



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Puriny obsahující butenolidovou podjednotku a jejich účinky
jako strigolaktony**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tomáš Dostál
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tomáš Dostál
Název práce	Puriny obsahující butenolidovou podjednotku a jejich účinky jako strigolaktony
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů a CRH
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Bakalářská práce se zaměřuje na syntézu nových strigolaktonových mimetik a jejich biologickou aktivitu při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin rodu <i>Striga</i>. V teoretické části jsou shrnuty dosavadní poznatky o strigolaktonech, jejich biosyntéze v rostlinách, biologickém účinku a možnosti jejich využití pro kontrolu šíření parazitického plevelu z rodu <i>Striga</i> a <i>Orobancha</i>. Experimentální část se zaměřuje na syntézu nových látek, které jsou odvozeny od purinu, anilinu, benzylaminu a o-toluidinu. Práce dále popisuje biologické testování připravených sloučenin a jejich biologickou aktivitu jako iniciátorů klíčení semen parazitů rodu <i>Striga</i>.
Klíčová slova	Strigolakton, purin, mimetikum, <i>Striga</i> , <i>Orobancha</i> , butenolid
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tomáš Dostál
Title of thesis	Butenolid-Containing purines acting as Strigolactone
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	The bachelor thesis is focuses on a synthesis of new strigolactone mimics and their biological activity as a <i>Striga</i> parasitic weeds germination agent. The theoretic part summarizes previous knowledge about strigolactones, their biosynthesis in plants, bioactivity and their possible use in control of the parasitic weeds of the genus <i>Striga</i> and <i>Orobancha</i>. The experimental part deals with the synthesis of new substances derived from purine, aniline, benzylamine and <i>o</i>-toluidine. The next part of thesis describes a bioassay of the prepared compounds and their biological activity towards germination of <i>Striga</i> seeds.
Keywords	Strigolactone, purine, mimics, <i>Striga</i> , <i>Orobancha</i> , butenolide
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením
Mgr. Tomáše Pospíšila, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 21. 5. 2015

.....

Děkuji celému kolektivu laboratoře organické syntézy, CRH, za vstřícnost, podporu a pomoc při práci v laboratoři.

Zvláště bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady a především za trpělivost a vstřícnost při vypracovávání této bakalářské práce.

Obsah

1 Úvod a cíle práce	8
2 Teoretická část	9
2.1 Historie objevu strigolaktonů.....	9
2.2 Přírodní strigolaktomy – struktura a biosyntéza	10
2.3 Úloha strigolaktonů v rostlinách.....	12
2.3.1 Větvící faktory v procesu arbuskulární mykorhizy	13
2.3.2 Inhibice větvení nadzemních částí rostliny.....	13
2.3.3 Iniclace klíčení semen parazitických rostlin.....	13
2.4 Parazitické rostliny a jejich životní cyklus	15
2.5 Syntetické sloučeniny	16
2.5.1 Strigolaktonová analoga – struktura a mechanismus.....	17
2.5.2 Strigolaktonová mimetika – struktura a mechanismus.....	20
3 Experimentální část.....	26
3.1 Chemikálie	26
3.2 Materiál.....	26
3.3 Metody	26
3.4 Syntéza strigolaktonových mimetik.....	27
3.4.1 Příprava purinových derivátů.....	27
3.4.2 Příprava derivátů odvozených od anilinu a benzylaminu	31
3.5 Biologické testování	36
4 Výsledky a diskuze	38
4.1 Deriváty adeninu.....	38
4.2 Modelové sloučeniny – deriváty anilinu a benzylaminu	40
4.3 Biologická aktivita.....	41
5 Závěr	43
Použitá literatura	44

Seznam použitých zkratek

AM – arbuskulární mykorhiza
4BD – 4-Br-debranon
Boc – *t*-butyloxykarbonyl
Boc₂O – di-*t*-butyloxykarbonyl
CPMF – 5-(4-chlorophenoxy)-3-methylfuran-2(5*H*)-on
CCD7 – karotenoidní dioxygenasa 7
CCD8 – karotenoidní dioxygenasa 8
D27 – β-karoten isomerasa
d – dublet
DCM – dichlormethan
DMAP – 4-dimethylaminopyridin
DMF – *N,N*-dimethylformamid
ES⁺ – ionizace pomocí elektrospreje
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
J – štěpící konstanta
m – multiplet
MAX1 – enzym patřící do rodiny cytochromů P450
MeOH – methanol
MS – hmotnostní spektrometrie
NMR – nukleární magnetická rezonance
ppm – parts per milion
rac – racemická směs
r.t. – laboratorní teplota
s – singlet
spp. – z lat. species pluralis (druhy)
t – triplet
TFA – kyselina trifluoroctová
THF – tetrahydrofuran
TLC – tenkovrstevná chromatografie
δ – chemický posun

1 Úvod a cíle práce

Relativně nedávno objevenou skupinou rostlinných hormonů jsou strigolaktony. U této skupiny je dosud známo jen několik funkcí. Mezi nejvýznamnější z nich se řadí iniciace klíčení semen parazitických rostlin z rodu *Striga* a *Orobanche*, iniciace arbuskulární mykorhizy a inhibice větvení nadzemních částí rostliny.

Můžeme je rozdělit na přírodní a syntetické. Na základě struktury se syntetické strigolaktony dále dělí na strigolaktonová analoga a strigolaktonová mimetika.

Prvním cílem bakalářské práce je vypracování literární rešerše o základním účinku strigolaktonů. Dalšími cíli jsou syntéza nových derivátů purinu substituovaných v pozici 6 butenolidovými kruhy a příprava derivátů anilinu a benzylaminu s jejich následnou charakterizací prostřednictvím dostupných fyzikálně-chemických metod a jejich testování v biotestu na klíčení semen parazitických rostlin.

2 Teoretická část

2.1 Historie objevu strigolaktonů

Již v první polovině 19. století bylo známo, že parazitické rostliny z rodu *Striga* a *Orobanche* potřebují ke klíčení svých semen specifické stimulující látky, které jsou produkovány jejich hostitelskými rostlinami. Tento jev byl na přelomu 19. a 20. století zkoumán u dalších druhů z rodu *Striga* a *Lathraea*. Vědci neustále hledali zdroj látek, které zodpovídají za iniciaci klíčení semen parazitických rostlin *Striga* a *Orobanche*. Bylo nalezeno mnoho rostlin produkujících tyto stimulanty (Brown a kol., 1951a; Brown a kol., 1951b). Podařilo se získat několik částečně čistých aktivních sloučenin, avšak jejich struktura zůstávala neznámá. Předpokládalo se, že by mohly obsahovat laktonovou skupinu, jelikož se prokázaly jako relativně stabilní v slabě kyselém prostředí, zatímco v zásaditém docházelo k jejich rozkladu (Brown a kol., 1952).

Prvním přírodním stimulantem klíčení semen parazita z rodu *Striga*, s již ověřenou strukturou byl (+)-strigol (**1**) (Obr. 1). Tento stimulant byl vyizolován v roce 1966 z kořenových exudátů bavlníku (*Gossypium hirsutum*) (Cook a kol., 1966). O několik let později se podařilo získat ještě další přírodní látku, označovanou jako strigyl acetát (**2**) (Cook a kol., 1972). Na základě experimentů se zjistilo, že obě tyto látky jsou účinnými stimulanty klíčení parazitů z rodu *Striga* (Cook a kol., 1966, Cook a kol., 1972).

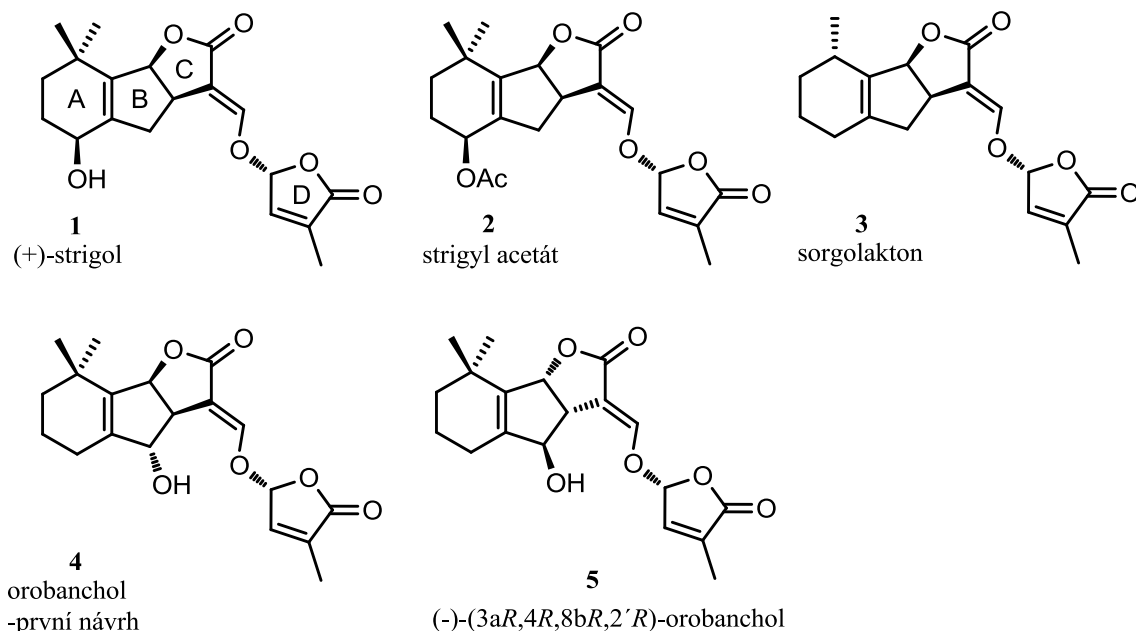
O několik let později bylo připraveno a otestováno patnáct terpenoidních látek, strukturně velice podobných strigolu. U devíti z nich bylo prokázáno, že spouštějí klíčení parazitů *Striga asiatica* a *Orobanche ramosa* (Vail a kol., 1990).

Dalším strigolaktonem, který byl izolován byl sorgolakton (**3**), který byl objeven v čiroku (*Sorghum bicolor*) (Obr. 1) (Hauck a kol., 1992).

Ke konci 20. století byl (+)-strigol vyizolován i z exudátů dalších rostlin. Těmito rostlinami byly – kukuřice (*Zea mays*), proso (*Panicum miliaceum*) a čirok (*Sorghum bicolor*). Izolace strigolu je dnes považována za významný milník ve výzkumu parazitického plevelu (Siame a kol. 1993).

V roce 1998 došlo k identifikaci nového strigolaktonu izolovaného z kořenových exudátů jetele červeného (*Trifolium pratense*), který byl nazván orobanchol (**4**) (Obr. 1). Orobanchol byl prvním přírodním stimulantem klíčení semen parazita z rodu *Orobanche* (Yokota a kol., 1998). První strukturu orobancholu navrhl Mori na základě podobnosti s (+)-strigolem (Mori a kol., 1999). Avšak později byla stereochemie orobancholu revidována a díky rozvoji spektrálních metod byla určena přesná prostorová struktura

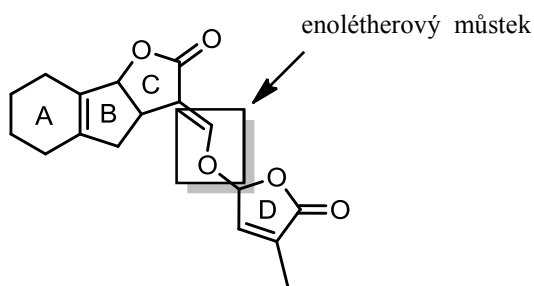
přírodního orobancholu, která je $(-)-(3aR,4R,8bR,2'R)$ -orobanchol (**5**) (Ueno a kol., 2011). Na základě stereochemie můžeme strigolaktony rozdělit do dvou rodin – strigolové a orobancholové. Tyto rodiny se liší ve stereochemii vazeb na C kruhu molekuly strigolaktonu.



Obr. 1 – (+)-strigol, strigyl acetát, sorgolakton, nesprávná struktura orobancholu, skutečná struktura orobancholu.

2.2 Přírodní strigolaktony – struktura a biosyntéza

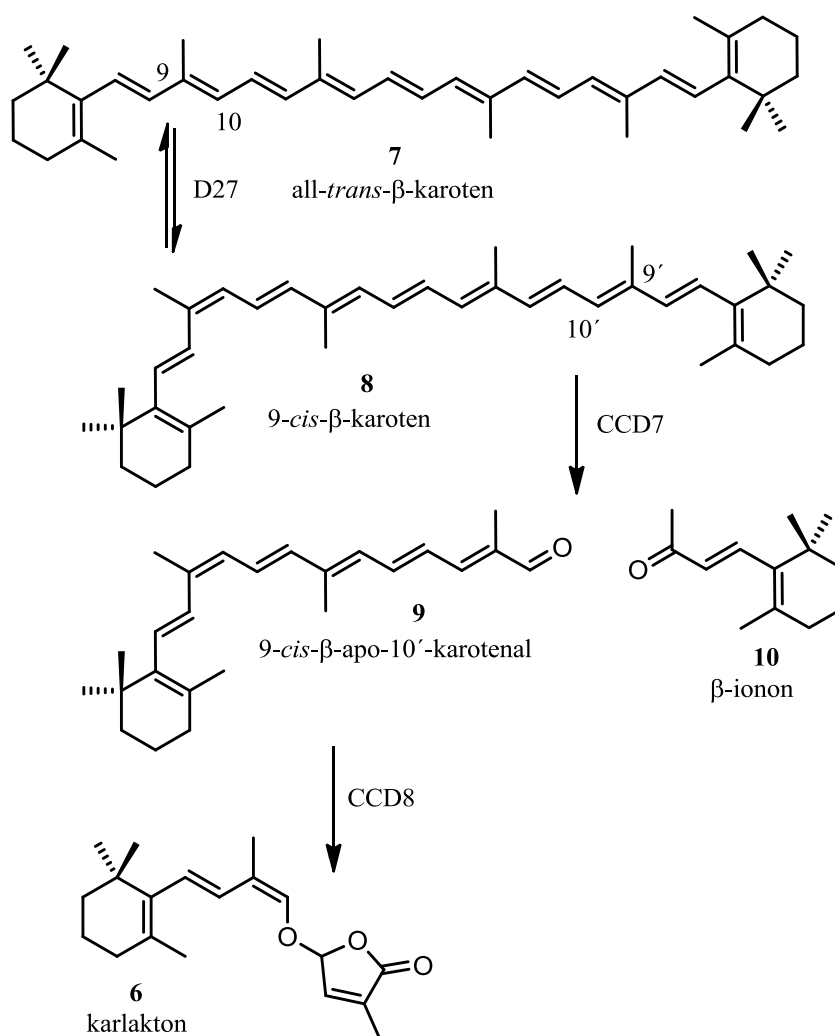
Přírodní strigolaktony jsou sloučeniny, složené z ABC tricyklu a butenolidové skupiny (D kruhu), které jsou vzájemně propojeny skrze enolétherový můstek (Obr. 2) (Hauck a kol., 1992).



