

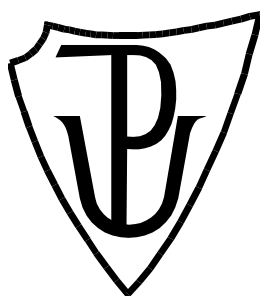
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Centrum regionu Haná

pro biotechnologický a zemědělský výzkum



Nové syntetické Strigolaktony: syntéza a biologická aktivita

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ondřej Kováč
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2014

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ondřej Kováč
Název práce	Nové syntetické Strigolaktony: syntéza a biologická aktivita
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů a CRH.
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	Bakalářská práce se zabývá syntézou látek mimikujících funkci strigolaktonů a jejich následnou biologickou aktivitou při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin. Teoretická část shrnuje dosavadní informace o strigolaktonech, jejich funkci, využití a řešení problému parazitických rostlin rodu <i>Striga</i> a <i>Orobancha</i>. Praktická část se zabývá syntézou nových látek, které jsou odvozeny od derivátů adeninu a jejich využitím jako aktivních látek při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin. Dále bylo provedeno biologické testování nově připravených látek. Byla stanovena aktivita při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin.
Klíčová slova	Strigolaktony, <i>Striga</i> , <i>Orobancha</i> , parazitické rostliny
Počet stran	42
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Ondřej Kováč
Title of thesis	Novel Synthetic Strigolactones: Synthesis and Biological Activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph. D.
The year of presentation	2014
Abstract	The bachelor thesis is focus on synthesis of compounds mimicking the strigolactone's function and their biological activity for parasitic seeds germination. The theoretical part summarizes the information about strigolactones, their functions, their applications and problem with parasitic weeds. The practical part concerns the chemical synthesis of new substances that are derived from adenine derivatives and their biological activity as initiator of parasitic seeds germination.
Keywords	Strigolaktone, <i>Striga</i> , <i>Orobanch</i> e, germination bioassay, parasitic weeds
Number of pages	42
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 19.5. 2014

.....

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

Zejména bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph. D. za všechny jeho cenné rady, odborné vedení a zvláště za trpělivost a vstřícnost během vypracování této bakalářské práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1 Úvod a cíle práce.....	8
2 Teoretická část	9
2.1 Růstové regulátory	9
2.2 Objevení strigolaktonů a jejich funkcí	9
2.3 Strigolaktony a parazité.....	12
2.3.1 Životní cyklus parazitických rostlin	14
2.4 Řešení problému parazitického plevelu.....	15
2.4.1 Další možnost - Sebevražedné klíčení parazitických rostlin	16
2.5 Předpokládaný mechanismus působení strigolaktonů.....	17
2.6 Přírodní strigolaktony	19
2.7 Strigolaktonová analoga	22
2.8 Strigolaktonová mimika	23
3 Experimentální část.....	26
3.1 Chemikálie.....	26
3.2 Materiál	26
3.3 Metody.....	26
3.4 Příprava strigolaktonových mimik	27
3.5 Biologické testování	31
4 Výsledky a diskuze	33
5 Závěr	37
Použitá literatura	38

Seznam použitých zkratek

AIBN – azobisisobutyronitril

AM – arbuskulární mykorhiza

BAP – benzylaminopurin

Bn – benzyl

d – dublet

DMA – dimethylacetamid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ES⁺ - ionizace pomocí elektrospreje

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

$h\nu$ – UV záření

iP – isopentenyl

iPA – isopentenyladenin

J – štěpící konstanta

m - multiplet

Me – methyl

MS – hmotnostní spektrometrie

MW – mikrovlnné záření

NBS – *N*-bromsukcinimid

NMR – nukleární magnetická rezonance

ppm – parts per milion

s – singlet

Spp – lat. *species pluralis* (druhy)

t – triplet

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

TMS – trimethylsilyl

δ – chemický posun

1 Úvod a cíle práce

Strigolaktony jsou nejmladší skupinou látek řadící se mezi rostlinné hormony. Jejich doposud známé funkce jsou iniciace symbiózy rostliny s AM houbami, inhibice větvení nadzemních částí rostlin a iniciace klíčení semen parazitických rostlin.

Kromě přírodních strigolaktonů byly již připravené strukturně podobná syntetická analoga a skupina strukturně jednodušších látek označovaná za strigolaktonová mimika.

Cílem práce je vypracování literární rešerše o strigolaktonech se zaměřením na užití strigolaktonů, jejich analogů a mimetik pro klíčení semen parazitických rostlin z rodu *Striga* a *Orobancha*. Syntéza nových strigolaktonových derivátů, zejména strigolaktonových mimik. Dále pak využití připravených látek v biologickém testování stanovující iniciaci klíčení semen parazitických rostlin rodu *Striga* a *Orobancha*.

2 Teoretická část

2.1 Růstové regulátory

Z nepřeberného množství látek vyskytujících se v rostlinách je zcela po právu upřena velká pozornost na látky, které přímo ovlivňují vývoj a růst rostlin. Tyto látky můžeme rozčlenit do skupin podle účinků, oblastí působení apod. Základní rozdělení však vychází z účinných koncentrací látek. Látky účinné již při nepatrných koncentracích (10^{-6} a méně) se nazývají rostlinné hormony – fytohormony. Látky, jejichž vliv se projeví až při vyšších koncentracích (10^{-5} a více) se nazývají látky s regulační funkcí. Do první skupiny patří strigolaktony, cytokininy, auxiny, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. Jednotlivé rostlinné hormony ovlivňují: tvorbu adventivních kořenů, stimulují dělení buněk, potlačují apikální dominanci, zpomalují stárnutí, indukují kvetení, regulují dormanci a atd. Do druhé skupiny jsou řazeny brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová a její deriváty, oligosacharidy a fenolické látky. Tyto látky se vyznačují podobnými funkcemi jako fytohormony a velice často s nimi interagují (Procházka a kol., 2003).

Strigolaktony jsou nejmladší skupinou látek řadící se mezi rostlinné hormony, byly zařazeny mezi skupinu fytohormonů teprve během posledních 10 - 15 let.

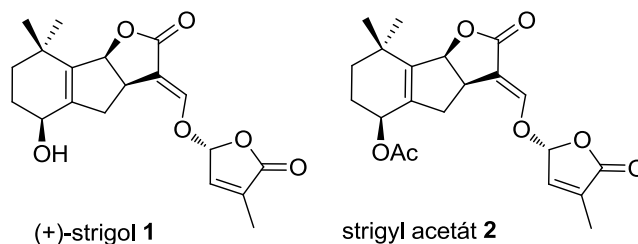
2.2 Objevení strigolaktonů a jejich funkcí

Už v roce 1823 bylo zjištěno, že rostlinní parazité rodu *Orobanch* a *Striga* se vyznačují tím, že jejich semena vyžadují pro své vyklíčení specifickou látku, která je označována jako stimulant klíčení. Tento stimulant klíčení je produkován hostitelskou rostlinou a semena parazitických rostlin poté reagují na tento podnět vyklíčením a následným napojením se na kořeny hostitelské rostliny pomocí haustorií, které umožňují parazitu čerpat živiny (Yoneyama, 2010).

Mezi roky 1940 až 1950 bylo prozkoumáno mnoho rostlin ve snaze identifikovat rostliny, které produkují stimulanty klíčení, a tím umožňují ovlivnit vývoj parazitů rodu *Striga* a *Orobanch* (Brown a kol., 1951a; Brown a kol., 1951b). Na základě experimentů s extrakty z rostlin bylo předpovězeno, že strigolaktony by měly obsahovat laktonovou skupinu. Tento předpoklad byl podpořen relativní

stabilitou aktivních látek v lehce kyselém prostředí a jejich rozkladem v prostředí alkalickém (Brown a kol., 1952).

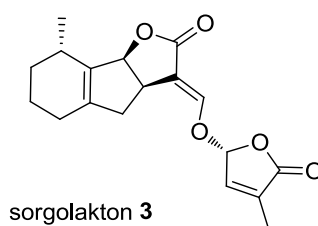
V roce 1966 se povedlo vyizolovat z bavlníku (*Gossypium hirsutum*) první stimulanty klíčení, kteří byly účinní na klíčení semen parazita rodu *Striga*. Těmito prvními strigolaktony byly (+)-strigol (**1**) a strigyl acetát (**2**) (Obr. 1) (Cook a kol., 1966).



Obr. 1 – (+)-Strigol a strigyl acetát.

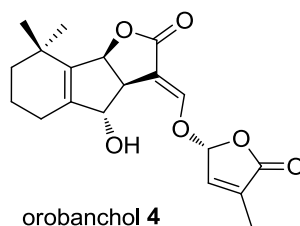
(+)-Strigol (**1**) byl poté objeven i u jiných druhů rostlin jako je například čirok (*Sorghum bicolor*), kukuřice (*Zea Mays*) a proso (*Panicum miliaceum*) (Siame, 1993).

Dalším strigolaktonem, který byl identifikován, byl v roce 1992 sorgolakton (**3**) (Obr. 2) (Hauck a kol., 1992).



Obr. 2 – Sorgolakton.

