

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Strigolaktonová mimetika od jednoduchých alkoholů jako stimulantí
klíčení semen parazitických rostlin**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Frydryšková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Frydryšková
Název práce	Strigolaktonová mimetika od jednoduchých alkoholů jako stimulantů klíčení semen parazitických rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů a CRH
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Bakalářská práce se věnuje syntéze strigolaktonových mimetik a testování jejich biologické aktivity na parazitických rostlinách rodu <i>Striga</i> , <i>Orobanche</i> a <i>Phelipanche</i> . V teoretické části jsou shrnuty známé informace o strigolaktonech, o jejich funkcích v rostlinách a využití v zemědělství proti parazitickým rostlinám. V praktické části je popsána syntéza nových strigolaktonových mimetik odvozených od jednoduchých alkoholů spolu s testem jejich biologické aktivity jako stimulantů klíčení semen parazitických rostlin.
Klíčová slova	Strigolaktony, parazitické rostliny, klíčení, fytohormony, <i>Striga</i>
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Frydryšková
Title of thesis	Strigolactone mimics from simple alcohols as a germination stimulant for parasitic plants seeds
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph. D.
The year of presentation	2020
Abstract	The bachelor thesis deals with the synthesis of strigolactone mimics and testing of their biological activity on parasitic plants of the genus <i>Striga</i> , <i>Orobanche</i> and <i>Phelipanche</i> . In theoretical part, known information about strigolactones, their functions in plants and their use in agriculture against parasitic plants are summarised. In practical part, synthesis of a new strigolactone mimics derived from simple alcohols together with test of their biological activity as germination stimulant of parasitic plants seeds is described.
Keywords	Strigolactone, parasitic plants, germination, phytohormone, <i>Striga</i>
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Děkuji Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. za odborné vedení a rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Noskové za pomoc při provádění biologických testů na parazitických semínkách a Mgr. Haně Ománikové za analýzy provedené HPLC a HPLC/MS.

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod a cíle práce	9
2 Teoretická část	10
2.1 Rostlinné hormony	10
2.2 Strigolaktony – jejich historie a funkce	10
2.2.1 Symbióza s AM houbami	11
2.3 Struktura a biosyntéza strigolaktonů	12
2.3.1 Chemická syntéza	15
2.4 Mechanismus signalizace	16
2.4.1 Strigolaktonový receptor	17
2.5 Syntetické deriváty strigolaktonů – analoga a mimetika	18
2.6 Parazitické rostliny	20
2.6.1 Životní cyklus parazitických rostlin	22
2.7 Boj s parazitickými rostlinami	22
2.7.1 Sebevražedné klíčení	23
3 Experimentální část	25
3.1 Chemikálie	25
3.2 Materiál	25
3.3 Metody	25
3.4 Příprava strigolaktonových mimetik	26
3.4.1 Bromace 3-methyl-2-furan-2(5 <i>H</i>)-onu	26
3.4.2 Napojení Br-D kruhu na alkohol	26
3.5 Stabilita látek	27
3.6 Biologické testy na semenech parazitických rostlin	27
4 Výsledky	29
4.1 Syntéza strigolaktonových mimetik	29
4.2 Testy stability	31
4.3 Biologické testování	33
5 Diskuze	34
5.1 Syntéza strigolaktonových mimetik	34
5.2 Testy stability	34
5.3 Biologické testování	35
6 Závěr	38
Použitá literatura	39

Seznam použitých zkratk

ABC-FTL – ABC-formyl-tricyklický lakton

AIBN – azobisisobutyronitril

AM houby – arbuskulární mykorhizní houby

AtD14 – *Arabidopsis thaliana* D14

CCl₄ – tetrachlormethan

CCD7/CCD8 – karotenoidy štěpící dioxygenasa 7/8

CDCl₃ – deuterovaný chloroform

CL – karlakton

d – dublet

dd – dublet dubletu

dq – dublet kvartetu

D14 – DWARF14, strigolaktonový receptor (*Oryza sativa*, rýže)

D27 – DWARF27, karotenoidní isomerasa (*Oryza sativa*, rýže)

DAD2 – decreased apical dominance 2, α/β hydrolasa (*Petunia hybrida*, petunie)

DMSO – dimethylsulfoxid

ES⁺ – ionizace pomocí elektrospreje

GR – germination releaser (stimulátor klíčení)

HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová

HMB – hydroxy-methyl-butenolid

HO-D – hydroxybutenolid

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

h ν – UV záření

J – štěpící konstanta

LiHMDS – bis(trimethylsilyl)amid lithný

LLE – extrakce kapalina kapalina

m – multiplet

MS – hmotnostní spektrometrie

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid

NBS – *N*-bromsukcinimid

NMR – nukleární magnetická rezonance

ppm – parts per milion

PPM – Plant preservative Mixture

q – kvartet

rac – racemická směs

RMS3 – Ramosus³⁴, esterasa (*Pisum sativum*, hrášek)

s – singlet

sext – sextet

spp – lat. *species pluralis* (druhy)

t – triplet

TEA – trimethylamin

THF – tetrahydrofuran

TLC – tenkovrstvá chromatografie

δ – chemický posun

1 Úvod a cíle práce

Strigolaktony se řadí k nejmladším rostlinným hormonům biogeneticky příbuzným karotenoidům. Hlavním místem jejich biosyntézy v rostlině jsou kořeny, kde podporují symbiotické interakce s arbuskulárními mykorhizními (AM) houbami a klíčení kořenových parazitických rostlin (Waters a kol., 2017). Hrají roli ve vývoji rostlin – stimulují růst internodií, urychlují senescenci listů, prodlužují kořenové vlásky, zvyšují růst primárních kořenů, zvětšují tloušťku stonku a vyvolávají sekundární růst, inhibují růst axilárních pupenů a inhibují tvorbu adventivních a postranních kořenů (Al-Babili a Bouwmeester, 2015). Strigolaktony mají také význam jako signální molekuly (Xie a kol., 2010).

Přírodní strigolaktony se izolují z kořenových exudátů, kde se vyskytují ve velmi malém množství. Vzhledem k jejich struktuře s řadou chirálních center je jejich syntéza obtížná a drahá. Proto byly připraveny syntetické deriváty, které jsou cenově dostupnější a lze je využít v zemědělství k tzv. „sebevražednému klíčení parazitických rostlin“. Syntetické deriváty strigolaktonů se dělí na analoga a mimetika.

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši o strigolaktonech, jejich funkci a využití v zemědělství se zaměřením na parazitické rostliny rodu *Striga*, *Orobanche* a *Phelipanche*. Dále připravit nová mimetika strigolaktonů odvozená od alkoholů a otestovat jejich biologickou aktivitu při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin.

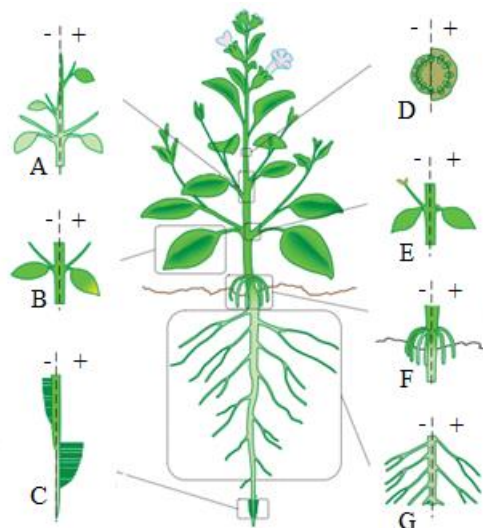
2 Teoretická část

2.1 Rostlinné hormony

Rostliny jsou imobilní organismy, proto je schopnost adaptace na široké spektrum podmínek prostředí pro jejich přežití kritická. Rostliny používají signální systémy pro kontrolu růstu a komunikace s jinými organismy v reakci na změny prostředí. Jeden z těchto systémů zahrnuje rostlinné hormony, které regulují širokou škálu buněčných procesů. Rostlinné hormony jsou životně důležité pro mnoho základních aspektů rostlinné biologie, jsou zapojeny do procesů jako je klíčení semen, doba kvetení, kontrola stárnutí listů, zrání plodů a další. Tyto fyziologické procesy v rostlinách řízené pomocí nízkomolekulárních látek se dělí do dvou skupin na základě účinné koncentrace (Procházka a kol., 2003). První skupinou jsou rostlinné hormony (fytohormony), které účinkují už při velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až 10^{-9} M), patří sem auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, ethylen a strigolaktony. Fytohormony jsou přírodní látky působící v místě vzniku, popřípadě částech rostliny, do kterých jsou transportovány. Druhou skupinu představují látky, jejichž účinek se projeví až při vyšších koncentracích (od 10^{-5} M). Těmto látkám se říká růstové regulátory. Mezi látky s regulační aktivitou náleží brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová, oligosacharidy a fenolické látky. Růstové a vývojové procesy v rostlině jsou propojeny a ovlivněny vzájemným působením fytohormonů a růstových regulátorů.

2.2 Strigolaktony – jejich historie a funkce

Strigolaktony, seskviterpenoidní laktony, jsou biogeneticky příbuzné karotenoidům. Jsou nejmladší skupinou fytohormonů, které hrají roli ve vývoji rostlin – stimulují růst internodií, urychlují senescenci listů, prodlužují kořenové vlásky a zvyšují růst primárních kořenů, zvětšují tloušťku stonku a vyvolávají sekundární růst, inhibují růst axilárních pupenů a inhibují tvorbu adventivních a postranních kořenů (Obr. 1) (Al-Babili a Bouwmeester, 2015). Strigolaktony jsou rostlinami vylučovány do rhizosféry, kde podporují symbiotické interakce s AM houbami a klíčení kořenových parazitických rostlin (Waters a kol., 2017) a také mají význam jako signalizační molekuly (Xie a kol., 2010).



Obr. 1 – Role strigolaktonů ve vývoji rostlin (převzato z Al-Babili a Bouwmeester, 2015).

A – stimulace růstu internodií, B – urychlení senescence listů, C – prodloužení kořenových vlásků a zvýšení růstu primárních kořenů, D – umožňují tloušťnutí stonku a vyvolávají sekundární růst, E – inhibice růstu axilárních pupenů, F – inhibice tvorby adventivních kořenů, G – inhibice tvorby postranních kořenů.

První strigolakton byl izolován z kořenových exudátů bavlníku srstnatého (*Gossypium hirsutum*) v roce 1966 a byl pojmenován strigol (1) (Obr. 3) (Cook a kol., 1966). Strigol byl identifikován v exudátech dalších rostlin, jako například čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor*) (Siame, 1993), kukuřice setá (*Zea mays*) (Siame, 1993) a proso seté (*Panicum miliaceum*) (Siame, 1993).

V roce 1992 byl izolován sorgolakton (3) (Obr. 3), sloučenina svou strukturou podobná strigolu. Sorgolakton byl izolován z kořenových exudátů čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*). Na konci 90. let 20. století byla izolována látka zvaná orobanchol (4) (Obr. 3), z exudátu kořene jetele lučního (*Trifolium pratense*), na kterém parazitují rostliny rodu *Orobanche*. Bylo dokázáno, že *Striga* i *Orobanche* využívají strigolaktony k iniciaci klíčení (Xie a kol., 2010). V roce 2005 byl izolován 5-deoxystrigol (2) (Obr. 3) z kořenových exudátů leknínu japonského (*Lotus japonicus*). U látky 2 byl poprvé pozorován účinek strigolaktonů jako faktorů pro větvení hyf AM hub (Akiyama a kol., 2005).