Obr. 2 – Struktura přírodních strigolaktonů.

Tyto přírodní látky jsou v rostlinách zastoupeny jen ve velmi malých množstvích a během purifikačních procesů může docházet k jejich degradaci (Rani a kol., 2008).

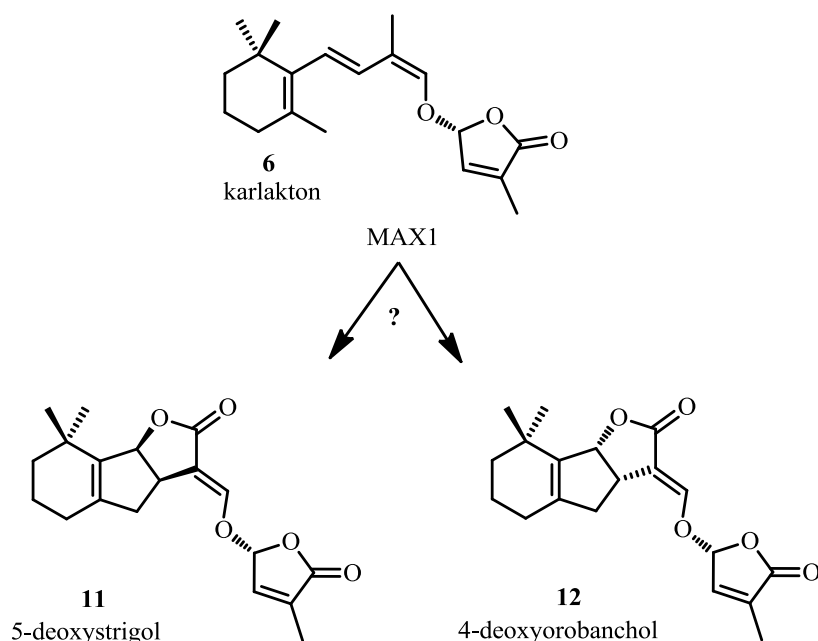
Předpokládá se, že přírodní strigolaktony jsou odvozeny od karotenoidů. Jejich prekurzorem je pravděpodobně karlakton (**6**), jehož molekulární struktura se velice podobá struktuře strigolaktonů a vzniká jako produkt tří enzymatických reakcí (Obr. 3). V první reakci enzym D27 izomeruje dvojnou vazbu C9-C10 *all-trans*- β -karotenu (**7**). Výsledný 9-*cis*- β -karoten (**8**) je následně prostřednictvím enzymu CCD7 rozštěpen na 9-*cis*- β -apo-10'-karotenal (**9**) a β -ionon (**10**). CCD8 následně přetváří karotenal (**9**) na karlakton (**6**). Tato sloučenina obsahuje D-kruh a enoléterový můstek, což jsou základní části molekuly strigolaktonů (Alder a kol., 2012).



Obr. 3 – Biosyntéza karlaktonu.

Dále je karlakton (**6**) pravděpodobně prostřednictvím enzymu MAX1 přetvářen na 5-deoxystrigol (**11**) respektive 4-deoxyorobanchol (**12**) (Obr. 4). 5-deoxystrigol byl vyizolován v roce 2005 z leknínu japonského (*Lotus japonicus*). Při experimentech se ukázalo, že tato nová látka indukuje větvení hyf u arbuskulárně mykorhytických (AM) hub (Akiyama a kol., 2005).

Dále se předpokládá, že ostatní přírodní strigolaktony vznikají prostřednictvím hydroxylací, acetylací, karboxylací a oxidací z 5-deoxystrigolu respektive 4-deoxyorobancholu.



Obr. 4 – Přeměna karlaktonu v 5-deoxystrigol respektive 4-deoxyorobanchol.

2.3 Úloha strigolaktonů v rostlinách

Neustále se objevovala otázka, proč vlastně rostliny vylučují strigolaktony, když tyto sloučeniny zodpovídají za klíčení a vývoj jejich nepřátel. Proto se předpokládalo, že musí mít v přírodě ještě nějaké pozitivní role. Několik takovýchto funkcí již bylo odhaleno. Mezi nejvýznamnější z nich se řadí inhibice větvení nadzemí části rostlin a iniciace symbiózy mezi rostlinami a AM houbami.

2.3.1 Větvící faktory v procesu arbuskulární mykorhizy

AM houby se řadí do skupiny půdních mikroorganismů, které žijí v symbióze s mnoha rostlinami. Tyto houby pronikají a váží se na kořeny rostlin, kde vytváří struktury označované jako arbuskuly. Tyto struktury jsou místem výměny látek mezi rostlinou a AM houbou. Houba zásobuje rostlinu vodou a živinami, které získává z půdy prostřednictvím hyf. Hostitelská rostlina na oplátku poskytuje látky vznikající v průběhu fotosyntézy. Arbuskulární mykorhiza patří mezi nejstarší a vůbec nejčastější symbiózu na Zemi (Smith a kol. 2008).

V roce 2005 profesor Akiyama a jeho kolegové hledali souvislosti mezi arbuskulární mykorhizou a strigolaktony. Jejich experimenty byly zaměřeny na zkoumání aktivity přírodních strigolaktonů v procesu větvení hyf u AM houby *Gigaspora margarita*. Výsledky experimentů ukázaly, že všechny testované sloučeniny jsou aktivními větvícími faktory.

Strigolaktony jsou tedy pravděpodobně signálními molekulami, které kromě iniciace klíčení semen podporují také větvení hyf u AM hub (Akiyama a kol., 2005, Akiyama a kol., 2010).

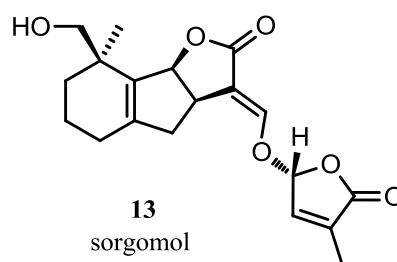
2.3.2 Inhibice větvení nadzemních částí rostliny

V roce 2008 týmy Gomez-Roldana a Umehary objevily další funkci strigolaktonů. Zjistily, že se strigolaktony zapojují v procesu inhibice větvení stonku. Jeden tým testoval strigolaktony na mutantech hrášku (Gomez-Roldan a kol., 2008) a druhý na mutantech rýže (Umehara a kol., 2008). Výsledky ukázaly, že při vysokých koncentracích aplikovaného strigolaktonu dochází k úplnému potlačení tvorby postranních větví. Předpokládá se, že tvorba strigolaktonů v rostlině je odezvou na stres a nedostatečné množství živin. V těchto situacích se rostlina přestane úplně větvit a zaměří se zcela na symbiózu s AM houbami (Gomez-Roldan a kol., 2008; Umehara a kol., 2008).

2.3.3 Iniciace klíčení semen parazitických rostlin

Další funkcí strigolaktonů je iniciace klíčení semen parazitů z rodu *Striga* a *Orobanche*. Při zkoumání této funkce bylo provedeno mnoho rozsáhlých studií. Jejich hlavním zájmem bylo zkoumání souvislosti mezi strukturou strigolaktonů a jejich aktivitou. Na základě experimentů se prokázalo, že bioaktivním místem je CD část molekuly.

Aktivita strigolaktonů u jednoho parazitického druhu se může zcela lišit od druhů ostatních. Významnou roli zde hraje především roční období, koncentrace a stereochemie strigolaktonu. Tento jev lze pozorovat na příkladu strigolaktonu sorgomolu (**13**) (Obr. 5). Sorgomol byl za stejných podmínek testován na semenech parazitů z rodu *Striga* a *Orobanche*. V případě *Striga hermonthica* se tento stimulant ukázal až tisíckrát aktivnější než v případě *Orobanche minor* (Xie a kol. 2008). Sorgomol se přirozeně vyskytuje v hostitelských rostlinách parazita *Striga hermonthica*, zatímco u hostitele parazita *Orobanche minor* ne, což může vysvětlovat rozdíl v aktivitě této látky. Dalším důležitým faktorem aktivity těchto látek je tedy i specializace parazitické rostliny na dané plodiny a z toho vyplývající specifita k danému strigolaktonu.



Obr. 5 – sorgomol.

2.3.3.1 Sebevražedné klíčení parazitů

Jednou z možností kontroly parazitického plevelu je sebevražedné klíčení. V této metodě je využito efektu stimulantu klíčení, který je aplikován v nepřítomnosti hostitele do půdy s dormantními semeny. Jakmile parazit začne vlivem stimulantu klíčit a nemá k dispozici hostitelskou rostlinu, postupně umírá kvůli „vyhladovění“.

První látkou, která byla takto testována, byl ethylen. Tento fytohormon byl shledán jako vysoce účinná látka indukující klíčení semen *Striga hermonthica* (Egley, 1970). Jelikož se jeho využití nakonec ukázalo jako finančně náročné a fytohormon vykazoval aktivitu jen u některých parazitických druhů, muselo se od jeho využití v zemědělství nakonec ustoupit (Egley 1990).

Dále bylo experimentováno se strigolaktonovými analogy. Jednalo se o GR sloučeniny, konkrétně GR24 a GR7 (viz kapitola 2.5.1). Testování bylo prováděno na semenech parazita *S. hermonthica*. Zpočátku se výsledky ukázaly jako velice přesvědčivé, avšak následně bylo pozorováno, že v půdě dochází k jejich postupné degradaci, takže bylo ustoupeno i od jejich užívání (Eplee a kol., 1987).

V současné době je potřeba neustále hledat další látky a metody, kterými by bylo možné co nejlépe eliminovat parazitický plevel a zvýšit tak výnosy hospodářských plodin. Tato práce je zaměřena právě na přípravu možných stimulantů klíčení semen rostlin z rodu *Orobanche* a *Striga*.

2.4 Parazitické rostliny a jejich životní cyklus

Striga a *Orobanche* se řadí mezi kořenové parazity, kteří většinu svého života zůstávají pod zemí. V určité fázi života vytváří na povrchu země stonek, na kterém se postupně vyvíjí květy. Jsou velmi dobře přizpůsobeni hostitelské rostlině (Joel, 1995) a díky tomu jsou schopni vnímat velké množství signálů od hostitele, potřebných pro iniciaci jejich klíčení nebo vývoj (Musselman, 1980).

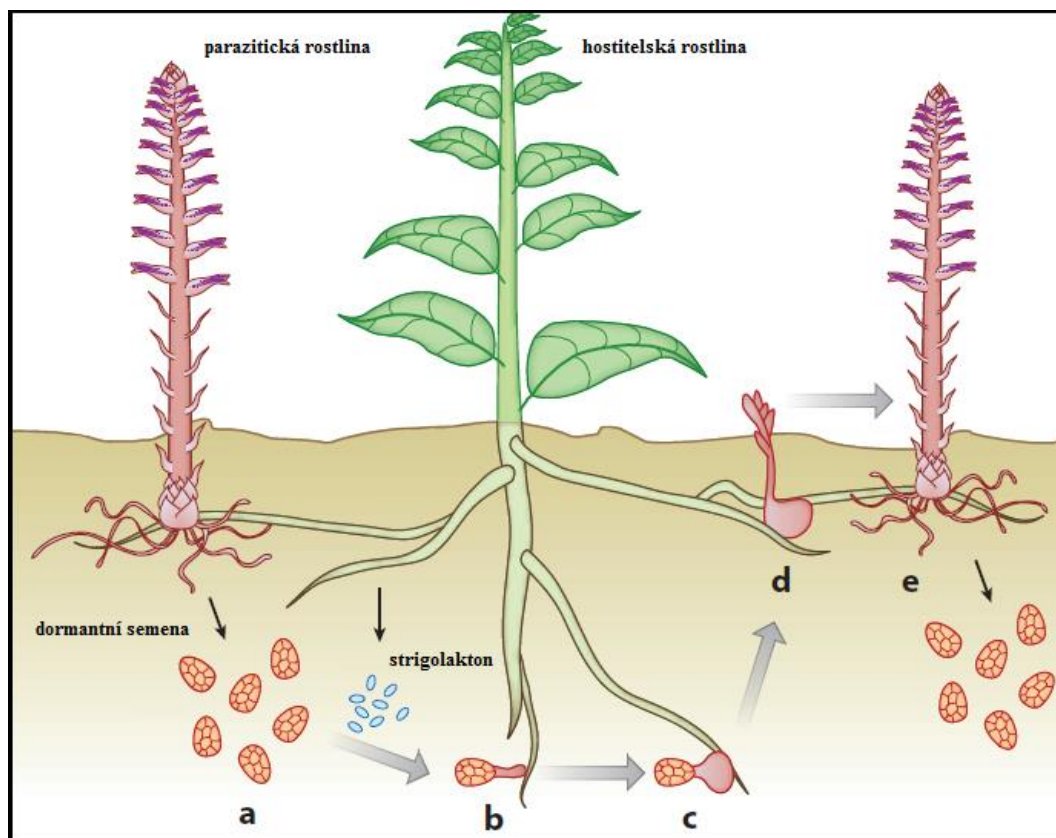
Jejich semena jsou v půdě zpočátku v inaktivním stavu. K jejich klíčení dochází pouze tehdy, jsou-li vystaveny specifické stimulující látky – strigolaktonu, zodpovědné za iniciaci klíčení. Takovéto stimulanty jsou vylučovány kořenovým systémem hostitelské rostliny. Celý životní cyklus je schématicky znázorněn na Obr. 6 (Xie a kol., 2010).

