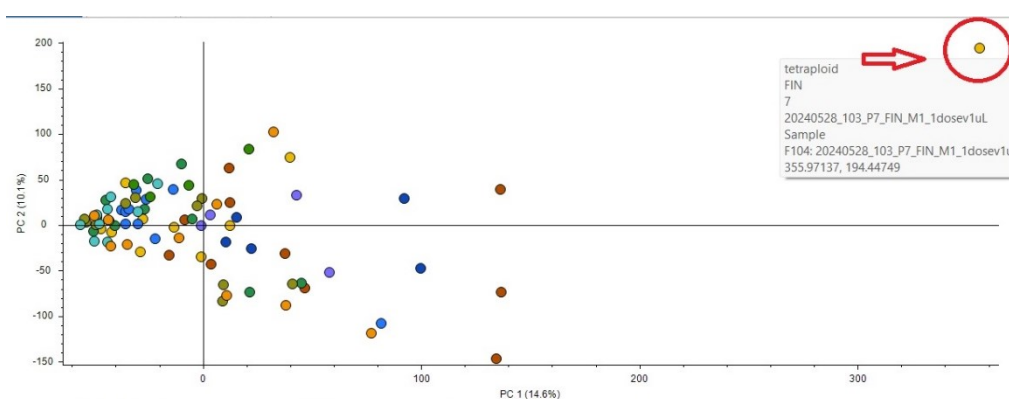
Na měření obsahu a kvantity sekundárních metabolitů byl použit systém Vanquish™ Flex UHPLC spojený s hmotnostním spektrometrem Orbitrap ID-X Tribrid vybaveným zahřívanou elektrosprejovou ionizací (H-ESI) v laboratoři skupiny Tomáše Pluskala v ÚOCHB AV ČR (Obr. 6).

K oddělení složek směsi kapalinovým chromatografem byla použita kolona Waters ACQUITY BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 μ m) s průtokovým gradientem 0,350 ml/min, teplotou kolony 40 °C a injekčním objemem 1 μ L. Jako rozpouštědla byla použita voda s 0,1 % kyseliny mravenčí (A) a acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí (B). Pro analýzu všech vzorků byla použita tato metoda: lineární gradient 5 až 100 % B po dobu 15,5 min, izokratický gradient při 100 % B po dobu 2 min a 2 min při 5 % B. Elektrosprejová ionizace (vytvoří ionty) pro hmotnostní spektrometrii byla provedena v pozitivním modu. Parametry hmotnostního spektrometru pro analýzu struktury jednotlivých složek byly následující: teplota iontové přenosové trubice nastavena na 325 °C, průtok pomocného plynu 10 L/min, teplota odpařovače nastavena na 350 °C, průtok ochranného plynu nastaven na 50 L/min, kapilární napětí nastaveno na 3000 V, rozlišení MS na 60 000, izolace kvadrupólu, rozsah skenování od m/z 100 –1000, RF čočka nastavena na 45 % a maximální doba nástřiku 118 ms.

5.4.3. Zpracování dat

Data z měření LC–MS byla zpracována pomocí softwaru Compound Discoverer 3.3 SP3 (Thermo Fisher Scientific Inc.), kvůli menší časové náročnosti a efektivitě programu (metabolity jsou automaticky anotovány). Zkušební verzi je možné stáhnout na webových stránkách (<https://thermo.flexnetoperations.com/control/thmo/download?element=3961968>).

Primární matice dat vytvořená LC–MS byla nejdříve upravena, aby bylo možné ji vyhodnotit pomocí softwaru Compound Discoverer. Bylo také potřeba odstranit outliera (P7_FIN_M1_1dosev), který byl objeven v prvním (pouze informativním) spuštění softwaru, aby bylo možné lépe vyhodnotit data (Obr. 7).



Obr. 7 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent vytvořený automaticky programem Compound Discoverer 3.3 SP3 zobrazující variabilitu v rámci všech nalezených metabolitů nalezených v celkovém datasetu. Jeden vzorek (tj. tetraploidní rostlina z Finska=outlier) se příliš lišil od ostatních a byl proto odstraněn z celkového datasetu.

Kvůli velkému množství (více než 20 tisíc) sloučenin nalezených softwarem Compound Discoverer a nemožnosti softwaru je všechny spolehlivě anotovat bylo vytipováno deset sekundárních metabolitů ("kyselina kafeoyl jablečná"=*Caffeoylmalic acid*, rutin, eskulin, kyselina kávová, kyselina kapronová, kyselina kaprylová, kyselina palmitová, kyselina ferulová, kvercetin, kemferol), které již byly dříve v rámci rodu *Urtica* studovány (Frag *et al.*, 2013; Brahmī-Chendouh *et al.*, 2021; Đurović *et al.*, 2024) a zároveň byly anotovány softwarem.

Data, zahrnující hodnoty oblastí píků deseti vybraných metabolitů příslušících k jednotlivým vzorkům, byla exportována do programu Excel. V programu bylo vytvořeno celkem šest jednotlivých tabulek, obsahujících odlišný počet vzorků, různě rozřazených do skupin, tak aby bylo možné odpovědět na otázky vymezené v této práci (Tab. 4).

Celkem bylo v souboru vytvořeno šest různých skupin znázorňujících jednotlivé signály – taxonomický, signál ploidie (dvojitým způsobem), geografický, signál zohledňující poslední fylogenezi a signál srovnání syntetického tetraploida (Tab. 4). Pro zjištění taxonomického signálu bylo vytvořeno šest skupin, představujících jednotlivé taxony okruhu *Urtica dioica* (*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *dioica*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp.

pubescens a *U. dioica* subsp. *kurdistanica* a jako outgroup *U. atrovirens*) (Tab. 4). Signál ploidie byl zjišťován srovnáním 3 skupin (diploidní, tetraploidní a neotetraploidní rostliny). Kvůli kontrole syntetických neotetraploidů bylo zároveň vytvořeno podobné rozdělení tří skupin dle ploidie, avšak z diploidů zahrnovalo pouze moravské diploidní rostliny (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*), jako rodičovskou generaci neotetraploidů (tj. moravské diploidní rostliny, tetraploidní a neotetraploidní rostliny) (Tab. 4). Geografický signál byl pozorován pomocí vytvoření tří skupin reprezentujících sever (*U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica*), střed (*U. dioica* subsp. *subinermis* a *U. dioica* subsp. *dioica*) a jih Evropy (*U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *dioica*) (Tab. 4). Protože poslední fylogeneze okruhu *Urtica dioica* (Rejlová et al., 2021) odlišuje *U. dioica* subsp. *dioica* s výskytem v Íránu od hlavní sesterské skupiny (tj. *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *dioica*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica*) bylo vytvořeno ještě jedno srovnání v rámci taxonomického signálu představené třemi skupinami (iránská *U. dioica* subsp. *dioica*, hlavní sesterská skupina okruhu *Urtica dioica* a jako outgroup *U. atrovirens*) (Tab. 4). Posledním zkoumaným signálem byl vliv původu polyploidie znázorněné srovnáním dvou skupin (přírodně a synteticky vytvořené tetraploidní rostliny) (Tab. 4).

Takto připravené tabulky byly dále analyzovány statistickým softwarem Past (Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P.D., 2001). Data byla nejdříve normalizována logaritmováním a poté zpracována analýzou hlavních komponent (PCA) a lineární diskriminační analýzou (LDA).

V rámci LDA byly k šesti jednotlivým rozdělení skupin rostlin ke zpřesnění výsledků navíc vytvořeny další způsoby oddělení skupin (viz Výsledky a Diskuze).

Tab. 4 – Rozdělení skupin rostlinného materiálu vzhledem k pokládaným otázkám

ROZDĚLENÍ DLE TAXONOMIE	ROZDĚLENÍ DLE PLOIDIE	ROZDĚLENÍ DLE GEOGRAFIE	ROZDĚLENÍ DLE POSLEDNÍ FYZLOGENEZE	ROZDĚLENÍ DLE PŮVODU POLYPLOIDIE	ROZDĚLENÍ DLE PLOIDIE 2
U_atrov_7_U2920	P7_FIN_M2_3	P7_FIN_M1_3	U_atrov_7_U2920	P7_FIN_M1_3	CZM_1_1
U_atrov_1U2920	P7_FIN_M2_4	P7_FIN_M1_5	U_atrov_1U2920	P7_FIN_M1_5	CZM_1_3
U_atrov_4_U2920	P7_FIN_M2_5	P7_FIN_M1_6	U_atrov_4_U2920	P7_FIN_M1_6	CZM_1_4
U_atrov_6_U2920	P7_FIN_M2_6	P7_FIN_M1_7_9	U_atrov_6_U2920	P7_FIN_M1_7_9	CZM_1_5
U_atrov_5_U2920	P7_FIN_M2_7	P7_FIN_M1_8	U_atrov_5_U2920	P7_FIN_M1_8	CZM_1_6
P7_FIN_M2_3	P7_FIN_M2_8	P7_FIN_M1_15	IR4	P7_FIN_M1_15	CZM_1_7
P7_FIN_M2_4	P7_FIN_M2_9	P7_FIN_M1_2dosev	IR7	P7_FIN_M1_2dosev	CZM_1_9
P7_FIN_M2_5	P7_FIN_M2_10	P7_FIN_M1_3dosev	IR9	P7_FIN_M1_3dosev	CZM_1_10
P7_FIN_M2_6	P7_FIN_M2_1-klon	P7_FIN_M1_4dosev	IR10	P7_FIN_M1_4dosev	CZM_1_11
P7_FIN_M2_7	P7_FIN_M2_14	P7_FIN_M2_3	IR11	CZM_2_2	CZM_1_14
P7_FIN_M2_8	CZM_1_1	P7_FIN_M2_4	P7_FIN_M1_3	CZM_2_3	P7_FIN_M1_3
P7_FIN_M2_9	CZM_1_3	P7_FIN_M2_5	P7_FIN_M1_5	CZM_2_4	P7_FIN_M1_5
P7_FIN_M2_10	CZM_1_4	P7_FIN_M2_6	P7_FIN_M1_6	CZM_2_5	P7_FIN_M1_6
P7_FIN_M2_1-klon	CZM_1_5	P7_FIN_M2_7	P7_FIN_M1_7_9	CZM_2_6	P7_FIN_M1_7_9
P7_FIN_M2_14	CZM_1_6	P7_FIN_M2_8	P7_FIN_M1_8	CZM_2_8	P7_FIN_M1_8
CZM_1_1	CZM_1_7	P7_FIN_M2_9	P7_FIN_M1_15	CZM_2_9	P7_FIN_M1_15
CZM_1_3	CZM_1_9	P7_FIN_M2_10	P7_FIN_M1_2dosev	CZM_2_10	P7_FIN_M1_2dosev
CZM_1_4	CZM_1_10	P7_FIN_M2_1-klon	P7_FIN_M1_3dosev	CZM_2_13	P7_FIN_M1_3dosev
CZM_1_5	CZM_1_11	P7_FIN_M2_14	P7_FIN_M1_4dosev	CZM_2_17	P7_FIN_M1_4dosev
CZM_1_6	CZM_1_14	CZM_1_1	P7_FIN_M2_3	IT_M2_3	CZM_2_2
CZM_1_7	IT_M1_3	CZM_1_3	P7_FIN_M2_4	IT_M2_6	CZM_2_3
CZM_1_9	IT_M1_4	CZM_1_4	P7_FIN_M2_5	IT_M2_7	CZM_2_4
CZM_1_10	IT_M1_5	CZM_1_5	P7_FIN_M2_6	IT_M2_14	CZM_2_5
CZM_1_11	IT_M1_6	CZM_1_6	P7_FIN_M2_7	IT_M2_15	CZM_2_6
CZM_1_14	IT_M1_7	CZM_1_7	P7_FIN_M2_8	IT_M2_16	CZM_2_8
IT_M1_3	IT_M1_9	CZM_1_9	P7_FIN_M2_9	IT_M2_18	CZM_2_9
IT_M1_4	IT_M1_12	CZM_1_10	P7_FIN_M2_10	IT_M2_20	CZM_2_10
IT_M1_5	IT_M1_14	CZM_1_11	P7_FIN_M2_1-klon	IT_M2_24	CZM_2_13
IT_M1_6	IT_M1_22	CZM_1_14	P7_FIN_M2_14	IT_M2_25	CZM_2_17
IT_M1_7	IT_M1_23	CZM_2_2	CZM_1_1	neo4xKJM_49_13	IT_M2_3
IT_M1_9	kurdl	CZM_2_3	CZM_1_3	neo4xKJM_49_15	IT_M2_6
IT_M1_12	kurd2junior	CZM_2_4	CZM_1_4	neo4xKJM_49_17	IT_M2_7
IT_M1_14	kurd3junior	CZM_2_5	CZM_1_5	neo4xKJM_49_18	IT_M2_14
IT_M1_22	kurd4junior	CZM_2_6	CZM_1_6	neo4xKJM_49_2	IT_M2_15
IT_M1_23	P7_FIN_M1_3	CZM_2_8	CZM_1_7	neo4xKJM_49_3	IT_M2_16
kurdl	P7_FIN_M1_5	CZM_2_9	CZM_1_9	neo4xKJM_49_4	IT_M2_18
kurd2junior	P7_FIN_M1_6	CZM_2_10	CZM_1_10	neo4xKJM_49_5	IT_M2_20
kurd3junior	P7_FIN_M1_7_9	CZM_2_13	CZM_1_11	neo4xKJM_49_6	IT_M2_24
kurd4junior	P7_FIN_M1_8	CZM_2_17	CZM_1_14	neo4xKJM_49_7	IT_M2_25
P7_FIN_M1_3	P7_FIN_M1_15	IT_M1_3	CZM_2_2		IR4
P7_FIN_M1_5	P7_FIN_M1_2dosev	IT_M1_4	CZM_2_3		IR7
P7_FIN_M1_6	P7_FIN_M1_3dosev	IT_M1_5	CZM_2_4		IR9
P7_FIN_M1_7_9	P7_FIN_M1_4dosev	IT_M1_6	CZM_2_5		IR10
P7_FIN_M1_8	CZM_2_2	IT_M1_7	CZM_2_6		IR11
P7_FIN_M1_15	CZM_2_3	IT_M1_9	CZM_2_8		neo4xKJM_49_13
P7_FIN_M1_2dosev	CZM_2_4	IT_M1_12	CZM_2_9		neo4xKJM_49_15
P7_FIN_M1_3dosev	CZM_2_5	IT_M1_14	CZM_2_10		neo4xKJM_49_17
P7_FIN_M1_4dosev	CZM_2_6	IT_M1_22	CZM_2_13		neo4xKJM_49_18
CZM_2_2	CZM_2_8	IT_M1_23	CZM_2_17		neo4xKJM_49_2
CZM_2_3	CZM_2_9	IT_M2_3	IT_M1_3		neo4xKJM_49_3
CZM_2_4	CZM_2_10	IT_M2_6	IT_M1_4		neo4xKJM_49_4
CZM_2_5	CZM_2_13	IT_M2_7	IT_M1_5		neo4xKJM_49_5

CZM_2_6	CZM_2_17	IT_M2_14	IT_M1_6		neo4xKJM_49_6
CZM_2_8	IT_M2_3	IT_M2_15	IT_M1_7		neo4xKJM_49_7
CZM_2_9	IT_M2_6	IT_M2_16	IT_M1_9		
CZM_2_10	IT_M2_7	IT_M2_18	IT_M1_12		
CZM_2_13	IT_M2_14	IT_M2_20	IT_M1_14		
CZM_2_17	IT_M2_15	IT_M2_24	IT_M1_22		
IT_M2_3	IT_M2_16	IT_M2_25	IT_M1_23		
IT_M2_6	IT_M2_18		IT_M2_3		
IT_M2_7	IT_M2_20		IT_M2_6		
IT_M2_14	IT_M2_24		IT_M2_7		
IT_M2_15	IT_M2_25		IT_M2_14		
IT_M2_16	IR4		IT_M2_15		
IT_M2_18	IR7		IT_M2_16		
IT_M2_20	IR9		IT_M2_18		
IT_M2_24	IR10		IT_M2_20		
IT_M2_25	IR11		IT_M2_24		
IR4	neo4xKJM_49_13		IT_M2_25		
IR7	neo4xKJM_49_15		kurd1		
IR9	neo4xKJM_49_17		kurd2junior		
IR10	neo4xKJM_49_18		kurd3junior		
IR11	neo4xKJM_49_2		kurd4junior		
	neo4xKJM_49_3				
	neo4xKJM_49_4				
	neo4xKJM_49_5				
	neo4xKJM_49_6				
	neo4xKJM_49_7				

6. Výsledky

6.1. Průtoková cytometrie

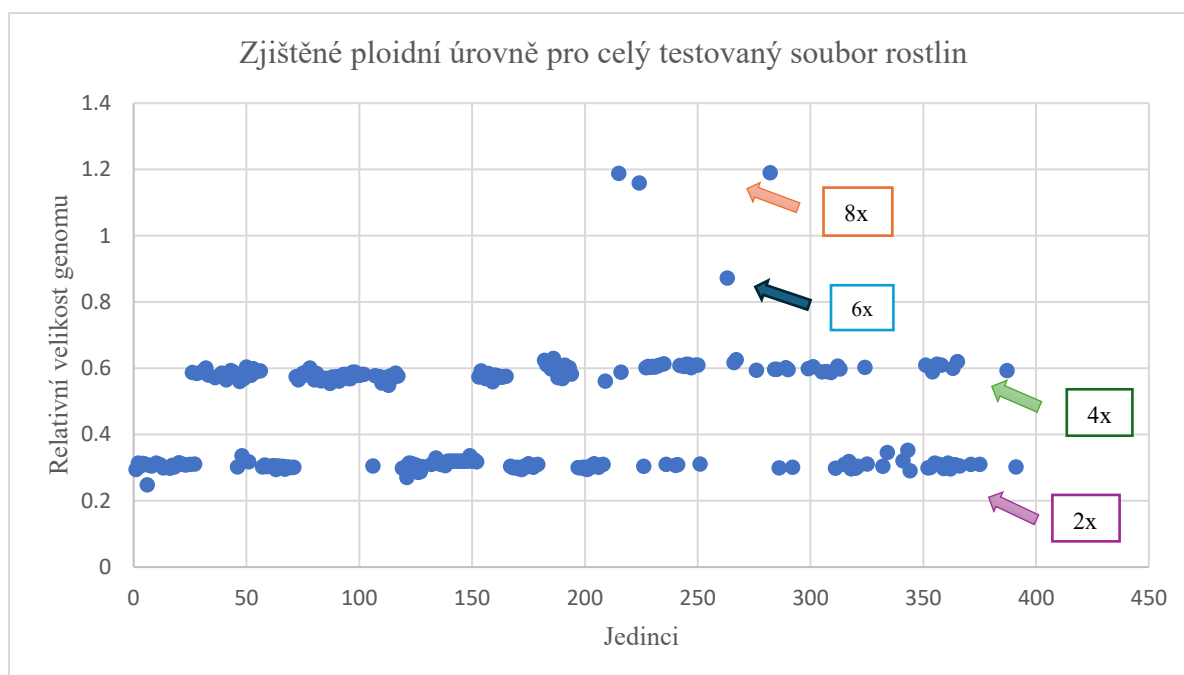
Celkem byla průtokovou cytometrií ověřena ploidní úroveň u 303 rostlin vyskytujících se na 6 lokalitách (Tab. 5).

Pomocí relativní velikosti genomu bylo možné potvrdit zařazení jednotlivých rostlin do příslušných taxonů (rozmezí 0,25 až 0,35 diploidní druhy a 0,55 až 0,63 tetraploidní druhy) (Obr. 8).

Tab. 5 – Přehled celkového množství rostlin s ověřením ploidie průtokovou cytometrií (KJM F0=parentální generace rostlin na vytvoření syntetických polyploidů KJM; KJM F1=1. generace potomstva synteticky ošetřeného kolchicinem; KJM 2=2. generace potomstva synteticky ošetřeného kolchicinem=neo4x KJM 49)

Lokalita	Označení populace/Zkratka	Cytotyp	Počet rostlin
Finsko	P7 FIN M1	4x (vyjíměčně 2x)	21
	P7 FIN M2	2x	11
jižní Morava (Křivé jezero)	CZM 1	2x	15
	CZM 2	4x	18
	KJM F0=KJM	2x	13
	KJM F1	2x, 4x (vyjíměčně 6x, 8x)	134
	KJM F2=neo4x KJM 49	4x	13
Itálie	IT M1	2x	20
	IT M2	4x (vyjíměčně 2x)	26
Anatolie	kurd.	2x	5
Írán	IR	4x	13
Korsika	U. atrov. U2920	2x	14
	Celkem		303

Ve většině případů byla ploidní úroveň, potvrzená průtokovou cytometrií, předpovězená správně. Výjimkou byla například jedna diploidní rostlina vyskytující se v populaci tetraploidních rostlin P7 FIN M1 a podobně, v populaci tetraploidních rostlin IT M2 se vyskytovali 4 diploidní rostliny (Tab. 5). Tyto odlišující se rostliny byly ze souboru vyřazeny.