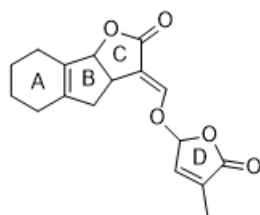
2.2.1 Symbióza s AM houbami

V přírodě jsou rostlinné mikrobiální symbiózy běžné, zejména ty, které zahrnují druhy AM hub. AM houby, které patří do kmene Glomeromycota, se účastní mutualistické symbiózy s více než 80 % suchozemských rostlin (Gianinazzi-Pearson, 1996; Harrison, 2005). AM

houby jsou obligátně biotrofní organismy, jejichž životní cyklus probíhá výhradně v přítomnosti hostitelské rostliny. Symbiotický vztah zvyšuje odolnost hostitelské rostliny vůči biotickému a abiotickému stresu (Pozo a Azcon-Aguilar, 2007) a rezistenci proti patogenům. Hyfy hub pronikají do rhizodermálních buněčných vrstev a šíří se podélně po vnitřní kořenové kůře, kde se větví a tvoří jedinečnou strukturu, arbuskulu, ve které dochází k výměně živin (Harrison, 1997, 2005). Výrůstek AM hyfy mimo kořen rostliny umožňuje vstřebávání minerálních živin, zejména fosfátů. Na oplátku AM houba získá od rostliny sacharidy získané fotosyntézou (Brundrett, 2002). Symbióza je zahájena výměnou chemických signálů mezi oběma partnery. Kořeny rostlin uvolní „větvicí faktor“, který indukuje větvení hyf, což zvyšuje pravděpodobnost kontaktu hyf s kořeny rostliny. AM houby současně produkují látku známou jako „myc faktor“, která v kořeni vyvolává presymbiotický stav (Kosuta a kol., 2003; Navazio a kol., 2007). Žádný z těchto signálů nebyl izolován a chemicky identifikován do doby, kdy byl „větvicí faktor“ identifikován jako 5-deoxystrigol (**2**) (Akiyama a kol., 2005). Důkazy z fosilních nálezů naznačují, že symbióza rostlin s AM houbami vznikla před více než 400 miliony let (Remy a kol., 1994) a mohla ulehčit kolonizaci půdy rostlinami.

2.3 Struktura a biosyntéza strigolaktonů

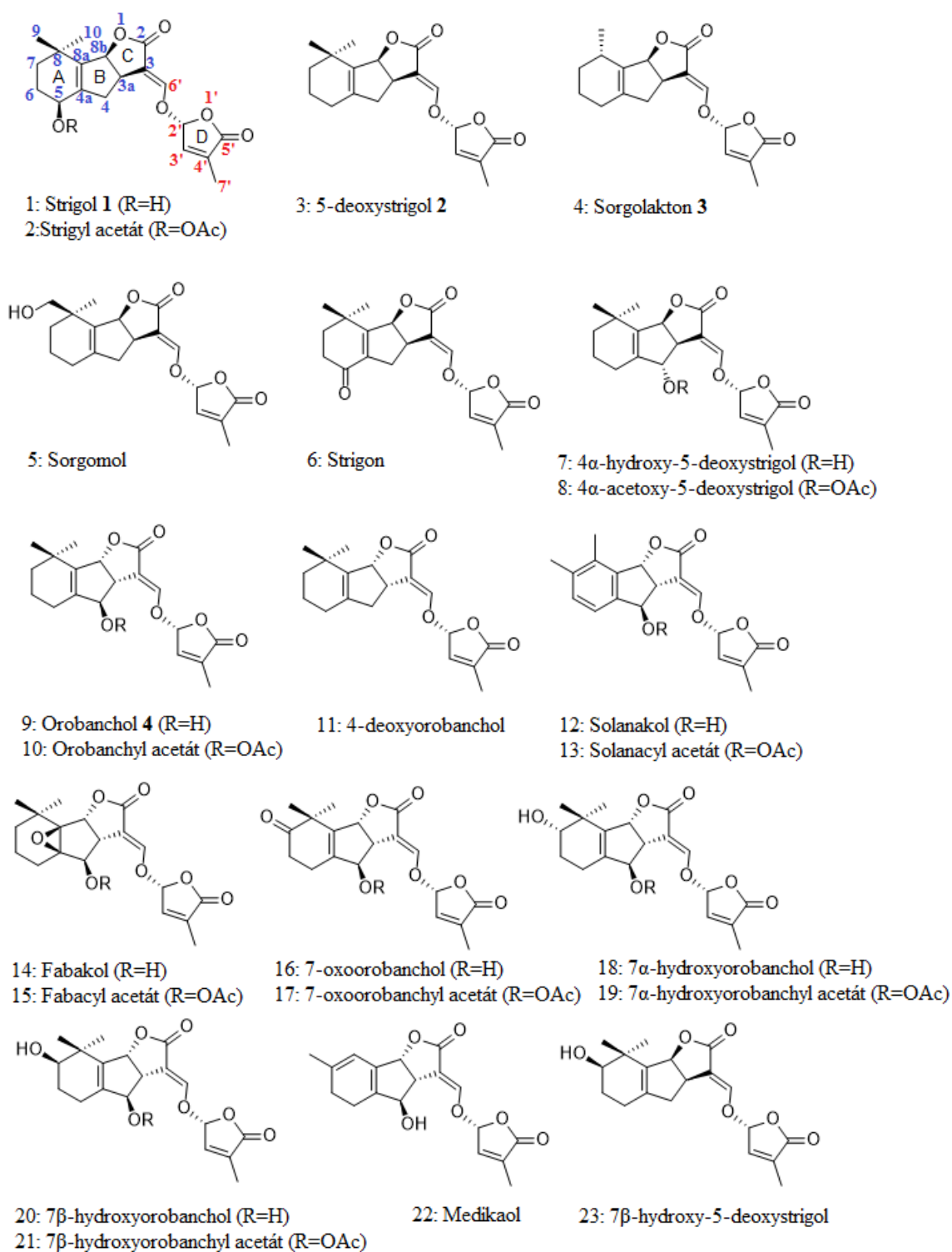
Většina přirozeně se vyskytujících strigolaktonů sdílí společnou laktonovou strukturu složenou ze tří kruhů („ABC“), které jsou připojeny pomocí enoetherového můstku na butenolidový D-kruh (Obr. 2) (Zwanenburg a kol., 2009, 2013). Na A-kruhu je přítomna jedna nebo dvě methylové skupiny, může být přítomna i hydroxylová skupina, popřípadě jedna a více acetyloxylových skupin na A/B-kruhu (Xie a kol., 2010).



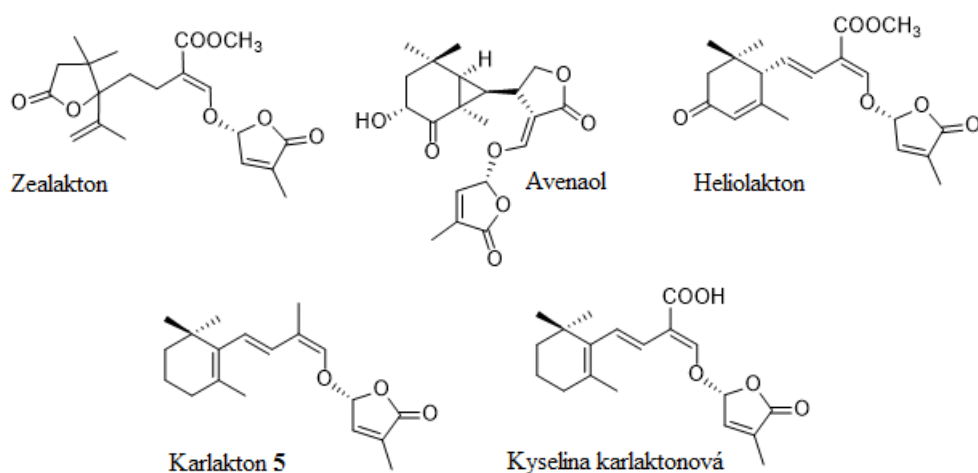
Obr. 2 – Základní ABCD skelet většiny přírodních strigolaktonů.

Strigolaktony se v současné době dělí na základě jejich struktury do dvou skupin. Sloučeniny, které obsahují tricyklickou ABC strukturu spojenou s butenolidovým D-kruhem přes enoetherový můstek se nazývají kanonické strigolaktony (Obr. 3) (Al-Babili a Bouwmeester, 2015). Kanonické strigolaktony se dále dělí na dvě skupiny látek, jedna je odvozena od strigolu (**1**), druhá od orobancholu (**4**) a vzájemně se liší stereochemií BC

spojení. Nedávno byly izolovány a charakterizovány nové typy strigolaktonů bez A, B nebo C kruhu, ale mající přítomen D-kruh. Tyto látky jsou označovány za nekanonické strigolaktony (Obr. 4) (Yoneyama a kol., 2018). Nejjednodušším nekanonickým strigolaktonem je karlakton (CL) (5) (Alder a kol., 2012).

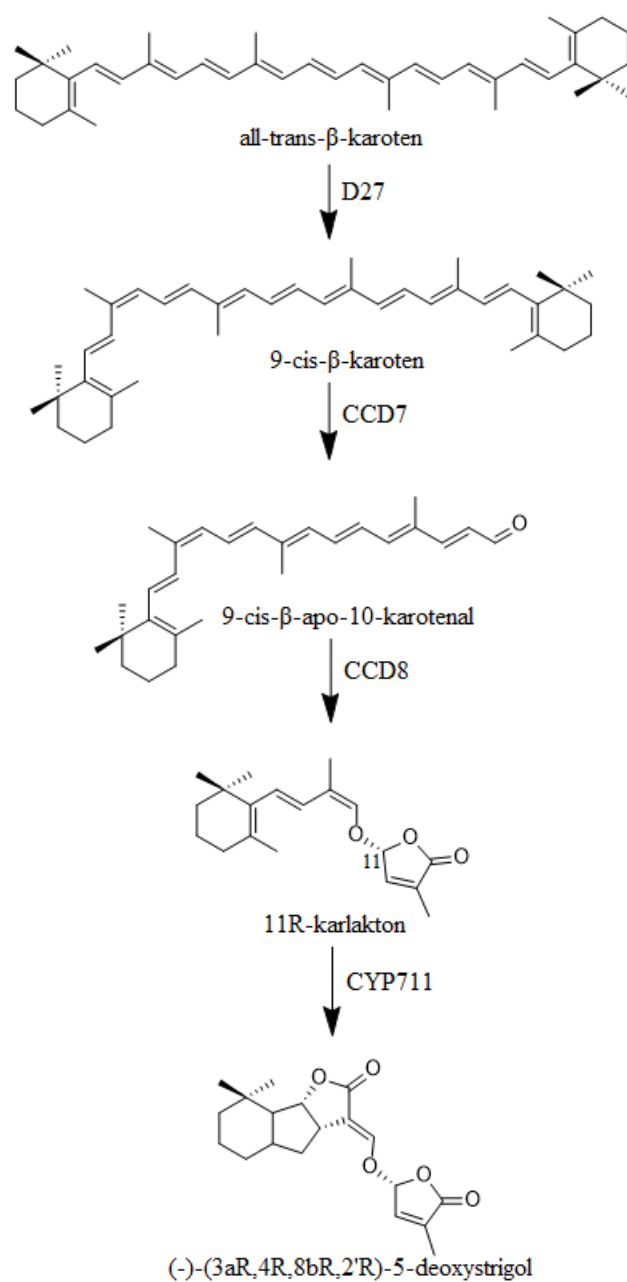


Obr. 3 – Struktury kanonických strigolaktonů: 1-8, 23 strigolaktony odvozené od strigolu, 9-22 strigolaktony odvozené od orobancholu (převzato a upraveno z Yoneyama a kol., 2018).



Obr. 4 – Struktury nekanonických strigolaktonů (převzato a upraveno z Yoneyama a kol., 2018).

V roce 2005 Matusova a kol. uvedli, že strigolaktony mohou být syntetizovány z karotenoidů, což bylo zjištěno díky karotenoidovému biosyntetickému inhibitoru fluridonu a některým mutantům, které blokují karotenoidovou biosyntetickou dráhu. V roce 2008 se ukázalo, že deoxygenasy CCD7 a CCD8 jsou zapojeny ve štěpení karotenoidů (Umehara a kol., 2008; Gomez-Roldan a kol., 2008). Bylo také prokázáno, že kromě těchto dvou CCD mají v biosyntéze strigolaktonů funkci i cytochrom P450, MAX1, D27 a D14 (Crawford a kol., 2010; Lin a kol., 2009). Bylo zjištěno, že D27 katalyzuje reverzibilní izomerizaci all-trans- β -karotenu na C-9 pozici za vzniku 9-cis- β -karotenu. Alder a kol. (2012) pak prokázali, že CCD7 štěpí 9-cis- β -karoten za vzniku 9-cis- β -apo-10-karotenalu, který je poté štěpen CCD8 na CL (5). V posledním kroku katalyzovaném CCD8, dochází k intramolekulárnímu přesmyku a syntéze D-kruhu (Obr. 5). CL potlačoval větvení výhonků u biosyntetických mutantů rýže s blokovaným proteinem d10 a d27 a stimuloval klíčení semen *S. hermonthica*, což naznačilo, že CL je biosyntetickým prekurzorem strigolaktonů.