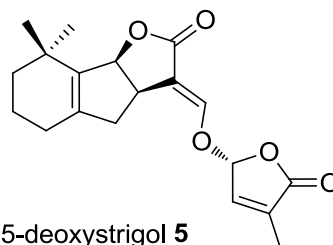
Do poloviny 90. let 20. století byly objeveny jen strigolaktony, které iniciovaly klíčení semen jen u parazitických rostlin rodu *Striga*. Až v roce 1998 se povedlo vyizolovat také látku zodpovědnou za iniciaci klíčení semen rodu *Orobanch*e orobanchol (**4**) (Obr. 3), byl identifikován v exudátu kořenů červeného jetele (*Trifolium pratense*) (Yokota a kol., 1998).



Obr. 3 – Orobanchol.

Otázkou bylo, proč by hostitelské rostliny dobrovolně produkovaly látky, které způsobují růst jejich parazitů. Na základě této hypotézy bylo přepokládáno, že strigolaktony mají i jinou funkci, při které využívá rostlina tyto látky ke svému růstu a vývoji.

Tato hypotéza byla potvrzena v roce 2005 kdy ruku v ruce s izolací 5-deoxystrigolu (5) (Obr. 4) z leknínu japonského (*Lotus japonicus*) objevila skupina prof. Akiyamy vztah mezi strigolaktony a symbiózou rostlin s arbuskulárními mykorhizními houbami (AM houby). Zjistili, že strigolaktony indukují větší větvení hyf u AM houby. Později bylo prokázáno, že jsou iniciátory samotné symbiózy (Akiyama a kol., 2005).



Obr. 4 – 5-Deoxystrigol.

AM houby jsou půdní mikroorganismy, které jsou v symbióze s mnoha rostlinami a jsou schopny pronikat a vázat se na kořeny rostlin pomocí rozvětvených struktur, které se nazývají arbuskuly. Právě tyto struktury jsou důležité pro výměnu životně důležitých živin. AM houby poskytují rostlině živiny, které získávají pomocí hyf z okolní půdy, naopak rostlina jim poskytuje produkty fotosyntézy (Smith a kol., 2008).

Strigolaktony jsou tedy nezbytným signálem pro iniciaci tvorby symbiotického spojení mezi hostitelskou rostlinou a AM houbami. Nicméně strigolaktony produkují i další rostliny, které nejsou hostitelem pro AM houby.

Takovou rostlinou je například huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) nebo lupina bílá (*Lupinus albus*), což jsou hostitelské rostliny pro *Orobanch* spp. Na základě těchto poznatků se usoudilo, že strigolaktony mají další neznámou funkci, která pravděpodobně ovlivňuje růst a vývoj rostlin.

Tato funkce byla objevena dvěma týmy nezávisle na sobě. Zjistily, že strigolaktony inhibují větvení stonku (Gomez-Roldan a kol., 2008; Umehara a kol., 2008).

Umehara a kol., prováděli testy na mutantu rýže, kdežto Gomez- Roldan a kol. s mutanty hrášku. Obě skupiny prokázaly, že při vyšších koncentracích se jakékoliv větvení stonku úplně potlačí. Na základě výsledků se uvažuje o hypotéze, že syntéza strigolaktonů v rostlině je reakcí na nedostatek živin. Mohlo by se jednat o strategii, která vede ke snížení větvení nadzemních částí, ale následné maximalizace symbiózy s AM houbami (Umehara a kol., 2008; Gomez-Roldan a kol., 2008).

V současnosti se strigolaktony zkoumají převážně ve vztahu k jejich účinkům na vývoj rostlin a to inhibice větvení a vliv na symbiózu rostlin s AM houbami. Studium negativní vlastnosti strigolaktonů (iniciace klíčení parazitických semen) není věnována vědeckou komunitou přílišná pozornost klíčení parazitických rostlin.

Tato práce se věnuje výhradně strigolaktonům ve vztahu k parazitickým rostlinám rodu *Striga* a *Orobanch*.

2.3 Strigolaktony a parazité

Mezi hospodářsky nejzávažnější parazitické rostliny patří právě rody *Striga* a *Orobanch*. Oba dva rody jsou velkým problémem z důvodu napadání kulturních plodin, a to v oblastech, kde je tamní obyvatelstvo závislé na zemědělství. Proto je nezbytné, aby se našel způsob, který by pomohl regulovat tento problém a eliminovat tak snižování výnosu úrody z důvodu napadení plodin parazity. *Striga* spp. parazitují na jedno i dvouděložných rostlinách, kdežto *Orobanch* spp. jsou více specifické na své hostitele a parazitují pouze na dvouděložných rostlinách.

Striga spp. jsou obligátní parazité, kteří patří mezi nejdůležitější rod z čeledi *Scrophulariaceae*. Do tohoto rodu patří hlavně *Striga hermonthica* (Obr. 5), *Striga asiatica* a *Striga gesnerioides*. *S. hermonthica* se nachází hlavně v Africe, kde parazituje na obilninách, jako jsou čirok a proso. *S. asiatica* napadá jak výše zmíněné obilniny, tak hlavně kukuřici, na níž způsobuje největší škody. Nejrozšířenější je

v Africe, Indii, ale také v Indonésii a Filipínách. *Striga gesnerioides* napadá zejména dvouděložné rostliny jako jsou fazole, brambory a tabák.



Obr. 5 – *Striga hermonthica* (staženo 13.3.2014 z <http://blog.plantwise.org/2012/01/17>).

Orobanche spp. jsou holoparazité, kteří postrádají jakýkoliv chlorofyl a stejně jako *Striga* spp. způsobují velké množství škod na úrodě. Vyskytuje se zejména v oblastech středního východu, Středozemního moře a východní Evropy. *Orobanche* spp. parazitují pouze na dvouděložných rostlinách, jako jsou fazole, rajčata, tabák, slunečnice, okurek, zelí, mrkev a hrášek. Nejvíce škodí *O. crenata* (Obr. 6), které napadá fazole, hrášek a mrkev a dalším druhem je *O. ramosa*, které parazituje hlavně na zelí, mrkvi a slunečnici.



Obr. 6 – *Orobanche crenata* (převzato z *Orobanche: The European broomrape species*, C.A.J. Kreutz).

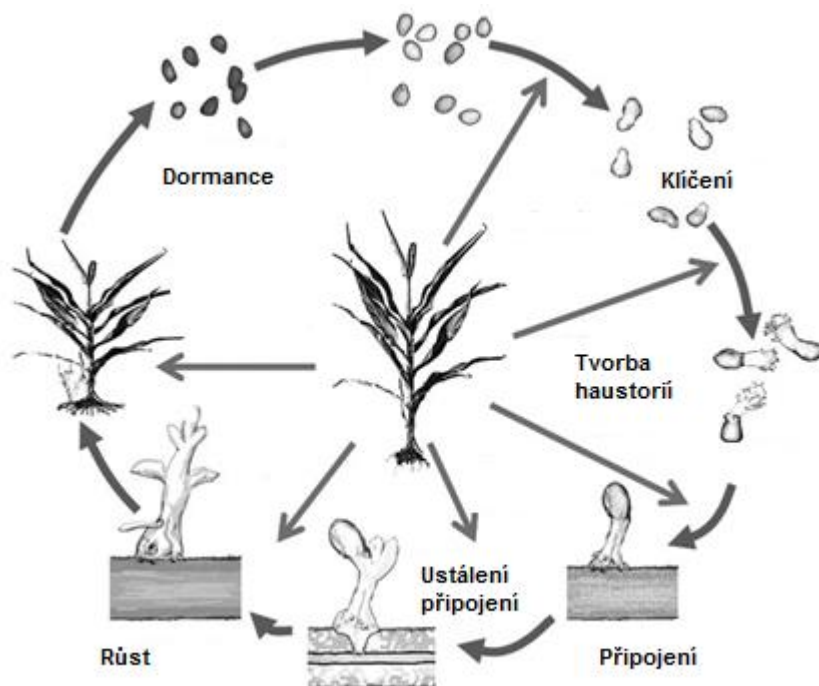
Oba výše uvedené rody parazitických rostlin mají podobný životní cyklus. Jedním z přístupů pro účinný boj s těmito parazity je využití kritických bodů v životním cyklu parazita, a tím snížit procento parazitických rostlin na polích, které byly zasaženy.

2.3.1 Životní cyklus parazitických rostlin

Životní cyklus parazitických rostlin je velice dobře přizpůsoben životnímu cyklu hostitelských rostlin. Jde především o vnímání různých vývojových signálů, které jsou důležité pro jednotlivé fáze životního cyklu parazita (Musselman, 1987).

Rody *Orobanche* a *Striga* mají komplexní životní cyklus, který se skládá z několika částí (Obr. 7). Počínaje dormancí, klíčení, tvorba haustorií, připojení k hostiteli, proniknutí do cévního systému hostitele, samotný růst a vývoj semena. Semena těchto parazitů jsou velice malá (asi 0,2 mm) a jedna rostlina jich dokáže vyprodukovat až 100 000 za jedno vegetační období. Navíc semena mohou v půdě vydržet v dormanci po dobu několika desítek let (Worsham, 1987). Při dosažení správné teploty a vlhkosti je semeno schopno reagovat na podnět, který způsobí jeho klíčení a tvorbu haustorií. Haustoria jsou důležitá pro napojení se na kořenový systém hostitele. Kritickou fází v životním cyklu parazita je doba mezi reakcí semena

na podnět klíčení a napojení na hostitelskou rostlinu, které by mělo proběhnout během několika dnů, jinak parazit zahyne.