Striga a *Orobanche* parazitují na mnoha rostlinných druzích. Důvod, proč se o tyto rostliny věda zajímá je ten, že kromě neúžitkových rostlin napadají také hospodářsky významné plodiny, jako je např. čirok (*Sorghum bicolor*), kukuřice (*Zea mays*), rýže (*Oryza sativa*), hrách (*Pisum sativum*) nebo proso (*Panicum miliaceum*). Tito parazité jsou tudíž velkým problémem v oblastech, kde jsou místní obyvatelé zcela závislí na těchto plodinách.

Striga spp. jsou skupinou obligátních hemiparazitů patřících do čeledi zárazovité (*Orobanchaceae*). Hlavními zástupci tohoto rodu jsou *Striga hermonthica*, *Striga asiatica* a *Striga gesnerioides*. *Striga hermonthica* se vyskytuje převážně v Africe. Jejím nejčastějším hostitelem je čirok, proso, kukuřice a cukrová třtina. *Striga asiatica* parazituje na kukuřici, což vede k závažným ztrátám na její úrodnosti. Je rozšířena v oblastech Afriky, Indie, Indonésie a Nové Guinei. *Striga gesnerioides* napadá převážně fazole. Vyskytuje se v Africe a Indii.

Orobanche spp. se řadí do skupiny holoparazitů, kteří zcela postrádají jakýkoliv chlorofyl. Řadí se rovněž do čeledi zárazovité (*Orobanchaceae*). Napadají převážně dvouděložné rostliny jako je tabák, rajče, mrkev, okurka, zelí, slunečnice či luštěniny. Výskyt těchto parazitů je lokalizován v oblastech východní Evropy, blízkého východu,

Středozemního moře, západní Asie a Austrálie. K nejškodlivějším zástupcům tohoto rodu se řadí *Orobanche ramosa* a *Orobanche cernua* (Parker, 2009).



Obr. 6 – Životní cyklus parazitických rostlin – *Orobanche minor*. (a) navození klíčení semen parazita stimulující látkou – strigolaktonem, (b) připojení semen k hostiteli prostřednictvím haustorií, (c) zesílení připojení a růst parazita pod zemí po několik týdnů, (d) tvorba kvetoucích výhonků nad zemí, (e) produkce mnoha nových semen, které zůstávají životaschopné po několik let (převzato z Xie a kol., 2010).

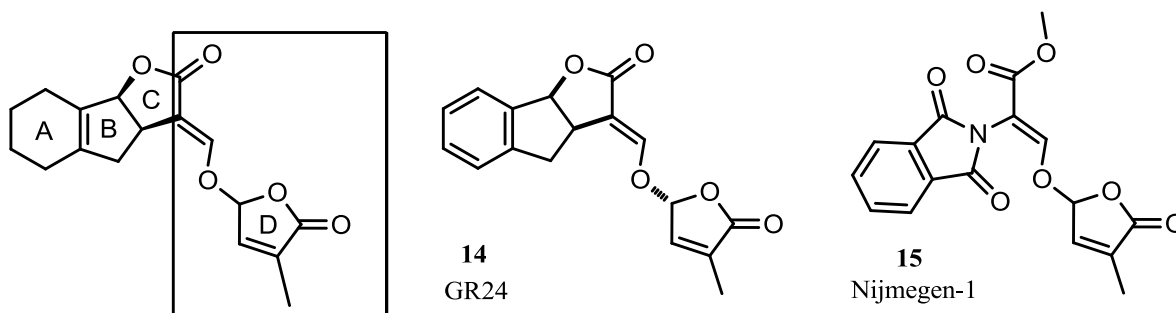
2.5 Syntetické sloučeniny

Získat strigolaktony přímo z rostlin ve větších množstvích je téměř nemožné, jelikož se v rostlinách vyskytují ve velmi malém množství a vlivem purifikačních metod dochází k jejich rozkladu. Tento fakt přiměl vědce k přípravě nových syntetických derivátů. Na základě jejich chemické struktury a předpokládaného mechanismu účinku je můžeme rozdělit na strigolaktonová analoga nebo strigolaktonová mimetika.

2.5.1 Strigolaktonová analoga – struktura a mechanismus

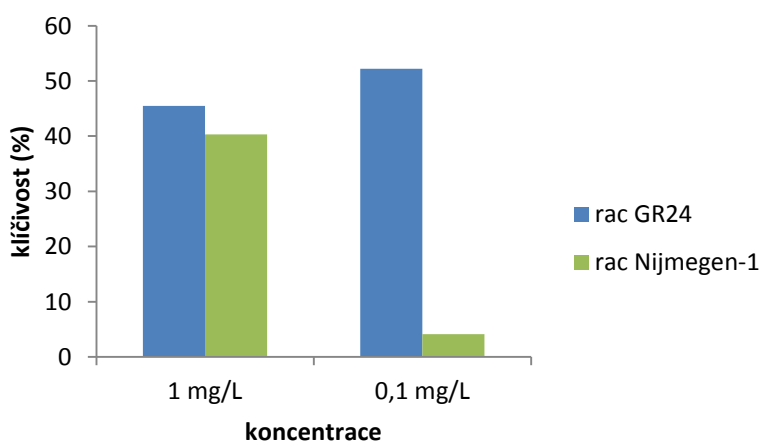
Strigolaktonová analoga jsou syntetické sloučeniny, jejichž molekula se skládá z D kruhu, enoléterového můstku a karboxylové skupiny (Obr. 7). Jejich struktura je téměř shodná se strukturou přírodních strigolaktonů, tudíž se předpokládá, že mechanismus jejich účinku bude stejný.

Nejvýznamnějšími látkami této skupiny jsou GR24 (**14**) (Johnson a kol., 1981) a Nijmegen-1 (**15**) (Obr. 7) (Nefkens a kol., 1997).

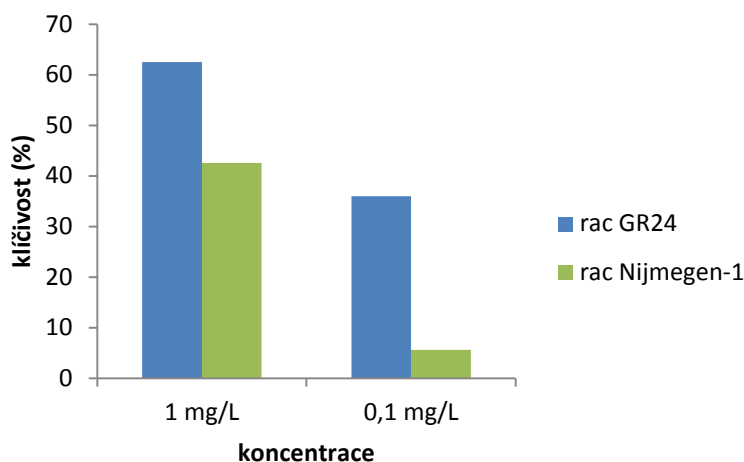


Obr. 7 – Vyznačení důležité části strigolaktonových analogů, struktura GR24 a Nijmegen-1.

Bioaktivita těchto látek se ukázala jako vysoká, a proto se **14** a **15** využívají jako pozitivní kontroly v biotestech na klíčení semen parazitů (Graf 1; Graf 2) (Mangnus a kol., 1992a; Nefkens a kol., 1997).

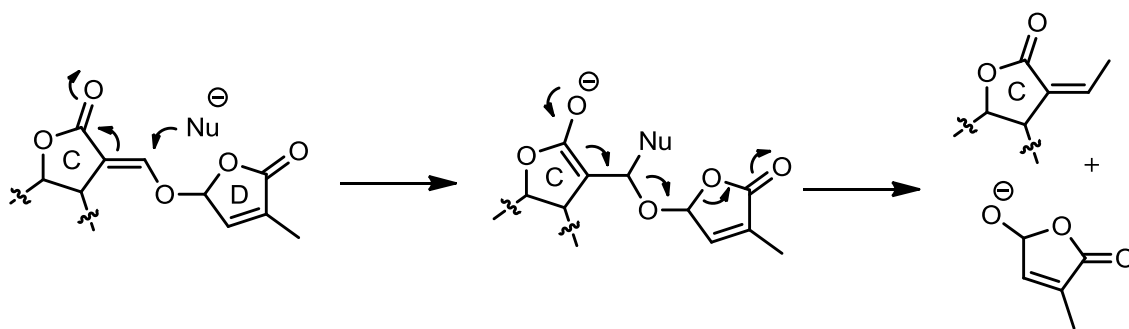


Graf 1 – Srovnání klíčivosti GR24 a Nijmegen-1 u parazita *S. hermonthica*.



Graf 2 – Srovnání klíčivosti GR24 a Nijmegen-1 u parazita *O. crenata*.

Pozitivní výsledky klíčivosti těchto látek následně vedly k vytvoření předběžného molekulárního mechanismu stimulace klíčení semen parazitů (Obr. 8).



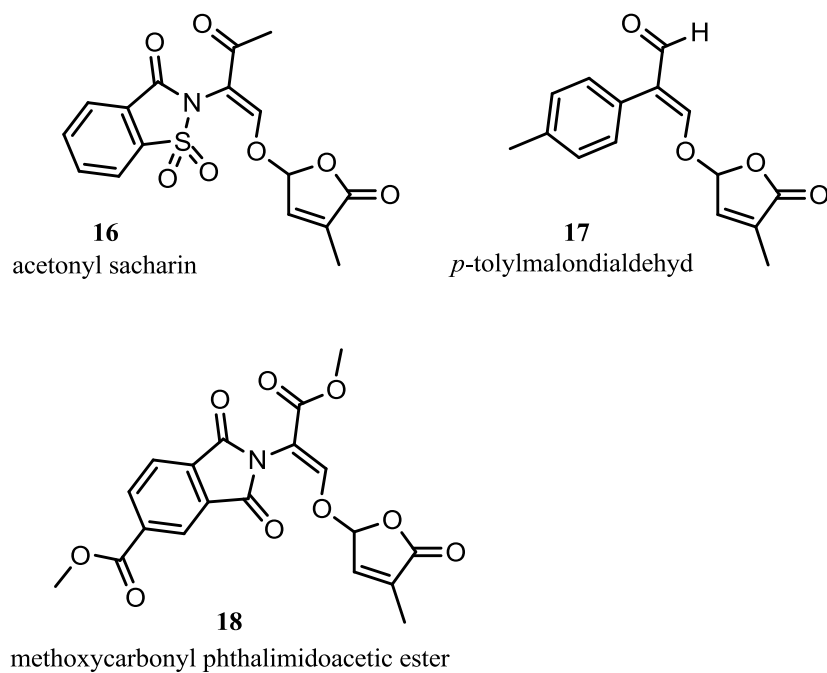
Obr. 8 – Předpokládaný molekulární mechanismus stimulace klíčení semen.

Mechanismus zahrnuje atak nukleofilu (Michaelovu adici) přítomného na/v receptoru semene s následnou eliminací D kruhu. Tato chemická interakce je pravděpodobně zodpovědná za iniciaci klíčení.

Důležitost zmiňované enolétherové části molekuly byla dokázána nahrazením dvojné vazby na enolétheru ($>C=CH-O-$) v molekule GR24 jednoduchou vazbou ($>CH-CH_2-O-$). Následné testování ukázalo úplnou ztrátu aktivity u takto pozměněné molekuly (Mangnus a Zwanenburg, 1992; Zwanenburg a kol., 2009).

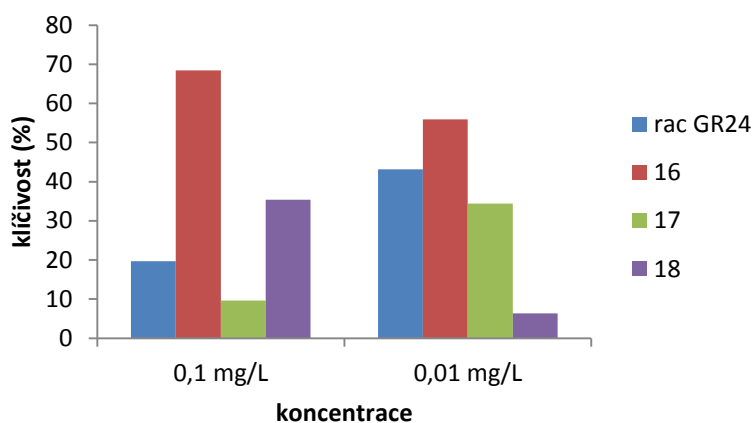
Do roku 2011 bylo připraveno ještě mnoho dalších strigolaktonových analogů, které byly následně studovány jako stimulanty klíčení semen parazitických rostlin (Mangnus a kol., 1992b; Wigchert a Zwanenburg, 1999). Patří sem např. acetonyl

sacharin (**16**), *p*-tolylmalondialdehyd (**17**) a methoxycarbonyl phthalimidoacetic ester (**18**) (Obr. 9) (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011).



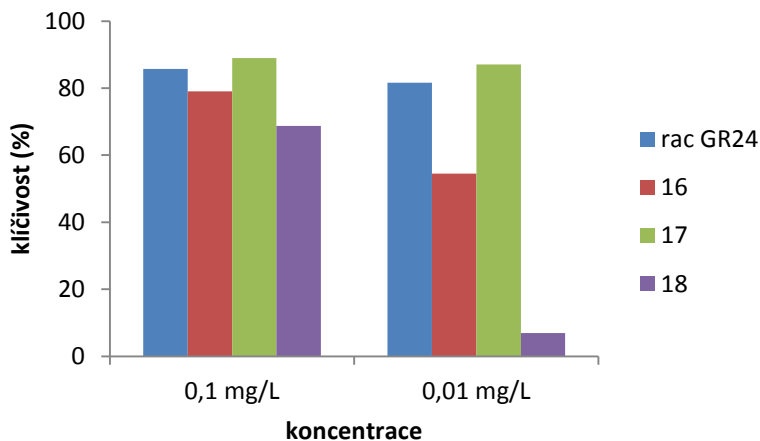
Obr. 9 – acetonyl sacharin, *p*-tolylmalondialdehyd, methoxycarbonyl phthalimidoacetic ester.