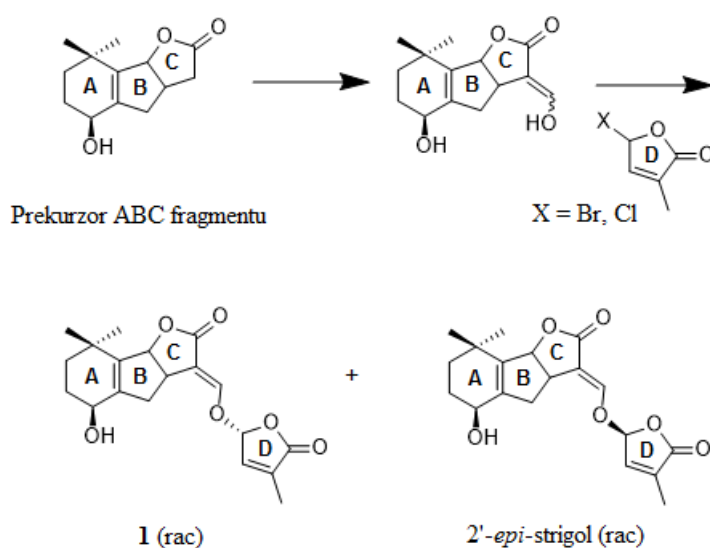
Obr. 5 – Syntéza strigolaktonů (převzato a upraveno z Dvořáková a Vaněk, 2015).

2.3.1 Chemická syntéza

Syntéza strigolaktonů zahrnuje tři klíčové kroky (Zwanenburg, Zeljković a Pospíšil, 2016) (Obr. 6). Prvním z nich je syntéza ABC skeletu. Druhým krokem je zavedení požadovaných substituentů v A nebo B-kruhu následované třetím krokem, kterým je připojení D-kruhu. Tento postup může být také obrácen tak, že první je připojen D-kruh a následně jsou k A nebo B-kruhu přidány vhodné substituenty. Vhodným výchozím materiálem je mesityl oxid, který je převeden na derivát cyklohexenkarboxylové kyseliny a následně podroben Nazarově

cyklizaci za účelem vzniku AB-kruhů. Přestože jsou výtěžky těchto kroků průměrně vyšší než 80 %, tak celkový výtěžek je jen 20 %, v závislosti na dovednosti chemika. ABC skelet má jednu efektivní stereogenní jednotku na BC spojení, proto syntéza vede ke vzniku racemických směsí.

Připojení D-kruhu nastává po formylaci ABC skeletu s (m)ethyl formiátem v přítomnosti vhodné báze. Získaný enolát je ponechán v reakci s chloro nebo brombutenolidem. Požadovaný brombutenolid se nejnadhěji získá radikálovou bromací odpovídajícího butenolidu použitím N-bromsukcinimidu (NBS)/dibenzoylperoxidu nebo NBS a světla.



Obr. 6 – Schéma připojení D-kruhu k ABC skeletu při celkové syntéze strigolu (1)

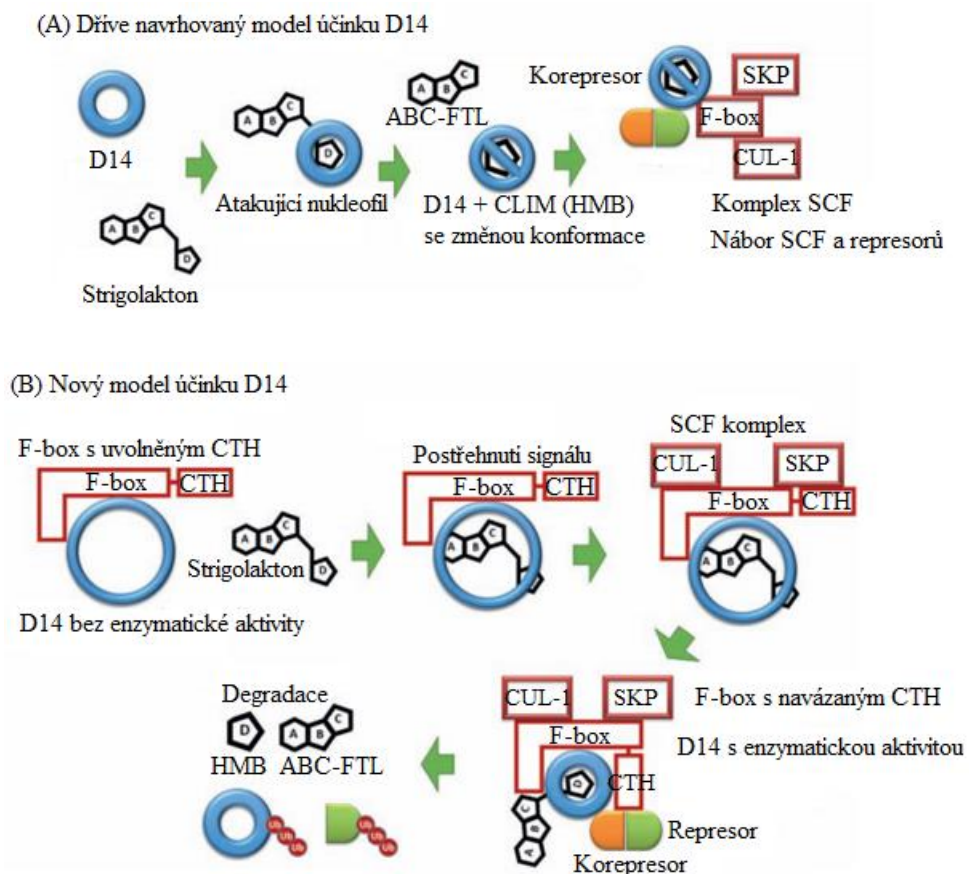
2.4 Mechanismus signalizace

Mechanismus signalizace strigolaktonů je proveden pomocí proteazomální degradace (Saeed a kol., 2017). Signální dráha strigolaktonů zahrnuje receptory třídy α/β -hydrolasových enzymů DWARF14 (D14), More Axillary Growth2 (MAX2) F-box proteiny a supresory MAX2 1 (SMAX1) a SMAX1-LIKE (SMXL) (Carlsson a kol., 2018). MAX2 kóduje F-box protein bohatý na leucin (Stirnberg a kol., 2007). Tato třída proteinů funguje jako substrátová podjednotka komplexů SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF). SCF komplexy jsou ubikvitin E3 ligasy, které mohou katalyzovat polyubikvitinaci svých proteinových substrátů, čímž je označí pro degradaci proteasomem 26S.

2.4.1 Strigolaktonový receptor

Strigolaktonový receptor D14 byl původně popsán v mutantu rýže d14, jeho homology byly nalezeny v huseničku (AtD14), petunii (DAD2) a hrášku (RMS3). Receptor strigolaktonů v rostlinách je neobvyklý v tom, že zároveň váže a hydrolyzuje molekuly strigolaktonů (Marzec a Brewer, 2019). Studie ukázaly, že se produkt hydrolyzy ireverzibilně váže na receptor a poté aktivuje signalizaci.

D14 se váže na molekulu strigolaktonu a atakující nukleofil pak odděluje ABC-formyl-tricyklický lakton (ABC-FTL) od D-kruhu (hydroxy-methyl-butenolid – HMB) (Obr. 7) (Marzec a Brewer, 2019). Hydrolasová aktivita D14 je závislá na přítomnosti katalytické triády aminokyselin Ser-His-Asp. Při nahrazení těchto aminokyselin došlo ke ztrátě aktivity a citlivosti D14. Re-analýza struktury D14 odhalila, že během konformačních změn se zvětšuje dutina přítomná na povrchu D14, což umožňuje vazbu celé molekuly strigolaktonu (př: GR24, debranon) (Seto a kol., 2019). Konformace F-boxu a stav hydrolyzy mohou být důležité pro způsob přenosu signálu.



Obr. 7 – Vnímání signálů strigolaktonů (převzato a upraveno z Marzec a Brewer, 2019).

A – Receptor D14 se váže na molekulu strigolaktону a na základě hydrolytické aktivity odděluje ABC-FTL od HMB. ABC-FTL se uvolňuje a HMB je kovalentně vázán na D14, jako kovalentně vázaná intermediární molekula (CLIM), která mění konformaci D14 a umožňuje tak její interakci s jinými složkami signální dráhy strigolaktонů.

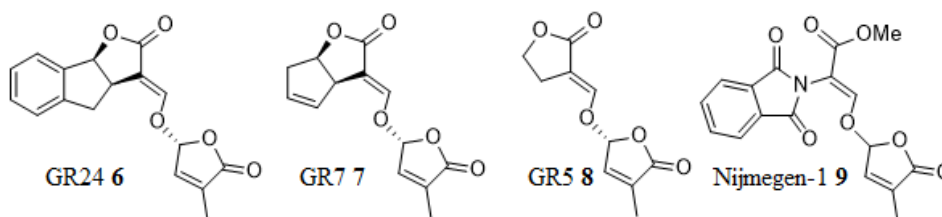
B – Konformační změny v D14 jsou výsledkem interakce s F-box proteinem (v závislosti na konformaci C-terminálního α -helixu – CTH), což umožňuje D14 vazbu celé molekuly strigolaktону.

Oba modely mají za následek degradaci molekuly strigolaktону a ubikvitinaci D14 a cílových proteinů.

2.5 Syntetické deriváty strigolaktонů – analoga a mimetika

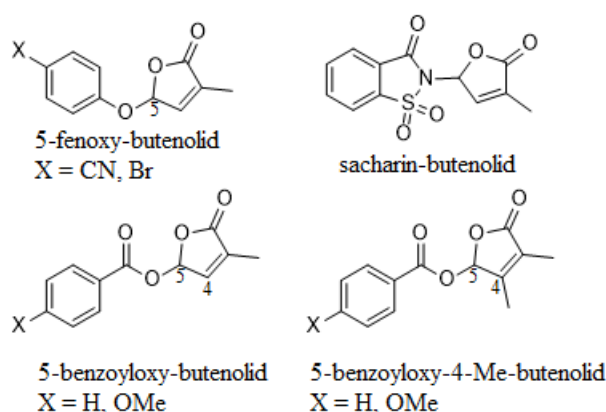
Přírodní strigolaktony se izolují z kořenových exudátů, kde se vyskytují ve velmi malém množství. Vzhledem k jejich struktuře s řadou chirálních center je jejich syntéza obtížná a drahá, proto nejsou vhodná pro použití v praxi. K překonání těchto problémů byla vyvinuta různá analoga a mimetika. Protože mají strigolaktony mnoho fyziologických funkcí jiných, než jsou jejich účinky na kořeny parazitických rostlin, tak strigolaktонová analoga a mimetika mohou být aplikována pro různé účely v zemědělství.

Analoga strigolaktонů jsou definována jako sloučeniny mající stejný bioaktiofor jako přírodní strigolaktony, to znamená, že D-kruh je spojen s α , β -nenasyceným enonem pomocí enoletherového můstku (Zwanenburg, Zeljković a Pospíšil, 2016). Příkladem analoga je sloučenina s kódovým jménem GR24 (6) (Obr. 8), jejíž A-kruh je nahrazen benzenovým kruhem. Po odstranění A-kruhu vzniká GR7 (7), po odříznutí B-kruhu GR5 (8). Mezi analoga se také řadí Nijmegen-1 (9). Všechny tyto látky mají zjednodušenou strukturu oproti přírodním strigolaktонům a jsou aktivní při iniciaci klíčení semen parazitických rostlin. GR24 je používán jako standard v testech klíčení parazitických rostlin. Důvod je pravděpodobně historický, jedná se o první analog strigolaktонů s vysokou aktivitou.