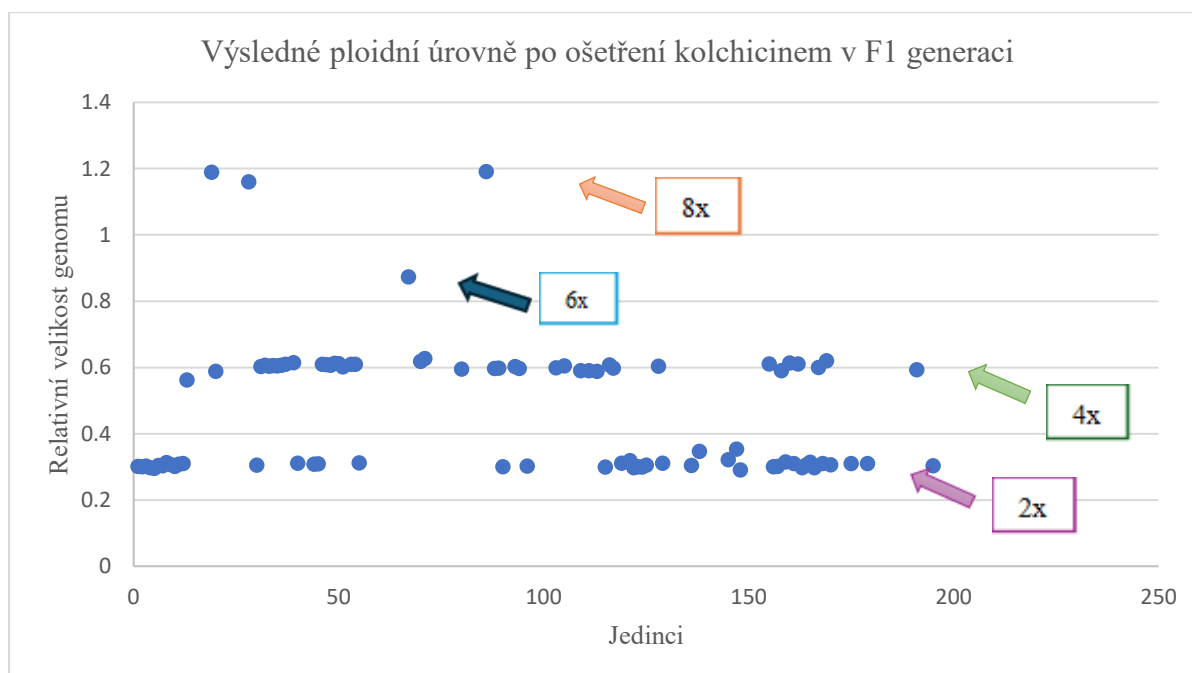
Obr. 8 – Přehled naměřených ploidních úrovní v celém testovaném souboru rostlin *Urtica dioica* agg. (včetně rostlin synteticky ošetřených kolchicinem; bez chimér)

6.2. Příprava syntetických polyploidů

Celkem bylo kolchicinovému ošetření vystaveno 1350 rostlin F1 generace, z nichž přežilo 490 (36 % úspěšnost). Z těchto přeživších byl náhodně vybrán soubor 134 rostlin, který byl ploidně ověřen průtokovou cytometrií. Celková úspěšnost vytvoření syntetických neotetraploidů je téměř 30 % (Tab. 6; Obr. 9; z 134 rostlin bylo 40 tetraploidních). Kromě tetraploidních cytotypů vznikly po ošetření kolchicinem také tzv. chiméry (ca 34 %; diploidní a tetraploidní píky, vzácně i oktaploidní pík), výjimečně vznikly i hexaploidní (ca 1 %) či oktaploidní rostliny (ca 2 %) (Tab. 6; Obr. 9). U celkem 45 rostlin (ca 34 %) po ošetření kolchicinem nedošlo ke změně ploidní úrovně (Tab. 6; Obr. 9; diploidi). Celková úspěšnost vytvoření syntetických tetraploidů v F2 generaci je 100 % (z 13 rostlin je 13 neotetraploidních).

Tab. 6 – Úspěšnost F1 generace synteticky ošetřených rostlin kolchicinem

Ploidní úroveň	Počet rostlin	Úspěšnost (%; z celkového počtu rostlin 134)
2x	45	33,58
4x	40	29,85
6x	1	0,75
8x	3	2,24
chiméry (2 píky – 2x a 4x; 3 píky – 2x, 4x, 8x)	45	33,58



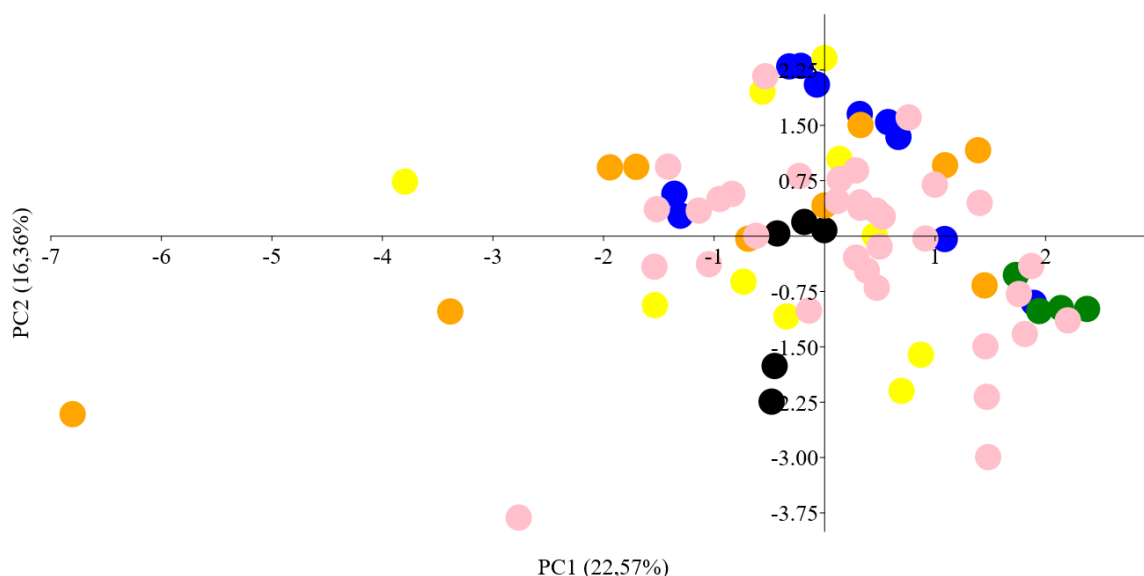
Obr. 9 – Přehled synteticky vzniklých ploidních úrovní v F1 generaci KJM po ošetření kolchicinem (bez chimér)

6.3. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC–MS)

6.3.1. Analýza hlavních komponent (PCA)

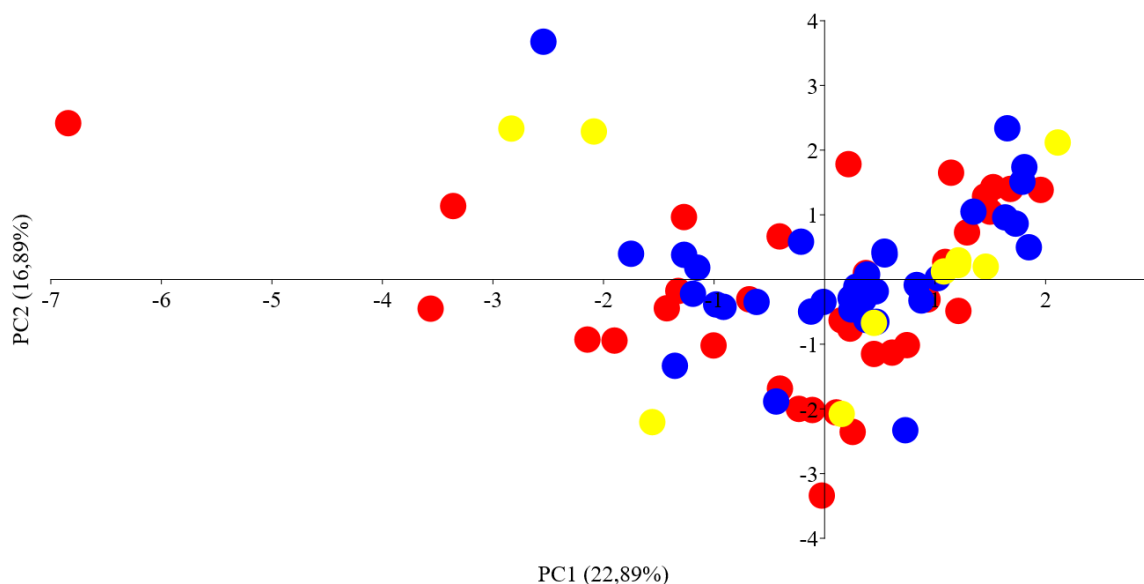
K zobrazení struktury dat získaných analýzou obsahu sekundárních metabolitů v rostlinách *Urtica dioica* agg. byla zvolena analýza hlavních komponent (PCA). Celkem bylo použito 83 rostlin (po odstranění „outliera“) různě rozdělených do skupin v šesti datasetech cílících na různé otázky (viz Metodika Tab. 4). Vzhledem k množství datasetů byly kvůli lepší přehlednosti diagramy znázorňující ordinace jednotlivých sloučenin vloženy do přílohové části práce (viz Příloha). Příspěvky 10 sloučenin v rámci různých rozdělení jsou vidět v tabulce č. 7, č. 8 a č. 9.

U analýzy prvního datasetu (PCA1; 73 jedinců; Obr. 10), který byl rozdělen do šesti skupin na základě taxonomického signálu (diploidní druhy/poddruhy a tetraploidní *U. dioica* subsp. *dioica*) byl pozorovatelný náznak agregace u taxonů *U. atrovirens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica* a *U. dioica* subsp. *sondenii* (procenta vysvětlené variability: PC1 22,57 %, PC2 16,36 %, PC3 13,23 %). Skupina *U. dioica* subsp. *kurdistanica* byla zároveň poměrně dobře oddělena podle první komponentní osy od dalších diploidních taxonů (ty se naopak překrývaly). Tetraploidní *U. dioica* subsp. *dioica* se překrývala se všemi ostatními taxony.



Obr. 10 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA1) zobrazuje metabolomickou variabilitu 73 rostlin rozdělených na základě taxonomického signálu. Na diagramu je znázorněno pět taxonů spadajících do hlavní sesterské skupiny *Urtica dioica* agg. (*U. dioica* subsp. *subinermis*=oranžové body; *U. dioica* subsp. *pubescens*=žluté body; *U. dioica* subsp. *kurdistanica*=zelené body; *U. dioica* subsp. *sondenii*=modré body a *U. dioica* subsp. *dioica*=růžové body) a jeden příbuzný druh sloužící jako „outgroup“ (*U. atrovirens*=černé body). První osa vysvětlila 22,57 % a druhá 16,36 % variability.

U analýzy druhého datasetu (PCA2; 78 jedinců; Obr. 11), který byl rozdělen do tří skupin podle na základě ploidie *Urtica dioica* agg. (tj. diploidi, tetraploidi a syntetiční tetraploidi) se skupiny překrývaly a nebylo možné jejich odlišení (procenta vysvětlené variability: PC1 22,89 %, PC2 16,89 %, PC3 12,18 %).

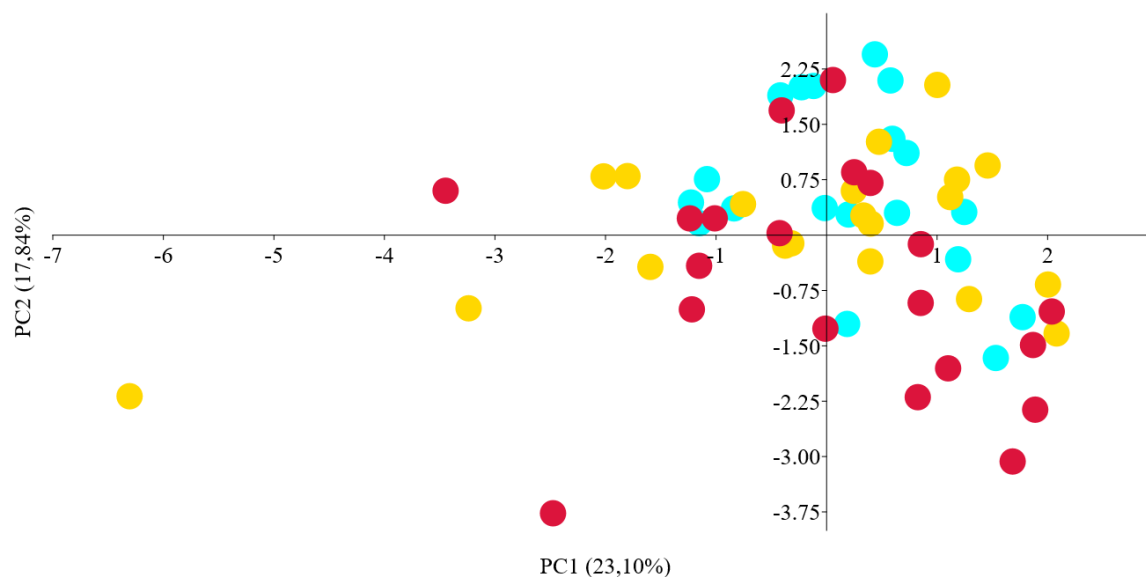


Obr. 11 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA2) zobrazuje metabolomickou variabilitu 78 rostlin rozdělených podle typu cytotypu *Urtica dioica* agg. Na diagramu jsou znázorněny dva přirozené cytotypy *Urtica dioica* agg. (diploidní taxony=*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*=červené body; tetraploidní taxon=*U. dioica* subsp. *dioica*=modré body) a synteticky vytvořený neotetraploidní cytotyp (žluté body). První osa vysvětlila 22,89 % a druhá 16,89 % variability.

Tab. 7 – Příspěvky 10 sloučenin PCA (A="kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*), B=rutin, C=eskulin, D=kyselina kávová, E=kyselina kapronová, F=kyselina kaprylová, G=kyselina palmitová, H=kyselina ferulová, I=kvercetin, J=kemferol). Zvýrazněné hodnoty mají nejvyšší korelaci s první a druhou komponentní osou.

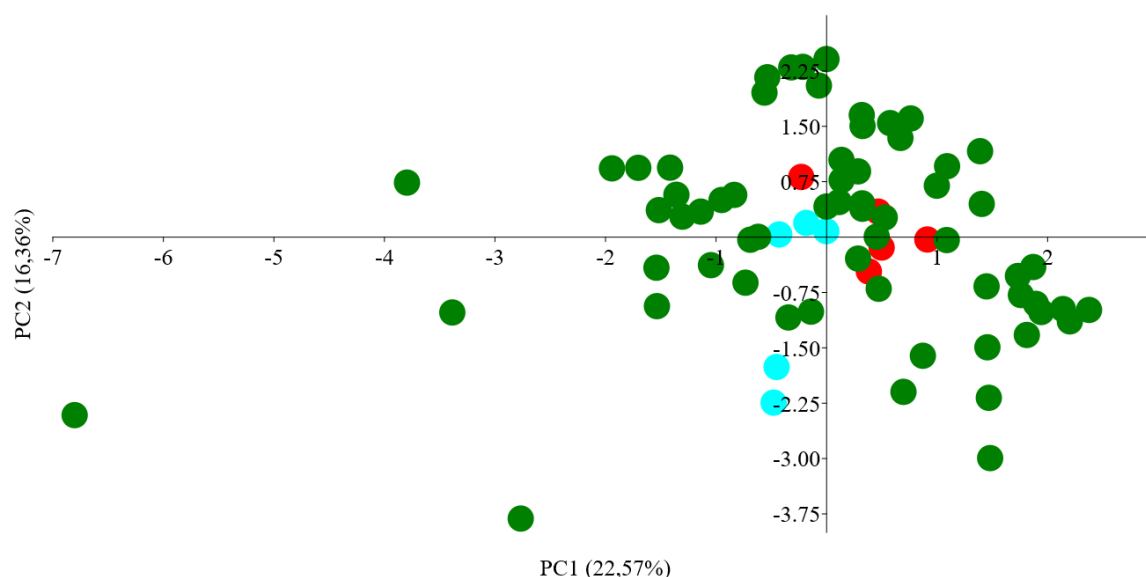
Sloučenina	PCA1		PCA2	
	PC1 (22,57 %)	PC2 (16,36 %)	PC1 (22,89 %)	PC2 (16,89 %)
A	0.29117	-0.09327	0.18938	0.23312
B	0.5356	0.20986	0.54325	-0.18729
C	0.20177	-0.42938	0.19677	0.44604
D	-0.00145	0.40776	0.079545	-0.30984
E	0.31195	-0.53	0.28579	0.51908
F	0.00643	-0.08992	0.038824	0.3475
G	0.001973	0.40017	-0.0728	-0.36976
H	-0.08919	0.26786	-0.11866	-0.02448
I	0.52377	0.19987	0.51146	-0.27555
J	0.45606	0.18923	0.50973	-0.11035

U analýzy třetího datasetu (PCA3; 59 jedinců; Obr. 12), který byl rozdělen do tří skupin dle regionů s párovým výskytem diploidních a tetraploidních populací (jih, střed a sever Evropy) docházelo na ordinačním diagramu opět k výrazným překryvům (procenta vysvětlené variability: PC1 23,10 %, PC2 17,84 %, PC3 12,79 %). Skandinávská skupina vykazovala určitý trend seskupení.



Obr. 12 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA3) zobrazuje metabolickou variabilitu 59 rostlin rozdělených dle regionů s párovým výskytem diploidních a tetraploidních populací. Na diagramu jsou znázorněny tři oblasti výskytu populací diploidního a tetraploidního cytotypu *U. dioica* agg. (střed Evropy=*U. dioica* subsp. *subinermis* a *U. dioica* subsp. *dioica* z jižní Moravy=žluté body; jih Evropy=*U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *dioica* z Itálie=červené body; sever Evropy=*U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica* z Finska=tyrkysově modré body). První osa vysvětlila 23,10 % a druhá 17,84 % variability.

U analýzy čtvrtého datasetu (PCA4; 73 jedinců; Obr. 13), ve kterém je zohledněna recentní fylogeneze (Rejlová *et al.* 2021), byly vymezeny tři skupiny (*Urtica dioica* agg. bez íránských tetraploidních rostlin, íránské tetraploidní rostliny a *U. atrovirens*). Na výsledném ordinačním diagramu byl pozorovatelný náznak odlišení skupiny s rostlinami *U. atrovirens* (procenta vysvětlené variability: PC1 22,57 %, PC2 16,36 %, PC3 13,23 %). Íránská skupina jen naznačovala nezřetelnou agregaci, avšak podle první komponentní osy byla poměrně dobře oddělena od *U. atrovirens*.

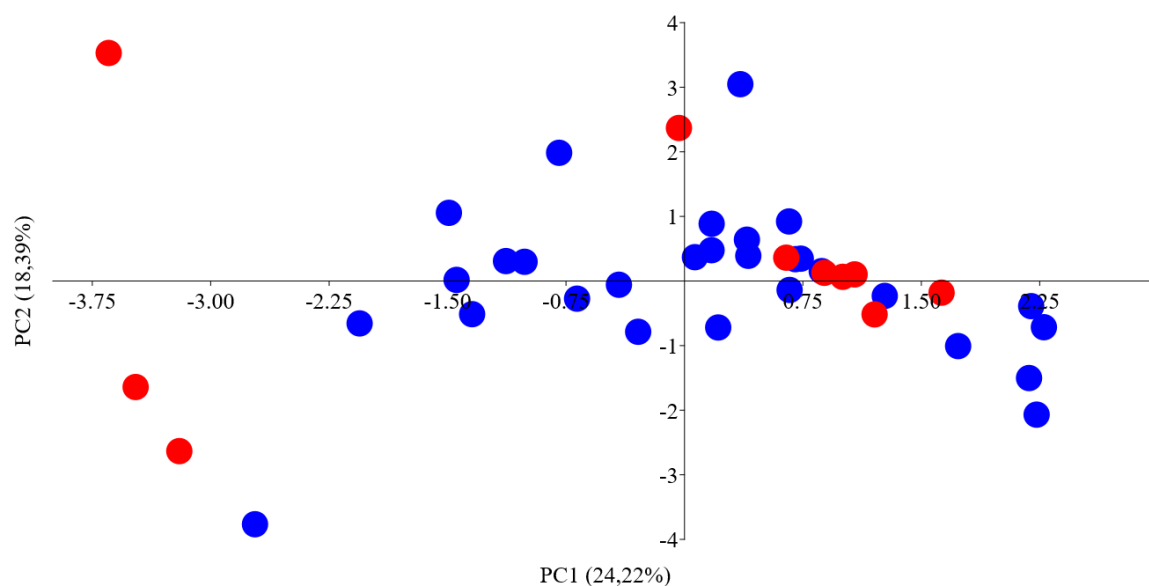


Obr. 13 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA4) zobrazuje metabolickou variabilitu 73 rostlin rozdělených do skupin vytvořených na základě recentní fylogeneze *Urtica dioica*. Na diagramu jsou znázorněny dvě „outgroupové“ skupiny (*U. dioica* subsp. *dioica* z Íránu=červené body; *U. atrovirens*=tyrkysově modré body) a hlavní sesterská skupina *Urtica dioica* agg. (tj. *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *subinermis* a *U. dioica* subsp. *dioica*=zelené body). První osa vysvětlila 22,57 % a druhá 16,36 % variability.