Obr. 7 – Životní cyklus parazitických rostlin rodu *Orobanche* a *Striga*.

2.4 Řešení problému parazitického plevelu

Nejjednodušší metodou jak se zbavit parazitického plevelu je pletí, které pomůže snížit jeho přítomnost. Této metody se využívá v zemědělsky chudých oblastech, kde není možnost použít jinou metodu z finančních důvodů.

Dalším možným řešením je setí rostlin, které nejsou hostiteli a jsou schopny vylučovat látky podněcující klíčení parazitů. Výsledkem je, že dojde k vyklíčení parazitů a v nepřítomnosti hostitele poté parazit zahyne. Užitím falešných hostitelů se sníží množství semen v půdě, ale nevýhodou této metody je obsazení pole na celý vegetační cyklus a omezený výběr použitelných plodin (bavlník, sója, súdánská tráva). Aby došlo k výraznému snížení množství parazitů na napadeném poli je zapotřebí několika let (Ramaiah a kol., 1985).

Další možností jak zamezit šíření parazitického plevele je využití jejich přirozených nepřátel. První pokusy byly provedeny s využitím hmyzu, který měl napadat parazity rodu *Striga* (Girling a kol., 1979). V Indii, východní Africe a Súdánu byli vyzkoušeni brouci druhu *Smicrony*, ale výsledky nenaplnily očekávání (Bashir a kol., 1987).

Dalším pokusem bylo použití houbového patogenu *Fusarium oxysporium*, který snižoval přítomnost *Orobanch* spp. na polích, kde byl vysazen tabák (Mazaheri a kol., 1991). Hlavní nevýhodou bylo, že daný patogen produkuje mykotoxiny, které mají negativní vliv na člověka (Kroschel, 1996).

Efektivní metodou pro hubení parazitů by mohlo být upravení plodin, tak aby byly resistantní vůči parazitickým rostlinám. Pro tyto účely byla využita například vigna čínská. Nevýhodou bylo, že ačkoliv byly plodiny imunní vůči parazitům, neměly takovou úrodnost jako původní druh. Navíc během delšího časového úseku došlo ke ztrátě odolnosti plodin a následnému napadení parazity (Lane a kol., 1994).

Kromě biologických metod byly prováděny experimenty i s fungicidy, které umožňují zahubit nejen semena, ale i rostliny nacházející se v různých fázích životního cyklu. Nejúčinnějším fungicidem se stal methyl bromid, který se používal na hubení semen, hlístic a patogenů, které se nacházely v půdě. Protože methyl bromid je silné alkylační činidlo, které způsobuje změny ve struktuře DNA, je jeho použití v praxi nemožné (Eplee, 1971).

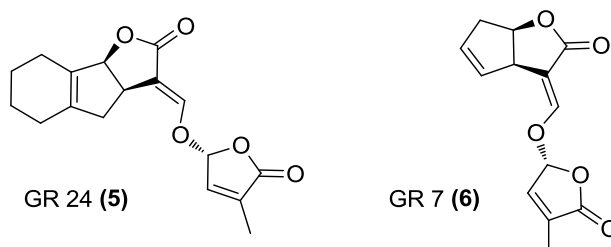
2.4.1 Další možnost - Sebevražedné klíčení parazitických rostlin

Další metodou, která by mohla dopomoci k vyřešení problému s parazitickými rostlinami je sebevražedné klíčení. Hlavním principem této metody je použití aplikace stimulantu klíčení v nepřítomnosti jiných plodin. Tato látka vyvolá klíčení parazitů, ale jelikož není přítomen žádný vhodný hostitel, parazit zahyne během několika dnů.

Jako první byl použit rostlinný hormon ethylen, který byl vpravován do půdy pomocí jehly a vysokého tlaku. Ukázalo se, že ethylen je velice účinný na druhy *Striga asiatica* a *Striga hermonthica*, ale bohužel nepůsobil na druh *Striga gesnerioides*. Taková látka, která působí specificky jenom na některé druhy parazitů, nebyla vhodná pro použití v zemědělství. Finanční náročnost, přístrojové vybavení a speciální technika byly také limitujícím faktorem k efektivnímu používání (Egley a kol., 1990).

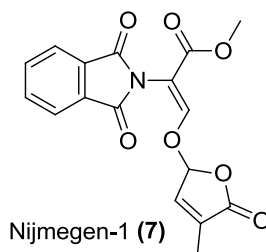
Dalším pokusem bylo využití stimulantů klíčení, které byly odvozeny ze struktury a aktivity strigolu, viz. kapitola 2.5. Mezi takové látky patří GR 24 (5) a GR 7 (6) (Obr. 8). Tyto látky byly aplikovány na pole napadené *Striga* spp., kde bylo pozorováno značné snížení populace semen (kolem 50 %). Využití analogů

strigolu vykazovalo slibné výsledky, ale z důvodu jejich předčasného rozkládání v půdě se od jejich použití ustoupilo (Eplee a kol., 1987). Tímto se podpořila domněnka, že strigolaktony jsou velice náchylné na hydrolýzu a jejich stabilita klesá v alkalickém prostředí.



Obr. 8 – Struktura GR 24 a GR 7.

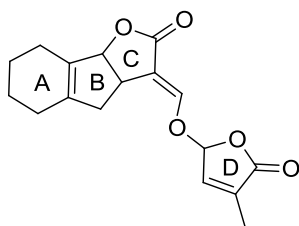
Aby se dosáhlo lepší stability v půdě, bylo uvažováno o použití strigolaktonů v podobné formě jako jsou aplikovány herbicidy. Doposud je znám jediný experiment s využitím tohoto přístupu. Na tabákových polích v jižním Německu, která byla napadena *O. ramosa* byl aplikován syntetický analog Nijmegen-1 (7) (Obr. 9) v koncentraci 7×10^{-7} mol/L. Po aplikaci došlo ke snížení počtu semen až o 70 % (Zwanenburg a kol., nepublikováno).



Obr. 9 – Nijmegen-1.

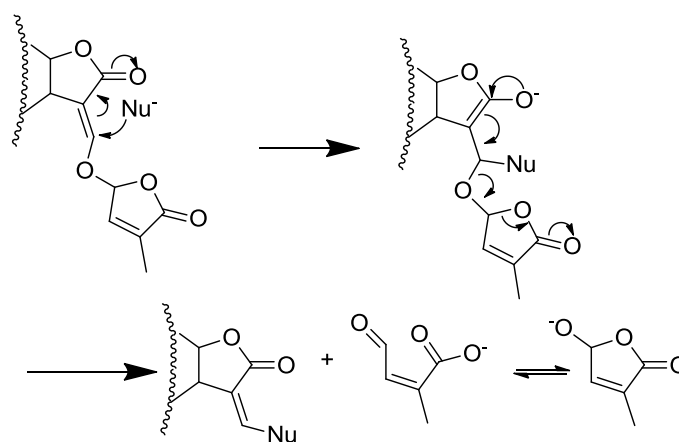
2.5 Předpokládaný mechanismus působení strigolaktonů

Přírodní strigolaktony mají všechny stejnou strukturu. Skládají se z ABC skeletu, na kterém je napojen D kruh pomocí enoetherového můstku.



Obr. 10 – Základní ABCD skelet přírodních strigolaktonů.

Předpokládaný mechanismus působení strigolaktonů se zaměřuje na enoletherový můstek a zahrnuje adici nukleofilu (Michaelovu adici), který se nachází na receptorové straně. Mechanismus je ilustrován na Obr. 11. Po Michaelově adici dochází k eliminaci D kruhu a vzniká ABC skelet, na který je kovalentně vázán atakující nukleofil. Při předpokladu, že nukleofil je součástí receptoru, je kovalentní vazba mezi receptorem a ABC skeletem iniciátorem klíčení. Tímto mechanismem se vysvětluje bioaktivita všech přírodních strigolaktonů. Dále se na základě tohoto poznatku může vysvětlit nestabilita v alkalickém prostředí, kdy roli nukleofilu hraje hydroxidový iont (Mangnus a kol, 1992a).

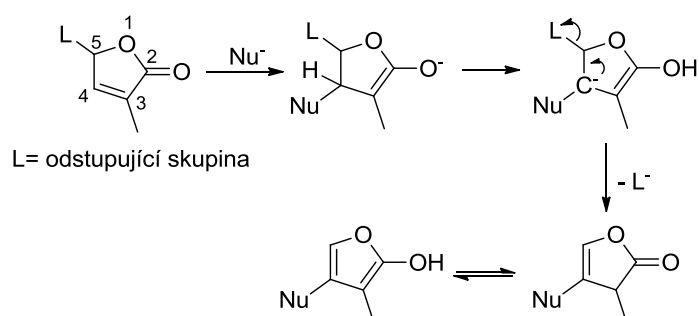


Obr. 11 – Předpokládaný molekulární mechanismus přírodních strigolaktonů.