Porovnání aktivit těchto připravených strigolaktonových analogů s GR24 je ukázáno v Grafu 3 a Grafu 4.



Graf 3 – Klíčivost **16**, **17**, **18** v porovnání s GR24 u parazita *S. hermonthica*.

Při sledování klíčivosti jednotlivých testovaných látek u parazita *S. hermonthica* při koncentraci 0,01 mg/L lze pozorovat poměrně vysokou klíčivost látky **16** (klíčivost: 55,9 %) a **17** (klíčivost 34,4 %). Látka **16** se překvapivě ukázala jako aktivnější stimulant klíčení než pozitivní kontrola GR24 (klíčivost 43,2 %) (Graf 3).

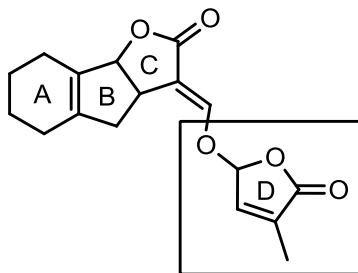


Graf 4 – Klíčivost **16**, **17**, **18** v porovnání s GR24 u parazita *O. cernua*.

V Grafu 4 lze pozorovat, že u parazita *O. cernua* při stejné koncentraci (0,01 mg/L) aplikované látky se opět jako vysoce aktivní ukázaly látky **16** (klíčivost 54,5 %) a **17** (klíčivost 87,1 %). Látka **17** byla dokonce aktivnější než standard GR24 (klíčivost 81,6 %).

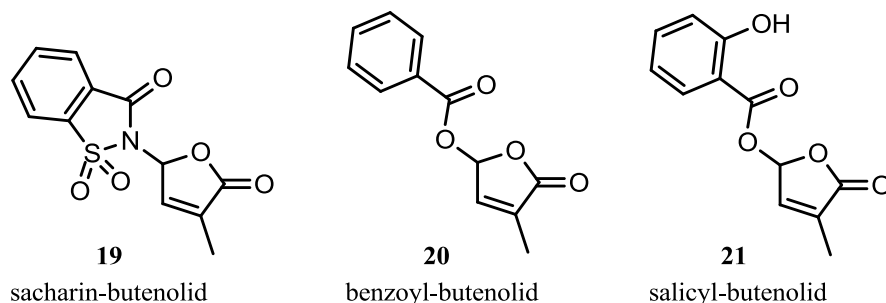
2.5.2 Strigolaktonová mimetika – struktura a mechanismus

Další skupinou syntetických strigolaktonů jsou strigolaktonová mimetika. Jedná se o sloučeniny, které jsou strukturně daleko jednodušší než strigolaktonová analoga. Ze strigolaktonového skeletu (ABCD) u nich zůstala zachována pouze butenolidová skupina (D kruh) (Obr. 10).

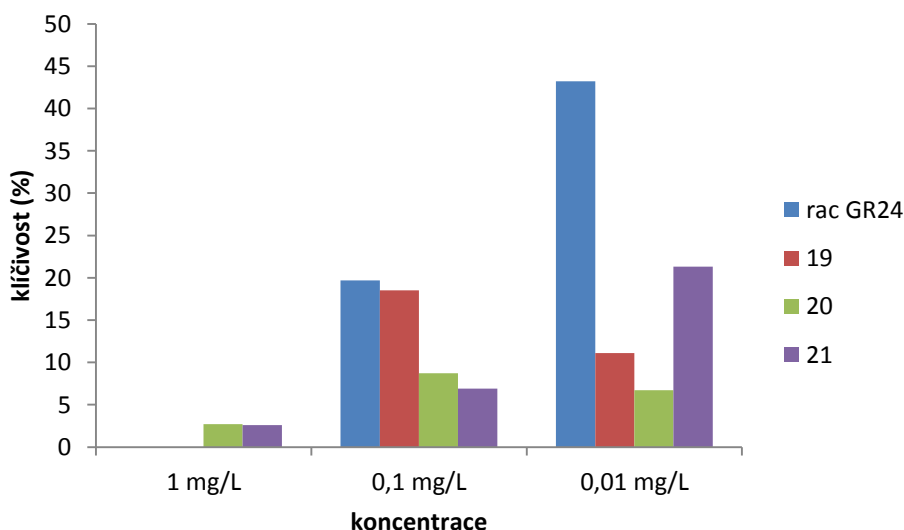


Obr. 10 – Vyznačení základního skeletu (D kruhu) strigolaktonových mimetik.

Prvním testovaným strigolaktonovým mimetikem byl sacharin-butenolid (**19**) (Obr. 11). Tým prof. Zwanenburga ze zvědavosti tuto látku otestoval v biotestu na klíčení semen parazitů společně s připravenými analogy o kterých bylo psáno dříve (viz kapitola 2.5.1). Výsledná vysoká aktivita této látky byla velice překvapivá (Graf 5; Graf 6) a vedla k přípravě dalších mimetik. Jednalo se např. o deriváty odvozené od kyseliny benzoové (**20**) a salicylové (**21**) (Obr. 11). I u těchto sloučenin byla následně testována jejich aktivita na semenech parazitů *S. hermonthica* a *O. cernua*. Výsledky opět ukázaly zřetelnou aktivitu v procesu iniciace klíčení. Klíčivost připravených strigolaktonových mimetik u jednotlivých parazitů je zobrazena v Grafu 5 a Grafu 6 (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011).

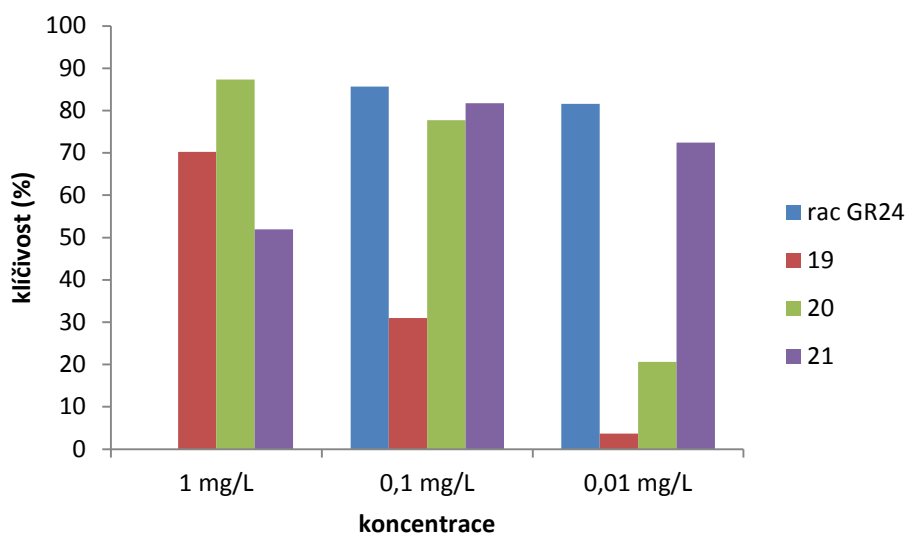


Obr. 11 – Sacharin-butenolid, benzoyl-butenolid a salicyl-butenolid.



Graf 5 – Klíčivost **19**, **20**, **21** a jejich porovnání s GR 24 u parazita *S. hermonthica* (GR24 při koncentraci 1 mg/L nebyla testována).

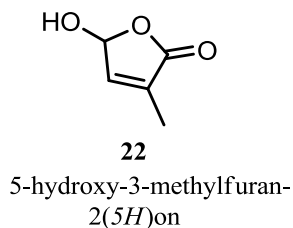
Z Grafu 5 lze pozorovat, že při koncentraci 0,1 mg/L aplikované látky se v případě *S. hermonthica* jako nejpřesvědčivější látka ukázala látka **19** (klíčivost 18,5%), která se svojí aktivitou téměř vyrovnala pozitivní kontrole GR24 (19,7 %). Látky **20** (klíčivost 8,7 %) a **21** (klíčivost 6,9 %) při stejné koncentraci vykazovaly poloviční aktivitu, než látka **19** a GR24. Avšak při nižší koncentraci 0,01 mg/L se k aktivitě strigolaktonového analogu GR24 již nepřiblížily.



Graf 6 – Klíčivost **19**, **20**, **21** a jejich porovnání s GR 24 u parazita *O. cernua* (GR24 při koncentraci 1 mg/L nebyla testována).

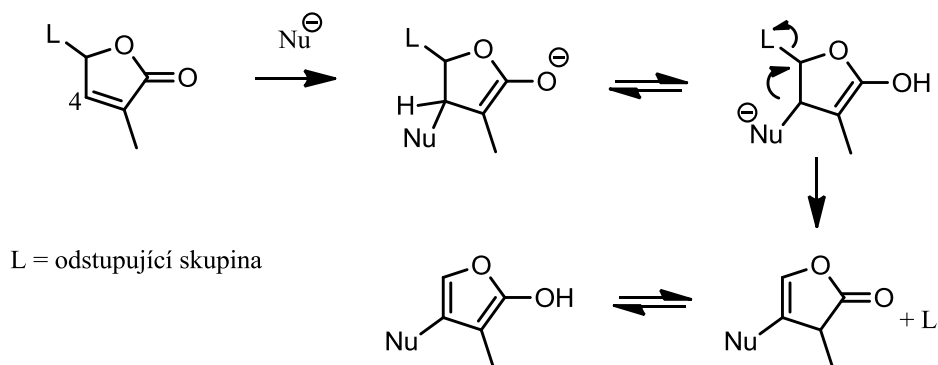
Při testování těchto látek při stejné koncentraci (0,1 mg/L) na semenech parazita *O. cernua* se jako nejvíce aktivní ukázaly látky **20** (klíčivost 77,7 %) a **21** (klíčivost 81,7 %), které téměř dosahovaly aktivity látky GR24 (klíčivost 85,7 %). Při nižší koncentraci si vysokou aktivitu při porovnání s GR24 udržela již jen látka **21**.

Bylo pozorováno, že strigolaktony ve vodném prostředí mohou podléhat hydrolýze na 5-hydroxy-3-methylbutenolid (**22**) (Obr. 12) a zbytek molekuly. Následné testování látky **22** ukázalo, že tento rozkladný produkt je zcela neaktivní stimulant klíčení semen parazitů (Johnson a kol., 1976).



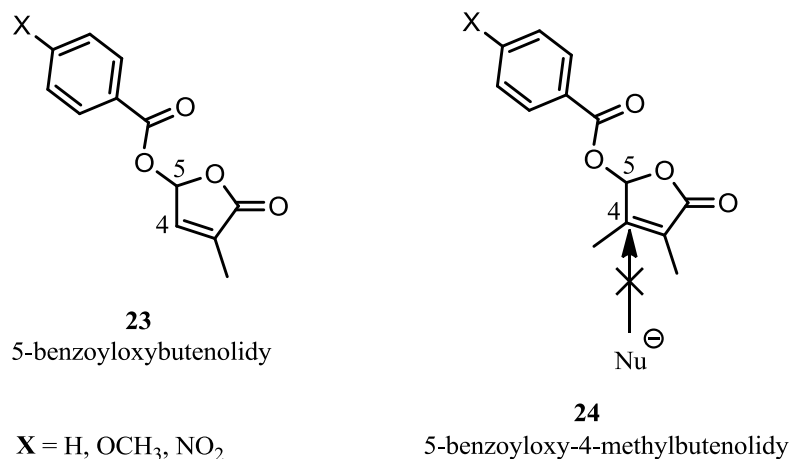
Obr. 12 – 5-hydroxy-3-methylbutenolid.

Jelikož tyto nové látky neobsahují enoléterové spojení, předpokládá se u nich zcela odlišný mechanismus biologického účinku než u přírodních strigolaktonů a analogů. Na základě získaných výsledků byl navržen předpokládaný mechanismus jejich působení (Obr. 13). Nejprve dochází k Michaelově adici nukleofilu na butenolid a následně k přesmyku protonu. Na závěr probíhá eliminace odstupující skupiny.



Obr. 13 – Předpokládaný mechanismus účinku strigolaktonových mimetik.

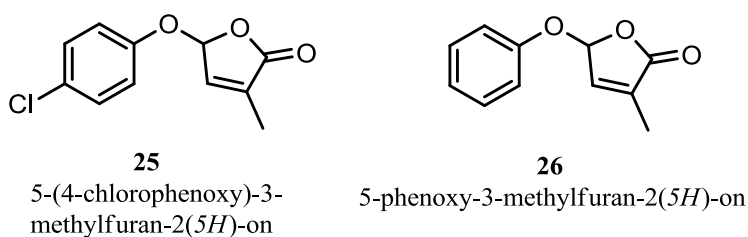
K ověření tohoto mechanismu byly připraveny tři 5-benzoyloxybutenolidy (**23**), které vykazovaly značnou aktivitu v procesu klíčení semen parazita *S. hermonthica* (klíčivost (%): X = H – 10 %; X = OCH₃ – 37 %; X = NO₂ – 42 %) a následně tři butenolidy (**24**), u kterých byl nahrazen vodíkový atom na uhlíku C-4 methylovou skupinou (Obr. 14). Přítomnost této methylové skupiny by měla zabránit nukleofilnímu ataku, a proto by tyto sloučeniny neměly být aktivními stimulanty klíčení semen parazitických rostlin. Test na klíčení semen parazita *S. hermonthica* prokázal, že tyto látky jsou zcela neaktivní (Zwanenburg a Pospíšil., 2013).



Obr. 14 – Mechanismus účinku při přítomnosti methylové skupiny na uhlíku C-4.