Tab. 8 – Příspěvky 10 sloučenin PCA (A="kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*), B=rutin, C=eskulin, D=kyselina kávová, E=kyselina kapronová, F=kyselina kaprylová, G=kyselina palmitová, H=kyselina ferulová, I=kvercetin, J=kemferol). Zvýrazněné hodnoty mají nejvyšší korelaci s první a druhou komponentní osou.

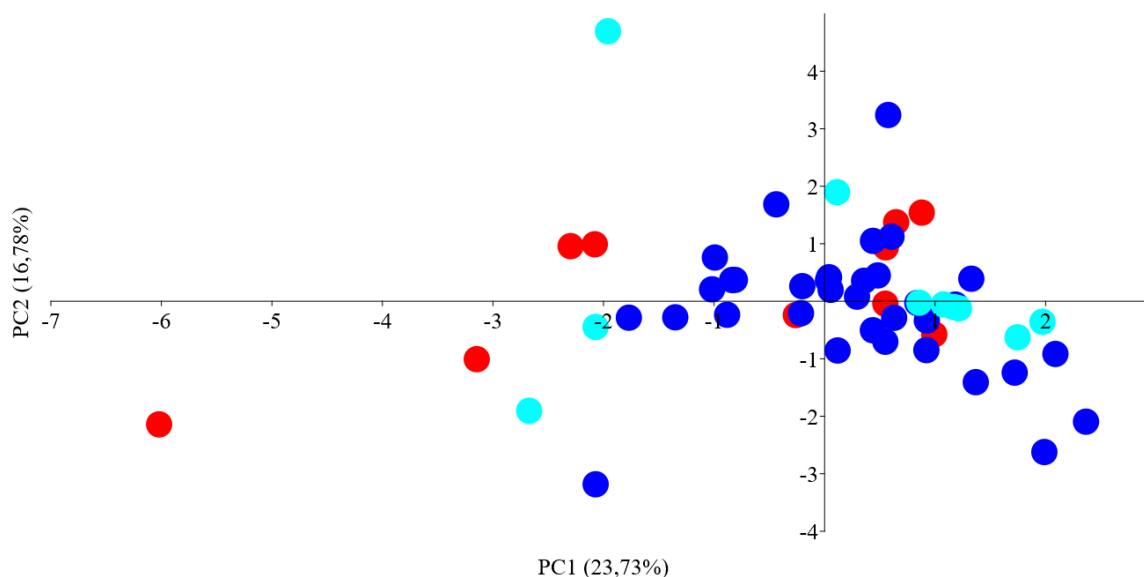
	PCA3		PCA4	
Sloučenina	PC1 (23,10 %)	PC2 (17,84 %)	PC1 (22,57 %)	PC2 (16,36 %)
A	0.25958	-0.07941	0.29117	-0.09327
B	0.52233	0.19482	0.5356	0.20986
C	0.20747	-0.41198	0.20177	-0.42938
D	0.10129	0.35293	-0.00145	0.40776
E	0.30132	-0.53748	0.31195	-0.53
F	-0.04454	-0.24854	0.00643	-0.08992
G	-0.03474	0.42286	0.001973	0.40017
H	-0.18871	0.25074	-0.08919	0.26786
I	0.5129	0.20054	0.52377	0.19987
J	0.46241	0.17001	0.45606	0.18923

U analýzy pátého datasetu (PCA5; 39 jedinců; Obr. 14), kde byly vytvořeny dvě skupiny zahrnující přirozené a uměle vytvořené tetraploidy byl pozorovatelný náznak odlišení synteticky vytvořených tetraploidů (procenta vysvětlené variability: PC1 24,22 %, PC2 18,39 %, PC3 14,28 %).



Obr. 14 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA5) zobrazuje metabolomickou variabilitu 39 rostlin reprezentujících přirozené a syntetické tetraploidy. Na diagramu jsou znázorněny přirozené tetraploidy *Urtica dioica* agg. (*U. dioica* subsp. *dioica* bez rostlin z Íránu=modré body) a synteticky vytvořené neotetraploidy (červené body). První osa vysvětlila 24,22 % a druhá 18,39 % variability.

U analýzy šestého datasetu (PCA6; 54 jedinců; Obr. 15), který byl rozdělen do tří skupin podle ploidie *Urtica dioica* agg., avšak z diploidních rostlin byly zahrnuty pouze *U. dioica* subsp. *subinermis*, sloužící jako kontrola (tj. diploidi=*U. dioica* subsp. *subinermis*, tetraploidi a syntetičtí tetraploidi) bylo možné pozorovat nevýrazné odlišení diploidních od synteticky vytvořených tetraploidních rostlin (procenta vysvětlené variability: PC1 23,73 %, PC2 16,78 %, PC3 14,56 %).



Obr. 15 – Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA6) zobrazuje metabolickou variabilitu 54 rostlin rozdělených podle ploidie *Urtica dioica* agg. Na diagramu jsou znázorněny dva přirozené cytotypy *Urtica dioica* agg. (rodičovský diploidní taxon použitý pro přípravu syntetických neotetraploidů=*U. dioica* subsp. *subinermis*=červené body; tetraploidní taxon=*U. dioica* subsp. *dioica*=modré body) a synteticky vytvořený neotetraploidní cytotyp (tyrkysově modré body). První osa vysvětlila 23,73 % a druhá 16,78 % variability.

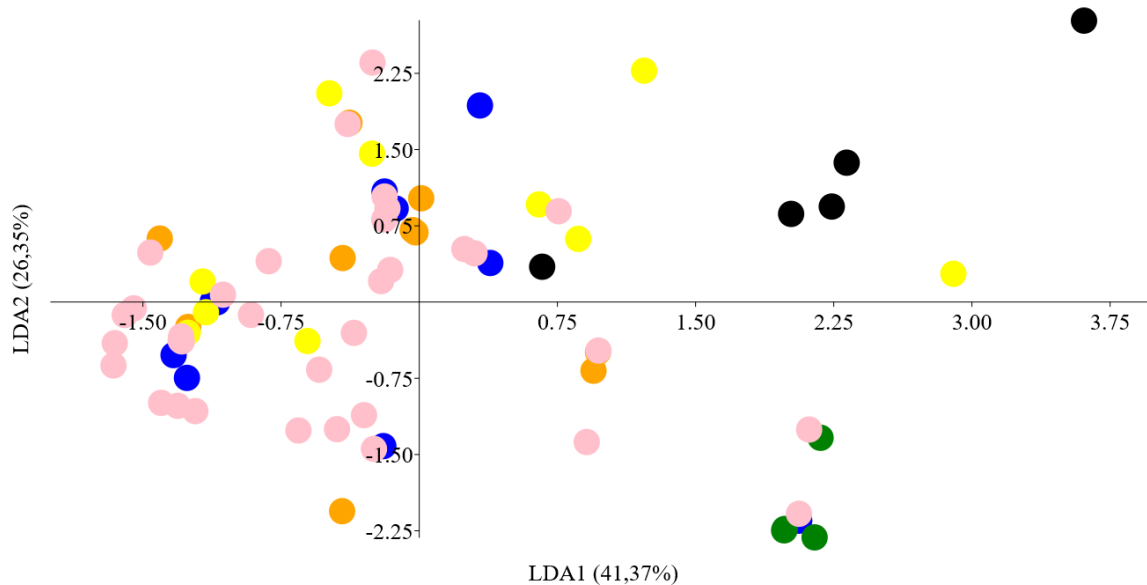
Tab. 9 – Příspěvky 10 sloučenin PCA (A="kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*), B=rutin, C=eskulin, D=kyselina kávová, E=kyselina kapronová, F=kyselina kaprylová, G=kyselina palmitová, H=kyselina ferulová, I=kvercetin, J=kemferol). Zvýrazněné hodnoty mají nejvyšší korelaci s první a druhou komponentní osou.

Sloučenina	PCA5		PCA6	
	PC1 (24,22 %)	PC2 (18,39 %)	PC1 (23,73 %)	PC2 (16,78 %)
A	-0.10937	0.11039	0.048994	0.27779
B	0.55403	0.23178	0.51855	0.1982
C	0.24227	-0.42309	0.21107	-0.39283
D	-0.00536	0.29204	0.19792	0.28783
E	0.2022	-0.43697	0.25065	-0.38696
F	0.1608	-0.41833	0.058047	-0.465
G	-0.12267	0.34966	-0.15436	0.3445
H	-0.27447	0.17076	-0.26055	0.28184
I	0.43427	0.36316	0.48208	0.28301
J	0.52597	0.14336	0.50465	0.04701

6.3.2. Diskriminační analýza

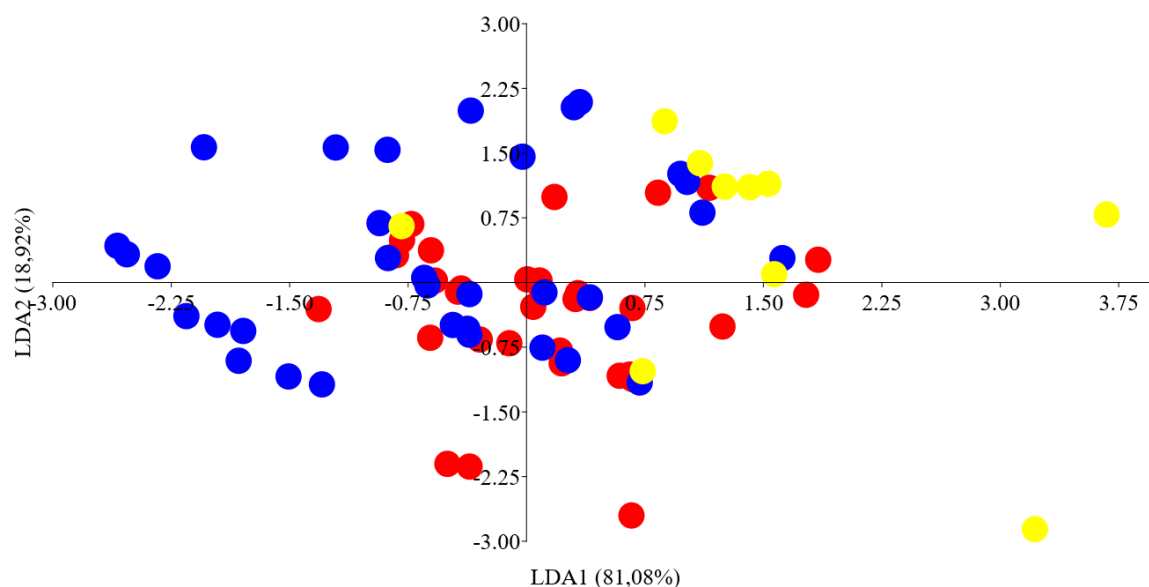
Ke zjištění, které sekundární metabolity nejvíce přispívají k odlišení skupin rostlin *Urtica dioica* agg., byla zvolena lineární diskriminační analýza. Celkem bylo analyzováno devět odlišných rozdělení skupin vycházejících z původních šesti datasetů použitých již pro PCA.

U analýzy prvního datasetu (LDA1; 73 jedinců; Obr. 16), který byl rozdělen do šesti skupin na základě taxonomického signálu (diploidní druhy/poddruhy a tetraploidní *U. dioica* subsp. *dioica*) se ukázalo částečné oddělení *U. atrovirens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica* od ostatních diploidních poddruhů podle první osy a oddělení *U. atrovirens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica* podle druhé osy (procenta vysvětlené variability: LDA1 41,37 %, LDA2 26,35 %, LDA3 15,03 %). Ostatní skupiny se překrývaly. Nejvíce korelující znak s první osou byla "kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*; Tab. 10).



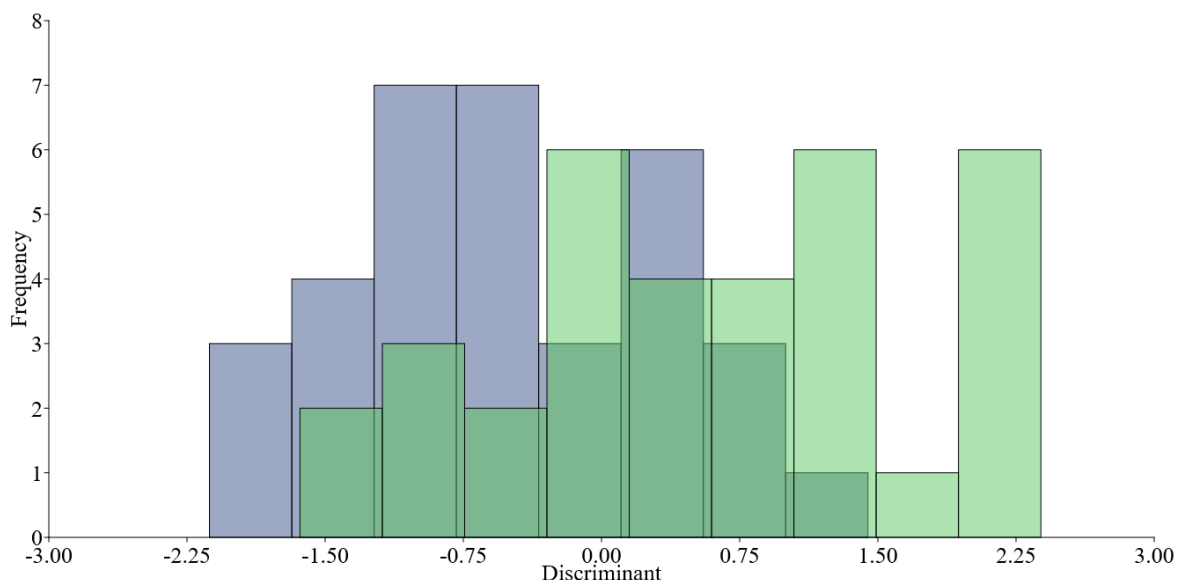
Obr. 16 – Ordinační diagram lineární diskriminační analýzy (LDA1) zobrazuje metabolickou variabilitu 73 rostlin rozdělených na základě taxonomického signálu. Na diagramu je znázorněno pět taxonů spadajících do hlavní sesterské skupiny *Urtica dioica* agg. (*U. dioica* subsp. *subinermis*=oranžové body; *U. dioica* subsp. *pubescens*=žluté body; *U. dioica* subsp. *kurdistanica*=zelené body; *U. dioica* subsp. *sondenii*=modré body a *U. dioica* subsp. *dioica*=růžové body) a jeden příbuzný druh sloužící jako „outgroup“ (*U. atrovirens*=černé body). První osa vysvětlila 41,37 % a druhá 26,35 % variability.

U analýzy druhého datasetu (LDA2; 78 jedinců; Obr. 17), který byl rozdělen do tří skupin podle ploidie *Urtica dioica* agg. (tj. diploidi, tetraploidi a syntetičtí tetraploidi) docházelo k výrazným překryvům (procenta vysvětlené variability: LDA1 81,08 %, LDA2 18,92 %). U skupiny synteticky vytvořených tetraploidů bylo možné pravděpodobně pozorovat náznak odlišení. Nejvíce korelující znak s první osou byla kyselina kapronová (Tab. 10).



Obr. 17 – Ordinační diagram lineární diskriminační analýzy (LDA2) zobrazuje metabolickou variabilitu 78 rostlin rozdělených podle typu cytotypu *Urtica dioica* agg. Na diagramu jsou znázorněny dva přirozené cytotypy *Urtica dioica* agg. (diploidní taxony=*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*=červené body; tetraploidní taxon=*U. dioica* subsp. *dioica*=modré body) a synteticky vytvořený neotetraploidní cytotyp (žluté body). První osa vysvětlila 81,08 % a druhá 18,92 % variability.

U analýzy třetího datasetu (LDA3; 68 jedinců; Obr. 18), který byl rozdělen do dvou skupin podle typu cytotypu *Urtica dioica* agg. (tj. diploidi a tetraploidi) opět docházelo částečně k překryvům, pozorovatelný byl pouze náznak odlišení dvou skupin. Nejvíce korelující znak s první osou byl rutin (Tab. 10).

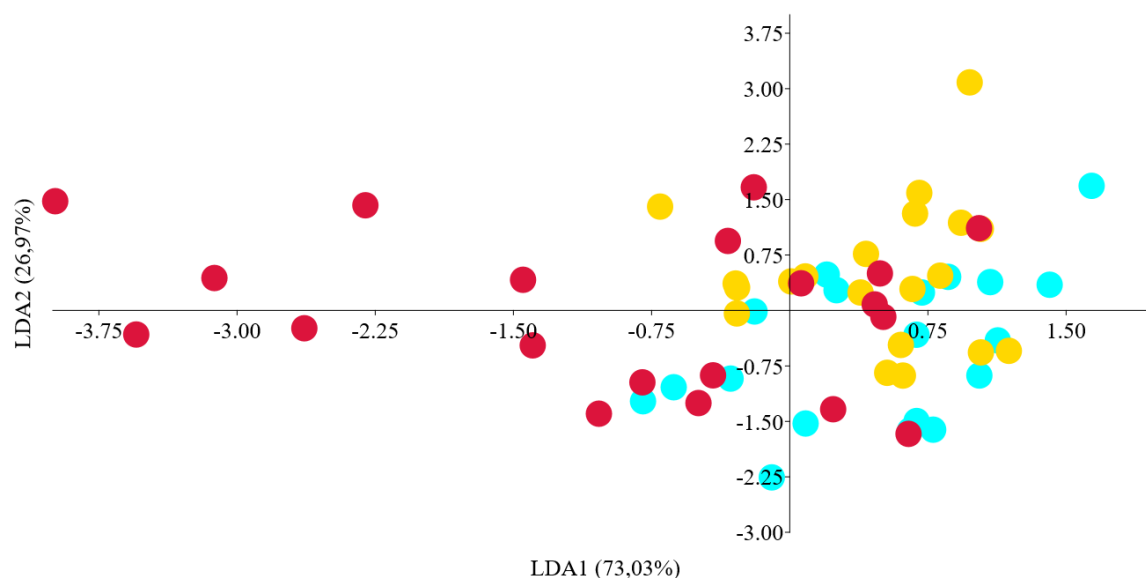


Obr. 18 – Histogram lineární diskriminační analýzy (LDA3) zobrazuje metabolickou variabilitu 68 rostlin rozdělených podle typu cytotypu *Urtica dioica* agg. Na histogramu jsou znázorněny dva přirozené cytotypy *Urtica dioica* agg. (diploidní taxony=*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*=šedé sloupce; tetraploidní taxon=*U. dioica* subsp. *dioica*=zelené sloupce).

Tab. 10 – Korelační koeficienty 10 sloučenin LDA (A="kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*), B=rutin, C=eskulin, D=kyselina kávová, E=kyselina kapronová, F=kyselina kaprylová, G=kyselina palmitová, H=kyselina ferulová, I=kvercetin, J=kemferol). Zvýrazněné hodnoty mají nejvyšší korelaci s první a druhou osou.