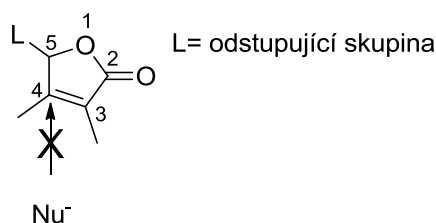
Velice zajímavý je výzkum na látkách, které jsou odvozeny od D kruhu strigolaktonů, ale oproti přírodním strigolaktonům postrádají enoletherový můstek. Tyto látky se nazývají strigolaktonová mimika.

Vzhledem k nepřítomnosti enoletherového můstku u strigolaktonových mimik, mechanismus biologického účinku musí být jiný, a proto byl navržen alternativní mechanismus (Obr. 12) (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011). Prvním krokem je opět

Michaelova adice na butenolid, dále dochází k přesmyku protonu a postupné eliminaci odstupující skupiny (Obr. 12). Na základě tohoto mechanismu byly připraveny strigolaktonová mimika, kde došlo k náhradě důležitého vodíkového atomu na čtvrtém uhlíku za methylovou skupinu. Přítomnost methylové skupiny na čtvrtém uhlíku by měla zabránit proběhnutí předpokládané adiční-eliminační reakci (Obr. 13) a tyto látky by měly být neaktivní jako stimulant klíčení. Biotesty ukázaly, že strigolaktonová mimika s methylovou skupinou nemají žádnou aktivitu vůči semenům *Striga hermothica*. (Zwanenburg a kol., 2013).



Obr. 12 - Předpokládaný mechanismus působení strigolaktonových mimik.



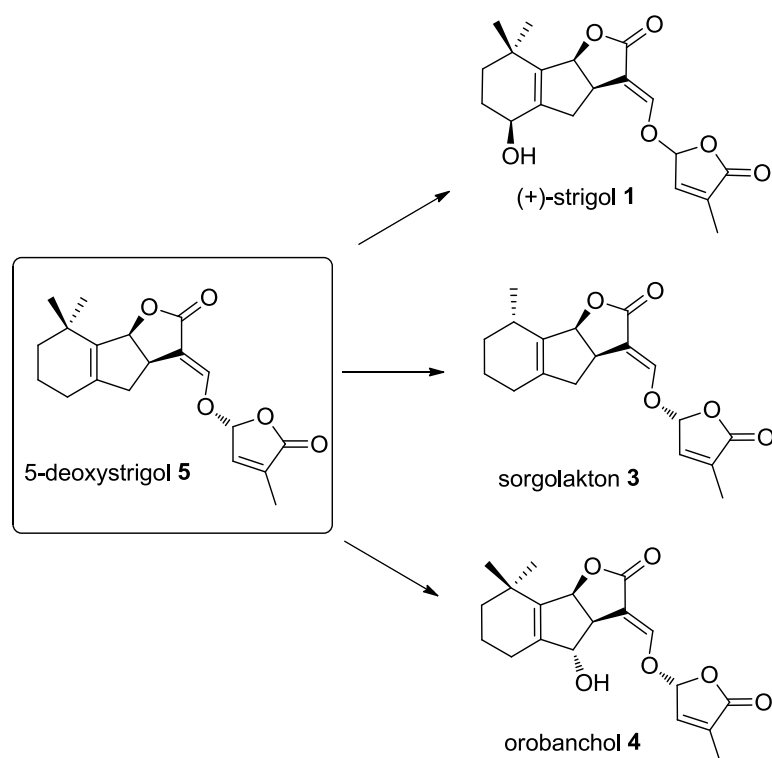
Obr. 13 – Předpokládaný mechanismus při přítomnosti methylové skupiny na čtvrtém uhlíku u strigolaktonových mimik.

Na základě předpokládaných mechanismů působení se uvažuje, že strigolactony iniciují klíčení semen pomocí receptoru. Nalezení tohoto receptoru by mohlo vést k pochopení mechanismu působení a následné přípravě syntetických strigolaktonů, které by se využily ke snížení počtu parazitických rostlin na napadených polích.

2.6 Přírodní strigolactony

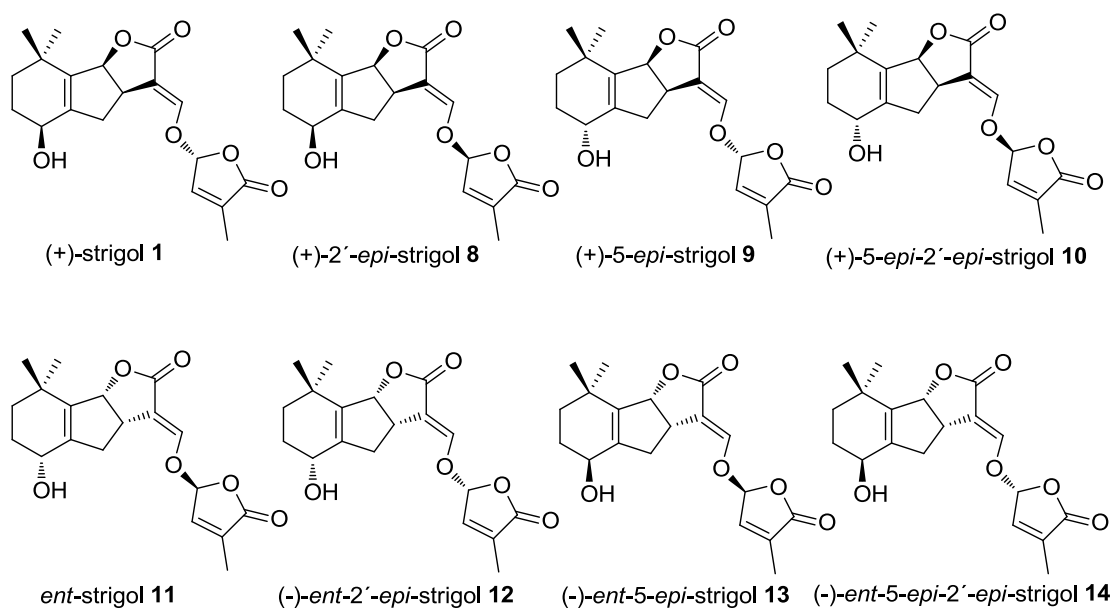
Všechny přírodní strigolactony se skládají z ABC kruhů. Na tento skelet je napojená butenolidová skupina označována jako D kruh. ABC skelet a D kruh jsou k sobě připojeny pomocí enoletherového můstku. Předpokládá se, že prekurzorem pro přírodní strigolactony je 5-deoxystrigol. Pomocí hydroxylací a acetylací dochází ke

konverzi v ostatní strigolaktony (Rani a kol., 2008). Jednotlivé konverze jsou znázorněny na Obr. 14.



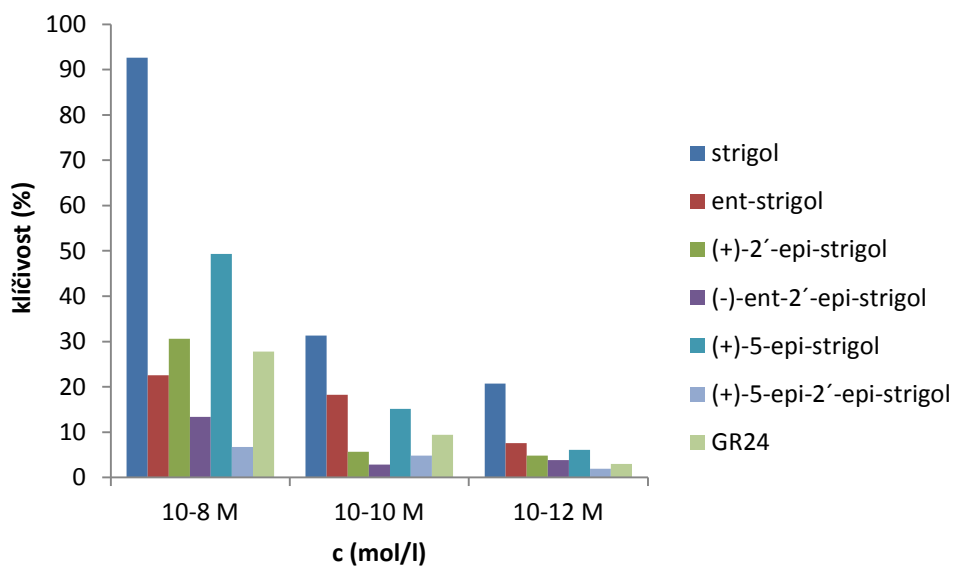
Obr. 14 – Přeměna 5-deoxystrigolu v ostatní strigolaktony.

Stereochemie u strigolaktonů hraje velkou roli při jejich aktivitě. Tato domněnka byla ověřena na stereoizomerech strigolu.



Obr. 15 – Stereoizomery strigolu.

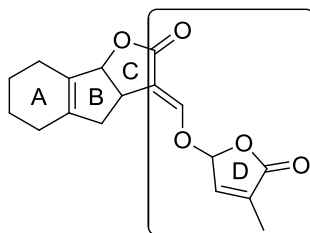
(+)-Strigol, je výrazně aktivnější než enantiomer *ent*-strigol (**11**) (Obr. 15), kdy **1** měl aktivitu při klíčení semen *Striga hermonthica* 95 %, **11** pouhých 22 %, a ani ostatních 6 stereoizomerů nedosahuje účinnosti (+)-strigolu (Graf 1) (Reizelman, 2001).