2.5.2.1 Strigolaktonová mimetika inhibující větvení nadzemních částí rostlin

Bylo připraveno i několik strigolaktonových mimetik, které nevykazovaly aktivitu při klíčení semen parazitů, ale ukázaly se jako aktivní stimulanty v procesu inhibice větvení stonku rostlin. V roce 2011 bylo připraveno několik těchto látek. Jednalo se o 5-(4-chlorphenoxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (CPMF) (**25**) a 5-phenoxy-3-methylfuran-2(5H)-on (PMF) (**26**) (Obr. 15). Při testování se CPMF ukázal jako aktivní inhibitor větvení, avšak PMF, který neobsahoval ve své molekule halogen, byl neaktivní (Fukui a kol., 2011).

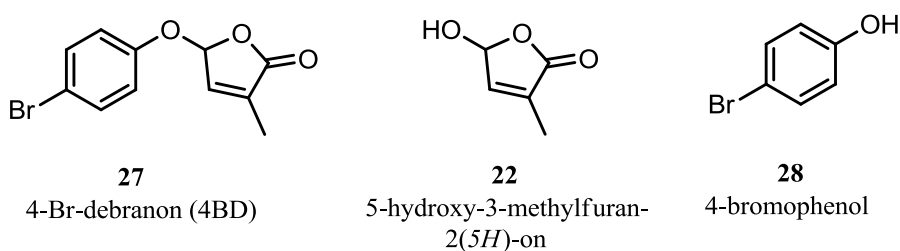


Obr. 15 – Struktura CPMF a PMF.

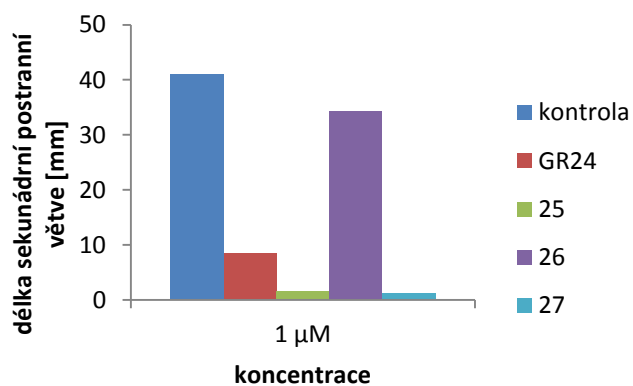
Tyto výsledky vedly k dalším studiím a syntéze několika dalších 5-phenoxy derivátů s různými substituenty na phenoxy skupině. Experimenty ukázaly, že aktivita těchto sloučenin souvisí právě s druhem substituentu. Halogenované sloučeniny obsahující fluor, brom, jód nebo již zmiňovaný chlór byly shledány jako aktivní (Graf 7). Kromě halogenderivátů se jako aktivní ukázaly ještě phenoxy sloučeniny substituované nitrilovou,

trifluormethylovou a methylovou skupinou. Za neaktivní či velmi málo aktivní je považována *tert*-butylová, butenolidová, methoxycarbonylová a methoxy skupina.

Z této studie se jako přesvědčivá sloučenina ukázala 4-Br-debranon (4BD) (**27**) (Obr. 16) (Graf 7). Bylo zjištěno, že ve vodném prostředí může 4BD podléhat hydrolýze za vzniku furanonu (**22**) a fenolu (**28**) (4-bromophenol), což potvrzuje skutečnost, že strigolaktonová mimetika nejsou příliš stabilními látkami (Obr. 16) (Fukui a kol. 2013).



Obr. 16 – 4-Br-debranon, 5-hydroxy-3-methylfuran-2[5H]-on a 4-bromophenol.



Graf 7 – Délka postranní odnože stonku při aplikaci **25**, **26**, **27** a GR24 u mutantu rýže *d10*.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro organickou syntézu bylo použito těchto chemických látek: trifenylmethylchlorid, *N,N*-dimethylformamid, pyridin, di-*t*-butyloxykarbonyl, uhličitán draselný, *o*-toluidin, 4-dimethylaminopyridin, anilin, tetrahydrofuran, dichlormethan, triethylamin, benzylamin, adenin, trifluoroctová kyselina, síran sodný bezvodý, nasycený roztok chloridu sodného, 9-(oxan-2-yl)purin-6-amin, 0,5 M kyselina chlorovodíková, ethylacetát, petrolether, aceton, methanol. Použitá rozpouštědla byla dodána firmami Sigma Aldrich a Lachner. Sloučeniny GR24 a Nijmegen-1 byly darovány profesorem Zwanenburgem.

3.2 Materiál

Připravené sloučeniny byly biologicky testovány na semenech parazita *Striga hermonthica* (Súdán 1994).

3.3 Metody

Reakce byly sledovány prostřednictvím tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách (Silikagel 60 WF 254; Merck). Pro analýzu produktů bylo využito metody nukleární magnetické rezonance (NMR). Získaná spektra byla pořízena při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C) na přístroji JEOL 500 ECA. Pro měření bylo využito těchto rozpouštědel: deuterovaný chloroform (CDCl_3) a deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$). Kalibrace chemických posunů byla prováděna na konkrétní rozpouštědlo ($\delta^1\text{H}$ (CDCl_3) = 7.25 ppm; $\delta^{13}\text{C}$ (CDCl_3) = 77.2 ppm; $\delta^1\text{H}$ ($\text{DMSO-}d_6$) = 2.45 ppm; $\delta^{13}\text{C}$ ($\text{DMSO-}d_6$) = 40.11 ppm). Ke stanovení čistoty látek bylo využito metody HPLC (150 mm x 2,1 mm, 5 μm , Symmetry C18, Waters) s UV detektorem. K získání hmotnostních spekter bylo využito přístroje Q-TOF MICRO (Waters). K inkubaci semen bylo využito termostatu INOVA 42.

3.4 Syntéza strigolaktonových mimetik

3.4.1 Příprava purinových derivátů

3.4.1.1 Butenolidy odvozené od adeninu

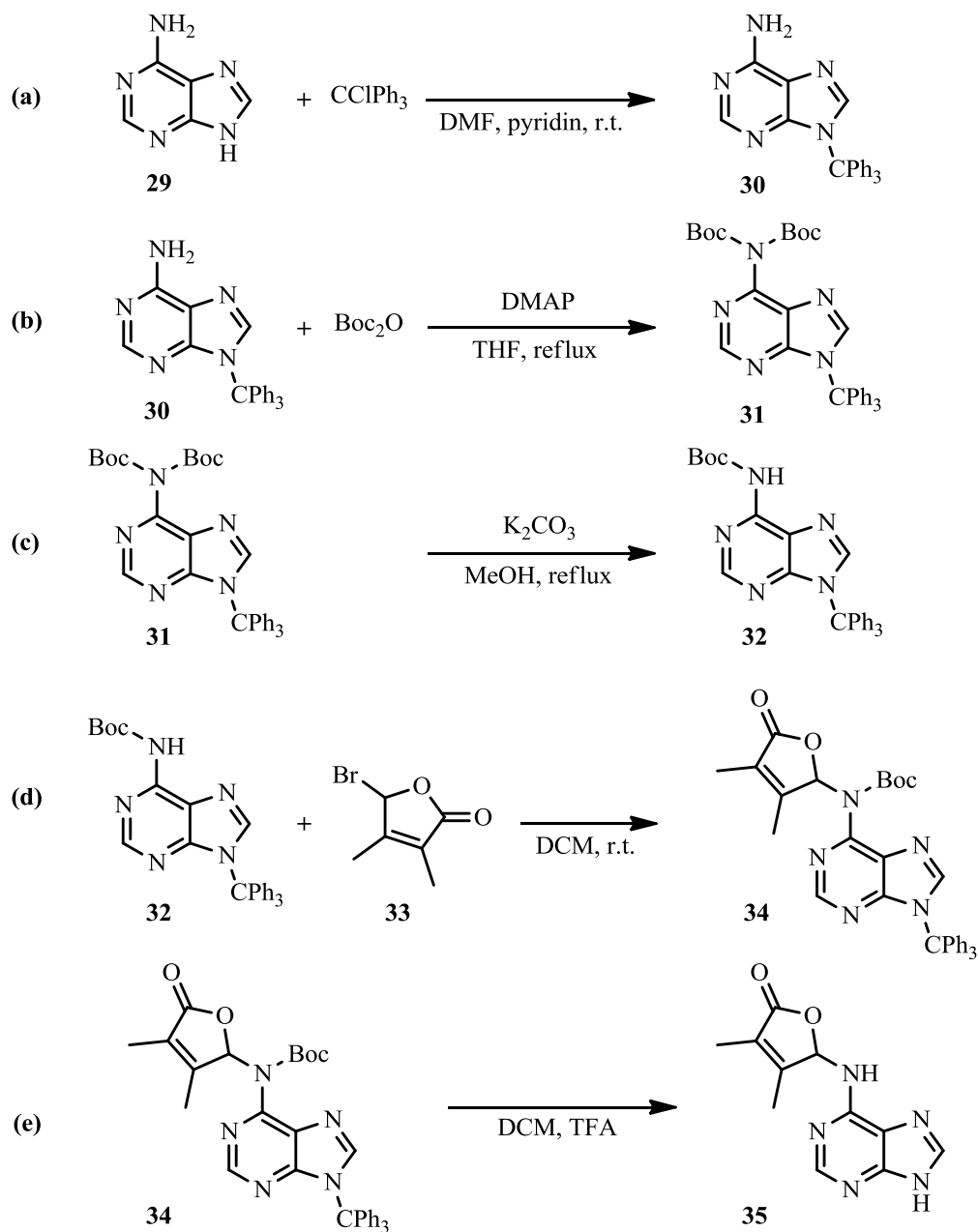
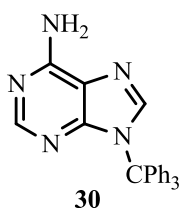


Schéma 1 – Obecné schéma přípravy butenolidových derivátů adeninu.

Reakce probíhaly v bezvodém prostředí a v přítomnosti inertního plynu argonu. (a) Do vysušené baňky byl nejdříve přidán adenin (9,99 mmol) rozpuštěný v *N,N*-dimethylformamidu (10 ml) a následně trifenylmethylchlorid (10 mmol) rozpuštěný v pyridinu (30 ml). Reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Poté byl k reakční směsi přidán ethylacetát (150 ml) a destilovaná voda (100 ml). Organická fáze byla protřepána destilovanou vodou (4 × 100 ml). První část produktu – pevná látka, která vznikla během extrakce, byla zfiltrována a získána ve velmi vysoké čistotě. Organická fáze obsahující druhou část produktu byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a odpařena na vakuové odparce. Produkt byl použit v další syntéze bez čištění.

9-trityl-9H-purin-6-amin

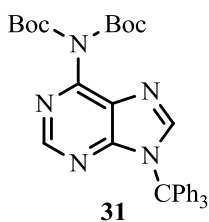


Výtěžek: kvantitativní, žlutobílá pevná látka

^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 5.97 (s; 2H), 7.13 – 7.15 (m; 6H); 7.29 – 7.30 (m; 9H), 7.74 (s; 1H), 8.02 (s; 1H).

(b) K produktu **30** (1 mmol) byl přidán tetrahydrofuran (47,5 ml). Po několika minutách byl přidán di-*t*-butyloxykarbonyl (3 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (0,1 mmol). Reakce probíhala přes noc při refluxování a její průběh byl kontrolován pomocí TLC. Po ukončení reakce byla reakční směs zfiltrována a k surovému produktu byla přidána 0,5 M kyselina chlorovodíková (50 ml) a ethylacetát (50 ml). Vodná fáze byla protřepána s ethylacetátem (3 × 50 ml), následně vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a odpařena na vakuové odparce. Surový produkt byl dle NMR získán ve vysoké čistotě a byl použit do další reakce.

N-(3,3-dimethylbutanoyl)-3,3-dimethyl-*N*-(9-trityl-9H-purin-6-yl)butanamid

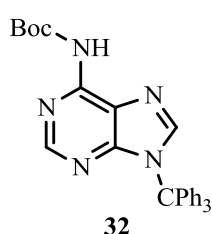


Výtěžek: kvantitativní, žlutobílá pěna

^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 1.41 (d; $J = 13,45$ Hz; 18H), 7.11 – 7.13 (m; 6H), 7.24 – 7.25 (m; 2H), 7.27 – 7.29 (m; 7H), 8.04 (s; 1H), 8.52 (s; 1H).

(c) Surový produkt **31** (1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (47,5 ml). Následně byl přidán uhličitán draselný (3 mmol). Reakce probíhala 3 hodiny při refluxu a kontrola jejího průběhu byla prováděna pomocí TLC. Reakční směs byla odpařena na vakuové odparce. K surovému produktu byla přidána 0,5 M kyselina chlorovodíková (50 ml) a ethylacetát (50 ml). Vodná fáze byla protřepána s ethylacetátem (3 × 50 ml). Získaná organická fáze byla dále protřepána nasyceným roztokem chloridu sodného a následně vysušena bezvodým síranem sodným a zfiltrována. Všechna rozpouštědla byla prostřednictvím vakuové odparky odpařena a surový produkt byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel, petrolether : ethylacetát; 10:1 – 1:0).

3,3-dimethyl-N-(9-trityl-9H-purin-6-yl)butanamid

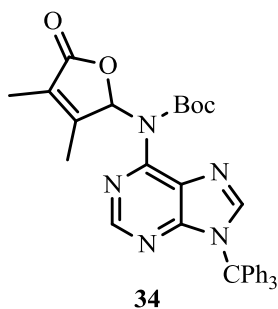


Výtěžek: 81 %, žlutobílá pěna

¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 1.52 (s; 9H), 6.02 (s; 1H), 7.11 – 7.16 (m; 6H), 7.27 – 7.33 (m; 9H), 7.89 (s; 1H), 8.45 (s; 1H).

(d) Do vysušené dvouhrdlé baňky byl přidán suchý dichlormethan a následně bromfuranon (**33**) (1,2 mmol) a produkt **32** (1 mmol). Reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě a její průběh byl kontrolován pomocí TLC. Reakční směs byla odpařena a surový produkt byl získán ve vysoké čistotě (dle NMR).

N-(3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-3,3-dimethyl-N-(9-trityl-9H-purin-6-yl)butanamid



Výtěžek: kvantitativní, bílá pěna

¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 1.59 (s; 9H), 1.87 (s; 3H), 2.09 (s; 3H), 6.67 (s; 1H), 7.26 – 7.31 (m; 15 H), 8.46 (s; 1H), 8.79 (s; 1H).