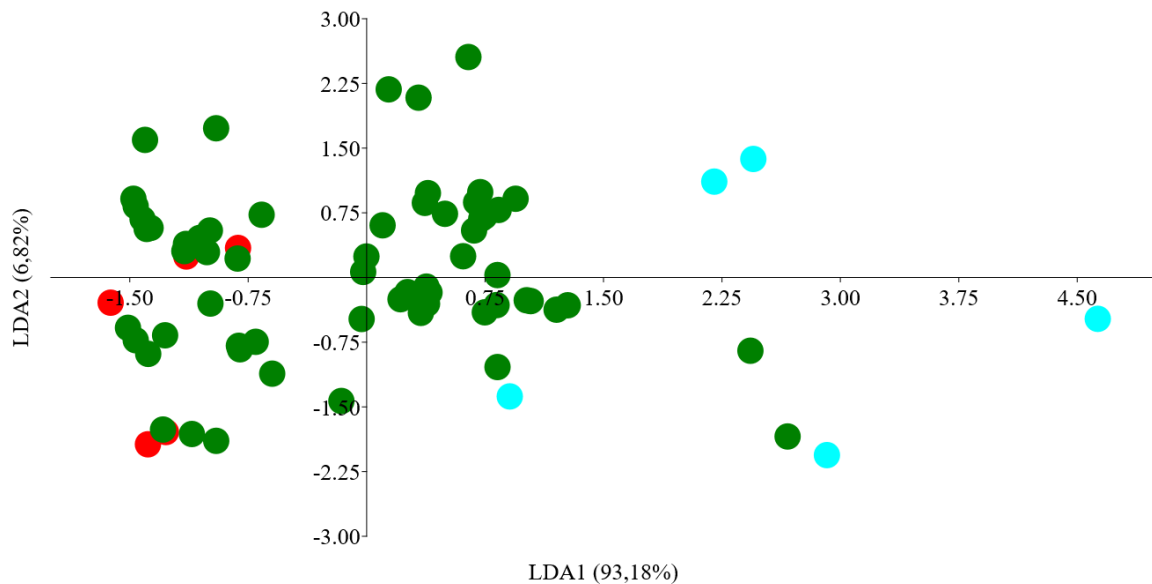
	LDA1		LDA2		LDA3
Sloučenina	LDA1 (41,37 %)	LDA2 (26,35 %)	LDA1 (81,08 %)	LDA2 (18,92 %)	LDA1
A	0.28374	-0.00577	0.093403	-0.10219	-0.22112
B	-0.049	-0.06662	-0.14618	0.34227	0.28463
C	-0.01722	-0.05337	-0.1321	0.12216	0.19837
D	0.006022	0.066338	0.17205	0.047566	-0.09455
E	0.12319	-0.10562	0.18717	0.11733	-0.04572
F	-0.20162	-0.12224	-0.12682	0.020863	0.19956
G	0.041541	-0.11207	0.097049	-0.00591	-0.02944
H	0.024688	-0.10746	0.053672	-0.08657	-0.08251
I	0.031646	-0.00269	-0.09862	-0.20512	-0.03096
J	-0.13221	-0.15662	-0.0125	0.0513	0.071767

U analýzy čtvrtého datasetu (LDA4; 59 jedinců; Obr. 19), který byl rozdělen do tří skupin dle regionů s párovým výskytem diploidních a tetraploidních populací (jih, střed a sever Evropy) docházelo na ordinačním diagramu opět k výrazným překryvům a zejména u skupiny italských rostlin byla pozorovatelná vysoká variabilita (procenta vysvětlené variability: LDA1 73,03 %, LDA2 26,97 %). Nejvíce korelující znak s první osou byla kyselina palmitová (Tab. 11).



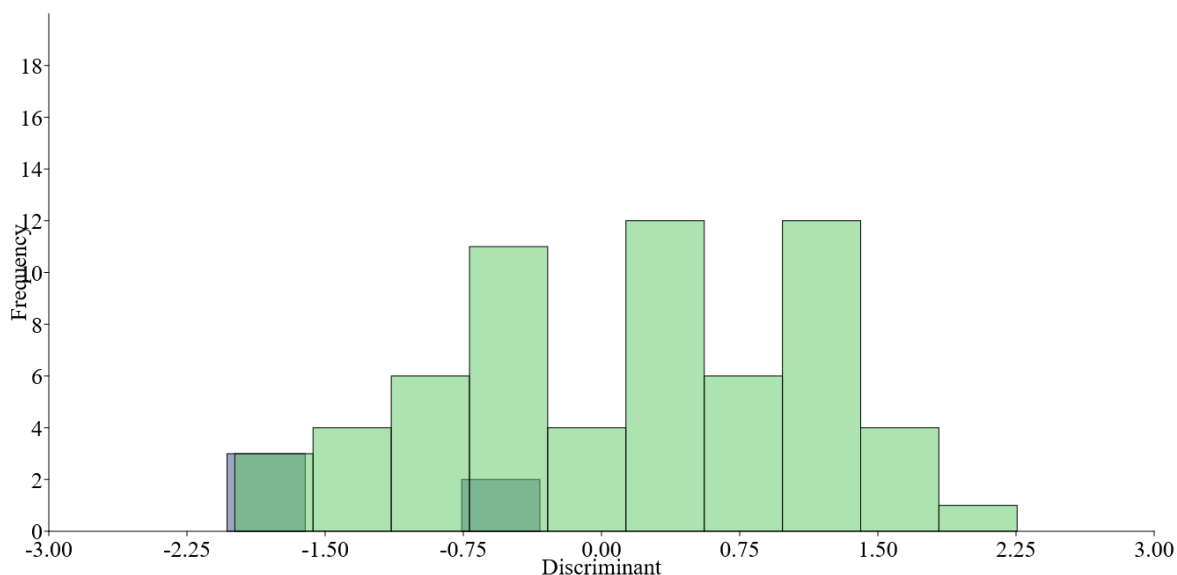
Obr. 19—Ordinační diagram lineární diskriminační analýzy (LDA4) zobrazuje metabolickou variabilitu 59 rostlin rozdělených dle regionů s párovým výskytem diploidního a tetraploidního cytotypu *U. dioica* agg. (střed Evropy=*U. dioica* subsp. *subinermis* a *U. dioica* subsp. *dioica* z jižní Moravy=žluté body; jih Evropy=*U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *dioica* z Itálie=červené body; sever Evropy=*U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica* z Finska=tyrkysově modré body). První osa vysvětlila 73,03 % a druhá 26,97 % variability.

U analýzy pátého datasetu (LDA5; 73 jedinců; Obr. 20), ve kterém je zohledněna recentní fylogeneze (Rejlová *et al.* 2021), byly vymezeny tři skupiny (*Urtica dioica* agg. bez íránských tetraploidních rostlin, íránské tetraploidní rostliny a *U. atrovirens*). První osa jasně odděluje íránské tetraploidní rostliny a *U. atrovirens*; hlavní sesterská skupina se překrývá s íránskou tetraploidní skupinou a částečně i s *U. atrovirens* (procenta vysvětlené variability: LDA1 93,18 %, LDA2 6,82 %). Nejvíce korelující znak s první osou byla kyselina kaprylová (Tab. 11).



Obr. 20 – Ordinační diagram lineární diskriminační analýzy (LDA5) zobrazuje metabolickou variabilitu 73 rostlin rozdělených do skupin vytvořených na základě recentní fylogeneze *Urtica dioica*. Na diagramu jsou znázorněny dvě „outgroupové“ skupiny (*U. dioica* subsp. *dioica* z Íránu=červené body; *U. atrovirens*=tyrkysově modré body) a hlavní sesterská skupina *Urtica dioica* agg. (tj. *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *subinermis* a *U. dioica* subsp. *dioica*=zelené body). První osa vysvětlila 93,18 % a druhá 6,82 % variability.

U analýzy šestého datasetu (LDA6; 68 jedinců; Obr. 21), ve kterém je zohledněna recentní fylogeneze (Rejlová *et al.* 2021), byly tentokrát vymezeny pouze dvě skupiny (*Urtica dioica* agg., íránské tetraploidní rostliny), outgroupová skupina *U. atrovirens* byla odstraněna z datasetu kvůli zpřesnění výsledků. Mezi dvěma skupinami byl opět pozorovatelný výrazný překryv a nejvíce korelujícím znakem s první osou byla "kyselina kafeoyl jablečná" (Caffeoylmalic acid; Tab. 11).

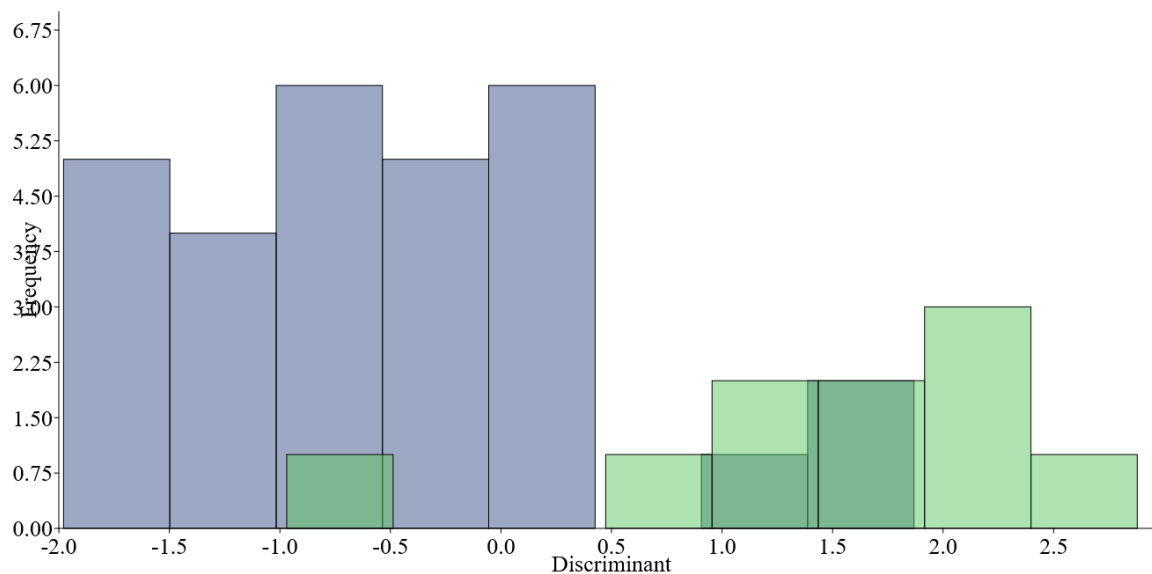


Obr. 21 – Histogram lineární diskriminační analýzy (LDA6) zobrazuje metabolickou variabilitu 68 rostlin rozdělených do dvou skupin vytvořených na základě recentní fylogeneze *Urtica dioica*. Na histogramu jsou znázorněny skupiny *U. dioica* subsp. *dioica* z Íránu=šedé sloupce a hlavní sesterská skupina *Urtica dioica* agg. (tj. *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *subinermis* a *U. dioica* subsp. *dioica*=zelené sloupce).

Tab. 11 – Korelační koeficienty 10 sloučenin LDA (A="kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*), B=rutin, C=eskulin, D=kyselina kávová, E=kyselina kapronová, F=kyselina kaprylová, G=kyselina palmitová, H=kyselina ferulová, I=kvercetin, J=kemferol). Zvýrazněné hodnoty mají nejvyšší korelaci s první a druhou osou.

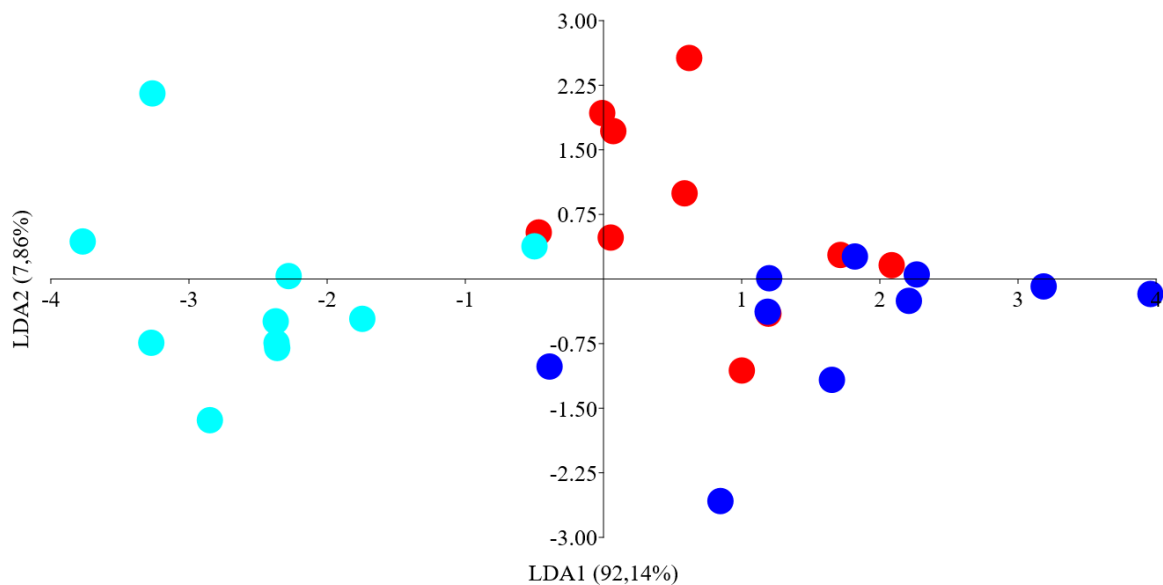
	LDA4		LDA5		LDA6
Sloučenina	LDA1 (73,03 %)	LDA2 (26,97 %)	LDA1 (93,18 %)	LDA2 (6,82 %)	LDA1
A	0.019558	0.1849	0.19045	0.050665	0.22209
B	-0.20318	-0.18194	0.027252	0.25059	0.1597
C	0.004975	0.17161	0.040254	-0.04775	0.005996
D	-0.04366	-0.0684	0.042881	0.11404	0.10676
E	-0.05615	-0.15245	0.032939	-0.00941	-0.01064
F	-0.01938	0.076651	-0.24375	0.081904	-0.16536
G	0.31157	-0.12408	0.010751	-0.17542	-0.10456
H	0.10363	0.002643	-0.02815	0.12619	0.04075
I	0.21734	-0.04909	0.024157	-0.11674	-0.04373
J	0.011189	-0.0291	-0.22246	-0.07334	-0.21265

U analýzy pro sedmý datset (LDA7; 39 jedinců; Obr. 22), kde byly vytvořeny dvě skupiny ke srovnání přirozených a uměle vytvořených tetraploidů, bylo na histogramu možné pozorovat významné odlišení těchto dvou skupin, překryv byl pouze minimální. Nejvíce korelující znak s první osou byl rutin (Tab. 12).



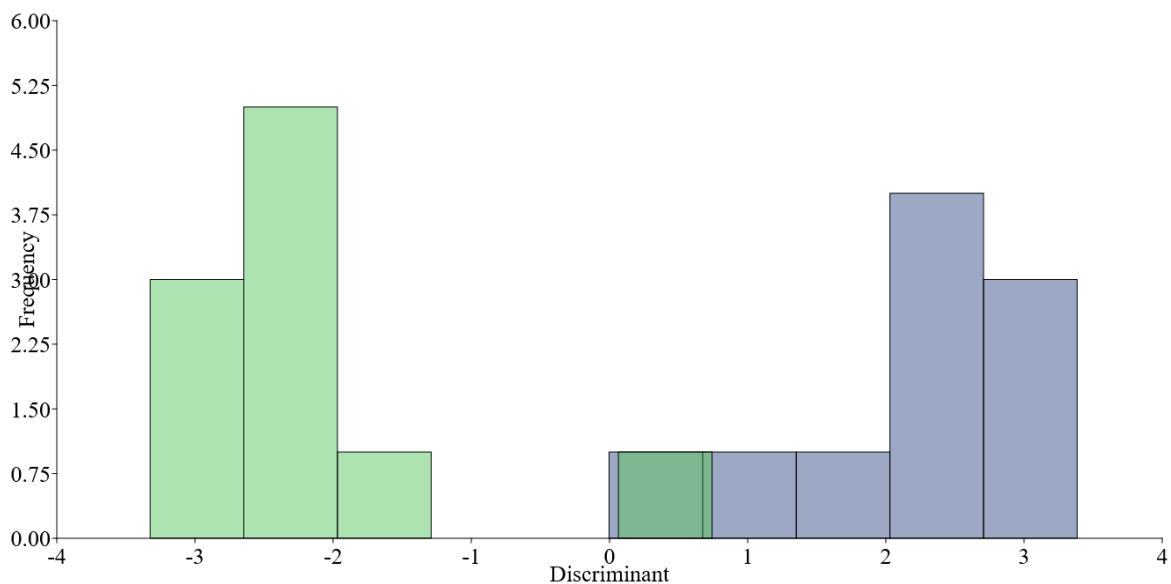
Obr. 22 – Histogram lineární diskriminační analýzy (LDA7) zobrazuje metabolomickou variabilitu 39 rostlin reprezentujících srovnání přirozených tetraploidů se syntetickou kontrolou. Na diagramu jsou znázorněny přirození tetraploidi *Urtica dioica* agg. (*U. dioica* subsp. *dioica* bez rostlin z Íránu=šedé sloupce) a synteticky vytvořené neotetraploidy (zelené sloupce).

U analýzy osmého datasetu (LDA8; 30 jedinců; Obr. 23), který byl rozdělen do tří skupin podle ploidie *Urtica dioica* agg., zahrnujícího pouze české rostliny (tj. diploidi=*U. dioica* subsp. *subinermis*; tetraploidi=*U. dioica* subsp. *dioica* z Moravy a syntetičtí neotetraploidi), je zřejmé oddělení syntetických neotetraploidů od přírodních diploidů a tetraploidů podle 1. osy a částečné oddělení přírodních diploidů a tetraploidů podle 2. osy (procenta vysvětlené variability: LDA1 92,14 %, LDA2 7,86 %). Nejvíce koreluje znak s první osou byl eskulin (Tab. 12).



Obr. 23 – Ordinační diagram lineární diskriminační analýzy (LDA8) zobrazuje metabolickou variabilitu 30 českých rostlin rozdělených podle typu cytotypu *Urtica dioica* agg. Na diagramu jsou znázorněny dva přirozené cytotypy *Urtica dioica* agg. (rodičovský diploidní taxon použitý pro přípravu syntetických neotetraploidů=*U. dioica* subsp. *subinermis*=červené body; tetraploidní taxon=*U. dioica* subsp. *dioica*=modré body) a synteticky vytvořený neotetraploidní cytotyp (tyrkysově modré body). První osa vysvětlila 92,14 % a druhá 7,86 % variability.

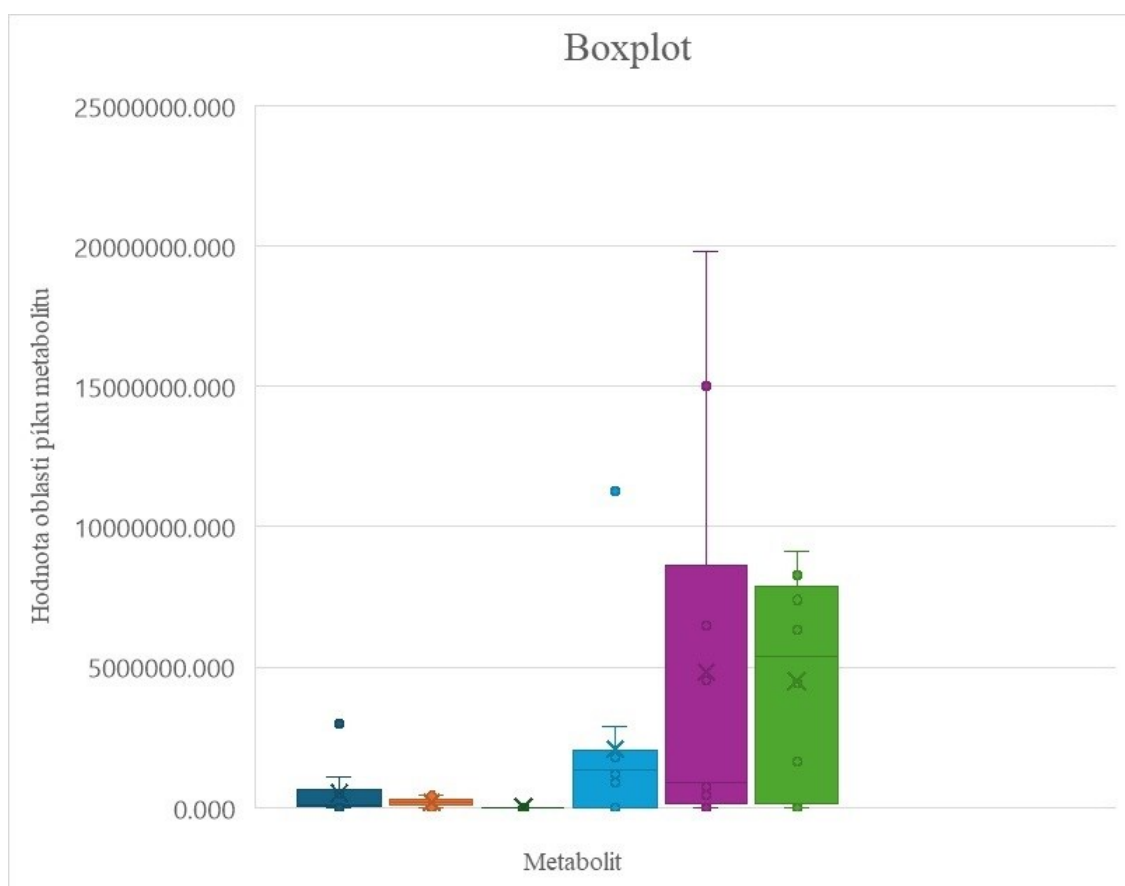
U analýzy devátého datasetu (LDA9; 20 jedinců; Obr. 24), který byl rozdělen do dvou skupin podle ploidie *Urtica dioica* agg., sloužící jako kontrola, (tj. rodičovští diploidi=*U. dioica* subsp. *subinermis* a syntetičtí neotetraploidi) bylo pozorovatelné významné odlišení těchto dvou skupin, překryv byl pouze minimální. Nejvíce korelující znak s první osou byl kvercetin (Obr. 25; Tab. 12).



Obr. 24 – Histogram lineární diskriminační analýzy (LDA9) zobrazuje metabolickou variabilitu 20 rostlin rozdělených podle typu cytotypu *Urtica dioica* agg na dvě skupiny (tj. rodičovský diploidní taxon použitý pro přípravu syntetických neotetraploidů=*U. dioica* subsp. *subinermis*=šedé sloupce a synteticky vytvořený neotetraploidní cytotyp=zelené sloupce).