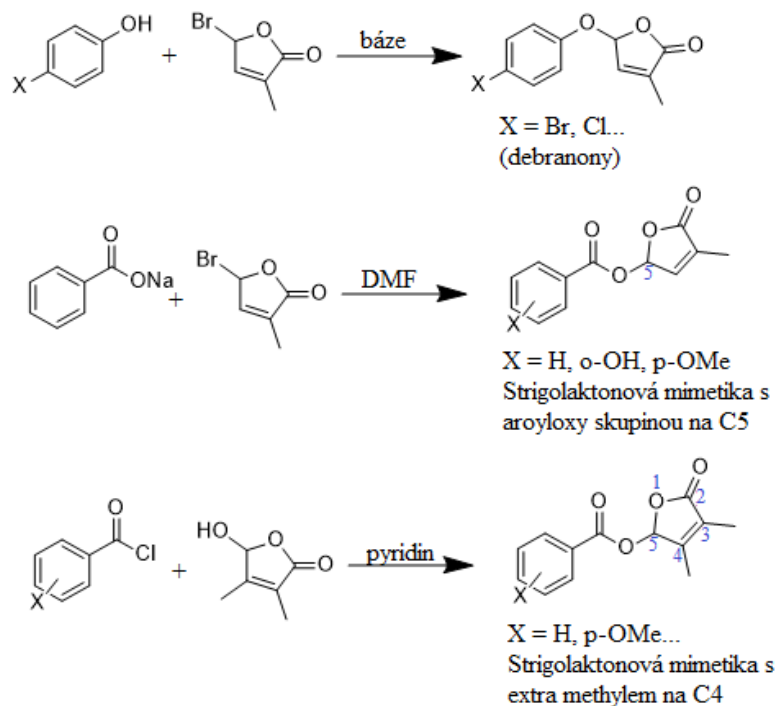
Obr. 8 – Příklady strigolaktонových analogů.

Za účelem zisku více aktivních sloučenin s jednodušší strukturou byla vyvinuta strigolaktonová mimetika (Obr. 9). Jedná se o skupinu sloučenin s podobnou aktivitou jako mají strigolaktony, ale D-kruh není s ostatními substituenty spojen pomocí enoletherového můstku, což vede k vyšší hydrolyzační stabilitě. Mohou být připraveny v pár syntetických krocích, a proto mají výhodu oproti přírodním strigolaktonům i jejich analogům, pokud jde o nízké náklady na přípravu (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011). Mimetika jsou založena na D-kruhu s vhodným substituentem na C-5 (Zwanenburg, Zeljković a Pospíšil, 2016). Existují dva typy mimetik. První typ má na C-5 substituovanou fenoxy skupinu, tyto butenolidy se hromadně nazývají debranony (Obr. 10). Jejich aktivita při klíčení semen *S. hermonthica* je spíše nižší, ale jsou aktivní jako inhibitory větvení. Druhá skupina, popsána téměř ve stejnou dobu, obsahuje aroyloxy skupinu na C-5 a je mírně aktivní jako klíčící látka pro semena *S. hermonthica* a významně aktivní pro semena *O. cernua*.



Obr. 9 – Příklady strigolaktonových mimetik (převzato a upraveno z Zwanenburg a Pospíšil, 2013).

Bylo pozorováno, že aktivita je prakticky snížena na nulu, když je na C-4 přítomna extra methylová skupina, což poskytlo přehled o jejím způsobu účinku. C-4 methyl má mechanicky blokující účinek (Boyer a kol., 2012). Synteticky lze mimetika velmi snadno připravit z brombutenolidu nebo hydroxybutenolidu (HO-D) (Obr. 10).



Obr. 10 – Syntéza strigolaktonových mimitik (převzato a upraveno z Zwanenburg, Zeljković a Pospíšil, 2016).

2.6 Parazitické rostliny

Parazitické rostliny přežívají díky zisku části nebo všech svých nutričních potřeb od jiné rostliny. Díky tomuto faktu představují parazitické rostliny jeden z nejzajímavějších příkladů interakce mezi rostlinami. Jednou z vlastností, která je u parazitů běžná, je potřeba získat vodu a minerální živiny od hostitele. Parazitické rostliny zahrnují spektrum od hemiparazitů po holoparazity a od fakultativních po obligátní parazity. Parazité jsou se svými hostiteli spojeni pomocí haustorií, které umožňují čerpání živin z hostitelského organismu. Parazité mohou mít redukované orgány jako jsou kořeny a listy, nebo jim mohou chybět úplně, také mohou postrádat chlorofyl.

Rostliny rodu *Striga*, *Orobanche* a *Phelipanche* jsou parazité kořenů rostlin, které spadají do čeledi Orobanchaceae a řadí se k rostlinám, které způsobují největší hospodářské škody. (Parker, 2009).

Striga je obligátním hemiparazitem (Parker, 2009). *Striga* spp. se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech, především v subsaharské Africe, Indii a Asii, kde infikuje převážně obiloviny. Nejškodlivějším zástupcem je *Striga hermonthica* (Obr. 11),

parazit čiroku a prosa, následovaná *S. asiatica*, která způsobuje největší škody na kukuřici a *S. gesnerioides* napadající tabák a sladké brambory.



Obr. 11 – *Striga hermonthica* (staženo 12.3.2020 z <https://academic.oup.com/jxb/pages/strigolactones>).

Rody *Orobanche* a *Phelipanche* způsobují podobné škody v produkci potravin jako *Striga* spp (Parker, 2009). *Orobanche* a *Phelipanche* spp. jsou obligátními holoparazity, kteří postrádají schopnost fotosyntézy a v otázce výživy se plně spoléhají na svého hostitele. Mohou infikovat mnoho rostlinných druhů, především čeled' lilkovitých a bobovitých. Orobanchaceae jsou významnými parazity, kteří zapříčiňují nezanedbatelné ztráty zemědělské produkce na všech kontinentech, nejvíce však v Africe (Parker, 2012). Nejvíce škodlivým zástupcem je *Orobanche crenata* (Obr. 12), která má největší ekonomický dopad na fazole, jiné luštěniny a kořenovou zeleninu a *Orobanche ramosa*, která nejčastěji napadá rajčata, brambory a tabák. Stejně plodiny napadá i *Phelipanche ramosa* (Péron a kol., 2012)



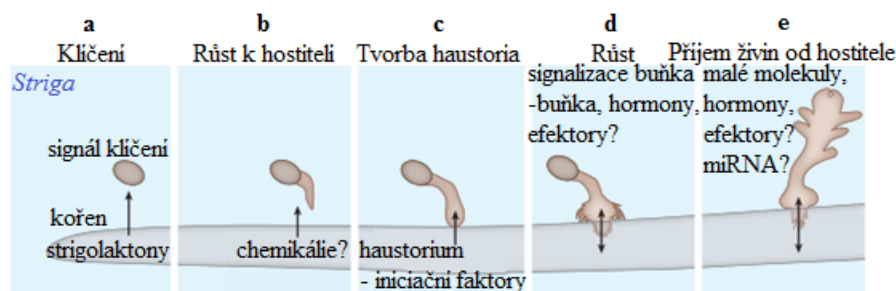
Obr. 12 – *Orobanche crenata* (staženo 12.3.2020 z <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id139534/>).

2.6.1 Životní cyklus parazitických rostlin

Životní cykly *Striga*, *Orobancha* a *Phelipanche* spp. sdílí mnoho podobností. Parazitické rostliny dokáží vyprodukovat až 100 000 semen za jedno vegetační období a tato semena jsou navíc schopna přežít v půdě v dormanci až několik desítek let (Kgosi a kol., 2012).

Jakmile je spuštěno klíčení, kořínek se vysune z pouzdra, prodlužuje se směrem k hostitelskému kořeni a vytváří haustorium. U *Strigy* spp. haustorium vytváří xylém-xylém spojení s hostitelem a může tak odebírat vodu a živiny. U *Phelipanche* a *Orobancha* tvoří haustorium spojení jak s xylémem, tak s floémem. Jakmile dojde k navození spojení s cévními svazky, začne parazit přijímat vodu a živiny od hostitele, dochází k tvorbě výhonků a květů a produkci nových semínek, která zvýší stávající počet semínek v půdě (Bouwmeester a kol., 2003).

Jeden z nejdůležitějších aspektů životního cyklu *Strigy*, *Orobancha* a *Phelipanche* spp. je vyvolání klíčení (Obr. 13). Semínka těchto parazitů jsou malá (0,2-0,3 mm) a mají omezené zásoby živin a jejich přežití je zcela závislé na přítomnosti blízkého vhodného hostitele. Obecně semena parazitů klíčí na základě vnímání sloučenin produkovaných rostlinou, jako jsou dihydrosorgoleon, seskviterpenoidní laktony, kinetin, kumarin, jasmónát a metabolity hub. V případě *Strigy*, *Orobancha* a *Phelipanche* jsou indukčním signálem strigolaktony. (Xie a kol., 2010).



Obr. 13 – Komunikace parazit (*Striga*) a hostitelská rostlina rozdělená do 5 bodů v životním cyklu (převzato a upraveno z Clarke a kol., 2019).

2.7 Boj s parazitickými rostlinami

Hemiparazité jsou již dlouhou dobu považováni za příčinu omezení produkce potravin v subsaharské Africe (Samejima a kol., 2016). *Striga* je neslavně známá tím, že dokáže zničit úrodu až se 100% ztrátou výnosu (Ejeta, 2007). Z oblasti původního výskytu v Súdánu a Etiopii se dokázala rozšířit do více než 40 zemí v Africe. Odhaduje se, že více než 60 % obdělávané zemědělské půdy v subsaharské Africe je zamořeno jedním nebo více druhy

Strigy, což má dopad na více než 300 milionů zemědělců a dochází tak k ročním ztrátám výnosů přesahujících 7 miliard dolarů.

Problémem u parazitických rostlin je produkce velkého množství semen, které vydrží několik desítek let životaschopné v půdě. Zbavování se parazitického plevele ručním plením je náročné, a ne příliš efektivní, ale je hojně využíváno v zemědělsky chudých zemích, kde nemají dostatek finančních prostředků.

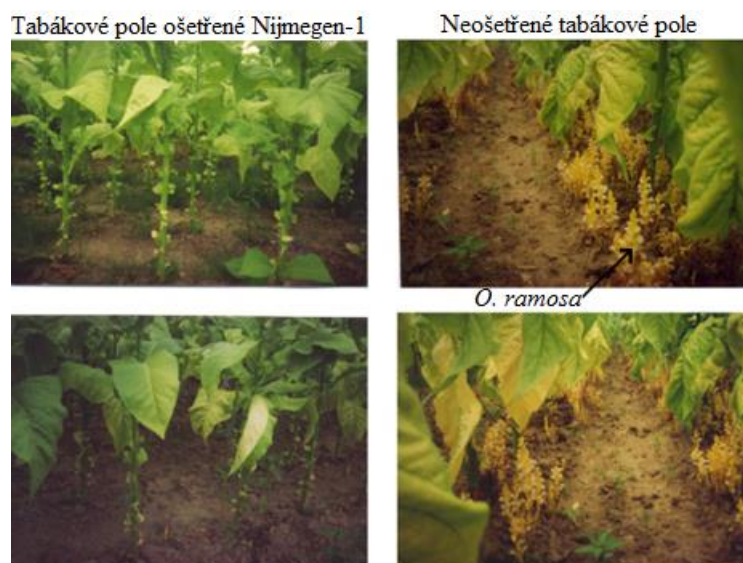
Růst je možné kontrolovat také chemicky využitím herbicidů, což je na jednu stranu účinné, nicméně jsou ovlivněny také hostitelské rostliny a je vyžadován pravidelný aplikační režim (Zwanenburg, Mwakaboko a Kannan, 2016). Navíc je tato metoda kritizována kvůli toxicitě herbicidů a jejich negativním účinkům na životní prostředí. Dalším možným řešením je střídání plodin, použití „falešných hostitelů“, kteří vylučují potřebné látky pro iniciaci klíčení parazitických semen, ale samy o sobě nejsou hostiteli. Jedním z příkladů je bavlník, záleží však na konkrétním druhu parazitické rostliny, na kterou je cíleno.