(e) K surovému produktu **34** (1 mmol) byl přidán suchý dichlormethan (2,6 ml) a trifluoroctová kyselina (2,6 ml). Reakce probíhala 3 hodiny při laboratorní teplotě. Průběh byl sledován pomocí TLC. Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena (TFA azeotrop s CHCl_3). Finální produkt nebyl získán, jelikož odstranění chránících skupin z látky **34** vedlo k hydrolyze finálního produktu **35** na adenin (**29**) a furanon (**36**) (Schéma 2).

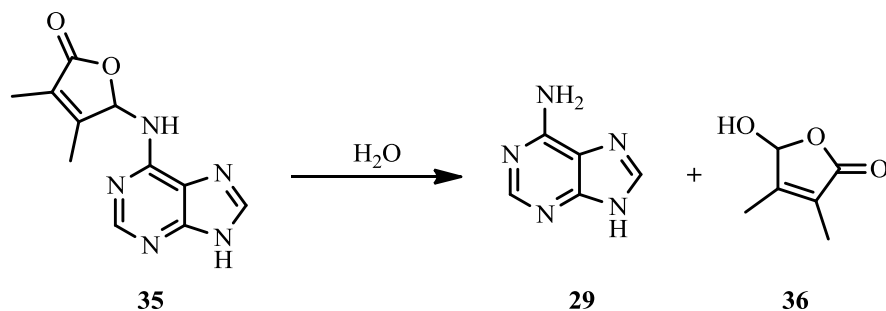
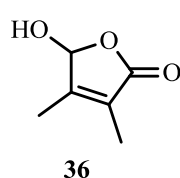


Schéma 2 – Rozklad **35** na **29** a **36**.

5-hydroxy-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on



^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 1.77 (s; 3H), 1.97 (s; 3H), 6.08 (s; 1H), 6.88 (m; 1H).

3.4.1.2 Butenolidy odvozené od 9-(oxan-2-yl)purin-6-aminu

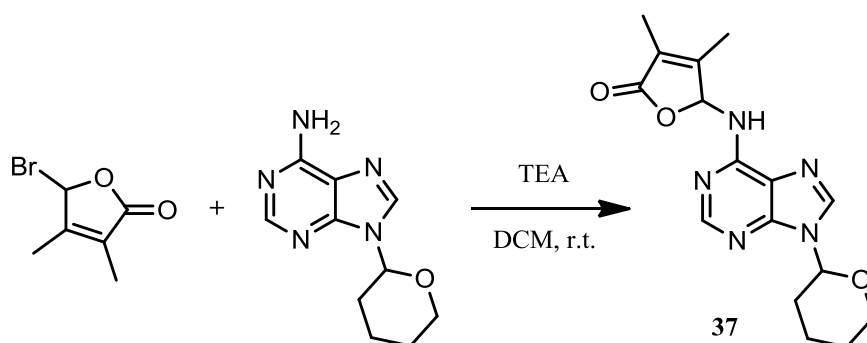


Schéma 3 – Obecné schéma přípravy butenolidových derivátů 9-(oxan-2-yl)purin-6-aminu.

Reakce probíhala v bezvodém prostředí a v přítomnosti inertního plynu argonu. Do vysušené baňky byl nejdříve přidán suchý dichlormethan (2,6 ml) s následným přidavkem bromfuranonu (1 mmol) a 9-(oxan-2-yl)purin-6-aminu (1 mmol). Reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě a její průběh byl sledován pomocí TLC. Po ukončení reakce byla k reakční směsi přidána destilovaná voda a vodná fáze byla vytřepána s ethylacetátem. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Následně byla organická fáze zfiltrována a zahuštěna prostřednictvím vakuové odparky. Analýza ^1H NMR ukázala, že k reakci nedošlo.

3.4.2 Příprava derivátů odvozených od anilinu a benzylaminu

3.4.2.1 Deriváty anilinu

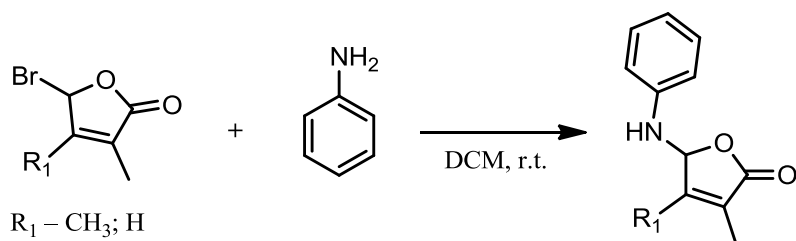
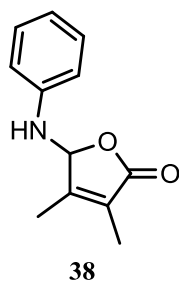


Schéma 4 – Obecné schéma přípravy derivátů anilinu.

Reakce probíhala v bezvodém prostředí a v přítomnosti inertního plynu argonu. Do předem vysušené dvouhrdlé baňky byl nejdříve přidán suchý dichlormethan (2,6 ml) s následným přidavkem bromfuranonu (1 mmol) a anilinu (1,5 mmol). Reakce probíhala 24 hodin při laboratorní teplotě a její průběh byl sledován pomocí TLC.

Po ukončení reakce byla reakční směs zfiltrována a následně odpařena s využitím vakuové odparky. Surový produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : ethylacetát; 10:1 – 3:1).

3,4-dimethyl-5-(phenylamino)-furan-2(5H)-on



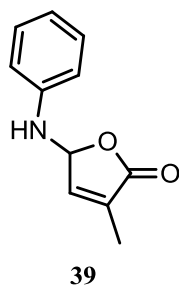
Výtěžek: 49 %, pevná hnědá látka

^1H NMR (DMSO-d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 1.74 (s; 3H), 1.94 (s; 3H), 6.26 (d; $J = 10,7$ Hz; 1H), 6.69 – 6.72 (m; 1H), 6.78 – 6.81 (m; 3H), 7.11 – 7.15 (m; 2H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6 ; 125 MHz) δ (ppm): 8.9, 12.6, 88.4, 114.4, 119.3, 125.3, 129.5, 146.0, 156.0, 173.3.

MS (ES^+), m/z : 203.88 [$\text{M}+1$].

3-methyl-5-(phenylamino)-furan-2(5H)-on



Výtěžek: 11%, pevná hnědá látka

^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 1.98 (d; $J = 1,5$ Hz; 3H), 6.23 (s; 1H), 6.86 – 6.95 (m; 4H).

^{13}C NMR (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 10.8, 86.2, 115.2, 121.1, 129.5, 134.8, 142.6, 143.7, 172.5.

MS (ES^+), m/z : 187.84 [$\text{M}+1$].

Finální produkt **39** byl uchováván v mrazicím boxu při teplotě -20°C , ale i přes to byl pozorován hydrolytický rozklad na anilin (**40**) a furanon (**22**) (Schéma 5).

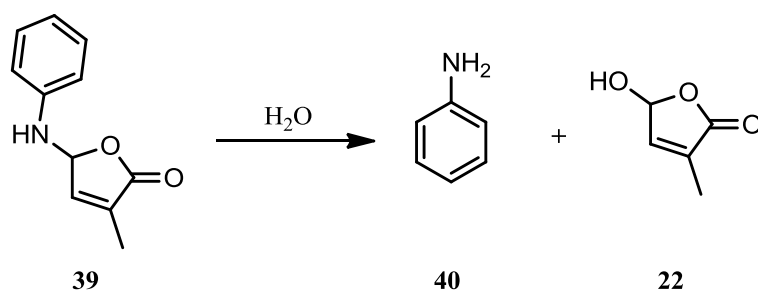
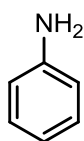


Schéma 5 – Rozklad **39** na **40** a **22**.

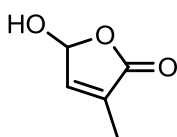
anilin



40

MS (ES⁺), m/z: 93.61 [M+1].

5-hydroxy-3-methylfuran-2(5H)-on



22

¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 1.97 (t; *J* = 1.6 Hz; 3H), 6.08 (s; 1H), 6.88 (m; 1H).

MS (ES⁺), m/z: 114.64 [M+1].

3.4.2.2 Deriváty benzylaminu

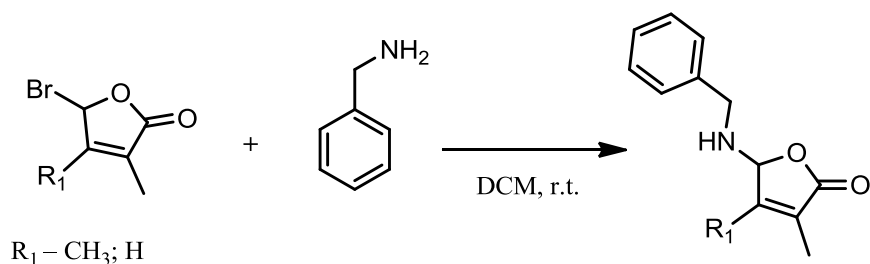
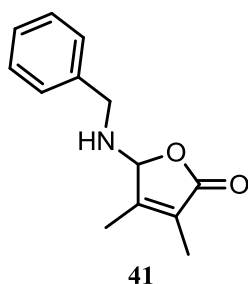


Schéma 6 – Obecné schéma přípravy derivátů benzylaminu.

Reakce probíhala za inertních podmínek (argon) a v bezvodém prostředí. Do vysušené tříhrdlé baňky byl nejdříve přidán suchý dichlormethan (2,6 ml) a následně bromfuranon (1 mmol) a benzylamin (1 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 h a její průběh byl kontrolován pomocí TLC.

Po skončení reakce byla reakční směs zfiltrována. Pevná složka byla odstraněna a zbylá reakční směs následně odpařena s využitím vakuové odparky. Surový produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether : ethylacetát; 10:1 – 2:1).

5-(benzylamino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on



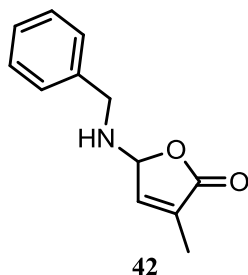
Výtěžek: 51 %, pevná bílá látka

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.80 (s; 3H), 1.90 (s; 3H), 4.27 (d; $J = 14,9$ Hz; 1H), 4.89 – 4.93 (m; 2H), 7.00 – 7.45 (m; 4H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.2, 10.9, 42.8, 83.0, 127.2, 128.0, 128.4, 129.3, 137.2, 147.9, 170.4.

MS (ES⁺), m/z : 217.89 [M+1].

5-(benzylamino)-3-methylfuran-2(5H)-on



Příprava finálního produktu se nezdařila. Při analýze TLC bylo pozorováno velké množství skvrn a při vyhodnocování NMR spektra (^1H) nebylo možné vlivem velkého množství signálů identifikovat jakýkoliv produkt.

3.4.2.3 Deriváty *o*-toluidinu

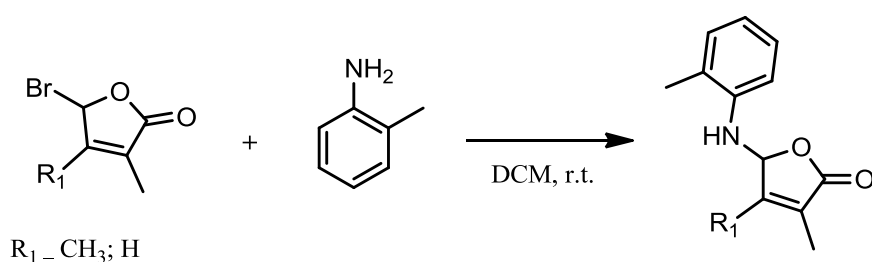


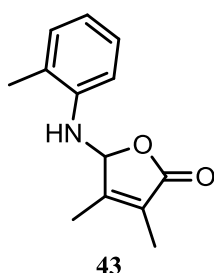
Schéma 7 – Obecné schéma přípravy derivátů *o*-toluidinu.

Reakce probíhala v bezvodém a inertním prostředí (argon). Do suché dvouhrdlé baňky byl přidán suchý dichlormethan (2,6 ml) a následně bromfuranon (1 mmol) a *o*-toluidin

(1,5 mmol). Reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě a její průběh byl analyzován pomocí TLC.

Po ukončení reakce byla reakční směs zfiltrována a pevná část odstraněna. Zbytek reakční směsi byl odpařen s využitím vakuové odparky. Následně byl surový produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Pro čištění produktu **43** byl použit silikagel (petrolether: ethylacetát; 1:1). U produktu **44** bylo pro purifikaci využito klasického silikagelu (petrolether: dichlormethan: aceton; 1:1:0,5), i silikagelu s reverzní fází (C18) (methanol: destilovaná voda; 3:1).

3,4-dimethyl-5-(o-tolylamino)-furan-2(5H)-on



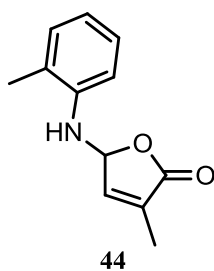
Výtěžek: 59 %, pevná hnědá látka

^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 1.89 (s; 3H), 2.05 (s; 3H), 2.16 (s; 3H), 6.05 (s; 1H), 6.86 (t; $J = 14,98$ Hz; 1H), 7.05 (d; $J = 7,95$ Hz, 1H), 7.10 (d; $J = 7,34$ Hz; 1H), 7.16 (t; $J = 15,28$ Hz; 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 8.8, 12.3, 17.5, 88.3, 113.7, 120.9, 124.4, 127.3, 127.4, 130.6, 142.2, 153.7, 172.9.

MS (ES+), m/z (%): 217.88 [M+1].

3-methyl-5-(o-tolylamino)-furan-2(5H)-on



Výtěžek: 71 %, pevná hnědooranžová látka

^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 2.05 (s; 3H), 2.16 (s; 3H), 6.05 (s; 1H), 6.86 (t; $J = 14,98$ Hz; 1H), 7.05 (d; $J = 7,95$ Hz, 1H), 7.10 (d; $J = 7,34$ Hz; 1H), 7.16 (t; $J = 15,28$ Hz; 1H).