Tab. 12 – Korelační koeficienty 10 sloučenin LDA (A="kyselina kafeoyl jablečná" (*Caffeoylmalic acid*), B=rutin, C=eskulin, D=kyselina kávová, E=kyselina kapronová, F=kyselina kaprylová, G=kyselina palmitová, H=kyselina ferulová, I=kvercetin, J=kemferol). Zvýrazněné hodnoty mají nejvyšší korelaci s první (a druhou) osou.

	LDA7	LDA8		LDA9
Sloučenina	LDA1	LDA1 (92,14 %)	LDA2 (7,86 %)	LDA1
A	0.025001	0.11093	0.008889	0.14867
B	-0.57291	-0.00577	-0.18631	-0.05393
C	-0.19771	0.46877	-0.23012	0.46748
D	0.13609	-0.26145	0.021529	-0.33774
E	0.21447	-0.32278	-0.0986	-0.41859
F	-0.05411	0.014231	0.31081	0.38551
G	0.089191	0.16535	0.11994	0.21129
H	0.10164	0.12221	-0.00098	0.14296
I	-0.04238	0.36446	-0.11129	0.47514
J	0.10309	-0.11927	0.074125	-0.22345



Obr. 25 – Srovnání reálných hodnot (bez logaritmizace) oblastí píků tří metabolitů nejvíce přispívajících k odlišení skupin *U. dioica* subsp. *subinermis* (tj. eskulin=tmavě modré body, kyselina kapronová=tmavě zelené body a kvercetin=fialové body) a synteticky vytvořených neotetraploidů (tj. eskulin=oranžové body, kyselina kapronová=modré body a kvercetin=zelené body). Nejvíce přispívá k rozdělení kvercetin.

7. Diskuze

Předložená práce se zabývá okruhem *Urtica dioica* a blízkými příbuznými taxony, soubor taxonů je pak doplněn kontrolou syntetických neotetraploidů. Neotetraploidní rostliny byly vytvořeny pomocí kolchicinu. V F1 generaci bylo dosaženo téměř 30 % úspěšnosti. V F2 generaci se podařilo úspěšně vytvořit soubor 13 syntetických neotetraploidních rostlin se 100% úspěšností. Celý soubor (84 rostlin) byl posléze analyzován prostřednictvím LC–MS.

Nejvýraznější odlišení skupin bylo možné pozorovat v rámci lineární diskriminační analýzy srovnáním skupin *U. atrovirens* s hlavní sesterskou skupinou/clade (tj. *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *dioica*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica*) a také mezi *U. atrovirens* a *U. dioica* subsp. *dioica* z Íránu. Je proto odůvodněné předpokládat, že největší rozdíly v obsahu sekundárních metabolitů budou na úrovni fylogeneze. Nicméně byly odhaleny trendy i v odlišnostech dalších skupin (dle ploidie a geografie). Nejméně se od sebe lišily taxonomicky definované skupiny, tj. diploidními poddruhy.

7.1. Úvod k diskuzi

Ačkoliv byl vliv polyploidie na celou řadu biologických i fyziologických vlastností rostlin zkoumán již nesčetněkrát, o vlivu polyploidie, konkrétně na obsah sekundárních metabolitů příliš biologických studií překvapivě zatím nebylo zpracováno (např. McCarthy *et al.*, 2017; Vergara *et al.*, 2017; Pradhan, Gupta & Goel, 2018). Ještě méně současných prací kromě polyploidie zkoumá také vliv geografie nebo taxonomie. Například ve studii Míka *et al.* (2005) byly použity fenolické látky jako chemické markery k objasnění taxonomie čeledi *Poaceae*. Dalším příkladem je chemotaxonomická studie, zabývající se alopolyploidním komplexem rodu *Rosa* sekce *Caninae* (Wisseemann, Riedel & Riederer, 2007) nebo studie zkoumající alopolyploidní linii *Asplenium normale* (Fujiwara *et al.*, 2017). Vliv geografie spolu s ploidii i taxonomií byl zkoumán například ve studii Jeelani *et al.* (2017) u rodu *Rumex*. Práce, která by zkoumala vliv polyploidie, geografie i taxonomie a zároveň ještě zahrnovala kontrolu v podobě syntetického polyploida snad doposud neexistuje.

7.2. Synteticky vytvořený tetraploidní cytotyp

Celková úspěšnost vytváření syntetických tetraploidů byla poměrně vysoká (29,85 %). U jiných studií (např. (Huy *et al.*, 2019; Carbajal *et al.*, 2019; Esmaeili *et al.*, 2020)), které také použily k vytvoření neopolyploidů kolchicinu byla úspěšnost nižší (2,2–19,88 %), ačkoliv například Zhang *et al.* (2024) pozoroval i vyšší úspěšnost tvorby neotetraploidů (až 45,7 %).

V porovnání s jinými mitotickými inhibitory, např. oryzalinem, je kolchicin často úspěšnější v tvorbě neopolyploidů (např. Zakizadeh, Kaviani & Hashemabadi, 2020; Marangelli *et al.*, 2022;

Fauzan *et al.*, 2024), a je proto také nejpoužívanější. Úspěšnost tvorby syntetických polyploidů však závisí na koncentraci roztoku a také optimalizaci doby jeho působení. Vzhledem k vysoké toxicitě kolchicinu hrozí při nadměrném vystavení účinkům roztoku zvýšená mortalita (vysoká koncentrace a dlouhá doba působení). Například ve studii Pavlíková *et al.* (2017) byla pozorovaná vyšší míra úmrtnosti po aplikaci 0,2 % roztoku kolchicinu při 18 hodinovém působení než po kratší době působení (12 nebo 15 hodin). V jiné studii (Ardabili, Zakaria & Zare, 2015) byla pozorována nejvyšší míra mortality při 48 hodinovém působení 0,2 % roztoku kolchicinu v porovnání s kratší dobou (8 a 24 hodin) a nižší koncentrací (0,025 %; 0,05 %; 0,1 %). Naopak při nedostatečném vystavení (nízká koncentrace a krátká doba působení) nemusí vůbec k polyploidizaci dojít. Například ve studii Surson *et al.* (2024) byla pozorována vyšší míra nezpolyloidizovaných rostlin *Centella asiatica* při působení 0,1 % roztoku kolchicinu po dobu 12 hodin než při působení stejně koncentrovaného roztoku (0,1 %) po delší dobu (24 hodin).

Je také dobré podotknout, že metodická optimalizace (výběr mitotického inhibitoru, koncentrace roztoku a doby jeho působení, typ pletiva, stáří rostliny aj.) k úspěšnému vytvoření neopolyploidů se často může lišit mezi jednotlivými druhy. Například u druhu *Echinochloa crus-galli* byli syntetičtí dodekaploidi úspěšně vytvořeni působením 0,05 % roztoku kolchicinu po dobu 48 hodin (Liu *et al.*, 2024), zatímco například u druhu *Cymbidium aloifolium* bylo k úspěšné tvorbě neotetraploidů potřeba rostliny ošetřit v 0,03 % a 0,04 % roztoku kolchicinu po dobu 8 týdnů (Taratima *et al.*, 2023). Podobně u dvou druhů jetele byla pozorována odlišná míra úspěšnosti tvorby neotetraploidů po ošetření různými mitotickými inhibitory (kolchicin, oryzalin, amiprofos-methyl a trifluarin). Zatímco u *Trifolium hybridum* vyšel neefektivněji kolchicin, u *T. pratense* vyšel efekt u všech inhibitorů (až na neefektivní trifluarin) podobně (Dabkevičienė *et al.*, 2016).

V rámci rodu *Urtica* však doposud nebyli syntetičtí polyploidi vytvářeni, a není proto možné metodické optimalizace porovnat. Koncentrace 0,2 % kolchicinového roztoku při 15 nebo 18hodinovém působení (podobně jako v Pavlíková *et al.* 2017) se nicméně ukázala být vyhovující, neboť celková úspěšnost přežití byla poměrně vysoká (36 %) a současně, vzhledem k celkové míře polyploidizace byla četnost nezpolyloidizovaných (diploidních) rostlin poměrně nízká (33,58 %). Optimalizace vycházející ze studie Pavlíková *et al.* (2017) o *Vicia cracca* tak může sloužit jako podklad k další studii zaměřené na vytvoření neotetraploidů *Urtica dioica* pomocí kolchicinu. Tato studie se však nezaměřovala na důkladné zkoumání metodické optimalizace vytváření syntetiků (hlavním cílem bylo vytvořit F2 generaci syntetických tetraploidů jako kontrolu pro metabolickou část), a nelze proto vyloučit, že by celková úspěšnost nebo míra přežití mohla být vyšší při jiné koncentraci či délce působení roztoku kolchicinu. Testování různých koncentrací v závislosti na různé době ošetření, či zkoumání vlivu jiných kultivačních podmínek může sloužit jako podnět k další studii.

Úskalím vytváření neopolyploidů může být detekce chimér (mixploidní rostliny) v první generaci. Celkové zastoupení chimér bylo relativně velké (33,58 % – stejně jako u nezpolyloidizovaných rostlin), jiné studie (např. Pavlíková, Paštová & Münzbergová, 2017; Esmaeilí *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2024) uvádějí nižší četnost (8,3 – 16,15 %). Zejména byly pozorovány kombinace diploidního a tetraploidního píku, jako uvádí také např. Pavlíková *et al.* (2017) nebo Huy *et al.* (2019). Minoritně byly však také pozorovány kombinace diploidního, tetraploidního a oktoploidního píku. K vyloučení chimér v F1 generaci byly z některých neotetraploidních rostlin (všechny rostliny použité jako rodičovská generace) podruhé změřeny

tři listy (z dolní, střední a horní části lodyhy). Kvůli velkému množství materiálu byl zbytek neotetraploidních rostlin ploidně ověřován pouze jednou a jen z jednoho listu. Analýza ploidie v F1 generaci z jedné části rostliny však není dostatečná, může zachytit pouze část chiméry a pokud je pletivo zrovna tetraploidní, může být chiméra mylně označena za neotetraploida. Není proto možné vyloučit, že úspěšnost chimér v F1 generaci není větší a úspěšnost neotetraploidů menší. Právě z důvodu nestability F1 generace je doporučováno vytvoření syntetických polyploidů zajistit F2 generaci, kde ke vzniku chimér již nedochází. V jiných studiích byly například k vyloučení chimér neotetraploidní rostliny přeměřovány pomocí průtokové cytometrie v různých fázích růstu, před a po (během) kvetení (Husband *et al.*, 2008; Maherali, Walden & Husband, 2009).

Ačkoliv byl vznik vyšších ploidních úrovní pozorován jen vzácně (hexaploidů 0,75 %; oktaploidů 2,24 %), existují i případy, kdy byly u biologických studií vyšší ploidní úrovně vytvářeny záměrně. Například u *Populus hopeiensis* byly kromě neotetraploidních rostlin vytvářeny také neooktoploidní rostliny s cílem prozkoumat vliv polyploidizace u vyšší ploidní úrovně (Wu *et al.*, 2022).

V F2 generaci bylo úspěšně vytvořeno 13 neotetraploidních rostlin. Vzhledem k malému počtu vyklíčených rostlin nebyly nalezeny jiné cytotypy, avšak jiné studie uvádí kromě neotetraploidů v F2 generaci vznik také např. triploidů či dokonce aneuploidů (Münzbergová, 2017), což by mohlo být dáno právě nezachycenými chimerickými rostlinami F1 generace. V této studii bylo riziko aneuploidie minimalizováno srovnáním velikosti genomu (poměry) F1 a F2 generace synteticky vytvořených tetraploidů s přirozenými tetraploidy. Poměry získané z vyhodnocování histogramů byly velmi blízké (rozmezí 0,55 až 0,63).

Ačkoliv má kontrola v podobě srovnání syntetických a přirozených polyploidů značný význam pro biologické studie při zkoumání polyploidie (vliv vnějších podmínek, evoluce atd. na přirozené polyploidy), pouze malá část prací ji do výzkumu doposud zahrnuje (např. Münzbergová, 2017; Spoelhof, Soltis & Soltis, 2021). Většina studií srovnává pouze přirozené polyploidy s diploidy (Church & Taylor, 2005; Barringer & Geber, 2008; Hull-Sanders *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2020; Pungaršek & Frajman, 2024), anebo pouze syntetické polyploidy s diploidy (Van Drunen & Husband, 2018; Pacey, Maherali & Husband, 2020; Mehlferber *et al.*, 2022; Anneberg, Turcotte & Ashman, 2023). To může poté ovlivnit přesnost výzkumu.

Jak uvádí některé recentní studie (Münzbergová, 2017), kromě neotetraploidů je vhodné zahrnout také jako kontrolu diploidní rostliny F2 generace po ošetření kolchicinem, jelikož je tímto způsobem možné pozorovat přímý vliv kolchicinu na fitness potomstva nezávisle na vlivu polyploidie. Do této práce nicméně nebyli kolchicinovaní diploidní jedinci z kapacitních důvodů zařazeni. Může být však podnětem pro další studie.

7.3. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC–MS)

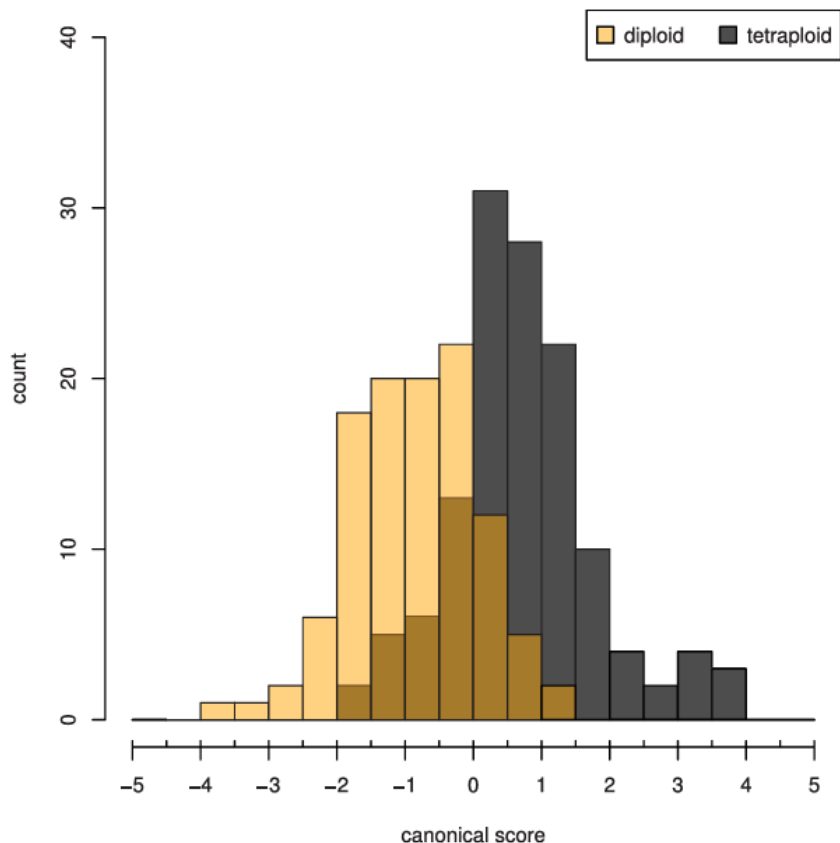
Nepřekvapivě nejvýraznější odlišení skupin bylo možné pozorovat u analýz datasetu rozděleného dle recentní fylogeneze (Rejlová *et al.*, 2021) na tři skupiny – hlavní sesterská skupina agregátu *U. dioica* (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica* bez íránských rostlin), „outgroupová“ skupina *U. atrovirens* a íránské tetraploidní rostliny (tj. *U. dioica* subsp. *dioica*) (PCA4, LDA5). Nejvíce se v rámci analýz od sebe odlišovaly skupiny rostlin *U. atrovirens* a hlavní sesterská skupina agregátu. Íránští tetraploidi se překvapivě poměrně významně překrývali s hlavní sesterskou skupinou, ačkoliv byla tato skupina pomocí molekulárních metod (Rejlová *et al.*, 2021) od ostatních rostlin hlavní sesterské skupiny odlišena. Jelikož procenta vysvětlené variability první osou LDA pátého datasetu vykazovala vysoké hodnoty, je pravděpodobné, že v rámci chemického složení jsou si tyto dvě skupiny v rámci vytipovaných metabolitů podobné (LDA1 93,18 %, %, LDA2 6,82 %). Pro kontrolu byly íránské rostliny (tj. *U. dioica* subsp. *dioica*) srovnány v rámci LDA šestého datasetu jen s hlavní sesterskou skupinou (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica* bez íránských rostlin) a ani zde nebylo pozorované odlišení skupin.

V rámci rozdělení skupin dle taxonomie, kde bylo vymezeno šest skupin – pět taxonů spadajících do hlavní sesterské skupiny agregátu (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica* včetně íránských rostlin) a „outgroupová“ skupina *U. atrovirens*, byly pozorovány u hlavních skupin výrazné překryvy. Pouze taxon *U. atrovirens* vykazoval náznak odlišení od ostatních rostlin.

Ani při rozdělení jednotlivých poddruhů hlavní sesterské skupiny na skupiny dle jejich odlišné ploidie, se od sebe cytotypy příliš nelišily. U LDA druhého datasetu, kde byly rozlišeny tetraploidní (tj. *U. dioica* subsp. *dioica* včetně íránských rostlin) a všechny diploidní rostliny (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii*) spadající do hlavní sesterské skupiny, společně se syntetickou kontrolou v podobě neotetraploidních rostlin, docházelo k výrazným překryvům. Překvapivě ani u synteticky vytvořené skupiny neotetraploidů nebylo možné pozorovat odlišení od skupin rostlin přirozených cytotypů, ačkoliv bylo v rámci syntetické kontroly (LDA7) potvrzeno jejich odlišení od etablovaného přirozeného tetraploidního cytotypu (tj. *U. dioica* subsp. *dioica* bez íránských rostlin – kvůli odstranění případného šumu; viz Rejlová *et al.*, 2021), které je možné pravděpodobně vysvětlit rozdílným evolučním stářím a s tím souvisejícími celogenomovými změnami (např. utišování genů). Je proto pravděpodobné, že příčinou vysoké variability v rámci srovnání (LDA2) by mohla být velikost datasetu (největší dataset – 78 jedinců).

U LDA osmého datasetu, kde byly zahrnuty pouze moravské diploidní (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*) a moravské tetraploidní rostliny (tj. *U. dioica* subsp. *dioica*), včetně neotetraploidů a byl tak i odstraněn případný šum v podobě odlišnosti regionů, byl náznak odlišení jednotlivých skupin již pozorován, zejména u syntetických neotetraploidů. U diploidních a tetraploidních rostlin byl pozorován částečný překryv a byly proto srovnány zvlášť v rámci LDA třetího datasetu, který však obsahoval všechny přirozené diploidní (*U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*) a tetraploidní rostliny (tj. *U. dioica* subsp. *dioica* včetně íránských rostlin). Ani v rámci této analýzy však nebylo pozorovatelné příliš významné rozdělení skupin, překryv byl

poměrně veliký. Výsledky však nejsou příliš překvapivé, neboť v recentní fylogenezi (Rejlová *et al.*, 2021) v rámci mnohorozměrné morfometrie se také nepodařilo diploidní a tetraploidní rostliny *U. dioica* pomocí diskriminační analýzy od sebe významně odlišit (Obr. 26).



Obr. 26 – Histogram diskriminační analýzy (mnohorozměrná morfometrie) zobrazuje rozdělení 2 cytotypů *U. dioica*, diploidů a tetraploidů (světle oranžová plocha=diploidní cytotyp, tmavě šedá plocha=tetraploidní cytotyp, hnědá plocha=překryv obou cytotypů). Převzato z Rejlová *et al.* (2021).

Naopak na úrovni uměle navozené polyploidie bylo možné v rámci LDA devátého datasetu pozorovat odlišení mezi rostlinami diploidního a neotetraploidního cytotypu poměrně výrazně, pouze s malým překryvem. Do srovnání byly zahrnuty z diploidních rostlin pouze *U. dioica* subsp. *subinermis*, které byly použity jako rodičovská generace pro vytvoření syntetických neotetraploidů a odlišení těchto dvou skupin tak potvrzuje, že samotná polyploidizace sama o sobě vyvolala metabolomickou změnu.

Pomocí boxplotů, zobrazujících tři sloučeniny nejvíce přispívající k rozdělení skupin diploidních rostlin *U. dioica* subsp. *subinermis* a syntetických neotetraploidů (tj. eskulin, kyselina kapronová, kvercetin), bylo navíc zjištěno, že s polyploidizací u některých sloučenin (tj. kyselina kapronová) došlo k navýšení jejich obsahu a u některých naopak ke snížení (tj. eskulin a kvercetin) jejich obsahu (v rámci jiných srovnání boxploty dělány nebyly, protože to nebylo relevantní pro tuto studii). Nicméně změny v obsahu sekundárních metabolitů vlivem uměle navozené celogenomové duplikace jsou často látkově specifické, a proto může u některých látek docházet k jejich navýšení, zatímco u jiných k jejich snížení. Například ve studii o *Thymus vulgaris* (Homaidan Shmeit *et al.*, 2020) byl při srovnání diploidních rodičovských

rostlin se synteticky vytvořenými neotetraploidy s polyploidizací pozorován nárůst metabolitů thymol a karvakrol, naopak u cymenu a terpinenu byly pozorovány hodnoty vyšší u diploidů.