Graf 1. – Srovnání stereoizomerů strigolu na klíčení semen *S. hermonthica*.

2.7 Strigolaktonová analoga

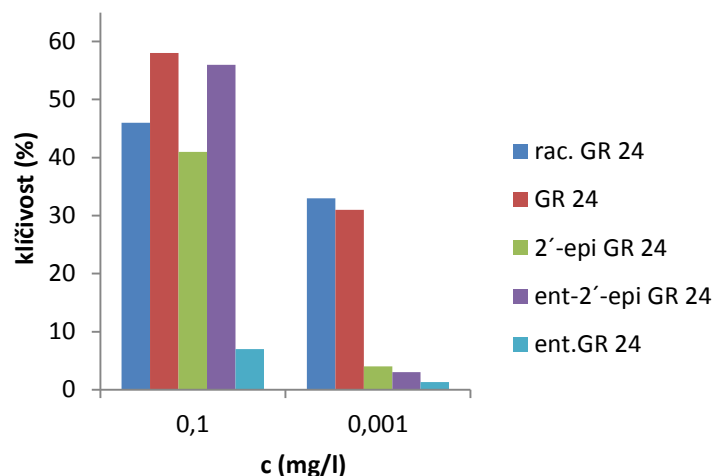
Z důvodu nelehké izolace přírodních strigolaktonů, popřípadě jejich drahé syntézy, byla snaha připravit takové látky, které jsou snadné a levné na přípravu. Takové látky se nazývají strigolaktonová analoga a obsahují D kruh připojený ke zbytku molekuly přes enoletherový můstek, tudíž mechanismus působení je podobný jako u přírodních strigolaktonů (Obr. 15).



Obr. 16 – Vyznačení důležité části u strigolaktonových analogů.

Mezi nejdůležitější analoga patří sloučeniny, které byly připraveny týmem profesora Johnsona. Tyto sloučeniny mají již vžitě označení GR. Mají jednodušší strukturu, ale jejich aktivita zůstává podobná jako u přírodních strigolaktonů. Konkrétně mezi GR látky patří GR 24 (**5**) a GR 7 (**6**) (Obr. 8) (Johnson a kol., 1976; Johnson a kol, 1981).

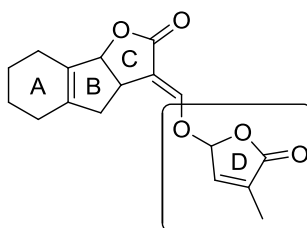
Stejně jako u přírodních strigolaktonů je i u strigolaktonových analogů důležitá stereochemie. Testování účinnosti jednotlivých stereoizomerů látky GR 24 (**5**) (Obr. 8) bylo prováděno na semenech druhu *Striga hermonthica*. Potvrdilo se, že sloučenina, která má podobnou konfiguraci jako (+)-strigol (**1**) (Obr. 1), má při nízké koncentraci vyšší aktivitu než ostatní stereoizomery (Graf 2) (Mangnus a kol., 1992b). GR 24 se od 80. let stala standardní látkou nahrazující přírodní strigolaktony v experimentech.



Graf. 2 – Bioaktivita všech stereoizomerů GR 24 proti *S. hermonthica* (rac GR 24 značí racemickou směs).

2.8 Strigolaktonová mimika

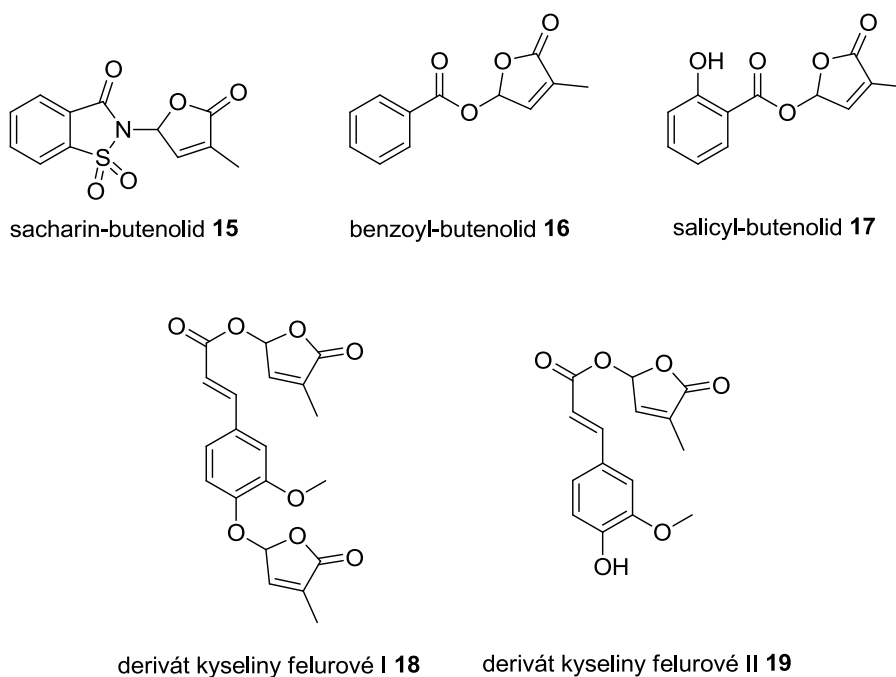
Strigolaktonová mimika byla připravena kvůli jejich vyšší stabilitě, která vyplývá z absence enoletherového můstku (Obr. 16).



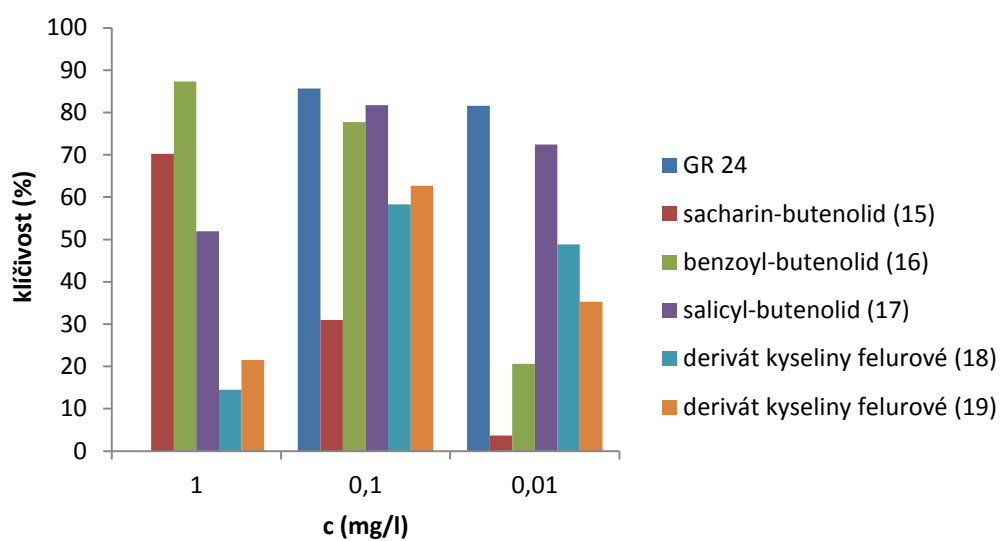
Obr. 16 – Zvýraznění důležité části strigolaktonových mimik.

Předpokládaný mechanismus působení těchto látek je odlišný od strigolaktonových analog, viz. kapitola 2.5, ale vzhledem k jejich snadnější přípravě jde o zajímavý přístup k výzkumu strigolaktonů.

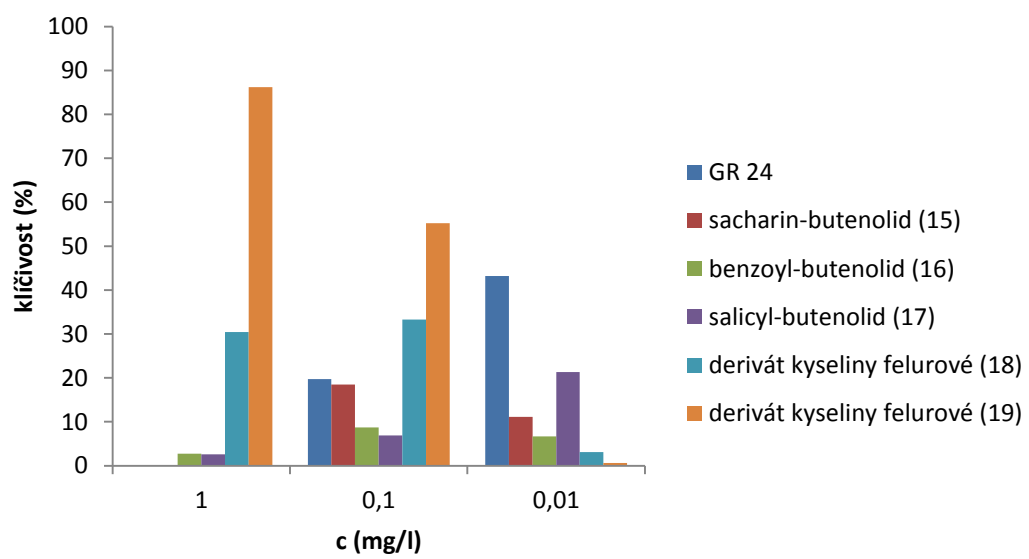
Variabilita strigolaktonových mimik je ukázána na vybraných příkladech (Obr. 17). Testy na parazitických semenech druhů *S. hermonthica* a *O.cernua* ukázaly, že ačkoliv mechanismus účinku je zaměřen na butenolidový kruh, je odstupující skupina důležitá vzhledem k vyšší aktivitě (Zwanenburg, 2011; Mwakaboko, disertační práce, 2003).