Výsledný produkt se podařilo připravit, avšak při jeho čištění na koloně s využitím silikagelu i silikagelu s reverzní fází (C18) byl pozorován rozklad. Vzniklo velké množství neidentifikovatelných produktů (TLC, ^1H NMR).

3.5 Biologické testování

Biologické testování bylo prováděno na semenech parazita *Striga hermonthica*. Sterilizace semen byla prováděna za stálého míchání po dobu 5 minut v roztoku Sava (4,7 g aktivního chlóru/100 ml), do něhož byl přidán detergent Triton X-100 (1% v/v). Následně byla sterilizovaná semena zfiltrována přes fritu a promyta destilovanou vodou. Po ukončení sterilizace byla semena sušena po dobu 3 hodin.

Před použitím semen bylo nachystáno několik Petriho misek, na jejichž dno byly vloženy dva kruhové filtrační papíry (průměr 9 cm). Na tyto dvě vrstvy filtračních papírů byly napipetovány 3 ml destilované vody a následně přiloženo 25 skelných filtračních čtverců o velikosti 1×1 cm. Na jednotlivé čtverce byla aplikována semena.

Na každý skelný čtverec bylo přidáno přibližně 25 kusů semen. Po přidání semen byly jednotlivé čtverce přikryty dalším čtvercem a byly na ně napipetovány další 3 ml destilované vody. Na závěr byla Petriho miska uzavřena a vložena do uzavíratelného plastového sáčku. Semena byla inkubována při 23°C po dobu 14 dní.

Po inkubaci byly jednotlivé skelné čtverce se semeny vyjmuty z Petriho misek a vysušeny prostřednictvím filtračního papíru. Do čistých Petriho misek byly vloženy dva papírové kruhy o průměru 9 cm a šířce 1 cm. Na tyto kruhy byly napipetovány 2 ml destilované vody. Do takto připravených Petriho misek byly vloženy 4 suché čtverce se semeny. Následně bylo na čtverce aplikováno 100 µl roztoku látky o testované koncentraci. Poté byly Petriho misky uzavřeny a vloženy do uzavíratelného plastového sáčku.

Aplikace testovaných látek byla prováděna ve třech koncentracích, které byly připraveny postupným ředěním. Látka byla rozpuštěna v potřebném množství acetonu a destilované vody tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku odpovídala koncentraci 10^{-4} M. Z tohoto zásobního roztoku byl odpipetován 1 ml a poté doplněn na objem 100 ml destilovanou vodou. Tímto byl získán roztok o koncentraci 10^{-6} M s objemovým obsahem acetonu 0,1 %. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml a doplněn na 10 ml destilovanou vodou. Takto byl získán roztok o koncentraci 10^{-7} M s objemovým obsahem acetonu 0,01 %. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml a opět doplněn na objem 10 ml. Takto byl získán roztok o koncentraci 10^{-8} M s objemovým obsahem acetonu 0,001 %.

Jako negativní kontrola byla použita destilovaná voda s obsahem acetonu 0,1 % (v/v) a 0,001% (v/v). Pozitivními kontrolami byly roztoky Nijmegen-1 a GR 24,

které byly připraveny identicky jako testované látky. Všechny koncentrace byly testovány ve 2 opakováních.

Semena *S. hermonthica* v Petriho miskách s aplikovanými roztoky byla inkubována po dobu 6 dní při teplotě 27°C.

Po uplynulé době inkubace byla semena spočítána pod binokulární lupou a byla stanovena procentualita klíčivosti.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Deriváty adeninu

První část syntézy byla zaměřena na přípravu nových strigolaktonových mimetik odvozených od purinu. V prvních krocích syntézy (**a-c**) byl adenin (**29**) ochráněn chránicími skupinami (-CPh₃, -Boc). V další části syntézy (**d**) byl substituován bromovaný furanon (**33**) v pozici 5 připraveným adeninovým derivátem (**32**). V posledním kroku (**e**) přípravy strigolaktonových mimetik byly v kyselém prostředí odstraněny chránicí skupiny (-Boc, -CPh₃).

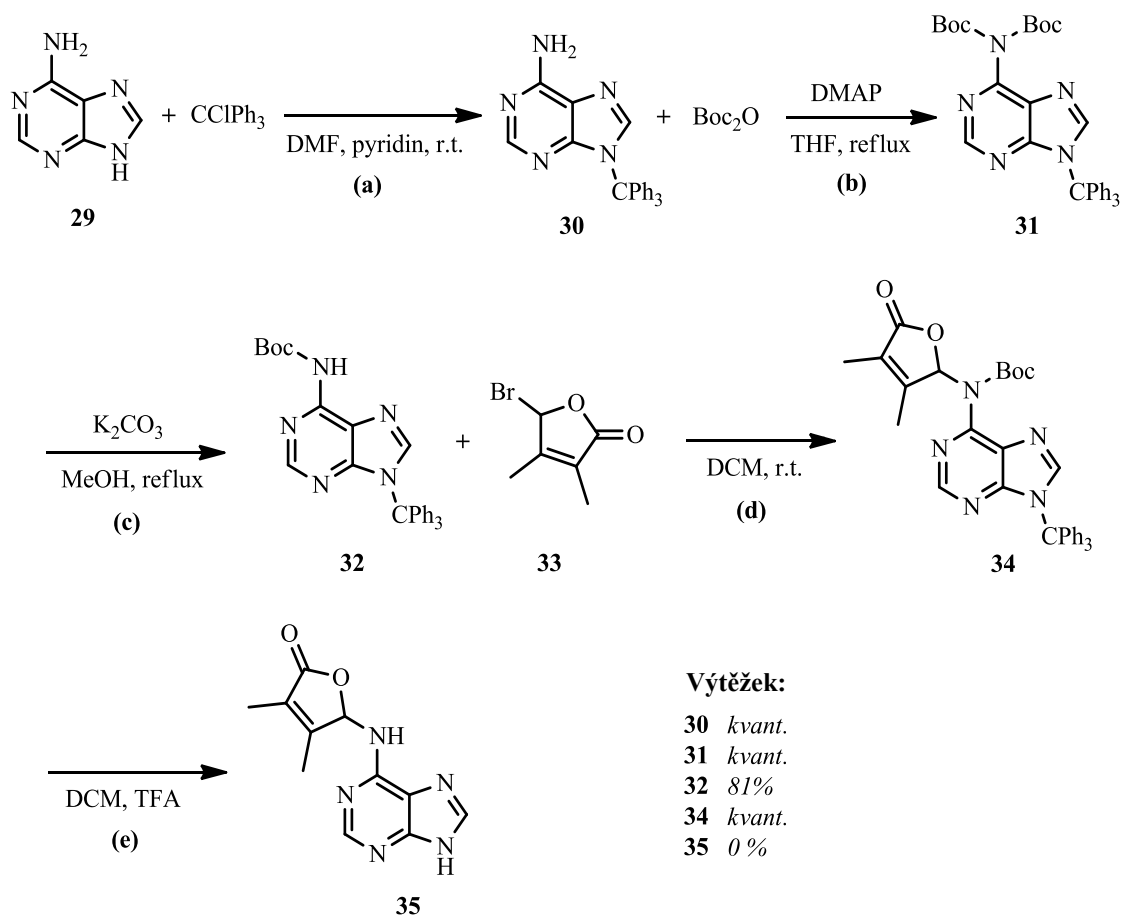


Schéma 8 – Obecné schéma přípravy derivátů *o*-toluidinu

Příprava produktů **30**, **31**, **32** a **34** byla úspěšná. Finální produkt (**35**) se získat nepodařilo, jelikož při pokusu o odstranění chránicích skupin z produktu **34** došlo též k odhydrolyzování furanonu (**36**) (Schéma 9).

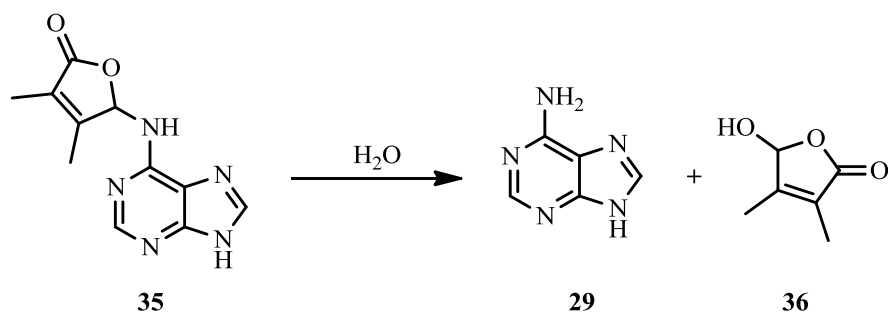


Schéma 9 – Rozklad 35 na 29 a 36.

Paralelně s přípravou produktu **35** byl vyzkoušen další alternativní postup přípravy strigolaktonových mimetik odvozených od purinu. Jednotlivá mimetika měla být připravena přímým spojením bromovaného furanonu (**33**) s purinem (**45**). Tato substituční reakce byla prováděna za laboratorní teploty v suchém dichlormethanu (Schéma 10).

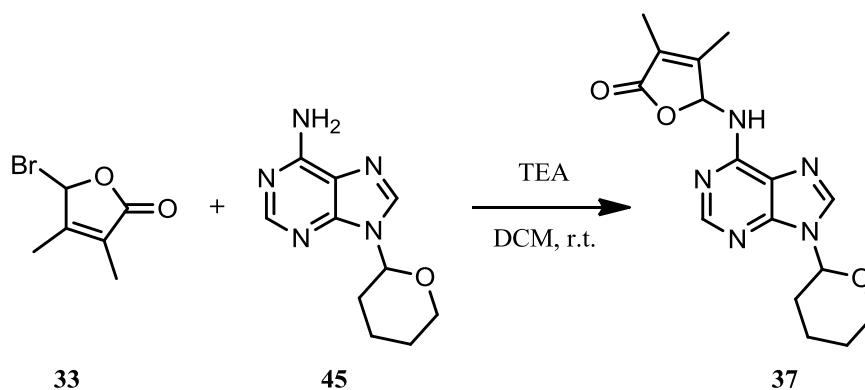


Schéma 10 – Spojení 33 s 45.

Analýza 1H NMR spektra a TLC ukázala, že příprava finálního produktu **37** byla neúspěšná. Na TLC bylo možné pozorovat, že ke konverzi výchozí látky (**45**) ve finální produkt (**37**) nedošlo, což bylo následně potvrzeno i analýzou 1H NMR spektra.

Příprava nových strigolaktonových mimetik odvozených od purinu se tedy nedařila a zdála se být ztrátou času. Tudíž bylo potřeba ověřit, zda je vůbec možné spojit D-kruh přes dusík s další látkou. Následně byla tedy syntéza zaměřena na přípravu modelových sloučenin.

4.2 Modelové sloučeniny – deriváty anilinu a benzylaminu

Další část syntézy byla zaměřena na přípravu modelových struktur – strigolaktonových mimetik odvozených od anilinu, benzylaminu. Jednotlivé látky byly připraveny substitucí bromfuranonu (**33**) a (**46**) v pozici 5 s daným aminem. Tato substituční reakce byla prováděna v suchém dichlormethanu za laboratorní teploty (Schéma 11).

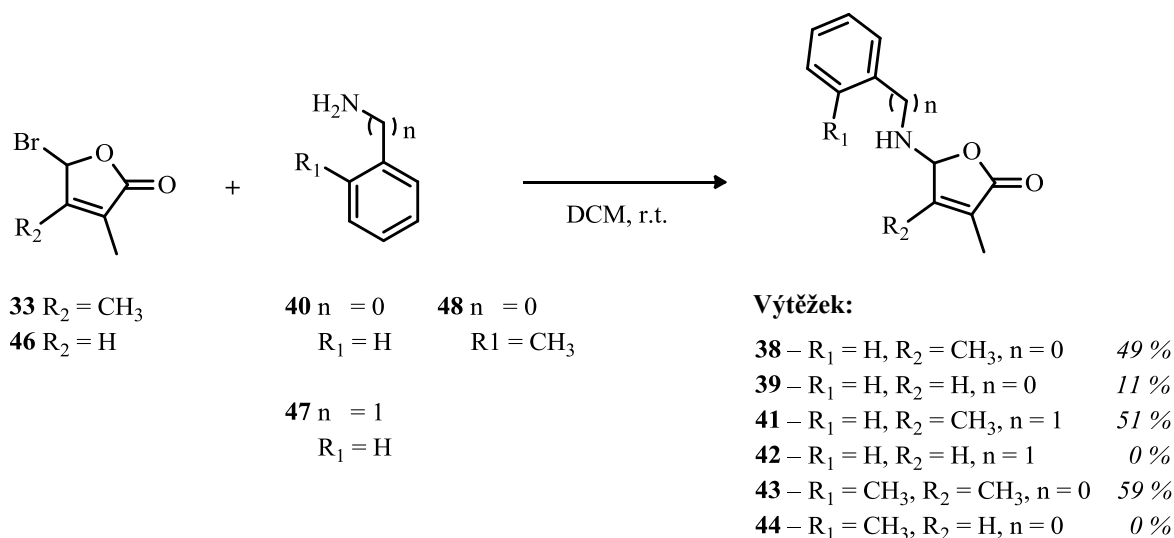


Schéma 11 – Spojení **33**, **46** s **40**, **47**, **48**.

Finální produkty **38**, **39**, **41**, **43** byly purifikovány prostřednictvím sloupové chromatografie s využitím klasického silikagelu. Po purifikaci byly produkty skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20°C . I přestože byla připravená mimetika uchovávána při tak nízké teplotě, bylo možné pozorovat u produktu **39** hydrolytický rozklad (Schéma 12).