Ani v rámci rozdělení dle geografie hlavní skupiny dle tří oblastí párového výskytu jejich diploidních a tetraploidních populací (Itálie, Morava, Finsko) se významně nepodařilo skupiny od sebe odlišit. U LDA čtvrtého datasetu bylo možné pozorovat pouze výrazné překryvy. Je však zajímavé, že v rámci skupiny rostlin italské populace byla pozorovatelná variabilita vyšší v porovnání s dalšími dvěma skupinami. Vzhledem k tomu, že tetraploidní rostliny italské populace byly sbírány ve vysoké nadmořské výšce (1295 m n. m.), zatímco diploidi výrazně níže (320 m n. m.), je pravděpodobné, že v reakci na odlišné vnější podmínky došlo u některých vytipovaných metabolitů ke změně a způsobilo tak vyšší variabilitu mezi cytotypy. U populací z Finska a Moravy se nadmořská výška místa výskytu diploidních a tetraploidních rostlin příliš nelišila a variabilita v rámci metabolitů byla menší. Například ve studii Gautam *et al.* (2019) byla také pozorována u *U. dioica* změna v obsahu sekundárních metabolitů (fenolické látky) se změnou nadmořské výšky. I vzhledem ke snadné ovlivnitelnosti některých sekundárních metabolitů vnějším prostředím je proto doporučované sjednocení kultivační podmínek pokusu.

Sekundární metabolity pravděpodobně mohou i podléhat změnám v reakci na různé vnitřní jevy (tj. utišování genů či jiné genomické změny). Například na úrovni celogenomové multiplikace očividně některé z vytipovaných metabolitů (tj. nejvíce korelující metabolit s první osou LDA3= rutin), vykazují mezi přirozenými cytotypy vyšší variabilitu a analyzované skupiny náznakem rozlišují, avšak nelze vyloučit, že by třeba jiné vytipované metabolity skupiny odlišily ještě lépe. Výstup analýzy LC–MS umožňuje dále pracovat s řádově desítkami metabolitů. Vytipování metabolitů, které by vykazovaly vyšší variabilitu například i mezi taxony může být podklad pro další studie. Nicméně variabilita v datech při práci s metabolity je poměrně častá. Například Farag *et al.* (2013) také pozoroval variabilitu v rámci bioaktivity rodu *Urtica*, v jiné studii (Regalado Gonzalez *et al.*, 2017) byla pozorována variabilita v rámci srovnání hexaploidního (6x) a dodekaploidního (12x) cytotypu *Asparagus maritimus* na kvantitativní i kvalitativní úrovni změny obsahu metabolitů (tj. obsah některých metabolitů byl s polyploidii navýšen a některých snížen).

Při práci s nevytipovanými metabolity (tzv. "untargeted" přístup) je výhodné, že není potřeba nijak příliš optimalizovat metodiku (jen např. výběr extraktantu, který odpovídá skupinám metabolitů v dané rostlině). Metoda LC–MS je často používaná kvůli možnosti práce s celou řadou skupin metabolitů a je také poměrně rychlá a snadná. V rámci rodu *Urtica* byla také například použita ve studii Farag *et al.* (2013) nebo přímo u druhu *Urtica dioica* ve studii Brahmī-Chendouh *et al.* (2021). Mastné kyseliny (z vytipovaných metabolitů v této studii to jsou: kyselina kapronová, kyselina kaprylová, kyselina palmitová), jsou často zkoumány také pomocí plynové chromatografie, jak uvádí např. Guil-Guerrero *et al.* (2003) ve studii o *Urtica dioica*.

Problémem práce s nevytipovanými metabolity však může být obrovské množství nalezených sloučenin, které je pak nutné zpracovat v rámci složitějších analýz, například v rámci programu MetaboAnalyst (dostupné z: <https://www.metaboanalyst.ca/>), jako to udělali např. u *Oryza sativa* (Turhadi *et al.*, 2023). V této studii byl ke zpracování primárních dat využito software Compound Discoverer 3.3 SP3. Navzdory své multifunkčnosti a poměrně časové nenáročnosti zpracování dat nenabízí však spolehlivou anotaci všech sloučenin, a ty je proto nutné ručně anotovat (pomocí databáze jako např. Lotus – dostupné z: <https://lotus.naturalproducts.net/>) a to je při práci s takovým množstvím metabolitů obtížné.

Řada chemických prací při studiu fytochemických metabolitů pracuje proto s vytipovanými metabolity (např. Wongwad *et al.*, 2024). Řešením však může být i vytipovat z velkého množství

nalezených sloučenin přístrojem pouze určitý počet metabolitů a na ně se jen zaměřit, jak to bylo uděláno v této práci.

Další nevýhodou softwaru Compound Discoverer 3.3 SP3 je například omezená konfigurace v rámci statistických analýz. Program automaticky vyhotoví analýzy (např. PCA), ale nenabízí možnost s nimi nijak výrazně pozměňovat. Data pro deset vybraných metabolitů (tj. velikost oblasti jejich píků v rámci chromatogramu) byla proto exportována a dále analyzována v jiném, jednodušším statistickém programu, Past.

Podobně jako v jiných fytochemických studiích, byla data nejdříve předběžně analyzována v rámci analýzy hlavních komponent a poté kvůli větší přesnosti výsledků byla ještě analyzována pomocí analýzy s vyšší výpovědní hodnotou (v této studii byla použita lineární diskriminační analýza). Farag *et al.* (2013) například použil k názornějšímu odlišení skupin rodu *Urtica* hierarchickou shlukovací analýzu.

7.4. *Urtica dioica* agg.

Navzdory množství fylogenezí, které vzniklo pro *Urtica dioica* agg. (Henning *et al.*, 2014; Grosse-Veldmann *et al.*, 2016; Rejlová *et al.*, 2019; Rejlová *et al.*, 2021) zůstává jeho struktura stále z velké části nedořešená. Hlavní otázkou zůstává, zda je udržitelný současný taxonomický koncept jednotlivých poddruhů (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica*), které spolehlivě nebylo možné od sebe odlišit ani na metabolomické úrovni. Je překvapivé, jak málo se diploidní poddruhy mezi sebou liší, přestože mají převážně ostrůvkovitý reliktní výskyt, ale také, jak málo se liší od tetraploidní sesterské skupiny (Rejlová *et al.*, 2021). Jelikož dosavadní biosystematické studie (užitím např. morfometriky a sekvenování Hyb-Seq – Rejlová *et al.*, 2021), včetně i této metabolomické, naznačují, že současný taxonomický koncept neodpovídá reálné struktuře tohoto široce pojatého agregátu, je pravděpodobné, že by měl být tento koncept možná znovu revidován.

Kromě poddruhů v rámci hlavní sesterské skupiny, některé fylogeneze nedokázaly rozlišit v rámci agregátu ani další skupiny, jako např. *U. kioviensis*. Autoři některých fylogenezí vysvětlují jako důvod neúspěchu molekulárních metod rozlišit skupiny v rámci agregátu např. genový tok (Rejlová *et al.*, 2021) nebo opakovanou polyploidizaci.

Například Grosse-Veldmann *et al.* (2016) zahrnuje na základě molekulárních markerů do euroasijské skupiny *U. dioica* agg., včetně samotné *U. dioica* (bez *U. dioica* subsp. *cypria*) také *U. kioviensis*. Zařazení *U. kioviensis* do okruhu *U. dioica* potvrzuje na základě kombinované metody molekulárních analýz a analýzy obsahu sekundárních metabolitů i jediná chemotaxonomie rodu *Urtica* (Farag *et al.*, 2013). Oddělení *U. dioica* subsp. *cypria* od *U. dioica* potvrzuje na základě odlišné velikosti genomu i např. fylogeneze Rejlová *et al.* (2019), která však také vyjímá z okruhu *U. dioica* taxon *U. kioviensis*. *Urtica atrovirens* byla potvrzena jako sesterská skupina okruhu *U. dioica* studií Grosse-Veldmann *et al.* (2016), což potvrzuje i na úrovni velikosti genomu Rejlová *et al.* (2019) a v rámci chemotaxonomie i Farag *et al.* (2013). V recentní fylogenezi (Rejlová *et al.*, 2021) byla na základě molekulárních analýz vymezena z hlavní sesterské skupiny *U. dioica* agg. (tj. *U. dioica* subsp. *sondenii*, *U. dioica* subsp. *dioica*, *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens* a *U. dioica* subsp. *kurdistanica*) *U.*

dioica subsp. *dioica* s výskytem v Íránu. Tato fylogeneze zároveň potvrzuje příbuznost sesterských skupin *U. atrovirens* a *U. kioviensis* s *U. dioica*. Tato recentní fylogeneze byla zohledněna při vytváření designu práce, *U. kioviensis* však zahrnuta nebyla, a to kvůli podezření z rozsáhlé hybridizace (Urfus *et al. unpubl.*).

Záměrem práce bylo otestovat vliv polyploidie na obsah sekundárních metabolitů v agregátu *Urtica dioica* s přihlédnutím také ke vlivu geografie či taxonomie na obsah těchto látek. Vliv polyploidie ani geografie na obsah vytipovaných sekundárních metabolitů v rostlinách jednoznačně potvrzen nebyl. Je pravděpodobné, že na rozdílném metabolomickém složení mezi taxony agregátu má největší vliv jejich fylogenetická příbuznost. Na druhou stranu se však jasně ukázal rozdíl při srovnání diploidních rostlin a z nich vzniklých syntetických tetraploidů, takže samotná polyploidizace na složení sekundárních metabolitů vliv má.

7.5. Budoucí směry

Tato práce může sloužit jako předběžná studie, zkoumající metabolomiku složitěho agregátu *U. dioica* a zahrnuje i rozsáhlý soubor dat, na kterém se dá dále pracovat. Byla by například vhodná anotace metabolitů nalezených v rámci softwaru Compound Discoverer pro pokročilé analýzy. Analýza sekundárních metabolitů by mohla být provedena i v rámci jiného programu, který nabízí více možností oproti současnému softwaru Compound Discoverer, například MZmine (postup zpracování dat je možné čerpat z: Mutabdzija *et al.*, 2024). V navazujících pracích by bylo také vhodné se více soustředit na vytipování zkoumaných metabolitů, tak aby byly mezi druhy co nejvíce variabilní. Pro přehlednější statistické analýzy by také mohly být použity složitější statistické softwary, jako např. R nebo např. v rámci programu MetaboAnalyst (dostupné z: <https://www.metaboanalyst.ca/>). Následující studie by se také mohly soustředit ve větší míře na kvantitativní studium metabolitů, například zjistit i kolik obsahuje daná skupina rostlin vytipovaného metabolitu.

8. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zodpovědět následující otázky:

1. Liší se cytotypy *Urtica dioica* agg. na úrovni složení sekundárních metabolitů?
2. Má syntetický neotetraploidní cytotyp srovnatelné složení sekundárních metabolitů s přirozenými tetraploidy?
3. Souvisí složení sekundárních metabolitů s odlišnou geografíí a/nebo taxonomií?

Výsledky této práce naznačují, že rostliny zahrnuté do hlavní skupiny (tj. *U. dioica* subsp. *subinermis*, *U. dioica* subsp. *pubescens*, *U. dioica* subsp. *kurdistanica*, *U. dioica* subsp. *sondenii* a *U. dioica* subsp. *dioica*) široce pojatého agregátu *U. dioica* si jsou velmi blízce příbuzné neboť ani na metabolomické úrovni se je mezi sebou nepodařilo nijak významně odlišit. Potvrzují tak recentní fylogenezi tohoto agregátu (Rejlová *et al.*, 2021).

Ačkoliv zjevně existují metabolity (tj. nejvíce korelující znak s první osou LDA3= rutin), které souvisí s náznakem odlišení rostlin diploidního a tetraploidního cytotypu *U. dioica*, není vyloučeno, že vytipováním metabolitů, které patří do jiných funkčních skupin by bylo možné variabilitu v rámci srovnání skupin snížit. Tato práce však byla koncipována pouze jako předběžná studie a poskytuje tak první data na úrovni komplexního metabolomu rostlin *U. dioica* agg. určená pro další výzkum.

Vliv duplikace genomu na obsah sekundárních metabolitů byl však v této práci potvrzen na úrovni syntetických neotetraploidů v rámci odlišení od diploidních rostlin rodičovské generace *U. dioica* subsp. *subinermis*. Bylo také potvrzeno, že se od sebe na metabolomické úrovni odlišují rostliny přirozených tetraploidů od neotetraploidů.

Zdá se, že oba cytotypy *U. dioica* agg. není možné rozlišit na metabolomické úrovni ani vzhledem k odlišné oblasti výskytu jejich párových populací (jih, střed a sever Evropy). Ani mezi jednotlivými taxony nebylo možné v rámci analýz pozorovat náznak odlišení.

Jelikož dosavadní fylogenetické studie, včetně i této metabolomické, naznačují, že současný taxonomický koncept neodpovídá reálné struktuře tohoto široce pojatého agregátu, je pravděpodobné, že by měl být tento koncept možná znovu revidován.

9. Seznam použité literatury

- Anneberg T., Turcotte M. & Ashman, T. (2023):** Plant neopolyploidy and genetic background differentiate the microbiome of duckweed across a variety of natural freshwater sources. – *Molecular Ecology* 32: 5849–5863.
- Ardabili G. S., Zakaria R. A. & Zare N. (2015):** In vitro induction of polyploidy in *Sorghum bicolor* L. – *Cytologia* 80: 495–503.
- Avery G. S. & Pottorf L. (1945):** Polyploidy, auxin and nitrogen in green plant tissue. – *American Journal of Botany* 32: 669–671.
- Baack E. J. & Stanton M. L. (2005):** Ecological factors influencing tetraploid speciation in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*): Niche differentiation and tetraploid establishment. – *Evolution* 59: 1936–1944.
- Baduel P., Bray S., Vallejo-Marin M., Kolář F. & Yant L. (2018):** The “polyploid hop”: Shifting challenges and opportunities over the evolutionary lifespan of genome duplications. – *Frontiers in Ecology and Evolution* 6.
- Balasundram N., Sundram K. & Samman S. (2006):** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. – *Food Chemistry* 99: 191–203.
- Barker M. S., Arrigo N., Baniaga A. E., Li Z. & Levin, D. A. (2016):** On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. – *New Phytologist* 210: 391–398.
- Barringer B. C. & Geber M. A. (2008):** Mating system and ploidy influence levels of inbreeding depression in *Clarkia* (*Onagraceae*). – *Evolution* 62: 1040–1051.
- Blakeslee A. F. (1941):** Effect of induced polyploidy in plants. – *The American Naturalist* 75: 117–135.
- Brahmachari G. (2019):** Discovery and development of therapeutics from natural products against neglected tropical diseases. – Chantilly, U.S.: Elsevier.
- Brahmi-Chendouh N., Piccolella S., Nigro E., Hamri-Zeghichi S., Madani K., Daniele A. & Pacifico S. (2021):** *Urtica dioica* L. leaf chemical composition: A never-ending disclosure by means of HR-MS/MS techniques. – *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 195: 113892.
- Bretagnolle F. & Thompson J. D. (1995):** Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. – *New Phytologist* 129: 1–22.
- Bretagnolle F., Thompson J. D. & Lumaret R. (1995):** The influence of seed size variation on seed germination and seedling vigour in diploid and tetraploid *Dactylis glomerata* L. – *Annals of Botany* 76: 607–615.
- Brochmann C., Brysting A. K., Alsos I. G., Borgen L., Grundt H. H., Scheen A.-C. & Elven R. (2004):** Polyploidy in arctic plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 521–536.

Bräutigam G. L. (2019): Kopřiva, Recepty pro zdraví, krásu a vitalitu. – Grada Publishing a. s.

Carbajal E. M., Zuleta M. C., Swayzer L., Schwartz B. M., Chavarro M. C., Ballen-Taborda A. C. & Milla-Lewis S. R. (2019): Development of colchicine-induced tetraploid St. Augustinegrass (*Stenotaphrum secundatum*) line. – Plant Breeding 138: 958–966.

Caruso I., Lepore L., De Tommasi N., Dal Piaz F., Frusciante L., Aversano R., Garramone R. & Carpato D. (2011): Secondary metabolite profile in induced tetraploids of wild *Solanum commersonii* Dun. – Chemistry and Biodiversity 8: 2226–2237.

Castro M., Castro S. & Loureiro J. (2018): Production of synthetic tetraploids as a tool for polyploid research. – Web Ecology 18: 129–141.

Cavalier-Smith T. (1978): Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate and the solution of the DNA C-value paradox. – Journal of Cell Science 34: 247–278.

Čertner M., Fenclová E., Kúr P., Kolář F., Koutecký P., Krahulcová A. & Suda J. (2017): Evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations in an annual herb: dispersal, local persistence and recurrent origins of polyploids. – Annals of Botany 120: 303–315.

Cheeseman T. (1925): *Urticaceae*. – Manual of the New Zealand flora 2: 380–382.

Chrtek J. (1979): Bemerkungen zur Gliederung der Gattung *Urtica* L. – Folia Geobotanica & Phytotaxonomica 14: 265–266.

Church S. A. & Taylor D. R. (2005): Speciation and hybridization among *Houstonia* (*Rubiaceae*) species: the influence of polyploidy on reticulate evolution. – American Journal of Botany 92: 1372–1380.

Comai L. (2005): The advantages and disadvantages of being polyploid. – Nature Reviews 6: 836–846.

Dabkevičienė G., Statkeviciute G., Mikaliūnienė J., Norkevičienė E. & Kemesyte V. (2016): Production of *Trifolium pratense* L. and *T. hybridum* L. tetraploid populations and assessment of their agrobiological characteristics. – Zemdirbyste-Agriculture 103: 377–384.

Dhooghe E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L. & Van Huylenbroeck J. (2011): Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 104: 359–373.

Dixon R. A. & Dickinson A. J. (2024): A century of studying plant secondary metabolism – From “what?” to “where, how and why?”. – Plant Physiology 195: 48–66.

Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nature Protocols 2: 2233–2244.

Đurović S., Kojić I., Radić D., Smyatskaya Y.A., Bazarnova J.G., Filip S. & Tosti T. (2024): Chemical constituents of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A comprehensive review on phenolic and polyphenolic compounds and their bioactivity. – International Journal of Molecular Sciences 25.

Edger P. P., Heidel-Fischer H. M., Bekaert M., Rota J., Glöckner G., Platts A. E., Heckel D. G., Der J. P., Wafula E. K., Tang M., Hofberger J. A., Smithson A., Hall J. C., Blanchette M., Bureau T. E., Wright S. I., Depamphilis C. W., Eric Schranz M., Barker M. S., Conant G. C., Wahlberg N., Vogel H., Pires J. C. & Wheat C. W. (2015): The butterfly plant arms-race escalated by gene and genome duplications. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 8362–8366.

El Haouari M., Bnouham M., Bendahou M., Aziz M., Ziyyat A., Legssyer A. & Mekhfi H. (2006): Inhibition of rat platelet aggregation by *Urtica dioica* leaves extracts. – *Phytotherapy Research* 20: 568–572.

Erb M. & Kliebenstein D. J. (2020): Plant secondary metabolites as defenses, regulators and primary metabolites: The blurred functional trichotomy. – *Plant Physiology* 184: 39–52.

Esmaili G., Van Laere K., Muylle H. & Leus L. (2020): Artificial chromosome doubling in allotetraploid *Calendula officinalis*. – *Frontiers in Plant Science* 11.

Exarchou V., Fiamegos Y. C., van Beek T. A., Nanos C. & Vervoort J. (2006): Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. – *Journal of Chromatography A* 1112: 293–302.

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: 170–183.

Fauzan Y., Supriyanto Mulyono J. & Tajuddin T. (2024): The effectiveness of colchicine and oryzalin on polyploidy induction in teak (*Tectona grandis* Linn. f.) in vitro. – *Indonesian Journal of Forestry Research* 11: 1–15.

Friis I. (1993): *Urticaceae*. – In: **Kubitzki, K., Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (eds.)**, Flowering plants · Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. – Berlin, Heidelberg: Springer, 612–630.

Fujiwara T., Uehara A., Iwashina T., Matsumoto S., Chang Y. H., Chao Y. S. & Watano Y. (2017): Allotetraploid cryptic species in *Asplenium normale* in the Japanese Archipelago, detected by chemotaxonomic and multi-locus genotype approaches. – *American Journal of Botany* 104: 1390–1406.

Gantait S. & Mukherjee E. (2021): Induced autopolyploidy – a promising approach for enhanced biosynthesis of plant secondary metabolites: an insight. – *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology* 19: 13.

Gautam V. K., Datta M. & Baldi A. (2019): Effect of geographical and seasonal variations on phenolic contents and antioxidant activity of aerial parts of *Urtica dioica* L. – *Current Traditional Medicine* 5: 159–167.