2.7.1 Sebevražedné klíčení

Možným řešením problému parazitických rostlin je metoda, která využívá stimulatoru klíčení, který je aplikován do půdy ve vhodné formě před výsevem či výsadbou hostitelské rostliny. Stimulant vyvolá klíčení parazitického plevele, aniž by byl v jeho blízkosti přítomen vhodný hostitel, což vede k jeho úhynu. Tato metoda je označována jako „sebevražedné klíčení“. Největší úspěch tohoto přístupu byl zaznamenán při použití ethenu (ethylenu), který byl do půdy vstřikován pod vysokým tlakem (Eplee, 1975). I když je jeho efektivita při snižování populace semen *S. asiatica* v půdě vysoká, jeho přivádění do půdy je nákladné. Naproti tomu *Orobanche* na vstřikovaný ethylen nereaguje.

Přírodní strigolaktony nelze použít k „sebevražednému klíčení“, protože jejich syntéza zahrnuje příliš mnoho kroků (Zwanenburg, Mwakaboko a Kannan, 2016). Naopak strigolaktonová analoga (viz. kapitola 2.5) jako GR24 (6) a GR7 (7) jsou vhodná pro navození „sebevražedného klíčení“. Experimenty se *S. asiatica* ukázaly, že dochází až k 50% snížení semen v půdě při použití GR24. Využití GR stimulantů bylo nakonec přerušeno z důvodů nestability v půdě, a to především v půdě alkalické. Což jen dokládá náchylnost strigolaktonů k hydrolýze. Při pokusech s hydrolyticky stabilnějším analogem Nijmegen-1 (9) na tabákových polích napadených *O. ramosa* (Obr. 14) byla popsána účinnost stimulantu v závislosti na hloubce, ve které byla semena parazitických rostlin přítomna. V hloubce 0-10 cm vyklíčilo 77 % semen, 35 % v 10-20 cm a 5 % v 20-30 cm. Závěr je takový, že použití

„sebevražedného klíčení“ v terénu je skvělým krokem vpřed v kontrole parazitických plevelů (Zwanenburg, Mwakaboko a Kannan, 2016).



Obr. 14 – Polní pokusy na tabákových polích v jižním Německu po použití Nijmegen-1 (převzato a upraveno z Zwanenburg, Mwakaboko a Kannan., 2016).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

K přípravě Br-D-kruhu (5-brom-3-methylfuran-2(5*H*)-on) byly použity tyto chemikálie: *N*-bromsukcinimid (NBS), azobisisobutyronitril (AIBN), tetrachlormethan (CCl₄), 3-methylfuran-2(5*H*)-on.

K syntéze strigolaktonových mimetik byly použity tyto chemikálie: 5-brom-3-methylfuran-2(5*H*)-on, triethylamin (TEA), bis(trimethylsilyl)amid lithný (LiHMDS), propan-1-ol, 3-methyl-butan-1-ol, fenylmethanol, heptadekan-1-ol, 3-chlorofenylmethanol, 3,7-dimethylokta-2,6-dien-1-ol, 2,3-dichloropropan-1-ol, aceton, tetrahydrofuran (THF). Dále byly využity petrolether, ethylacetát (EtOAc), nasycený roztok chloridu sodného (NaCl), bezvodý síran hořečnatý (MgSO₄), manganistan draselný (KMnO₄), vanilin a deuterovaný chloroform (CDCl₃).

Pro biologické testy byly použity: Sodium hyperchlorid (Savo, MilliQ voda, Triton X-100, Plant Preservative Mixture (PPM), 100% aceton, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) a lyzační roztok (10% (v/v) Triton X-100 a 0,04% (v/v) kyselina chlorovodíková v isopropanolu).

Pro stabilitní studii byly použity: dimethylsulfoxid (DMSO), HEPES (10 µl 100 mM zásobního roztoku), methanol (CH₃OH) a mravenčan amonný (HCOONH₄).

Všechny komerčně dostupné látky byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich, Fluka, VWR, Penta, Lachner, Merck či Litolab.

3.2 Materiál

Biologické testy byly provedeny na semenech parazitických rostlin *Striga hermonthica* (Sudan, 1994), *Orobanche cumana* (Španělsko, 1992) a *Phelipanche ramosa* (Španělsko, 1992).

3.3 Metody

Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 a 60 RP – 18 F₂₅₄S (Merck) a látky detekovány pod UV lampou při 254 nm, případně zvýrazněny pomocí manganistanu draselného a vanilinu. K oddělení analytu od získané směsi byla použita extrakce kapalina–kapalina (LLE), kdy hledaná látka přechází do organického rozpouštědla. Následně byla provedena filtrace a produkty byly odpařeny na odparce. Na Jeol 500 JNM-ECA 500 MHz při frekvenci

500 MHz (^1H) a 126 MHz (^{13}C) byla proměřena spektra nukleární magnetické rezonance (NMR). Kalibrace měření byla provedena pro deuterovaný chloroform (CDCl_3): ^1H – 7,26 ppm, ^{13}C – 77.0 ppm. Finální produkty byly přečištěny na chromatografické koloně za použití silikagelu 230-400 mesh (Sigma-Aldrich), čistota látek byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (150 mm x 2,1 mm, 5 μm , Symmetry C18, Waters). Eluce byla provedena gradientem (methanol/uhličitan amonný, pH 4) při průtoku 0,3 ml/min a 20 °C. Hmotnostní spektra byla získána na hmotnostním spektrometru Waters (Q-TOF MICRO). Sterilizovaná semínka byla inkubována spolu s připravenými látkami v 96-jamkové mikrotitrační destičce v termostatu značky Biological thermostat BT 120. Spontánní klíčení bylo kontrolováno pod binokulárem. Počítání semen bylo provedeno pomocí mikroskopu značky Motic Microscopy (SMZ 168 TL).

3.4 Příprava strigolaktonových mimetik

3.4.1 Bromace 3-methyl-2-furan-2(5H)-onu

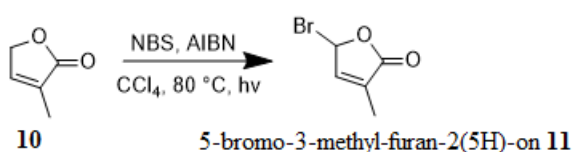


Schéma 1 – Bromace 3-methyl-2-furan-2(5H)-onu (**10**).

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Do suché jednohrdlé baňky byl přidán 3-methyl-2-furan-2(5H)-on (50,9 mmol), tetrachlormethan (200 ml), NBS (58,5 mmol) a AIBN (2,6 mmol). Roztok byl vložen do olejové lázně umístěné na magnetické míchačce zahřáté na 80 °C, ozařován UV světlem (365 nm) a zastíněn alobalem. Reakce probíhala přes noc a poté bylo pro kontrolu provedeno TLC, zda došlo k úplné konverzi. Po skončení reakce byl roztok zchlazen na teplotu 0 °C, zfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové odparky. Takto připravený Br-D-kruh byl použit k syntéze mimetik.

3.4.2 Napojení Br-D kruhu na alkohol

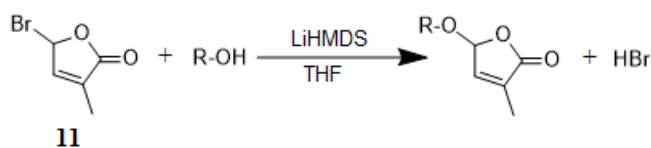


Schéma 2 – Obecné schéma přípravy strigolaktonových mimetik.

Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a inertní atmosféře (argon). Do tříhrdlé baňky bylo přidáno rozpouštědlo (10 ml, THF), alkohol (0,593 mmol), báze (0,593 mmol, LiHMDS) a po deseti minutách byl přidán Br-D-kruh (0,593 mmol). Směs byla ponechána přes noc za stálého míchání na magnetické míchačce. Kontrola průběhu reakce byla prováděna pomocí TLC. Jako mobilní fáze byl použit petrolether a ethylacetát (2 : 1). Jako detekční činidlo manganistan draselný. Produkt byl extrahován pomocí extrakce kapalina–kapalina (20 ml H₂O, 3 x 20 ml ethylacetátu), organická fáze byla vysušena nasyceným roztokem chloridu sodného a poté bezvodým síranem hořečnatým, který byl odstraněn pomocí filtrace. K zakoncentrování produktu byla použita vakuová odparka a následně byl produkt přečištěn na chromatografické koloně (silikagel, petrolether : ethylacetát, 2 : 1).

3.5 Stabilita látek

Testovaná sloučenina (1 mg) byla rozpuštěna v DMSO (100 μ l). Roztok (2 μ l) byl přidán do HEPES (10 μ l 100 mM zásobního roztoku při pH 6,5, 7,5 a 8,5) a doplněn vodou (988 μ l). Roztok byl analyzován pomocí HPLC (Waters 2695 series, detektor Waters DAD PDA 996, kolona Waters Symmetry C18 (5 μ m, 2.1 mm x 150 mm) se systémem rozpouštědel sestávajícím z methanolu (mobilní fáze A) a vody s mravenčanem amonným (mobilní fáze B, pH 4)). Relativní koncentrace sloučeniny byla stanovena z plochy píku.

3.6 Biologické testy na semenech parazitických rostlin

Biologické testy byly provedeny na semenech parazitických rostlin *Striga hermonthica* (Sudan, 1994), *Orobancha cumana* (Španělsko, 1992) a *Phelipanche ramosa* (Španělsko, 1992) pomocí MTT metody (Pouvreau a kol., 2013). Semena (0,2 g) byla sterilizována pomocí sterilizačního roztoku – 2% (v/v) Savo a 1% (v/v) Triton X-100 v MilliQ vodě (celkový objem činil 25 ml). Roztok byl míchán po dobu 6,5 minut. Sterilizační roztok byl ve flowboxu odsát přes fritu, semena byla 10x promyta sterilní vodou a poté přelita do sterilní 50 ml falkony a doplněna vodou na objem 20 ml. Poté bylo přidáno HEPES na koncentraci 1 mM a PPM (Plant Preservative Mixture) na koncentraci 0,1 % (v/v), falkona byla zabalena do alobalu a vložena do inkubátoru – *Striga* inkubována při 27 °C, *Orobancha* a *Phelipanche* při 21 °C.

Po několika dnech byla semena zkontrolována pod binokulárem, zda nedochází ke spontánnímu klíčení. Z falkony se semínky byla odstraněna polovina roztoku a byla doplněna na objem 20 ml roztokem agarosy (0,1%, w/v) a poté bylo přidáno HEPES a PPM na výše uvedené koncentrace. Do sterilní 96–jamkové destičky bylo nasázeno 50 μ l

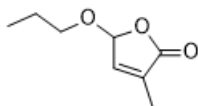
suspenze semen. Do prvních jamek řádků bylo ve třech opakováních napipetováno 10 μ l GR24 tak, že v každé další řadě byl roztok 10x zředěnější (10^{-4} – 10^{-11} M). Do dalších jamek bylo ve třech opakováních přidáno 10 μ l testované látky tak, že byla v další řadě 10x zředěnější (10^{-4} – 10^{-11} M). Do posledních jamek bylo přidáno 10 μ l 0,1% acetonu, který sloužil jako negativní kontrola. Do všech jamek bylo napipetováno 40 μ l vody. Finální koncentrace pozitivní kontroly GR24 v destičce byla 10^{-3} – 10^{-10} M a koncentrace testovaných látek od 10^{-3} M do 10^{-10} M. Deska byla zatažena parafilmem, zabalena do alobalu a vložena do inkubátoru na již zmíněné teploty.

Čtyři dny po stimulaci semen bylo do každé jamky přidáno 10 μ l MTT a deska byla opět navrácena do inkubátoru. Za 24 hodin byla semena zkontrolována pod binokulárem a bylo stanoveno procento vyklíčených semen. Do jamek bylo přidáno 100 μ l lyzačního roztoku a deska byla vrácena do inkubátoru. 24 hodin po přidání lyzačního roztoku byl na spektrofotometru změřen rozdíl absorbancí 570 a 690 nm (metoda MTT).

4 Výsledky

4.1 Syntéza strigolaktonových mimetik

3-methyl-5-propoxyfuran-2(5H)-on (**12**)



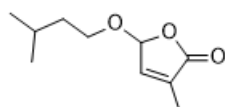
Výtěžek: 1 %, bezbarvá olejovitá kapalina

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.65 (sext., $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.94 (t, $J = 1.5$ Hz, 3H), 3.59-3.65 (m, 1H), 3.80-3.85 (m, 1H), 5.78-5.80 (m, 1H), 6.80-6.82 (m, 1H).