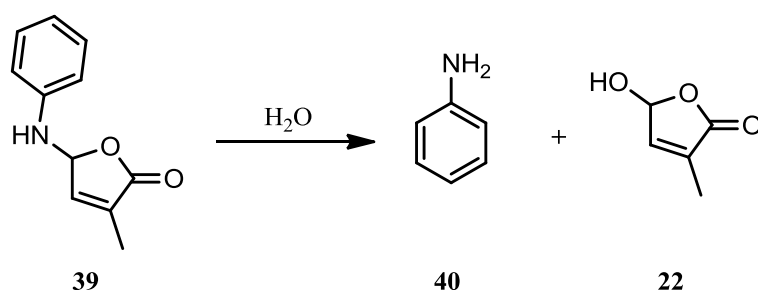


Schéma 12 – Rozklad **39** na **40** a **22**.

Příprava finálního produktu **42** byla neúspěšná. Při TLC analýze i v ^1H NMR spektru bylo pozorováno velké množství signálů.

Finální produkt **44** byl připraven úspěšně. Následně byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie s využitím silikagelu. Při TLC analýze byl bohužel zaznamenán jeho rozklad. Tato látka byla poté čištěna také na silikagelu s reverzní fází (C18). Následná analýza produktu pomocí TLC a NMR bohužel opět ukázala, že i tento způsob purifikace vedl k rozkladu. Ukázalo se, že tento produkt je velmi nestabilní a tak nedošlo k jeho testování.

4.3 Biologická aktivita

Bioaktivita nových připravených sloučenin byla otestována ve standardizovaném biotestu (Mangnus a kol., 1992c).

Postup provedení biotestu je zmíněn v kapitole 3.5. K testování byla použita semena rostlinného zástupce *Striga hermonthica*. Jako pozitivní kontroly byly aplikovány sloučeniny GR24 a Nijmegen-1. Testování bylo provedeno pro gradient koncentrací jednotlivých sloučenin. Biologické testování bylo prováděno v dubnu a semena rostliny *Striga hermonthica* v případě GR24 klíčila v rozmezí od 5,5 % do 56 % v závislosti na zvyšování koncentrace. Klíčivost kontroly Nijmegen-1 se pohybovala v rozmezí od 1,3 % do 23 % v závislosti na zvyšování koncentrace.

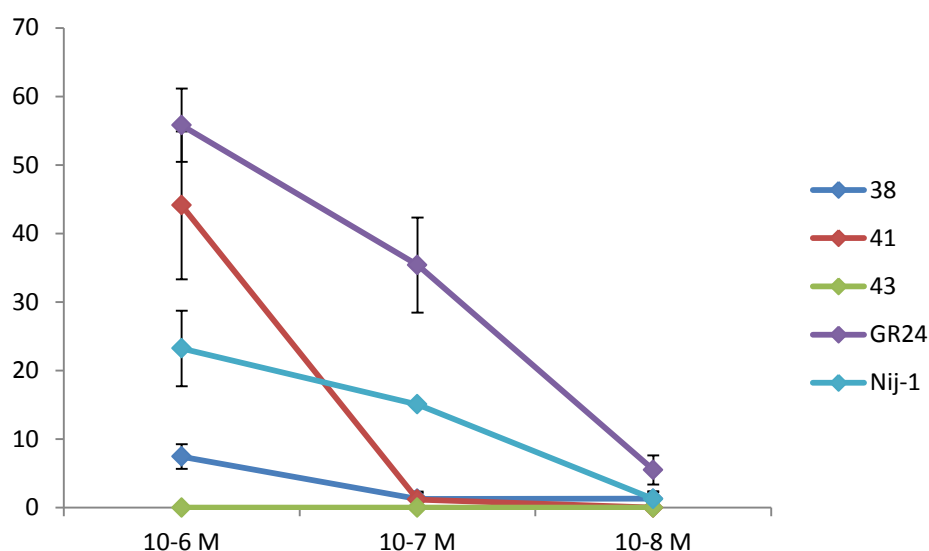
Spolehlivost biotestu byla ověřena negativní kontrolou (destilovaná voda), ve které byla příslušná koncentrace acetonu (0,1 % a 0,001 %). U negativní kontroly při koncentraci acetonu 0,1 % a 0,001% nebylo pozorováno žádné klíčení.

V biotestu na klíčení semen parazitů byly testovány látky **38**, **41** a **43**. Na základě navrženého mechanismu, který je popsán v kapitole 2.5.2 se předpokládalo, že by tyto látky měly být zcela neaktivními iniciátory klíčení. Výsledky biotestu však překvapivě ukázaly, že deriváty **38** a **41** jsou aktivními stimulanty klíčení semen parazita *S. hermonthica* (Tab. 1) (Graf 8).

Tab.1 – Klíčivost **41**, **43**, **GR24** a *Nijmegen-1* při koncentraci 10^{-6} M, 10^{-7} M a 10^{-8} M u semen parazita *S. hermonthica*.

testovaná látka	klíčivost (%) + SE						
	koncentrace						
	10^{-6} M		10^{-7} M		10^{-8} M		
38	7,5	1,8	1,3	1,06	1,3	1,1	
41	44,1	10,8	1,2	0,98	0,0	0,0	
43	0,0 ±	0,0	0,0 ±	0,00	0,0 ±	0,0	
GR24	55,8	5,3	35,4	6,95	5,5	2,1	
Nij-1	23,2	5,5	15,1	0,35	1,3	1,0	

Můžeme pozorovat, že klíčivost jednotlivých látek se snižuje s postupným snižováním koncentrace aplikované látky (Graf 8).



Graf 8 – Klíčivost **38**, **41**, **43** a jejich srovnání s *GR24*, *Nijmegen-1* u semen *S. hermonthica*.

Výsledky testování jsou o to překvapivější, jelikož kromě přítomnosti methyly v pozici C-4 butenolidového kruhu, struktury obsahují i poměrně špatně odstupující skupinu (amin) v pozici C-5. Pro vysvětlení aktivity bude nejprve nutné otestovat samostatné aminy jako potenciální aktivátory klíčení parazitických semen. V případě, že se podaří prokázat, že za biologickou aktivitu zodpovídají opravdu nové deriváty, zařadí se tak po bok karikininů (Flematti a kol., 2010) a seskviterpen laktonů (Galindo a kol., 2002) do skupiny látek, jejichž struktura vyžaduje jiný mechanismus účinku, než jaký

je navržen pro strigolaktonová mimetika. Na mechanismu působení karikininů a seskviterpen laktonů se v současné době bádá.

5 Závěr

Práce byla zpočátku zaměřena na přípravu nových strigolaktonových mimetik odvozených od purinu, ale jejich příprava se nezdařila. Proto byla připravena 4 nová dusíkatá mimetika, avšak pouze 3 z nich se ukázaly jako stabilní. Tyto 3 sloučeniny byly testovány na iniciaci klíčení semen parazitů z rodu *Striga*. Na základě biologického testování se ukázalo, že dvě ze tří testovaných látek vykazují aktivitu. Látka **41** byla o $\frac{1}{5}$ méně aktivní než pozitivní kontrola GR24 a látka **38** vykazovala $\frac{1}{8}$ aktivity GR24 při koncentraci 10^{-6} M.

Použitá literatura

Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**, 824-827.

Akiyama K., Ogasawara S., Ito S., Hayashi H. (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1104-1117.

Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S. (2012) The Path from β -Carotene to Carlactone, a Strigolactone-Like Plant Hormone. *Science*. **335**, 1348-1351.

Brown R., Greenwood A. D., Johnson A. W., Long A. G. (1951a) The stimulant involved in the germination of *Orobanche minor* Sm. 1. Assay technique and bulk preparation of the stimulant. *Biochem. J.* **48**, 559-564.

Brown R., Greenwood A. D., Johnson A. W., Long A. G. (1951b) The stimulant involved in the germination of the *Orobanche minor* Sm. 2. Chromatographic purification of crude concentrates. *Biochem J.* **48**, 564-568.

Brown R., Greenwood A. D., Johnson A. W., Lansdown A. R., Long A. G., Suderland N. (1952) The *Orobanche* germination factor. III. Concentration of the factor by counter current distribution. *Biochem. J.* **52**, 571-574.

Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E., Egley G. H. (1966) Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science*. **154**, 1189-1190.

Cook C. E., Whichard L. P., Wall M. E., Egley G. H., Coggan P., Luhan P. A., McPhail A. T. (1972) Germination stimulants II: The structure of strigol – a potent seed stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour). *Am. Chem. Soc. J.* **94**, 6198-6199.

Egley G. H., Dale J. E. (1970) Ethylene, 2-Chloroethylphosphonic Acid, and Witchweed Germination. *Weed Sci.* **18**, 586-589.

Egley G. H., Eplee R. E., Norris R. S. (1990) Discovery and development of ethylene as a witchweed seed germination stimulant, str. 56-67, Westbrooks eds., IL, USA.

Eplee R. E., Norris R. S. (1987) Chemical control of *Striga*, in Parasitic Weeds in Agriculture, str. 173-182, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Flematti G. R., Scaffidi A., Goddard-Borger E. D., Heath C. H., Nelson D. C., Commander L. E., Stick R. V., Dixon K. W., Smith S. M., Ghisalberti E. L. (2010) Structure-Activity Relationship of Karrikin Germination Stimulants. *Agric. Food Chem. J.* **58**, 8612-8617.

Fukui K., Ito S., Ueno K., Yamaguchi S., Kyozuka J., Asami T. (2011) New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg. Med. Chem. Letters.* **21**, 4905-4908.

Fukui K., Ito S., Asami T. (2013) Selective Mimics of Strigolactone Actions and Their Potential Use for Controlling Damage Caused by Root Parasitic Weeds. *Molecular Plant.* **6**, 88-99.

Galindo J. C., de Luque A. P., Jorrín J., Macías F. A. (2002) SAR studies of sesquiterpene lactones as *Orobancha cumana* seed germination stimulants. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1911-1917.

Hauck C., Müller S., Schildknecht H. (1992) A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *Plant Physiol. J.* **139**, 474-478.

Joel D. M., Steffens J. C., Matthews D.E. (1995) Germination of weedy root parasites. In *Seed Development and Germination*, ed. Kigel J., Galili G. 567-597.

Johnson A. W., Roseberry G., Parker C. (1976) The novel approach to *Striga* and *Orobancha* control using synthetic germination stimulants. *Weed Research.* **16**, 223-227.

Johnson A. W., Gowda G., Hassanali A., Knox J., Monaco S. Roseberry G. (1981). The preparation of synthetic analogs of strigol. *Chemical Society. Perkin Transactions. J.* **1**, 1734-1743.

Mangnus E. M., Dommerholt F. J., de Jong R. L. P., Zwanenburg B. (1992a) Improved synthesis of strigol analogue GR24 and evaluation of the bioactivity of its diastereomers. *Food Chemistry. Agric. J.* **40**, 1230-1235.

Mangnus E. M., Vliet L. A., Vandenput D. A. L., Zwanenburg B. J. (1992b) Structural modifications of strigol analogs. Influence of the B and C rings on the bioactivity of the germination stimulant GR24. *Food Chemistry. Agric. J.* **40**, 1066.

Mangnus E. M., Zwanenburg B., Stommen P. L. A (1992c) A Standardized Bioassay for Evaluation of Potential Germination Stimulants for Seeds of Parasitic Weeds. *Plant Growth Regul.* **11**, 91-98.

Mangnus E. M., Zwanenburg B. (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanch* seeds by strigol and its synthetic analogs. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1066-1070.

Mori K., Matsui J., Yokota T., Sakai, H. Bando, M. and Takeuchi, Y. (1999) Structure and synthesis of orobanchol, the germination stimulant for *Orobanch minor*. *Tetrahedron Lett.* **40**, 943-946.

Musselman L. J. (1980) The biology of *Striga*, *Orobanch*, and other root-parasitic weeds. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**, 463-489.

Nefkens G. H. L., Thuring J. F., Beenackers F. M., Zwanenburg B. (1997) Synthesis of a Phthaloylglycine-Derived Strigol Analogue and Its Germination Stimulatory Activity toward Seeds of the Parasitic Weeds *Striga hermonthica* and *Orobanch crenata*. *Agric. Food Chem. J.* **45**, 2273-2277.

Parker C. (2009) Observations on the current status of *Orobanch* and *Striga* problems worldwide. *Pest Manag. Sci.* **65**, 453-459.

Rani K., Zwanenburg B., Sugimoto Y., Yoneyama K., Bouwmeester H. J. (2008) Biosynthetic considerations could assist the structure elucidation of host plant produced rhizosphere signaling compounds (strigolactones) for arbuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 617-626.

Siame B. A., Weerasuriya Y., Wood K., Ejeta G., Butler L. G. (1993) Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *Agric Food Chem. J.* **41**, 1486-1491.

Smith S. E., Read D. (2008) Mycorrhizal Symbiosis, Academia Press, New York, USA, str. 787.

Ueno K., Nomura S., Muranaka S., Mizutani, M., Takikawa H., Sugimoto, Y. (2011) Ent-2'-epi-orobanchol and its acetate, as germination stimulants for *Striga gesnerioides* seeds isolated from cowpea and red clover. *Agric. Food Chem. J.* **59**, 10485-10490.

Vail S. L., Dailey O. D., Blanchard E. J., Pepperman A. B., Riopel J. L. (1990) Terpenoid precursors of strigol as seed germination stimulants of Broomrape (*Orobanche ramosa*) and witchweed (*Striga asiatica*). *Plant Growth Regul.* **9**, 77-83.

Wigchert S. C. M., Zwanenburg B. (1999) A critical account on the inception of *Striga* seed germination. *Food Chemistry. Agric. J.* **47**, 1320-1325.

Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Takeuchi Y., Yoneyama K., Sugimoto Y. (2008) Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Lett.* **49**, 2066-2068.

Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. (2010) The Strigolactone Story. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 93-117.

Yokota T., Sakai H., Okuno K., Yoneyama K., Takeuchi Y. (1998) Aleotrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry.* **49**, 1967-1973.

Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Reizelman A., Anilkumar G., Sethumadhavan D. (2009) Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag. Sci.* **65**, 478-493.

Zwanenburg B., Mwakaboko A. S. (2011) Strigolactone analogues and mimics derived from phthalimide, saccharine, *p*-tolylmalondialdehyde, benzoic and salicylic acid as scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 7394-7400.

Zwanenburg B., Pospíšil T. (2013) Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Molecular Plant.* **6**, 38-62.