Gaynor M. L., Lim-Hing S. & Mason C. M. (2020): Impact of genome duplication on secondary metabolite composition in non-cultivated species: a systematic meta-analysis. – *Annals of Botany* 126: 363–376.

- Geiser C., Mandáková T., Arrigo N., Lysak M. A. & Parisod C. (2016):** Repeated whole-genome duplication, karyotype reshuffling and biased retention of stress-responding genes in buckler mustard. – *The Plant Cell* 28: 17–27.
- Geltman D. V. (1998):** New species and new combinations of *Urtica* (*Urticaceae*) from South America. – *Novon* 8: 15–17.
- Goyal M. R., Rasul Suleria H. A., Olabode Ayeleso A., Joel T. J. & Kumar Panda S. (2019):** The therapeutic properties of medicinal plants: Health-rejuvenating bioactive compounds of native flora. – Milton, United Kingdom: Apple Academic Press.
- Grant V. (1981):** Plant Speciation. – Columbia University Press.
- Gross K. & Schiestl F. P. (2015):** Are tetraploids more successful? Floral signals, reproductive success and floral isolation in mixed-ploidy populations of a terrestrial orchid. – *Annals of Botany* 115: 263–273.
- 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.
- Guil-Guerrero J., Reboloso-Fuentes M. & Isasa M. (2003):** Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). – *Journal of Food Composition and Analysis* 16:111–119.
- Hahn S. K., Bai V. K. & Asiedu R. (1992):** Spontaneous somatic tetraploids in cassava. – *Japanese Journal of Breeding* 42: 303–308.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P.D. (2001):** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- Harborne J. B. (1998):** *Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis*, ed. 3. – London etc., Chapman and Hall.
- Hegi G. (1990):** *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, ed. 4. – 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: 61–83.
- Heslop-Harrison J. S. P., Schwarzacher T. & Liu Q. (2023):** Polyploidy: its consequences and enabling role in plant diversification and evolution – *Annals of Botany* 131: 1–10.
- Homaidan Shmeit Y., Fernández E., Nový P., Klouček P., Orosz M. & Kokoška L. (2020):** Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. – *Scientia Horticulturae* 263.
- Hull-Sanders H. M., Johnson R. H., Owen H. A. & Meyer G. A. (2009):** Influence of polyploidy on insect herbivores of native and invasive genotypes of *Solidago gigantea* (*Asteraceae*). – *Plant Signaling and Behavior* 4: 893–895.
- Husband B. C., Ozimec B., Martin S. L. & Pollock L. (2008):** Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: Current trends and insights from synthetic polyploids. – *International Journal of Plant Sciences* 169: 195–206.

Huy N. P., Tam D. T. T., Luan V. Q., Tung H. T., Hien V. T., Ngan H. T. M., Duy P. N. & Nhut D. T. (2019): In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. – *Scientia Horticulturae* 252: 283–290.

Jahodář L. (2022): Farmaceuticky významné semenné rostliny. – Praha: Charles University in Prague, Karolinum Press.

Jeelani S., Farooq U., Gupta A. & Lattoo S. (2017): Phytochemical evaluation of major bioactive compounds in different cytotypes of five species of *Rumex* L. – *Industrial Crops and Products* 109: 897–904.

Jiao Y., Wickett N. J., Ayyampalayam S., Chanderbali A. S., Landherr L., Ralph P. E., Tomsho L. P., Hu Y., Liang H., Soltis P. S., Soltis D. E., Clifton S. W., Schlarbaum S. E., Schuster S. C., Ma H., Leebens-Mack J. & dePamphilis C. W. (2011): Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. – *Nature* 473: 97–100.

Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds) (2021): Klíč ke květeně České republiky. Druhé, aktualizované a zcela přepracované vydání Klíče ke květeně České republiky z roku 2002. – Praha: Academia.

Kim S., Rayburn A. L., Boe A. & Lee D. K. (2012): Neopolyploidy in *Spartina pectinata* Link: 1. Morphological analysis of tetraploid and hexaploid plants in a mixed natural population. – *Plant Systematics & Evolution* 298: 1073–1083.

Kregiel D., Pawlikowska E. & Antolak H. (2018): *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary Properties. – *Molecules* 23: 1664.

Kulkarni R. & Ravindra N. (1988): Resistance to *Pythium aphanidermatum* in diploids and induced autotetraploids of *Catharanthus roseus*. – *Planta Medica* 54: 356–359.

Lavania U. C., Srivastava S., Lavania S., Basu S., Misra N. K. & Mukai Y. (2012): Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. – *The Plant Journal* 71: 539–549.

Li W. L., Berlyn G. P. & Ashton P. M. S. (1996): Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*). – *American Journal of Botany* 83: 15–20.

Li Z., Defoort J., Tasdighian S., Maere S., Van De Peer Y. & De Smet R. (2016): Gene duplicability of core genes is highly consistent across all Angiosperms. – *The Plant Cell* 28: 326–344.

Lichman B. R., Godden G. T. & Buell C. R. (2020): Gene and genome duplications in the evolution of chemodiversity: perspectives from studies of *Lamiaceae*. – *Current Opinion in Plant Biology* 55: 74–83.

Liu K., Zhou X., Wang W., Wu X., Zhao Z., Yang X., Feng Z., Lv P., Wang J., Zhu W., Zhang X., He Y., Cai D. & Song Z. (2024): Identification and characterization of autoallododecaploid barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* L.) induced by *in vitro* colchicine treatment. – *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*.

- Liu N., Zeller F. J. & Chen Q.-F. (2013):** The flavonoid content in leaves and inflorescences of the wild perennial *Fagopyrum cymosum* complex. – Genetic resources and Crop Evolution 60: 825–838.
- Liu S., Chen S., Chen Y., Guan Z., Yin D. & Chen F. (2011):** In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. – Scientia Horticulturae 127: 411–419.
- Luštinec J. & Žárský V. (2003):** Úvod do fyziologie vyšších rostlin. – Praha: Karolinum.
- Maherali H., Walden A. E. & Husband B. C. (2009):** Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. – New Phytologist 184: 721–731.
- Mandáková T. & Lysak M. A. (2018):** Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. – Current Opinion in Plant Biology 42: 55–65.
- Marangelli F., Pavese V., Vaia G., Lupo M., Bashir M., Cristofori V. & Silvestri C. (2022):** In vitro polyploid induction of highbush blueberry through *de novo* shoot organogenesis. — Plants (Basel) 11.
- Mccarthy E. W., Arnold S. E. J., Chittka L., Le Comber S. C., Verity R., Dodsworth S., Knapp S., Kelly L. J., Chase M. W., Baldwin I. T., Kovařík A., Mhiri C., Taylor L. & Leitch A. R. (2015):** The effect of polyploidy and hybridization on the evolution of floral colour in *Nicotiana* (*Solanaceae*). – Annals of Botany 115: 1117–1131.
- Mccarthy E. W., Berardi A. E., Smith S. D. & Litt A. (2017):** Related allopolyploids display distinct floral pigment profiles and transgressive pigments. – American Journal of Botany 104: 92–101.
- Mehlferber E., Song M., Pelaez J., Jaenisch J., Coate J., Koskella B. & Rothfels C. (2022):** Polyploidy and microbiome associations mediate similar responses to pathogens in *Arabidopsis*. – Current Biology 32: 2719–+.
- Merah O., Djazouli Z. E. & Zebib B. (2021):** Aqueous Extract of Algerian Nettle (*Urtica dioica* L.) as Possible Alternative Pathway to Control Some Plant Diseases. – Iranian Journal of Science & Technology Transaction 45: 463–468.
- Meyerson L., Cronin J., Bhattarai G., Brix H., Lambertini C., Lučanová M., Rinehart S., Suda J. & Pyšek P. (2016):** Do ploidy level and nuclear genome size and latitude of origin modify the expression of *Phragmites australis* traits and interactions with herbivores? – Biological Invasions 18: 2531–2549.
- Mutabdžija L., Myoli A., de Jonge N. F., Damiani T., Schmid R., van der Hooft J. J. J., Tugizimana F. & Pluskal T. (2024):** Studying plant specialized metabolites using computational metabolomics strategies. – Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 2788: 97–136.
- Míka V., Kubáň V., Klejdus B., Odstrčilová V. & Nerušil P. (2005):** Phenolic compounds as chemical markers of low taxonomic levels in the family *Poaceae*. – Plant, Soil and Environment 51: 506–512.
- Müntzing A. (1936):** The evolutionary significance of autoploidy. – Hereditas 21: 363–378.

- Münzbergová Z. (2006):** Ploidy level interacts with population size and habitat conditions to determine the degree of herbivory damage in plant populations. – *Oikos* 115: 443–452.
- Münzbergová Z. (2017):** Colchicine application significantly affects plant performance in the second generation of synthetic polyploids and its effects vary between populations. – *Annals of Botany* 120: 329–339.
- Nahata A. & Dixit V. K. (2012):** Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. – *Andrologia* 44: 396–409.
- Neenu M. G., Aswathi A., & Prasath D. (2024):** Synthetic polyploidy in spice crops: A review. – *Crop Science* 64: 2–23.
- Nováček F. (1986):** *Fytochemické základy botaniky.* – Olomouc: Univerzita Palackého.
- Osborn T., Pires J., Birchler J., Auger D., Chen Z., Lee H., Comai L., Madlung A., Doerge R., Colot V. & Martienssen R. (2003):** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. – *Trends in Genetics* 19: 141–147.
- Oswald B. P. & Nuismer S. L. (2007):** Neopolyploidy and pathogen resistance. – *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 2393–2397.
- Pacey E. K., Maherali H. & Husband B. C. (2020):** The influence of experimentally induced polyploidy on the relationships between endopolyploidy and plant function in *Arabidopsis thaliana*. – *Ecology & Evolution* 10: 198–216.
- Pandit M., Pockock M. & Kunin W. (2011):** Ploidy influences rarity and invasiveness in plants. – *Journal of Ecology* 99: 1108–1115.
- Papp M. (1987):** A six year study of a secondary succession after deforestation in North Hungary. – *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 22: 405–413.
- Parida B. & Misra B. (2015):** Is a plant's ploidy status reflected in its metabolome? – *Journal of Postdoctoral Research* 3: 1–11.
- Parisod C., Holderegger R. & Brochmann C. (2010):** Evolutionary consequences of autopolyploidy. – *New Phytologist* 186: 5–17.
- Pavlíková Z., Pařtová L. & Münzbergová Z. (2017):** Synthetic polyploids in *Vicia cracca*: methodology, effects on plant performance and aneuploidy. – *Plant Systematics and Evolution* 303: 827–839.
- Plomion C., Aury J.-M., Amselem J., Leroy T., Murat F., Duplessis S., Faye S., Francillon N., Labadie K., Le Provost G., Lesur I., Bartholomé J., Faivre-Rampant P., Kohler A., Leplé J.-C., Chantret N., Chen J., Diévar A., Alaeitabar T., Barbe V., Belser C., Bergès H., Bodénès C., Bogeat-Triboulot M.-B., Bouffaud M.-L., Brachi B., Chancerel E., Cohen D., Couloux A., Da Silva C., Dossat C., Ehrenmann F., Gaspin C., Grima-Pettenati J., Guichoux E., Hecker A., Herrmann S., Huguéney P., Hummel I., Klopp C., Lalanne C., Lascoux M., Lasserre E., Lemainque A., Desprez-Loustau M.-L., Luyten I., Madoui M.-A., Mangenot S., Marchal C., Maumus F., Mercier J., Michotey C., Panaud O., Picault N., Rouhier N., Rué O., Rustenholz C., Salin F., Soler M., Tarkka M., Velt A., Zanne A. E., Martin F., Wincker P., Quesneville H., Kremer A. & Salse J. (2018):** Oak genome reveals facets of long lifespan. – *Nature Plants* 4: 440–452.

Pradhan S. K., Gupta R. C. & Goel R. K. (2018): Differential content of secondary metabolites in diploid and tetraploid cytotypes of *Siegesbeckia orientalis* L. – Natural Product Research 32: 2476–2482.

Pungaršek Š. & Frajman B. (2024): Influence of polyploidy on morphology and distribution of the Cypress Spurge (*Euphorbia cyparissias*, *Euphorbiaceae*). – Plant Biology 26: 998–1007.

Rajput P., Chaudhary M. & Sharma R. (2018): Phytochemical and pharmacological importance of genus *Urtica* – a review. – International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 9: 1387–1396.

Ramsey J. & Schemske D. W. (2002): Neopolyploidy in flowering plants. – Annual Review of Ecology and Systematics 33: 589–639.

Regalado Gonzalez J. J., Moreno R., Castro P., Carmona-Martín E., Rodríguez Arcos R., Pedrol J., Larranaga N., Guillen R., Gil J. & Encina C. (2017): *Asparagus macrorrhizus* Pedrol, Regalado et López-Encina, an endemic species from Spain in extreme extinction risk, is a valuable genetic resource for asparagus breeding. – Genetic Resources and Crop Evolution 64: 1581–1594.

Rejlová L., Böhmová A., Chumová Z., Hořčicová Š., Josefiová J., Schmidt P.-A., Trávníček P., Urfus T., Vít P. & Chrtek J. (2021): Disparity between morphology and genetics in *Urtica dioica* (*Urticaceae*). – Botanical Journal of the Linnean Society 195: 606–621.

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.

Ren Y., Gao J., Dong X., Yan H. & Huang H. (2024): In vitro tetraploid induction and plant regeneration of *Pinellia ternata*, a pearl-like herb. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 156.

Schlaepfer D. R., Edwards P. J., Semple J. C. & Billeter R. (2008): Cytogeography of *Solidago gigantea* (*Asteraceae*) and its invasive ploidy level. – Journal of Biogeography 35: 2119–2127.

Schnitzler A. & Muller S. (1998): Ecology and biogeography of plants which invade Europa: The annoying knotweed from Japan (*Fallopia japonica* and *F. sachalinensis*). – Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie) 53: 3–39.

Schoen D. J. & Schultz S. T. (2019): Somatic mutation and evolution in plants. – Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 50: 49–73.

Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H. & Brochmann C. (2007): Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (*Juncaceae*) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. – Molecular Phylogenetics and Evolution 42: 92–103.

Segraves K. A. & Anneberg T. J. (2016): Species interactions and plant polyploidy. – American Journal of Botany 103: 1326–1335.

Semwal P., Rauf A., Olatunde A., Singh P., Zaky M. Y., Islam M. M., Khalil A. A., Aljohani A. S. M., AlAbdulmonem W. & Ribaud G. (2023): The medicinal chemistry of *Urtica dioica*

L.: from preliminary evidence to clinical studies supporting its neuroprotective activity. – *Natural Products and Bioprospecting* 13.

Shull G. H. (1948): What is "heterosis"? – *Genetics* 33: 439–446.

Soltis P., Marchant D., Van de Peer Y. & Soltis D. (2015): Polyploidy and genome evolution in plants. – *Current Opinion in Genetics and Development* 35: 119–125.

Soltis P. S. & Soltis D. E. (2000): The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 7051–7057.

Spoelhof J., Soltis D. & Soltis P. (2021): Polyploidy and mutation in *Arabidopsis*. – *Evolution* 75: 2299–2308.

Stevens A., Nicotra A., Godfree R. & Guja L. (2020): Polyploidy affects the seed, dormancy and seedling characteristics of a perennial grass, conferring an advantage in stressful climates. – *Plant Biology* 22: 500–513.

Surson S., Sitthaphanit S. & Wongkerson K. (2024): Effective colchicine-induced polyploid induction in *Centella asiatica* (L.) Urban. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 159.

Taratima W., Rohmah K., Plaikhuntod K., Maneerattanarungroj P. & Trunjaruen A. (2023): Optimal protocol for in vitro polyploid induction of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. – *BMC Plant Biology* 23.

Taylor K. (2009): Biological Flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. – *Journal of Ecology*, 97: 1436–1458.

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: 19–45.

Turhadi T., Hamim H., Ghulamahdi M. & Miftahudin M. (2023): UHPLC-Q-Orbitrap HRMS-Based metabolomic show biological pathways involved in rice (*Oryza sativa* L.) under Fe toxicity stress. – *Sains Malaysiana* 52: 513–531.

Upton R. (2013): Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. – *Journal of Herbal Medicine* 3: 9–38.

Urfus T., Kopecký M., Urfusová R. & Chrtek J. (2021): Whole genome duplication increases ecological niche breadth of the perennial herb *Urtica dioica*. – *Preslia* 93: 305–319.

Van De Peer Y., Mizrachi E. & Marchal K. (2017): The evolutionary significance of polyploidy. – *Nature Reviews Genetics* 18: 411–424.

Van Drunen W. & Husband B. (2018): Whole-genome duplication decreases clonal stolon production & genet size in the wild strawberry *Fragaria vesca*. – *American Journal of Botany* 105: 1712–1724.

Venkataraman K. (1972): Wood phenolics in the chemotaxonomy of the *Moraceae*. – *Phytochemistry* 11.

- Vergara F., Kikuchi J. & Breuer C. (2016):** Artificial autopolyploidization modifies the tricarboxylic acid cycle and GABA shunt in *Arabidopsis thaliana* Col-0. – Scientific Reports 6: 26515.
- Vergara F., Rymen B., Kuwahara A., Sawada Y., Sato M. & Hirai M. Y. (2017):** Autopolyploidization, geographic origin and metabolome evolution in *Arabidopsis thaliana*. – American Journal of Botany 104: 905–914.
- Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F. & Widholm J. M. (1991):** The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. – Theoretical & Applied Genetics 81: 205–211.
- Web of Science (2024):** Topic *Urtica dioica* 2004 až 2024. © 2025 Clarivate. – dostupné z: <https://www.webofscience.com/> [24.4.2024].
- Weigend M. (2005):** Die Erben Pokornys – Ein Beitrag zur Abgrenzung der Sippen *Urtica galeopsifolia* und *Urtica pubescens* in Mittel- und Osteuropa. – Hoppea – Denkschriften der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft 66: 101–118.
- Weigend M. (2006):** *Urtica dioica* subsp. *cypria*, with a re-Evaluation of the *U. dioica* group (*Urticaceae*) in Western Asia. – Willdenowia 36: 811–822.
- Wendel J. F. (2015):** The wondrous cycles of polyploidy in plants. – American Journal of Botany 102: 1753–1756.
- Wissemann V., Riedel M. & Riederer M. (2007):** Matroclinal inheritance of cuticular waxes in reciprocal hybrids of *Rosa* species, sect. *Caninae* (*Rosaceae*). – Plant Systematics and Evolution 263: 181–190.
- Wolfe K. H. (2001):** Yesterday's polyploids & the mystery of diploidization. – Nature Reviews 2: 333–341.
- Wongwad E., Preedalikit W., Changprasoed S., Somsai S., Singmee N., Srisuksomwong P., Srivilai J., Rungsang T. & Mungmai L. (2024):** Effects of different drying processes on the bioactivity and rutin content of *Prunus* spp. (plums). – International Journal of Food Science.
- Wu J., Cheng X., Kong B., Zhou Q., Sang Y. & Zhang P. (2022):** In vitro octoploid induction of *Populus hopeiensis* with colchicine. – BMC Plant Biology 22.
- Xu K. Y. (2023):** Population rescue through an increase in the selfing rate under pollen limitation: Plasticity versus evolution. – American Naturalist 202: 337–350.
- Zakizadeh S., Kaviani B. & Hashemabadi D. (2020):** *In vivo*-induced polyploidy in *Dendrobium 'Sonia'* in a bubble bioreactor system using colchicine & oryzalin. – Brazilian Journal of Botany 43: 921–932.
- Zhang S.-L., Zhang X., Wang M., Dong L.-J. & Liu G.-X. (2024):** Induction and characterization of tetraploids from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. seeds. – Pharmacognosy Magazine 20: 733–744.

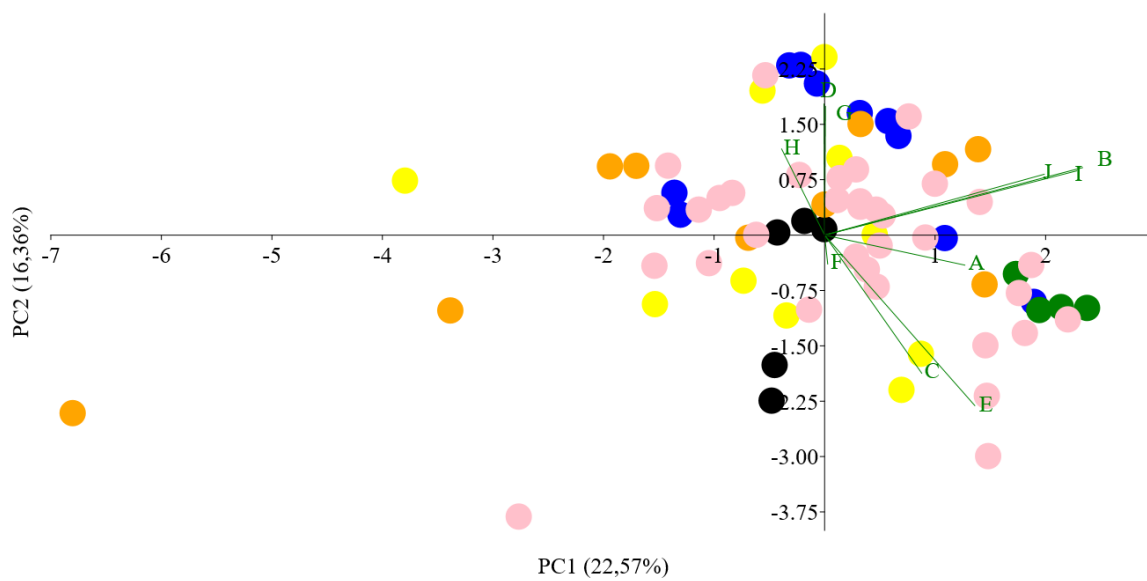
Zhang X., Lu X., Feng B., Xi Y., Gao C. & Feng W. (2023): Phytochemical and chemotaxonomic studies on four plants from genus of *Urtica* L. (*Urticaceae*). – *Biochemical Systematics and Ecology* 106: 104561.