^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 10.4, 10.6, 22.8, 72.0, 101.6, 134.0, 142.9, 172.0.

MS (ES+, m/z): 157,15 [100 %, $M+1$].

5-(isopentyloxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (**13**)



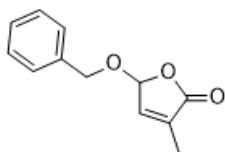
Výtěžek: 16 %, bezbarvá olejovitá kapalina

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.52 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.65-1.75 (m, 1H), 1.93-1.94 (m, 3H), 3.65-3.71 (m, 1H), 3.86-3.92 (m, 1H), 5.77-5.78 (m, 1H), 6.79-6.80 (m, 1H).

^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 10.6, 22.5, 24.8, 38.2, 68.8, 101.6, 134.0, 142.9, 172.0.

MS (ES+, m/z): 185,16 [100 %, $M+1$].

5-(benzyloxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (**14**)



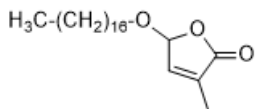
Výtěžek: 18 %, bílá pevná látka

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1.95 (t, $J = 1.6$ Hz, 3H), 4.71 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.87-5.88 (m, 1H), 6.82-6.83 (m, 1H), 7.33-7.40 (m, 5H).

^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 10.6, 71.7, 100.3, 128.4, 128.6, 134.1, 136.0, 143.0, 171.9.

MS (ES+, m/z): 205,10 [25 %, $M+1$].

5-(heptadecyloxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (**15**)

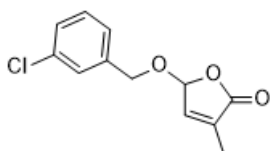


Výtěžek: 75 %, bílá pevná látka

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.29-1.19 (28H), 1.67-1.58 (2H), 1.94 (t, $J = 1.5$ Hz, 3H), 3.62-3.67 (m, 1H), 3.83-3.88 (m, 1H), 5.78-5.79 (m, 1H), 6.80-6.81 (m, 1H).
 ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 10.6, 14.1, 22.7, 25.9, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9, 70.5, 99.9, 101.6, 134.0, 142.9, 172.0.

MS (ES+, m/z): 353,39 [60 %, $M+1$].

5-((3-chlorobenzyl)oxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (**16**)



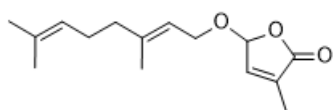
Výtěžek: 38 %, bílá pevná látka

^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.96 (t, $J = 1.4$ Hz, 3H), 4.85 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 5.93-5.94 (m, 1H), 6.85-6.87 (m, 1H), 7.26-7.28 (m, 2H), 7.36-7.40 (m, 1H), 7.44-7.46 (m, 1H).

^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 10.7, 68.9, 100.8, 126.9, 129.6, 129.6, 129.9, 133.5, 134.0, 134.3, 142.7, 171.8.

MS (ES+, m/z): 239,08 [50 %, $M+1$].

(E)-5-((3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)oxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (**17**)



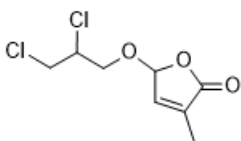
Výtěžek: 70 %, nažloutlá olejovitá kapalina

^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.59 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.94 (t, $J = 1.5$ Hz, 3H), 2.04-2.12 (m, 4 H), 4.27 (dd, $J = 11.5, 7.8$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J = 11.6, 7.0$ Hz, 1H), 5.05-5.09 (m, 1H), 5.33-5.37 (m, 1H), 5.82-5.84 (m, 1H), 6.80-6.81 (m, 1H).

^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 10.6, 16.5, 17.7, 25.7, 26.2, 39.6, 66.2, 100.2, 118.6, 123.7, 131.9, 133.9, 143.2, 143.3, 172.0.

MS (ES+, m/z): 251,30 [2 %, $M+1$], 273,14 [5 %, $M+\text{Na}$], 289,30 [4 %, $M+\text{K}$].

5-(2,3-dichloropropoxy)-3-methylfuran-2(5H)-on (**18**)



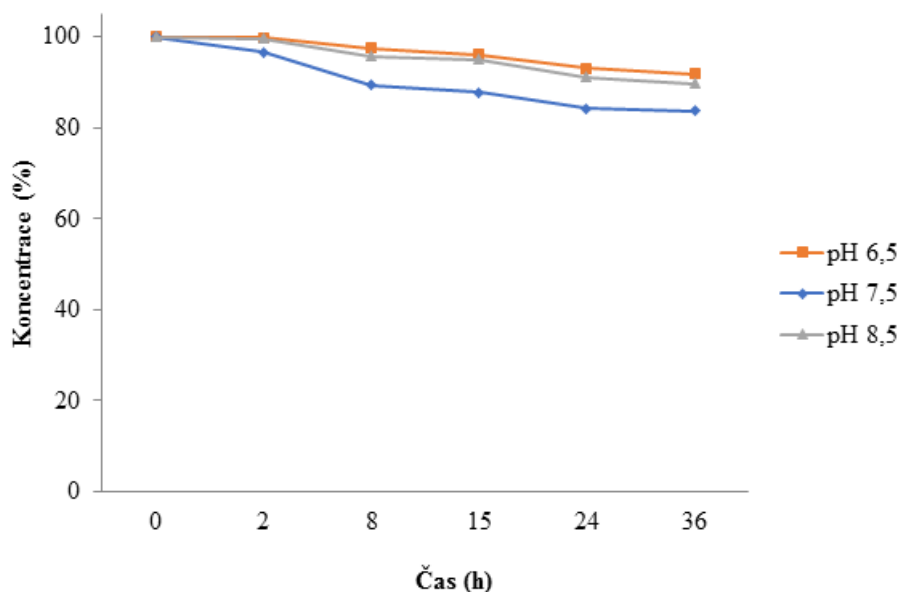
Výtěžek: 84 %, nažloutlá olejovitá kapalina

^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.96 (q, $J = 1.3$ Hz, 3H), 3.80 (dd, $J = 8.6, 6.1$ Hz, 2H), 3.94-4.00 (m, 1H), 4.12-4.15 (m, 1H), 4.18-4.26 (m, 1H), 5.86 (dq, $J = 6.3, 1.4$ Hz, 1H), 6.84-6.86 (m, 1H).

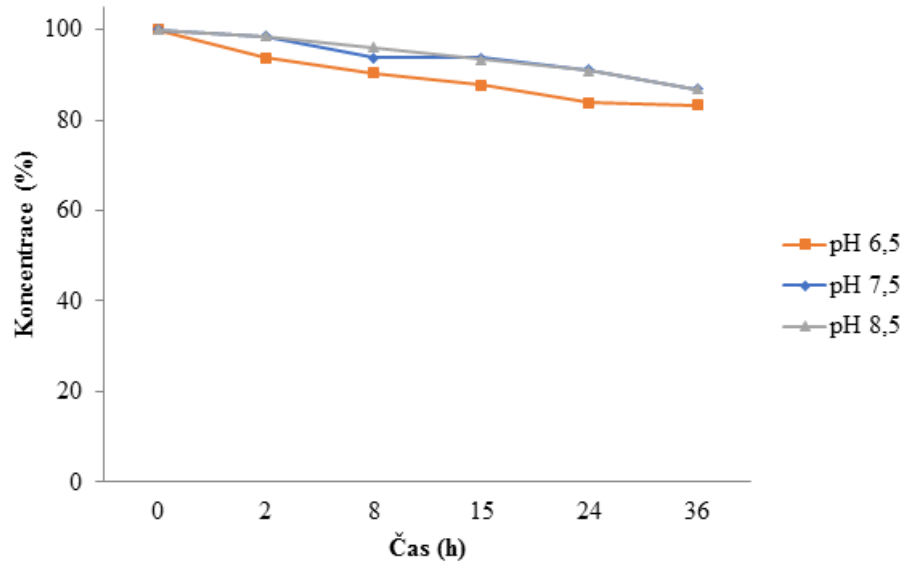
^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 10.6, 44.5, 44.7, 57.3, 57.6, 69.5, 69.6, 101.2, 101.5, 134.6, 134.7, 142.2, 171.3.

MS (ES+, m/z): 225,07 [100 %, $M+1$], 227,10 [70 %, $M+1$].

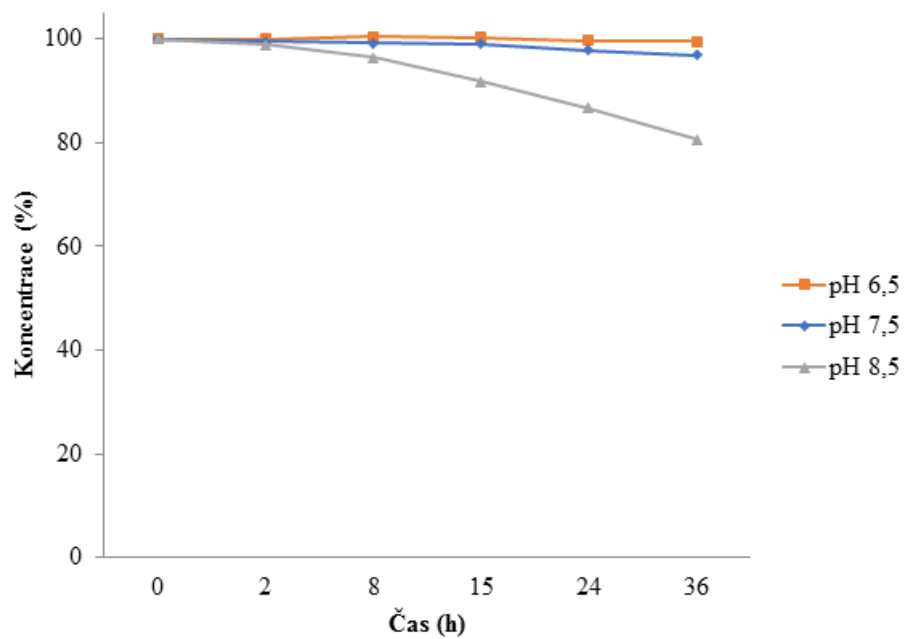
4.2 Testy stability



Graf 1 – Závislost koncentrace (%) 5-(benzyloxy)-3-methylfuran-2(5H)-onu (**14**) na čase (h) při různých hodnotách pH.

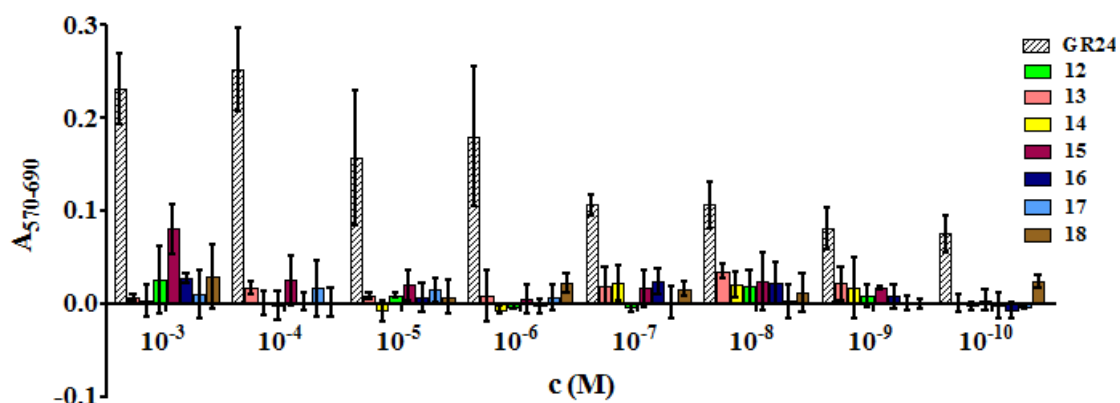


Graf 2 – Závislost koncentrace (%) 5-(isopentyloxy)-3-methylfuran-2(5H)-onu (**13**) na čase (h) při různých hodnotách pH.