Obr. 17 – Strigolaktonová mimika.



Graf 3 – Srovnání strigolaktonových mimik s GR 24 na klíčivosti semen *S. hermonthica*.



Graf 4 – Srovnání strigolaktonových mimik s GR 24 na klíčivosti semen *O. cernua*.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro jednotlivé kroky syntézy byly použity tyto chemikálie: anhydrid kyseliny 2,3-dimethylmaleinové a GR 24 jako dar od Prof. B. Zwanenburga. Borohydrid sodný (NaBH_4), *N*-bromsukcinimid (NBS), azobisisobutyronitril (AIBN), tetrachlormethan (CCl_4), dimethylacetamid (DMA), 3-methylfuranon od společnosti Sigma-Aldrich; tetrahydrofuran (THF), síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), ethylacetát (EtOAc), isopropanol a methanol od společnosti Lachner; 6-benzylaminopurin, 6-isopentenyladenin a nasycený roztok chloridu sodného byly připraveny v Laboratoři růstových regulátorů.

3.2 Materiál

Biologické testování bylo prováděno se semeny *Striga hermonthica* (Sudan, 1994) a *Orobancha crenata* (Španělsko, 1992).

3.3 Metody

Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 a 60 RP – 18 F₂₅₄ s (Merck). Spektra nukleární magnetické rezonance byla získána na Jeol 500 JNM-ECA 500 MHz při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Pro měření byla použita rozpouštědla: deuterovaný chloroform (CDCl_3), deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO}-d_6$), deuterovaný methanol (CD_3OD). Kalibrace chemických posunů byla provedena na TMS. Bromace byla prováděna při 365 nm pomocí UV lampy (100 W). Syntéza pomocí mikrovlnného reaktoru byla provedena na přístroji CEM Discover SP. Finální produkty byly purifikovány pomocí kolony Versa flash-C18 (Supelco). Čistota látek byla stanovena pomocí HPLC a provedena na RP-sloupci (150 mm x 2,1 mm, 5 μm , Symmetry C18, Waters). Eluce byla provedena gradientem (metanol/uhličitan amonný, pH = 4) při průtoku 0,3 ml/min a 20°C. Sloučeniny byly detekovány pomocí skenování UV absorpance eluátu mezi 200 a 400 nm. Hmotnostní spektra byla získána na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO). Semena byla inkubována v termostatu značky Biological thermostat BT

120. Počítání semen bylo prováděno pomocí mikroskopu značky Motic Microscopy (SMZ 168 TL).

3.4 Příprava strigolaktonových mimik

3.4.1.1 Redukce anhydridu

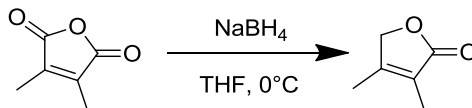
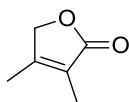


Schéma 1 – Obecné schéma redukce anhydridu.

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Anhydrid (1 mmol) byl přidán do baňky a následně rozpuštěn v suchém THF (2 ml), roztok byl zchlazen na 0°C. Při teplotě 0°C byl přidán borohydrid sodný (2,5 mmol). Vzniklý roztok byl míchán při 0°C po dobu 2h. Reakce byla ukončena přidáním destilované vody. Následně byl roztok okyselen pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 1. Produkt byl extrahován pomocí liquid-liquid extrakce (ethylacetát : voda). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a následně bezvodým síranem sodným, který byl odstraněn filtrací. Produkt byl zakonzentrován na vakuové odparce a vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel, petrolether : ethylacetát, 1:1).

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



Výtěžek: 63 %, žlutá olejovitá kapalina

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.81 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 4.61 (s, 2 H).

3.4.1.2 Bromace furanonu

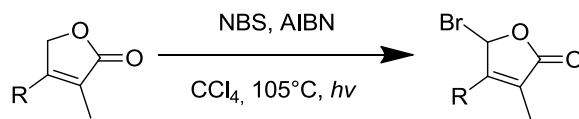
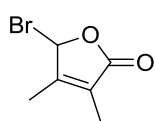


Schéma 2 – Obecné schéma bromace furanonu.

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Do suché jedno hrdlé baňky s kulatým dnem byl přidán furanon (1 mmol), který byl rozpuštěn v tetrachlormethanu (2,5 ml). Poté bylo k roztoku přidáno NBS (1 mmol) a AIBN (0,006 mmol). Roztok byl zahřát v olejové lázni na 105°C a ozařován UV světlem (365 nm). Reakce byla kontrolována pomocí TLC až do úplné konverze.

Po skončení reakce byl roztok zchlazen na 0°C a poté zfiltrován. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové odparky. Surový produkt byl získán v dostatečné čistotě.

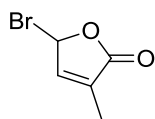
5-brom-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on



Výtěžek: kvantitativní, olejovitá kapalina

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1.88 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 6.67 (s, 1H).

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



Výtěžek: kvantitativní, olejovitá kapalina

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 2.04 (s, 3H), 6.83 (t, 1H), 7.19 (t, 1H).

3.4.1.3 Napojení furanonu na deriváty adeninu

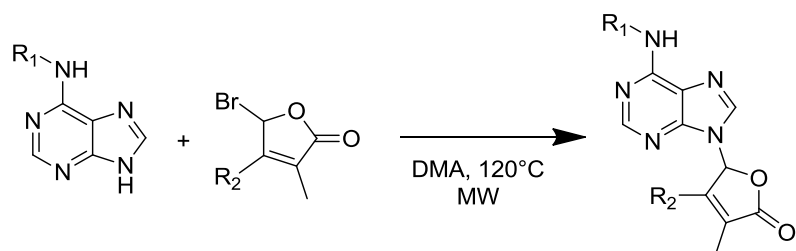
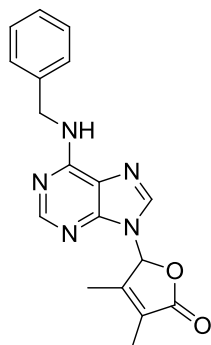


Schéma 3 – Obecné schéma přípravy látek strigolaktonových mimik.

Reakce byla provedena v mikrovlnném reaktoru. Do zkumavky byl přidán derivát adeninu (1 mmol), který byl rozpuštěn v DMA (5 ml). Poté byl přidán bromofuranon (1,4 mmol). Vzniklý roztok byl vložen do mikrovlnného reaktoru. Reakce probíhala při 120°C, stálém výkonu 10 W po dobu 50 minut. Po skončení reakce byl vzorek zakoncentrován pomocí vakuové odparky. Následně byla surová reakční směs vytřepána mezi vodu a ethyl acetát (H₂O 20 ml; ethyl acetát 3x20 ml). Organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a poté bezvodým síranem sodným. Vysušený produkt byl zfiltrován a zakoncentrován na vakuové odparce. Před purifikací byl vzorek sorbován na silikagel C18 a následně vyčištěn pomocí Versa Flash sloupcové chromatografie (C18 silikagel; isopropanol : voda, gradient 0 - 40% isopropanolu).

5-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on

Výtěžek: 18 %, pevná bílá látka

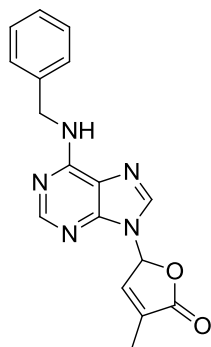


¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 1.95 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 4.97 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.27 – 7.44 (m, 5H), 8.35 (s, 1H), 8.79 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 7.46; 9.96; 45.29; 88.49, 88.56, 127.81, 127.99, 128.60, 128.93, 136.35, 146.58 (2xC), 147.06, 152.05, 152.21, 171.41.

MS (ES⁺), *m/z* (%): 336.15 [M+1].

5-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)-3-methylfuran-2(5H)-on



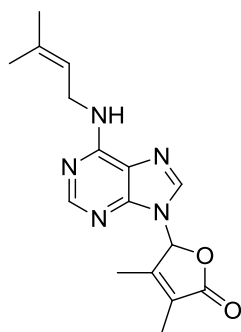
Výtěžek: 16 %, pevná bílá látka

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) $\delta(\text{ppm})$: 2.07 (t, $J = 1.53$ Hz, 3H), 4.97 (s, 2H), 7.31 – 7.44 (m, 7H), 8.39 (s, 1H), 8.78 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) $\delta(\text{ppm})$: 9.48, 45.34, 86.18, 86.24, 127.53, 127.98, 128.66, 136.02, 136.31, 140.77, 140.85, 144.74, 146.73, 152.01, 170.96.

MS (ES+), m/z (%): 322.15 [M+1].