10. Příloha

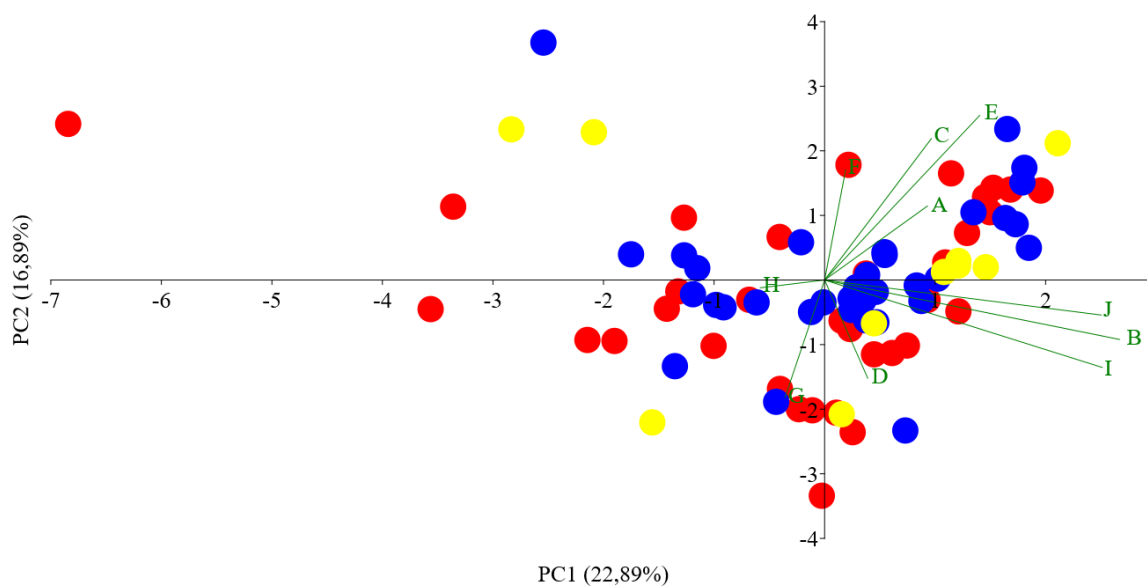
Tab. 13 – Primární matice dat se všemi vzorky a příslušnými hodnotami 10 vybraných metabolitů, vzor tabulky připravené k analýze v softwaru Past (83 vzorků rozděleno do 10 skupin podle taxonu, včetně neotetraploidů; nelogarithmované hodnoty).

black	1	1	0,001	3274852	915432	0,001	473665	0,001	937646	0,001	257738	0,001
black	1	2	146419	13563782	2865629	1429502	0,001	0,001	1150452	0,001	1128175	0,001
black	1	3	0,001	2294345	2098976	0,001	870256	195725	542782	0,001	179885	0,001
black	1	4	371959	10953816	2698502	1989430	0,001	190619	312062	213738	925556	0,001
black	1	5	69994	5886753	1343812	47737	0,001	224115	371434	161158	465002	0,001
blue	2	6	0,001	3420361	141745	138224	0,001	179688	103342	155774	261171	0,001
blue	2	7	0,001	160846171	182520	945435	0,001	240487	1431091	327728	14417397	512755
blue	2	8	0,001	122967070	249651	893805	0,001	255979	18113439	3249621	10524646	440084
blue	2	9	0,001	34130787	0,001	385616	0,001	256116	5130488	161830	2752664	136096
blue	2	10	123950	91919451	338094	0,001	1177592	243834	3836808	367893	7913752	365350
blue	2	11	0,001	2975300	67194	103630	0,001	206480	5483852	101448	218737	0,001
blue	2	12	0,001	45113767	0,001	676516	0,001	168386	1742892	267286	3630516	299302
blue	2	13	0,001	43470281	0,001	706860	0,001	0,001	1361428	0,001	3415026	278770
blue	2	14	0,001	49098287	182062	725586	0,001	0,001	2879855	2656991	4000258	638912
blue	2	15	0,001	57286935	402607	677891	1440122	219797	987917	185079	4472857	386233
orange	3	16	95584	72629423	130962	694287	0,001	205959	246225	1766927	6465976	293381
orange	3	17	98343	160223360	489285	1766459	0,001	176917	1517118	1846609	14993286	864024
orange	3	18	0,001	5576806	0,001	0,001	0,001	211272	2350005	1292089	434835	0,001
orange	3	19	0,001	683450	94190	0,001	0,001	205355	1747802	436935	0,001	0,001
orange	3	20	0,001	9773702	79300	250982	0,001	201197	812393	0,001	749860	77740
orange	3	21	0,001	53202248	73851	200713849	0,001	213974	2395509	142750	4544141	254611
orange	3	22	0,001	2239388	0,001	0,001	0,001	237552	9412882	775093	162987	0,001
orange	3	23	0,001	13145793	2989527	677112	0,001	199350	1584891	0,001	1013581	0,001
orange	3	24	0,001	0,001	95299	0,001	0,001	199435	466265	1809883	0,001	0,001
orange	3	25	0,001	217159382	1062423	0,001	193890	209630	607685	495221	19811959	989064
yellow	4	26	0,001	26318822	151222	727547	0,001	198422	491799	203169	2278794	150143
yellow	4	27	0,001	6072911	142992	144929	185057	214821	955577	0,001	517092	0,001
yellow	4	28	83155	19032854	383436	0,001	596235	193942	775439	0,001	1613571	0,001
yellow	4	29	0,001	1544397	132087	12725853	0,001	190609	0,001	947245	121234	0,001
yellow	4	30	0,001	30802948	370575	180801	428494	191266	0,001	327615	2527851	348922
yellow	4	31	0,001	12734703	1666934	0,001	0,001	0,001	384231	0,001	1003148	0,001
yellow	4	32	105925	3331245	444982	754768	0,001	204411	580089	0,001	269149	73549
yellow	4	33	0,001	1253950	0,001	179133	0,001	175099	233261	916702	0,001	0,001
yellow	4	34	0,001	12164575	0,001	882948	0,001	207587	100723	193602	959239	262669
yellow	4	35	0,001	103162594	0,001	1032465	0,001	228357	825844	1998278	8859937	385242
green	5	36	270292	146972489	2044674	0,001	1869551	217787	2119728	1826145	14529738	717008
green	5	37	138193	80145674	933437	0,001	944880	193076	600744	2397440	7474086	1612248
green	5	38	222307	40745900	1058603	728466	1582636	174413	102182	204482	3562073	262008
green	5	39	269703	328368018	1120876	0,001	980331	249345	259846	681991	33255974	2228752
pink	6	40	0,001	21790648	875559	583511	0,001	199410	1526428	0,001	1915362	166045

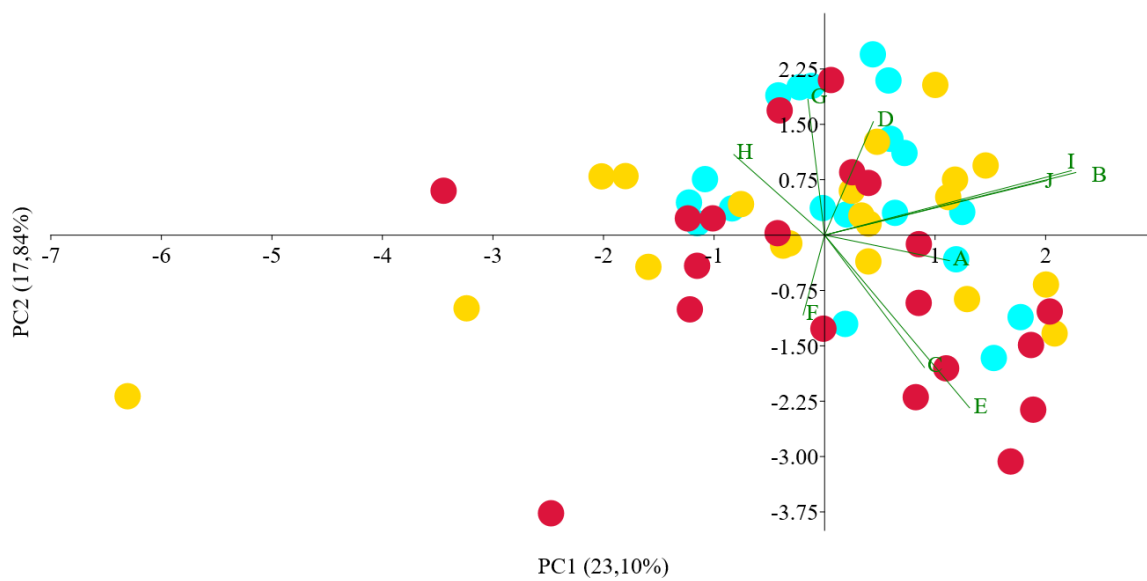
pink	6	41	0,001	78827143	2421798	0,001	3232693	281276	1562195	0,001	7369456	463445
pink	6	42	0,001	25197410	184523	0,001	0,001	186262	18097537	381058	2199937	108355
pink	6	43	0,001	15568311	0,001	329890	0,001	193366	2448780	202240	1266147	108820
pink	6	44	0,001	7899127	0,001	136751	0,001	189407	149383	0,001	627999	0,001
pink	6	45	0,001	46926895	163733	0,001	0,001	157461	1727366	269259	4130608	310890
pink	6	46	112708	151686217	467171	0,001	0,001	222864	24660908	403151	13722523	1060574
pink	6	47	0,001	11863886	99092	388375	863001	176780	1544048	0,001	903786	0,001
pink	6	48	0,001	14286226	85962	232777	0,001	186362	138275	222370	1090211	0,001
purple	7	49	0,001	19980030	2468032	468398	0,001	190626	106417	904404	1773846	181511
purple	7	50	241104	83938921	5851868	2337862	248411	194605	101255	347455	7702495	117906
purple	7	51	94388	36438302	3544418	672200	0,001	192403	485052	361211	3266932	198842
purple	7	52	0,001	16928281	748616	109498	0,001	272973	2759724	156066	1382042	0,001
purple	7	53	0,001	17773280	1632508	401410	0,001	223849	1457444	0,001	1519545	0,001
purple	7	54	0,001	1251347	754572	0,001	0,001	156827	2108842	925640	89544	0,001
purple	7	55	0,001	86233304	304237	0,001	0,001	176518	245883	206104	7381103	552165
purple	7	56	346350	197375759	1355901	0,001	847947	194331	94506	562488	17992252	914248
purple	7	57	0,001	241185152	222535	1400761	0,001	0,001	123406	2802531	21754000	885489
purple	7	58	0,001	20797529	107533	0,001	0,001	176821	750140	0,001	1622345	389623
fuchsia	8	59	0,001	5005990	1281741	151424	0,001	187605	755148	179688	414843	0,001
fuchsia	8	60	0,001	254981167	3017456	0,001	511763	175031	449831	0,001	25535880	3779302
fuchsia	8	61	0,001	34762223	1609314	536593	0,001	194304	384570	106357	3088114	164802
fuchsia	8	62	0,001	476059	1048939	0,001	234701	168568	0,001	808734	0,001	0,001
fuchsia	8	63	0,001	187801527	4129860	263665	2031219	194084	94354	0,001	18249335	2416166
fuchsia	8	64	0,001	93844058	3232247	688319	1255706	233592	0,001	0,001	8573247	499797
fuchsia	8	65	0,001	6588957	5560335	0,001	0,001	199002	1434158	1401999	530746	0,001
fuchsia	8	66	0,001	103732488	10913197	0,001	330558	165104	0,001	0,001	9509915	433685
fuchsia	8	67	0,001	1686494	151907	904284	385679	220920	1413610	0,001	1465924	188924
fuchsia	8	68	0,001	96698124	2047673	845227	0,001	203662	835987	2375771	0,001	766934
maroon	9	69	0,001	21799104	1639525	0,001	0,001	237908	569461	0,001	1928415	385065
maroon	9	70	0,001	124722586	985893	0,001	0,001	229529	7392276	0,001	12156581	2030506
maroon	9	71	0,001	50011254	0,001	0,001	159301	221942	395822	327867	4509626	546555
maroon	9	72	0,001	5247877	752281	520862	0,001	223569	566935	443636	421631	257404
maroon	9	73	0,001	9912192	397819	1291335	83950	218081	209129	379502	850955	160087
red	10	74	0,001	76936709	233838	5665413	1469191	196894	222718	224701	7395838	438906
red	10	75	0,001	80577208	406885	15864528	1199187	190580	583729	0,001	7699200	329577
red	10	76	0,001	18576619	237157	2650702	0,001	225715	403851	0,001	1644050	244838
red	10	77	25198528	442019	94147	4780563	871164	244477	845462	194375	0,001	0,001
red	10	78	0,001	86247742	0,001	9709333	0,001	224438	404654	1869208	8287089	1088997
red	10	79	0,001	392138	168443	0,001	1466020	189835	923437	635715	0,001	0,001
red	10	80	0,001	68211283	443145	7958108	11270930	215292	654726	4059458	6330490	516412
red	10	81	0,001	48190621	192733	5828008	1766551	258744	2696737	149145	4410536	596415
red	10	82	42756218	95776567	116179	10241520	2876088	164493	0,001	303283	9137702	717892
red	10	83	22795226	1876824	0,001	4435605	0,001	0,001	1266593	145648	151243	0,001



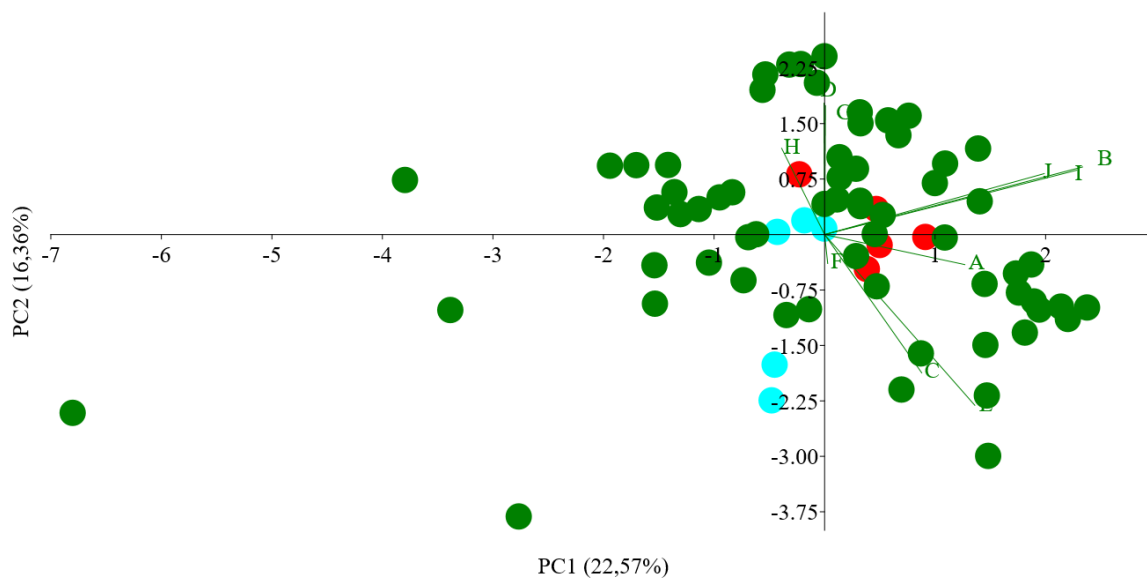
Obr. 27 – Ordinance 10 sloučenin k PCA1.



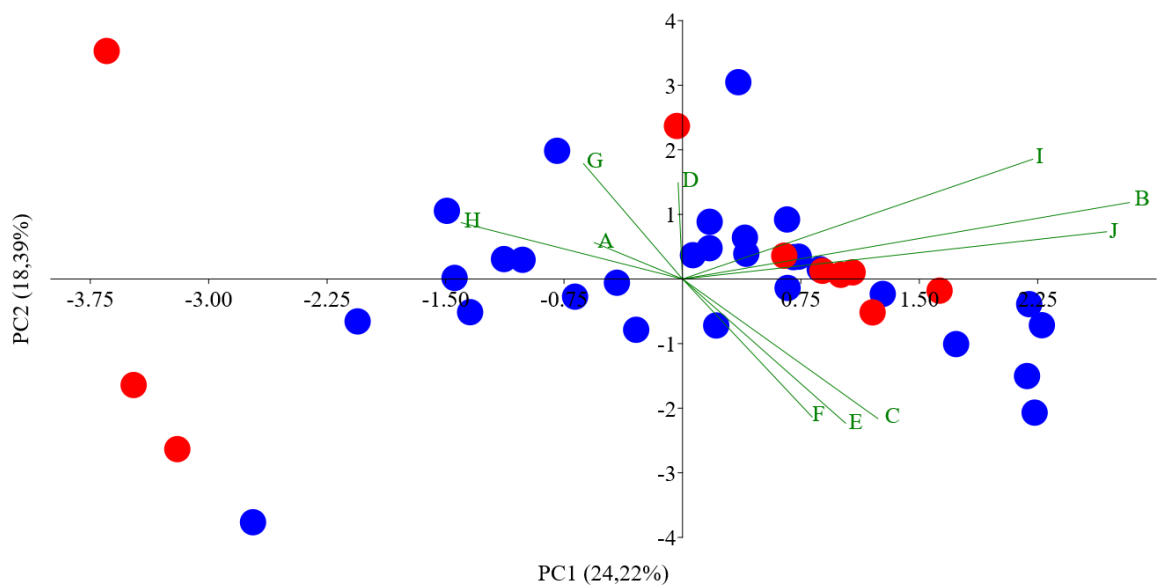
Obr. 28 – Ordinance 10 sloučenin k PCA2.



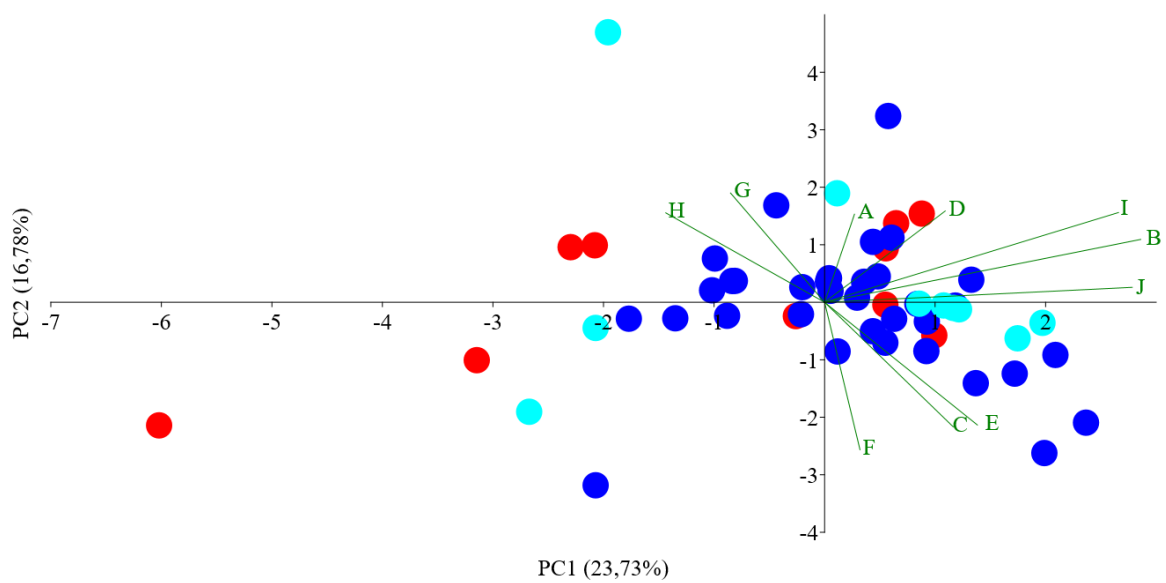
Obr. 29 – Ordinance 10 sloučenin k PCA3.



Obr. 30 – Ordinance 10 sloučenin k PCA4.



Obr. 31 – Ordinace 10 sloučenin k PCA5.



Obr. 32 – Ordinace 10 sloučenin k PCA6.