

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Centrum regionu Haná

pro biotechnologický a zemědělský výzkum



Sirná strigolaktonová mimetika – příprava a biologická aktivita

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Barošová
Název práce	Sírná strigolaktonová mimetika – příprava a biologická aktivita
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstový regulátorů a CRH
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na obecnou charakterizaci nových rostlinných hormonů – strigolaktonů, a jejich strukturních analogů a mimetik. Je zde shrnuta problematika parazitického plevele a užití strigolaktonů v procesu iniciace klíčení semen parazitických rostlin rodu <i>Orobanche</i> a <i>Striga</i>.</p> <p>Praktická část je věnována přípravě sírných strigolaktonových mimetik obsahujících sulfidovou respektive sulfonovou funkční skupinu. Pomocí standardizovaného biotestu byly tyto látky testovány na schopnost vyvolat klíčení parazitických semen.</p>
Klíčová slova	Strigolaktony, parazitické rostliny, <i>Striga</i> , <i>Orobanche</i> , sírná mimetika, strigolaktonová mimetika, butenolidy
Počet stran	38
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Barošová
Title of thesis	Sulfur containing strigolactone mimics - preparation and biological activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	The theoretical part of this bachelor thesis is focus on characterization of new plant hormone strigolactones and their structural analogues and mimics. SLs are active as a germination stimulant for seeds of parasitic weeds of genus <i>Striga</i> and <i>Orobanche</i> . Agricultural meaning of these weeds is mentioned. The experimental part is dedicated to preparation of new strigolactone mimics containing sulfide or sulfone functional group. Newly prepared compounds were tested for potential germination activity of parasitic seeds.
Keywords	Strigolactones, parasitic weeds, <i>Striga</i> , <i>Orobanche</i> , sulfur mimics, strigolactone mimics, butenolides
Number of pages	38
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. za veškerý jeho cenný čas a rady, trpělivost, ochotu a pozitivní myšlení během vypracovávání této bakalářské práce.

Mé díky patří také Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. za provedení HPLC/MS analýz.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu CRH, Oddělení chemické biologie a laboratoře organické syntézy, za vlídnost a pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Rostlinné hormony	10
1.2 Strigolaktony	10
1.2.1 Biosyntéza a strukturní diverzita	11
1.2.2 Strigolaktonová analoga	13
1.2.3 Strigolaktonová mimetika	15
1.2.4 Účinek působení strigolaktonů	17
1.3 Parazitické rostliny	18
1.3.1 <i>Striga</i> spp.	18
1.3.2 <i>Orobanche</i> spp.	20
1.3.3 Životní cyklus parazitických rostlin rodu <i>Striga</i> a <i>Orobanche</i>	20
1.4 Metody kontroly růstu parazitů rodu <i>Striga</i> a <i>Orobanche</i>	21
1.4.1 Sebevražedné klíčení	22
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
2.1 Materiál a metody	23
2.1.1 Chemikálie	23
2.1.2 Biologický materiál	23
2.1.3 Metody	23
2.2 Syntéza	24
2.2.1 Příprava sirných sulfidových mimetik	24
2.2.2 Oxidace sulfidových mimetik na sulfonové deriváty	26
2.3 Biologické testování	28
2.3.1 Sterilizace semen	28
2.3.2 Prekondicionování semen	28
2.3.3 Příprava roztoku stimulantu	28
2.3.4 Aplikace stimulantu	28
2.3.5 Hodnocení	29
VÝSLEDKY A DISKUZE	30
3.1 Syntéza strigolaktonových mimetik	30
3.2 Testování klíčivosti semen	31

ZÁVĚR	34
POUŽITÁ LITERATURA	35

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AM	arbuskulární mykorrhiza
CCD7(8)	karoten-dioxygenáza (z angl. „ <i>carotenoid cleavage dioxygenase</i> “)
CDCI ₃	deuterovaný chloroform
<i>d</i>	dublet
D27	β-karoten izomeráza (z angl. „ <i>Dwarf27</i> “)
EtOAc	ethyl acetát
ES+	ionizace pomocí elektrospreje v pozitivním módu
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<i>J</i>	štěpící konstanta
<i>m</i>	multiplet
MAX1	enzym (z angl. „ <i>more axillary growth</i> “)
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -chlorperoxybenzoová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>p</i>	pentet
PE	petrolether
ppm	parts per milion
<i>s</i>	singlet
SE	směrodatná odchylka
SLs	strigolaktony (z angl. „ <i>strigolactones</i> “)
Spp	druhy (z lat. „ <i>species pluralis</i> “)
<i>t</i>	triplet
TEA	triethylamin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
δ	chemický posun

ÚVOD

Strigolaktony (SLs) jsou poměrně novou skupinou látek řazenou mezi rostlinné hormony, které hrají důležitou roli v procesu růstu a vývoje rostliny. Mezi jejich doposud známé funkce patří symbióza s arbuskulárními houbami, inhibice větvení nadzemních částí rostlin a iniciace klíčení parazitických semen rodu *Orobancha* a *Striga*.