3,4-dimethyl-5-(6-((3-methylbut-2-en-1-yl)amino)-9H-purin-9-yl)furan-2(5H)-on



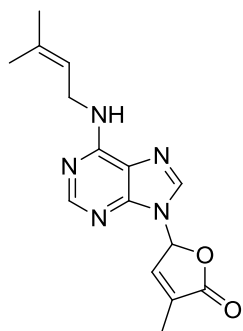
Výtěžek: 32 %, pevná bílá látka

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) $\delta(\text{ppm})$: 1.79 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 4.38 (d, $J = 7.03$ Hz, 2H), 5.37–5.41 (m, 1H), 7.18 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.77 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) $\delta(\text{ppm})$: 7.45, 9.92, 16.57, 24.51, 39.54, 88.46, 88.53, 110.89, 117.61, 128.97, 138.73, 144.47, 147.10, 151.81, 152.13, 171.40.

MS (ES+), m/z (%): 314.17 [M+1].

3-methyl-5-(6-((3-methylbut-2-en-1-yl)amino)-9H-purin-9-yl)furan-2(5H)-on



Výtěžek: 12 %, pevná bílá látka

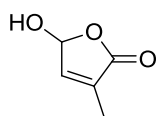
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) $\delta(\text{ppm})$: 1.77 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 4.35 (d, $J = 7.03$ Hz, 2H), 5.38 (t, $J = 7.34$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.68 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) $\delta(\text{ppm})$: 9.49, 16.74, 19.10, 24.51, 39.47, 86.19, 99.78, 131.66, 135.65, 135.99, 140.81, 145.78, 146.54, 171.00.

MS (ES^+), m/z (%): 300.19 [$\text{M}+1$].

Produkty hydrolýzy:

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



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 1.97 (t, $J = 1.6$ Hz, 3H), 6.08 (s, 1H), 6.88 (m, 1H).

3.5 Biologické testování

Pro biotest byla použita semena parazitů druhů *Striga hermonthica* (Sudan, 1994) a *Orobanche crenata* (Španělsko, 1992). Semena byla sterilizována pomocí roztoku Sava (4,7 g chlornanu sodného/100 ml), do kterého byl přidán Triton X-100 (1% v/v) po dobu 5 minut za stálého míchání. Sterilizovaná semena byla zfiltrovaná pomocí Büchnerovy nálevky, promyta destilovanou vodou a následně byla vysušena.

Před aplikací semen byly nachystány Petriho misky, do kterých byly přidány dva filtrační kruhové papíry o průměru 9 cm. Na filtrační papíry byly přidány 4 ml destilované vody a bylo přiloženo 5 kusů skelných filtračních disků. Jednotlivé disky byly před aplikací semen rozstříhány na 4 části. Na takto připravené disky se aplikovala semena.

Semena byla přidávána po 25 kusech na každý skelný disk, po aplikaci semen byly jednotlivé disky přikryty dalším diskem. Petriho miska se semeny byla uzavřena a následně vložena do uzavíratelného plastového sáčku. Semena *S. hermonthica* byla

inkubována při 27°C po dobu 14 dní. Semena *O. crenata* byla inkubována při 24°C po dobu 14 dní.

Po ukončení doby inkubace byly jednotlivé disky v Petriho miskách vysušeny pomocí filtračního papíru. Filtrační papíry s destilovanou vodou byly vyjmuty a Petriho miska očištěna. Do Petriho misky byly vloženy papírové kroužky o průměru 9 cm a o šířce 1 cm. Na tento kroužek byla aplikována destilovaná voda (2 ml). Na Petriho misku byly vloženy vysušené disky se semeny. Poté na disky byl aplikován roztok látky (100 µl) o testované koncentraci. Petriho misky byly uzavřeny a vloženy do uzavíratelného sáčku.

Jednotlivé látky byly aplikovány ve dvou koncentracích, které byly připraveny postupným ředěním. 10 mg látky bylo rozpuštěno v 10 ml acetonu a poté doplněno na objem 100 ml. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml a opět doplněno na objem 100 ml, tímto byl získán zásobní roztok o koncentraci 1 mg/l s objemovým obsahem acetonu 0,1 %. Ze zásobního roztoku byl odpipetován 1 ml a doplněn na objem 100 ml. Byl získán zásobní roztok o koncentraci 0,01 mg/l s objemovým obsahem acetonu 0,001 %.

Negativní kontrolou byla destilovaná voda s objemovým obsahem acetonu 0,1 a 0,001 %. Pozitivní kontrolou byly roztoky GR 24, které byly připraveny stejným postupem jako u testovaných látek. Pro každou koncentraci byly provedeny 3 opakování.

Připravené Petriho misky byly inkubovány po dobu 5 dní, semena *S. hermonthica* při 27 °C a semena *O. crenata* při 24 °C.

Vyklíčená semena byla spočítána pod mikroskopem a bylo stanoveno procento vyklíčených semen.

4 Výsledky a diskuze

Příprava nových strigolaktonových mimik byla zaměřena na deriváty odvozené od jiných růstových regulátorů – cytokininů. První byly připraveny butenolidové kruhy, které jsou nezbytné pro strigolaktonovou aktivitu. Dimethyl anhydrid kyseliny maleinové **20** byl zredukován pomocí borohydridu sodného na požadovaný butenolid **21**. Byl izolován ve formě žluté olejovité kapaliny s 63% výtěžkem (Schéma 4) (Sharma a kol., 2008).

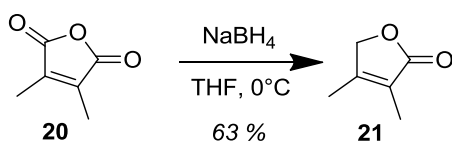


Schéma 4 – Redukce anhydridu **20**.

Butenolid **21** byl stejně jako komerční monomethylový derivát **22** substituován bromem v pozici 5 za využití termicky i fotochemicky iniciované radikálové bromace (Schéma 5) (Malik a kol., 2010). Bromované butenolidy **23** a **24** byly připraveny s kvantitativním výtěžkem a jejich čistota byla dostatečná, a proto v dalším průběhu syntézy byly použity ve formě surového produktu.

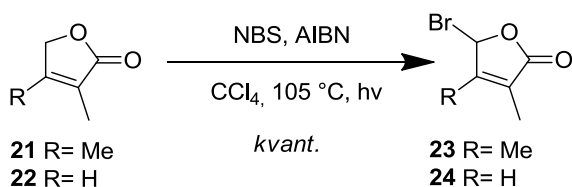


Schéma 5 – Bromace látek **21** a **22**.

Finálním krokem přípravy nových strigolaktonových mimik bylo spojení nabromovaných furanonů **23** a **24** s cytokininy 6-benzylaminopurin (**25**) a 6-isopentenyladenin (**26**). Toto spojení bylo provedeno pomocí substituční reakce za zvýšené teploty a mikrovlnného reaktoru (Schéma 6).



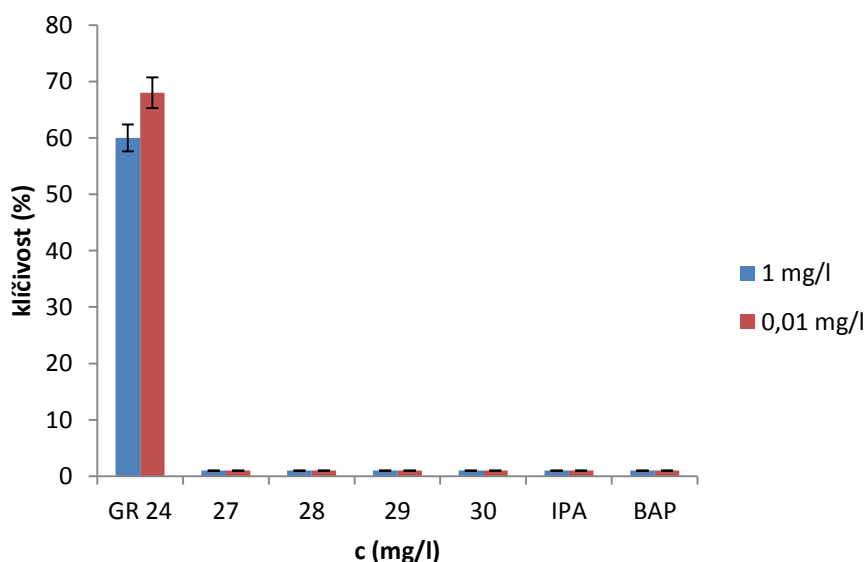
Schéma 7 – Rozklad 27 na 25 a 31 při použití klasického silikagelu.

Biologická aktivita nově připravených derivátů byla otestována na standardním používaném biotestu pro klíčení parazitických semen (Mangnus a kol., 1992a). Postup přípravy biotestu je detailně popsán v kapitole 3.5. Testování bylo provedeno na jednom zástupci rodu *Striga* konkrétně druhu *Striga hermonthica* a na jednom zástupci rodu *Orobanch*e (*O. crenata*).