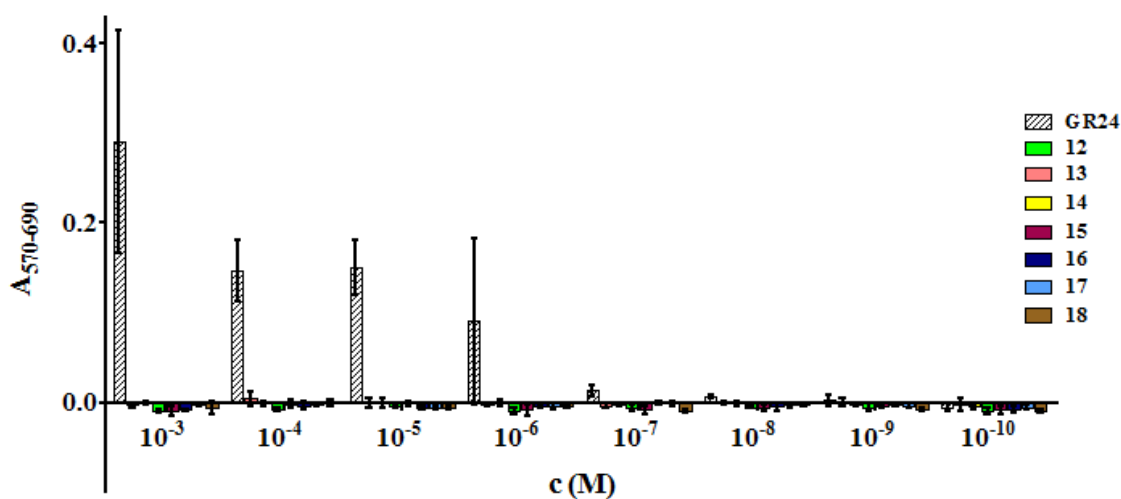


Graf 3 – Závislost koncentrace (%) GR24 na čase (h) při různých hodnotách pH.

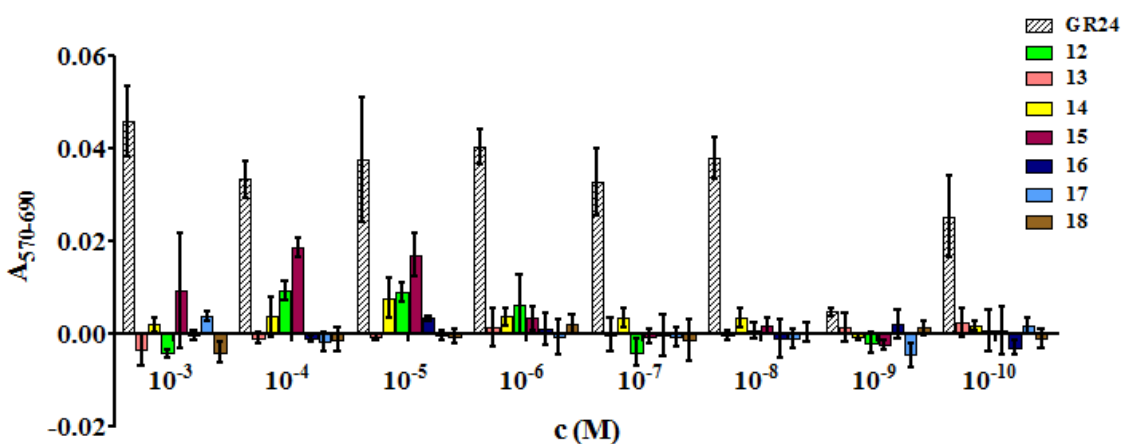
4.3 Biologické testování



Graf 4 – Závislost absorbance na koncentraci (M) připravených mimetik a standardu GR24, testování na semenech *S. hermonthica*.



Graf 5 – Závislost absorbance na koncentraci (M) připravených mimetik a standardu GR24, testování na semenech *O. cumana*.



Graf 6 – Závislost absorbance na koncentraci (M) připravených mimetik a standardu GR24, testování na semenech *P. ramosa*.

5 Diskuze

5.1 Syntéza strigolaktonových mimetik

V experimentální části této bakalářské práce bylo připraveno 7 strigolaktonových mimetik odvozených od alkoholů. Syntéza mimetik byla založena na jednom kroku, kdy reagoval alkohol s Br-D-kruhem (příprava viz kap. 3.4.1) v přítomnosti báze (LiHMDS) a rozpouštědla (THF) za laboratorní teploty (Schéma 3).

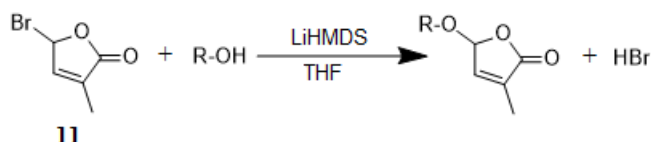


Schéma 3 – Spojení alkoholu s Br-D-kruhem (**11**).

Nasyntetizované látky lze rozdělit do tří skupin dle výtěžků. Látky **12** (1 %), **13** (16 %) a **14** (18 %) měly malý výtěžek, látka **16** (38 %) průměrný a látky **15** (75 %), **17** (70 %) a **18** (84 %) měly dobré až vysoké výtěžky. Obecně lze říci, že lepší reaktivitu poskytovaly kyselější alkoholy (s nižším pKa). U látek **12** a **13** byl postup syntézy upraven v porovnání s původním postupem (kap. 3.4.2), namísto THF byl jako rozpouštědlo použit aceton a jako báze TEA, avšak výtěžky byly horší než při použití THF a LiHMDS. Látky **12** a **13** byly získány jako bezbarvé olejovité kapaliny, látky **14**, **15** a **16** jako bílé pevné látky a látky **17** a **18** jako nažloutlé olejovité kapaliny.

Látky byly připraveny v dostatečném množství pro jejich charakterizaci a otestování klíčivosti na semenech parazitických rostlin rodu *Striga*, *Orobanche* a *Phelipanche*.

5.2 Testy stability

Byla hodnocena stabilita mimetik **13**, **14** a standardu GR24 při pH 6,5, 7,5 a 8,5. Stabilita je důležitým faktorem pro potenciální polní aplikaci, jelikož pH půdy se může měnit a přírodní strigolaktony se při vysokém pH rozkládají (Hýlová a kol., 2019).

Při porovnání hydrolytické stability látek **13** a **14** s profilem standardu GR24 je patrné, že mimetika **13** a **14** jsou nepatrně náchylnější vůči hydrolyze při pH 6,5 a 7,5, ale vykazují velmi dobrou stabilitu v porovnání s GR24 při pH 8,5 (Graf 1, 2, 3).

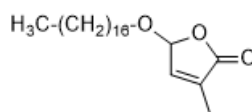
Stabilita nových mimetik ukazuje možnost využití takovýchto derivátů pro další vývoj strigolaktonům podobných látek jak pro sebevraždné klíčení parazitických rostlin, tak pro další aplikace v rostlinách.

5.3 Biologické testování

Biologická aktivita připravených látek **12-18** byla otestována MTT biotestem (Pouvreau a kol., 2013, modifikováno). Postup přípravy biotestu je popsán v kapitole 3.5. Testování bylo provedeno na semínech *S. hermonthica*, *O. cumana* a *P. ramosa*. Jako negativní kontrola pro určení kvality testu byl použit 0,1% aceton bez obsahu stimulantu, u něhož nedošlo ke klíčení semínek ani u jednoho druhu. Jako pozitivní kontrola byl použit standard GR24 **6** (Obr. 7). Testování probíhalo v červnu a bylo provedeno za účelem zjištění, zda semínka budou po stimulaci připravenými látkami klíčit.

Stimulant GR24 na semínech *S. hermonthica* vykazoval při koncentraci 10^{-3} M 34% klíčivost (Graf 4), což je méně než obvyklá hodnota. Červnovému období odpovídá klíčivost semen *S. hermonthica* po stimulaci GR24 přibližně 75 % (Mangnus a kol., 1992a). Odezva semínek *S. hermonthica* na stimulant klíčení je závislá na ročním období, nejvyšších hodnot dosahuje *Striga* v červenci a srpnu.

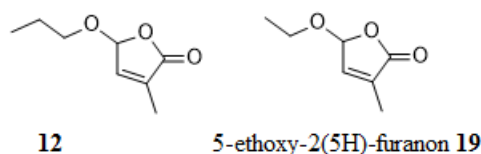
Ze všech připravených látek, které byly testovány na semenech *S. hermonthica*, byla nejvíce aktivní látka **15** při koncentraci 10^{-3} M (Graf 4). Při nižších koncentracích látky nevykazovaly téměř žádnou aktivitu. Žádná ze sloučenin nebyla citlivější než standard GR24. Látka **15** (Obr. 15) je lipofilní molekula a její struktura je pravděpodobně důvodem klíčení semen. I přesto látka vykazovala velmi malou aktivitu v iniciaci klíčení, lze se ale domnívat, že by mohla být aktivní při vyšších koncentracích než 10^{-3} M. Pokud se v budoucnu provede další testování při vyšších koncentracích, popřípadě modifikace řetězce jako přidání funkčních skupin, je možné, že se aktivita látky zvýší.



Obr. 15 – Struktura **15**.

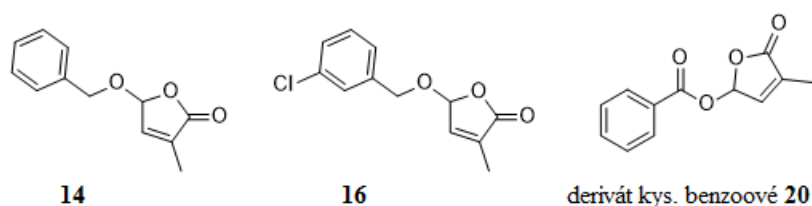
Mangnus a Zwanenburg (1992) testovali biologickou aktivitu strigolu a strigolaktonových analog a mimetik na semenech *S. hermonthica* a *O. crenata*. Jedním z mimetik, který použili byl 5-ethoxy-2(5H)-furanon (**19**), který se svou strukturou podobá látce **12** (Obr. 16). **19** nevykazoval žádnou aktivitu v iniciaci klíčení semen *S. hermonthica*. Pepperman a kol. (1982) uvedli vysokou aktivitu **19** v iniciaci klíčení, nicméně tyto výsledky nebyly reprodukovatelné, jelikož o rok později již aktivitu nepozorovali. Skutečnost, že látka **12** nevykazovala žádnou aktivitu v iniciaci klíčení *Strigy* podporuje Mangnusovo a

Zwanenburgovo tvrzení o **19**. Johnson (1976) pozoroval při použití látky **19** překvapivě dobrou klíčivost u *P. ramosa* (cca 40 %). Je tedy možná domněnka, že za určitých podmínek a u určitých druhů parazitů mohou i mimetika odvozená od alifatických alkoholů vyvolávat klíčení.



Obr. 16 – Struktury **12** a **19**.

Látky **14** a **16** jsou strukturně podobné derivátu kyseliny benzoové (**20**) (Obr. 17), který se řadí mezi mimetika s aroyloxy skupinou. Předpokládalo se, že mimetikum **20** nebude vyvolávat klíčení semen parazitických rostlin díky nepřítomnosti α , β -nenasyceného karboxylového systému, který byl považován za klíčový v mechanismu působení strigolaktonů (Mangnus and Zwanenburg, 1992). Tento předpoklad byl vyvrácen po provedení testů, jelikož látka **20** vyvolávala klíčení semen *S. hermonthica* i *O. crenata* (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011). Látky **14** a **16** nevyvolaly klíčení semen ani jednoho druhu, z čehož lze usuzovat, že pro aktivitu je důležitá karboxylová skupina. Tento výsledek potvrzuje mechanismus účinku mimetik s aroyloxy skupinou (Schéma 4), kde je karboxylový uhlík důležitým nukleofilním centrem. Za předpokladu platnosti uvedeného mechanismu, by látky **14** a **16** vůbec neměly vyvolávat klíčení, což se také potvrdilo.



Obr. 17 – Struktury **14**, **16** a **20**.

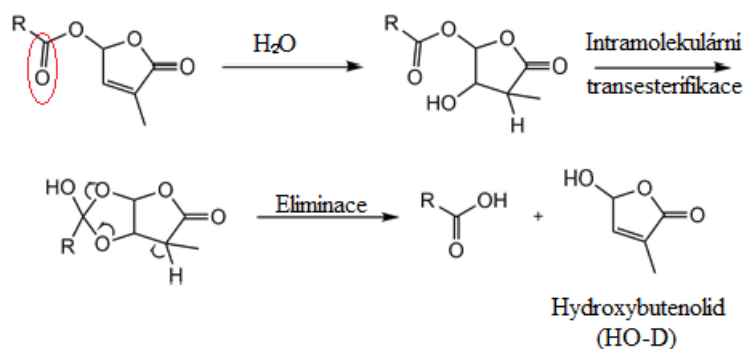
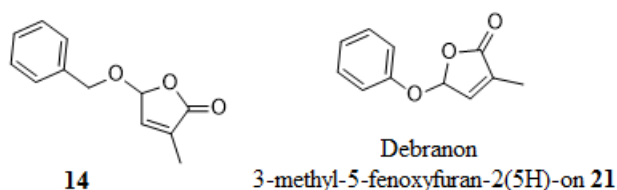


Schéma 4 – Předpokládaný mechanismus účinku mimetik s aroyloxy skupinou.

Látka **14** je svou strukturou také podobná debranonům (Obr. 18). Debranony jsou mimetika, která mají nízkou aktivitu v iniciaci klíčení semen *S. hermonthica*, ale jsou pozoruhodně aktivní jako inhibitory větvení výhonků (Fukui a kol., 2011), přičemž aktivita je srovnatelná s GR24 (Zwanenburg, Zeljković a Pospíšil, 2016). Mechanismus hydrolyzy debranonů při klíčení semen parazitických rostlin není znám a ani nebyl navržen. Látka **14** v podstatě neměla žádnou aktivitu a pokud by aktivita debranonů vycházela z kvality odstupující skupiny, tak by látka **14** mohla tuto domněnku potvrzovat, jelikož pKa fenolu je 9,95 a benzylalkoholu 15,4 (D. H. Ripin a D. A. Evans, Tabulka pKa).



Obr. 18 – Struktura **14** (benzylová skupina) a **21** (fenylová skupina)

U *O. cumana* po stimulaci GR24 při koncentraci 10^{-3} M vyklíčilo 56 % semínek (Graf 5). Tato hodnota je opět nižší než standard, který v červenci nabývá hodnot okolo 75 % (Mangnus a kol., 1992). Při testování na semenech *O. cumana* připravené látky vykazovaly nulovou aktivitu (Graf 5).

Biotest pro *P. ramosa* byl proveden, ale nemá průkaznou hodnotu (Graf 6), jelikož klíčivost standardu GR24 při koncentraci 10^{-3} M byla 16 %.

Výsledky nejsou zcela relevantní, jelikož byla provedena pouze jedna série testování biologické aktivity za účelem prvotního nástinu biologické aktivity nově připravených mimetik. I přesto tyto výsledky ukázaly nové otázky a další testování by mohlo pomoci odhalit zatím neznámé informace jako je například mechanismus působení debranonů či potvrzení nebo vyvrácení navrženého mechanismu aroylderivátů. Některé látky byly hůř rozpustné, a proto je třeba biotest modifikovat a najít vhodné rozpouštědlo či aditivum, ve kterém by byly dobře rozpustné všechny látky, a přitom nebylo ovlivněno klíčení semen jako v případě použití DMSO.

6 Závěr

V rámci bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma strigolaktony. V teoretické části byly shrnuty dosavadní informace o významu strigolaktonů jakožto fytohormonů, jejich biosyntéza, význam syntetických derivátů a účinků na semena parazitických rostlin rodu *Striga*, *Orobanche* a *Phelipanche*. V experimentální části bylo připraveno 7 nových strigolaktonových mimetik odvozených od alkoholů, jejichž aktivita byla otestována na semenech parazitických rostlin a byla sledována iniciace klíčení těchto semen.

Látky byly připraveny za účelem prozkoumání nových strukturních motivů. Výsledné testování na rodě *Striga* ukázalo, že nejúčinnější látkou byla látka **15** při koncentraci 10^{-3} M, vyšší koncentrace je v budoucnu třeba prozkoumat. Při nižších koncentracích látky nevykazovaly téměř žádnou aktivitu. Ani jedna z látek nepřekročila aktivitu strigolaktonového analogu GR24, který sloužil jako pozitivní kontrola. GR24 vyvolával u všech třech druhů semínek menší klíčivost, než je běžné, což bylo pravděpodobně zapříčiněno stářím semínek. Při testování na rodě *Orobanche* látky vykazovaly nulovou aktivitu. Test pro *P. ramosa* nebyl průkazný. Testování na vybraných látkách **13** a **14** ukázalo, že tento typ derivátů by měl být dostatečně stabilní při hodnotách pH 6,5, 7,5 a 8,5.

Použitá literatura

- Akiyama K., Matsuzaki K. a Hayashi H., 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**, 824-827.
- Al-Babili S. a Bouwmeester H. J., 2015. Strigolactones, a novel Carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology*. **66**, 161-186.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M. a kol., 2012. The path from β -Carotene to Carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*. **335**, 1348-1351.
- Bouwmeester H. J., Matusova R., Zhongkui S. a Beale M. H., 2003. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**, 358-364.
- Boyer F. D., de Saint Germain A., Pillot J. P. a kol., 2012. Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden Pea: Molecule design for shoot branching. *Plant Physiology*. **159**, 1524-1544.
- Brundrett M. C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. **154**, 275-304.
- Carlsson G. H., Hasse D., Cardinale F., Prandi C. a Andersson I., 2018. The elusive ligand complexes of the DWARF14 strigolactone receptor. *Journal of Experimental Botany*. **69**, 2345-2354.
- Clarke C. R., Timko M. P., Yoder J. I., Axtell M. J. a Westwood J. H., 2019. Molecular dialog between parasitic plants and their hosts. *Annual Review of Phytopathology*. **57**, 279-299.
- Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E. a Egley G. H., 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science*. **154**, 1189-1190.
- Crawford S., Shinohara N., Sieberer T. a kol., 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*. **137**, 2905-2913.
- Dvořáková M. a Vaněk T., 2015. Strigolaktony: Struktura a funkce v rostlinách. *Chemické listy*. **109**, 762-769.
- Ejeta G., 2007. The *Striga* scourge in Africa: A growing pandemi: Integrating new technologies for *Striga* control. *World Scientific*, 3-16.

- Eplee R. E., 1975. Ethylene: A witch weed germination stimulant. *Weed Sci.* **23**, 433-436.
- Fukui K., Ito S., Ueno K., Yamaguchi S., Kyojuka J. a Asami T., 2011. New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **21**, 4905-4908.
- Gianinazzi-Pearson V., 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell.* **8**, 1871-1883.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B. a kol., 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature.* **455**, 189-194.
- Harrison M. J., 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An underground association. *Trends in Plant Science.* **2**, 54-60.
- Harrison M. J., 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology.* **59**, 19-42.
- Hýlová A., Pospíšil T, Spíchal L., Mateman J. J., Blanco-Ania D. a Zwanenburg B., 2019. New hybrid type strigolactone mimics derived from plant growth regulator auxin. *New Biotechnology.* **48**, 76-82.
- Johnson A. W., Rosebery G. a Parker C., 1976. A novel approach to *Striga* and *Orobanche* control using synthetic germination stimulants. *Weed Research.* **16**, 223-227.
- Kgosi R. L., Zwanenburg B., Mwakaboko A. S. a Murdoch A. J., 2012. Strigolactone analogues induce suicidal seed germination of *Striga spp.* in soil. *Weed Research.* **52**, 197-203.
- Kosuta S., Chabaud M, Loughon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. G. a Bécard G., 2003. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology.* **131**, 952-962.
- Lin H., Wang R., Qian Q. a kol., 2009. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant Cell.* **21**, 1512-1525.
- Mangnus E. M. a Zwanenburg B., 1992. Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by strigol and its synthetic analogues. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1066-1070.

- Magnus E. M., Stommen P. L. A. a Zwanenburg B., 1992a. A standardized bioassay for evaluation of potential germination stimulants for seeds of parasitic weeds. *J Plant Growth Regul.* **11**, 91-98.
- Marzec M. a Brewer P., 2019. Binding or hydrolysis? How does the strigolactone receptor work? *Trends in Plant Science.* **24**, 571-574.
- Matusova R., Rani K., Verstappen F. W. A., Franssen M. C. R., Beale M. H. a Bouwmeester H. J., 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche spp.* are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology.* **139**, 920-934.
- Navazio L., Moscatiello R., Genre A., Novero M., Baldan B., Bonfante P. a Mariani P., 2007. A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiology.* **144**, 673-681.
- Parker C., 2009. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science.* **65**, 453-459.
- Parker C., 2012. Parasitic weeds: A world challenge. *Weed Science.* **60**, 269-276.
- Pepperman A. B., Connick W. J., Vail S. L., Worsham A. D., Pavlista A. D. a Moreland D. E., 1982. Evaluation of precursors and analogs of strigol as witchweed (*Striga asiatica*) seed germination stimulants. *Weed Science.* **30**, 561-566.
- Péron T., Véronési C., Mortreau E., Pouvreau J. B., Thoiron S., Leduc N., Delavault P. a Simier P., 2012. Role of the sucrose synthase encoding PrSus1 gene in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa L. (Pomel)*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **25**, 402-411.
- Pouvreau J. B., Gaudin Z., Auger B., Lechat M. M., Gauthier M., Delavault P. a Simier P., 2013. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods.* **9**, (modifikováno).
- Pozo M. J. a Azcón-Aguilar C., 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology.* **10**, 393-398.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J. a Šebánek J., 2003. Fyziologie rostlin, Nakladatelství Academia, Praha, ČR.

- Remy W., Taylor T. N., Hass H. a Kerp H., 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**, 11841-11843.
- Saeed W., Naseem S. a Ali Z., 2017. Strigolactones biosynthesis and their role in abiotic stress resilience in plants: A critical review. *Frontiers in Plant Science*. **8**, 1487.
- Samejima H., Babiker A. G., Takikawa H., Sasaki M. a Sugimoto Y., 2016. Practicality of the suicidal germination approach for controlling *Striga hermonthica*. *Pest Management Science*. **72**, 2035-2042.
- Seto Y., Yasui R., Kameoka H. a kol., 2019. Strigolactone perception and deactivation by a hydrolase receptor DWARF14. *Nature Communications*. **10**, 1-10.
- Siame B. A., Weerasuriya Y., Wood K., Ejeta G. a Butler L. G., 1993. Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **41**, 1486-1491.
- Stirnberg P., Furner I. J. a Leyser H. M. O., 2007. MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *The Plant Journal*. **50**, 80-94.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S. a kol., 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*. **455**, 195-200.
- Visser J. H. a Johnson A. W., 1982. The effect of certain strigol analogues on the seed germination of *Alectra*. *South African Journal of Botany*. **1**, 75-76.
- Waters M. T., Gutjahr C., Bennett T. a Nelson D. C., 2017. Strigolactone signaling and evolution. *The Annual Review of Plant Biology*. **16**, 291–322.
- Xie X., Yoneyama K. a Yoneyama K., 2010. The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology*. **48**, 93-117.
- Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Nakatani Y., Akiyama K. a Mcerlean C. S. P., 2018. Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? *Journal of Experimental Botany*. **69**, 2231-2239.
- Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Reizelman A., Anilkumar G. a Sethumadhavan D., 2009. Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science*. **65**, 478-491.

Zwanenburg B. a Mwakaboko A. S., 2011. Strigolactone analogues and mimics derived from phthalimide, saccharine, p-tolylmalondialdehyde, benzoic and salicylic acid as scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **19**, 7394-7400.

Zwanenburg B., Nayak S. K., Charnikhova T. V. a Bouwmeester H. J., 2013. New strigolactone mimics: Structure-activity relationship and mode of action as germinating stimulants for parasitic weeds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **23**, 5182-5186.

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

Zwanenburg B., Mwakaboko A. S. a Kannan C., 2016. Suicidal germination for parasitic weed control. *Pest Management Science*. **72**, 2016-2025.

Zwanenburg B., Čavar Zeljković S. a Pospíšil T., 2016. Synthesis of strigolactones, a strategic account. *Pest Management Science*. **72**, 15-29.