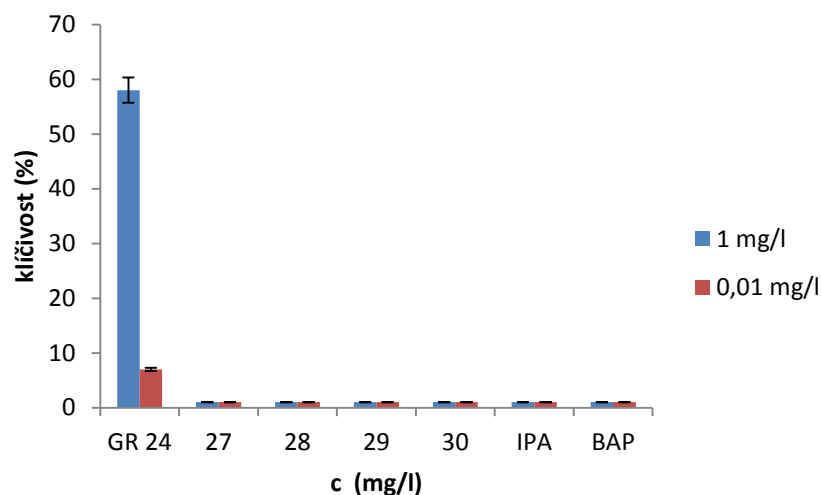
U obou druhů reagovaly semena odpovídajícím způsobem pro dané roční období a danou koncentraci pozitivní kontroly (Mangnus a kol., 1992a). Za pozitivní kontrolu se standardně používá GR 24 (5) (Obr. 8).

Test byl prováděn v dubnu a *Striga hermonthica* klíčila okolo 70 % bez závislosti na koncentraci GR 24 (Graf 5), kdežto *Orobancha crenata* vykazovala výrazně nižší aktivitu při nižší koncentraci (7 % : 53 %), což odpovídá publikované aktivitě pro dané roční období (Mangnus a kol., 1992a). Kvalita testu byla ověřena negativní kontrolou (destilovaná voda), u které nevyklíčilo ani jedno semínko bez ohledu na druh.

Ani jedna z připravených látek nevykazovala žádnou aktivitu. Látky **27**, **28**, **29**, **30** nevykazovaly žádnou aktivitu bez ohledu na koncentraci a druhu parazitické rostliny. Současně byly provedeny klíčivostní testy s výchozími cytokininy (iPA, BAP), ani tyto látky nevykazovaly aktivitu. Výchozí cytokininy byly testovány z důvodu nestability látek **27**, **28**, **29**, **30**, při jejichž hydrolýze dochází ke zpětnému vzniku cytokininu a tímto jsme chtěli vyloučit jejich efekt na klíčení semen. O druhém produktu hydrolýzy furanonu **31** je známo, že v klíčivostním testu není aktivní (Zwanenburg a kol., 1999).

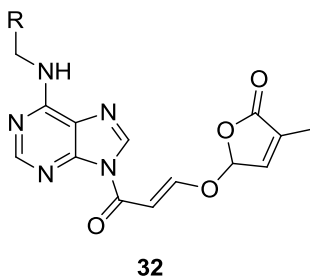


Graf 5 - Srovnání klíčivosti semen *S. hermonthica* mezi GR 24 a látkami **27**, **28**, **29**, **30**, iPA a BAP (1 mg/l, 0,01 mg/l).



Graf 6 - Srovnání klíčivosti semen *O. crenata* mezi GR 24 a látkami 27, 28, 29, 30, iPA a BAP (1 mg/l, 0,01 mg/l).

Důvodem nulové aktivity látek 27, 28, 29, 30 je pravděpodobně jejich hydrolýza na neaktivní cytokinin a furanon. Řešení tohoto problému může být příprava strigolaktonových analogů (32) odvozených od daných cytokininů, kde napojení heterocyklu na strigolaktonový enoletherový můstek pomocí acetylu by mělo přispět k větší stabilitě produktu (Obr. 18).



Obr. 18 – Strigolaktonový analog.

5 Závěr

Byla připravena 4 nová strigolaktonová mimika, která se následně testovala na iniciaci klíčení parazitických semen rodu *Striga* a *Orobanche*. Látky byly připravovány z důvodu jednoduché přípravy a předpokládané aktivity. Výsledné testování ukázalo velkou nestabilitu připravených látek a tudíž jejich nevhodnost k jakémukoliv použití.

Bylo navrženo řešení stabilizace podobných látek přidáním enoletherového můstku. Tyto nová strigolaktonová analoga, by mohly vykazovat nejen aktivitu v iniciaci klíčení parazitických semen, ale i v dalších oblastech působení strigolaktonů.

Použitá literatura

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.

Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–27.

Babiker A. G. T.; Ibrahim N. E., Edwards W. G. (1988) Persistence of GR7 and *Striga* germination stimulant(s) from *Euphorbia aegyptiaca* Boiss in soils and in solutions. *Weed Res.* **28**, 1-6.

Bashir M. O. (1987) Parazitic weed in agruculture, str. 183-206, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Brown R., Greenwood A. D., Johnson A. W., Long A. G (1951) The stimulant involved in the germination of *Orobancha 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. (1951) The stimulant involved in the germination of the *Orobancha*, *Biochem J.* **48**, 564–568.

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**, 1189-90.

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., Langston M. A. (1971) Contact soil fumigation. str. 127, In Proceedings of the Southern Weed Science Society, Little Rock, Arkansas, 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.

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

Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A. Pillot J. P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J. Ch., Bouwmeester H., Becart G., Beveridge Ch. A., Rameau C., Rochange S. F. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. **455**, 189-194.

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

Johnson A. W., Gowda G., Hassanali A., Knox J., Monaco S. Roseberry G. (1981) The preparation of synthetic analogs of strigol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 1734–1743.

Johnson A. W., Roseberry G., Parker C. (1976) A novel approach to *Striga* and *Orobanche* control using synthetic germination stimulants. *Weed Res.* **16**, 223–227.

Kroschel J., Hundt A., Abbasher A. A., Sauerborn J. (1996) Pathogenicity of fungi collected in northern Ghana to *Striga hermonthica*. *Weed Res.* **36**, 515-520.

Kuijt J. (1969) The Biology of Parasitic Flowering Plants, str. 246, University of California Press, Berkeley, USA

.

Lane J. A., Moore T. H. M., Child D. V., Cardwell K. E., Singh B. B., Bailey J. A. (1994) Virulence characteristics of a new race of the parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* from southern Benin on cowpea. *Euphytica*. **72**, 183–188.

Malik H., Rutjes F. P. J. T., Zwanenburg B. (2010) A new efficient synthesis of GR 24 and dimethyl A-ring analogues, germinating agents for seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* spp. *Tetrahedron*. **66**, 7198-7203.

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

Mangnus E. M., Stommen P. L. A, Zwanenburg B. (1992) A standardized bioassay for evaluation of potential germination stimulants for seed of parasitic weeds. *J. Plant Growth Regul.* **11**, 91-98.

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

Mwakaboko A. S. disertační práce, Radboud university Nijmegen, Nizozemí, 2003.

Nefkens G. H. L., Thuring J. W. J. F., Beenackers M. F. M., Zwanenburg B. (1997) Synthesis of a phthaloylglycine derived strigol analogue and its germination stimulatory activity towards seeds of the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata*. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2273–2277.

Parker C., Riches C. R. (1993) Parasitic Weeds of the World, Biology and Control, str. 332, CAB International, Wallingford, UK.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (2003) Fyziologie rostlin, str. 240–245, Nakladatelství Academia, Praha, ČR.

Ramaiah K. V., Parker C. (1982) *Striga* and other weeds in sorghum, str.291–302 Proceedings of the International Symposium on Sorghum., Andhra Pradesh, India.

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.

Reizelman A., Zwanenburg B., 2001, nepublikované výsledky.

Sharma V., Kelly G. T., Watanabe C. M. H. (2008) Exploration of the Molecular Origin of the Azinomycin Epoxide: Timing of the Biosynthesis Revealed, *Org. Lett.* **10**, 4815–4818.

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

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

Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome V., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi I. S. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature.* **455**, 195–200.

van der Heijden M. G. A., Klironomos J. N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T. T., Wiemken A., Sanders I. R. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature.* **396**, 69–72.

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

Worsham A. D. (1987) In Parasitic Weeds in Agriculture Vol. 1, str. 45, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Worsham A. D., Parker, C. (1991) Proceedings of the fifth international symposium on parasitic weeds, str. 237, CIMMYT, Nairobi, Kenya.

Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Yokota T., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2008) Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry*. **69**, 427-431.

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. Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry*. **49**, 1967–1973.

Yoneyama K., Takeuchi Y., Yokota T. (2001) Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. *Physiologia Plant.* **112**, 25–30.

Yoneyama K., Xie X., Kisygi T., Nomura T., Sekimoto H., Yokota T., Yoneyama, K. (2011) Characterization of strigolactones exuded by *Astreraceae* plants. *Plant Growth Regul.* **65**, 495-504.

Zwanenburg B. (2012), nepublikované výsledky.

Zwanenburg B., Mangnus E. M., Thuring J. W. J. F. (1994) Strigol analogues: Design, Synthesis and Biological Activity. In Proceedings of the third International Workshop on *Orobanche* and related *Striga* Research, Pieterse, A. H., Verkleij, J. A. C. 29 and ter Borg S. J., eds., (Royal Tropical Institute, Amsterdam), 187-197.

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.