Semena těchto parazitů jsou velice malá a dokážou v půdě přežít až desítky let v dormantním stavu. K započnutí klíčení potřebují chemický impuls v podobě látky, kterou vyloučí jejich hostitelská rostlina. Jakmile se tak stane a parazit začne klíčit, napojí se na cévní systém rostliny, skrz který jí začne odebírat živiny. Cílem těchto parazitů jsou bohužel i hospodářsky významné plodiny, jako je například kukuřice, proso nebo čirok, a to zejména v oblastech, které jsou na těchto plodinách závislé – oblast Středozemního moře, severní Afrika, Indie, Indonésie.

Cílem této bakalářské práce je sepsání rešerše o strigolaktonech se zaměřením na užití jejich analog a mimetik pro klíčení parazitických rostlin rodu *Orobancha* a *Striga*. Praktická část je orientovaná na přípravu skupiny syntetických sloučenin strukturně odvozených od přírodních strigolaktonů a obsahujících sulfidovou či sulfonovou funkční skupinu. Nově připravené látky jsou následně testovány v biotestu na iniciaci klíčení semen výše zmíněných parazitů.

TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony, tzv. fytohormony, jsou chemické regulátory syntetizované rostlinou, které vyvolávají fyziologickou odezvu. Ovlivňují především růst, ale i vývoj a reprodukci rostlin a zajišťují její komunikaci s okolím. Fytohormony jsou aktivní již ve velice malých koncentracích. Netvoří se v konkrétním rostlinném orgánu, ale hned na několika místech současně a jsou distribuovány do celé rostliny. Jejich účinek působení je v rostlinách komplexní.

Rostlinné hormony můžeme rozdělit do několika skupin podle jejich struktury či účinku působení. Mezi nejdéle známé a studované skupiny fytohormonů patří auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen.

Během posledních několika let se studium rostlinných hormonů dostalo do popředí výzkumu a množství doposud známých hormonů značně vzrostlo. Byly objeveny funkce či účinky například brassinosteroidů, jasmonátů, kyseliny salicylové a taky strigolaktonů, kterým je věnována tato bakalářská práce.

1.2 Strigolaktony

Strigolaktony jsou klasifikovány jako nová skupina rostlinných hormonů. Předpokládá se, že mají mnoho funkcí, ale doposud byla prokázána pouze inhibice větvení nadzemních částí rostlin, iniciace klíčení parazitických semen a podpora symbiózy rostlin s AM houbami.

Jejich název byl odvozen od parazitické rostliny *Striga asiatica* a látky stimulující její klíčení. Tato látka byla poprvé izolována v roce 1966 z kořenových výměšků bavlníku, *Gossypium hirsutum* L. Pomocí spektrálních dat byla později odvozena i struktura této látky a dostala název strigol (Cook *et al.*, 1966). Od té doby bylo objeveno mnoho dalších strukturních variant strigolu a všechny tyto sloučeniny dostaly souhrnné označení jako strigolaktony (SLs) (Butler, 1995).

Samotná izolace těchto látek z rostlin je velice náročná vzhledem k malému množství, které hostitelské rostliny vylučují skrz kořenový systém (15-30 pg strigolaktonu za den na rostlinu). Navíc jsou zejména v alkalickém prostředí nestabilní a podléhají hydrolytickému rozkladu (Zwanenburg and Mwakaboko, 2011).

Při první izolaci bylo potřeba více než 25 000 rostlin pro získání dostatečného množství látky k určení struktury molekuly. S použitím moderních chromatografických

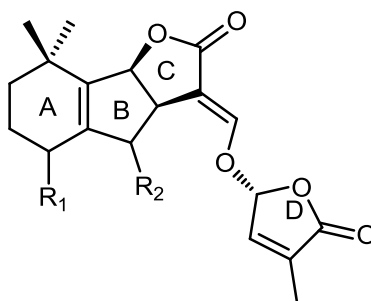
a spektroskopických technik se počet potřebných rostlin stále snižuje, nicméně i doposud se pohybuje okolo 100 a více - dle druhu rostliny a izolovaného strigolaktonu (Mori *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 1999).

Různé SLs mohou být izolovány i z rostlin, které nejsou přirozenými hostiteli těchto parazitů. Je to dáno tím, že rostliny nevyučují pouze jednu konkrétní látku, ale celou jejich směsí, a to pokaždé v jiném zastoupení a jiných koncentracích (Siame *et al.*, 1993).

Přítomnost strigolaktonů se táhne napříč celou rostlinnou říší. Byly identifikovány nejen v rostlinných extrudátech, ale i například v kořenových výměšcích stromů rodu *Pinus* spp. a *Eucalyptus* spp. (Yoneyama, 2013) či v mechorostech (Proust *et al.*, 2011).

1.2.1 Biosyntéza a strukturní diverzita

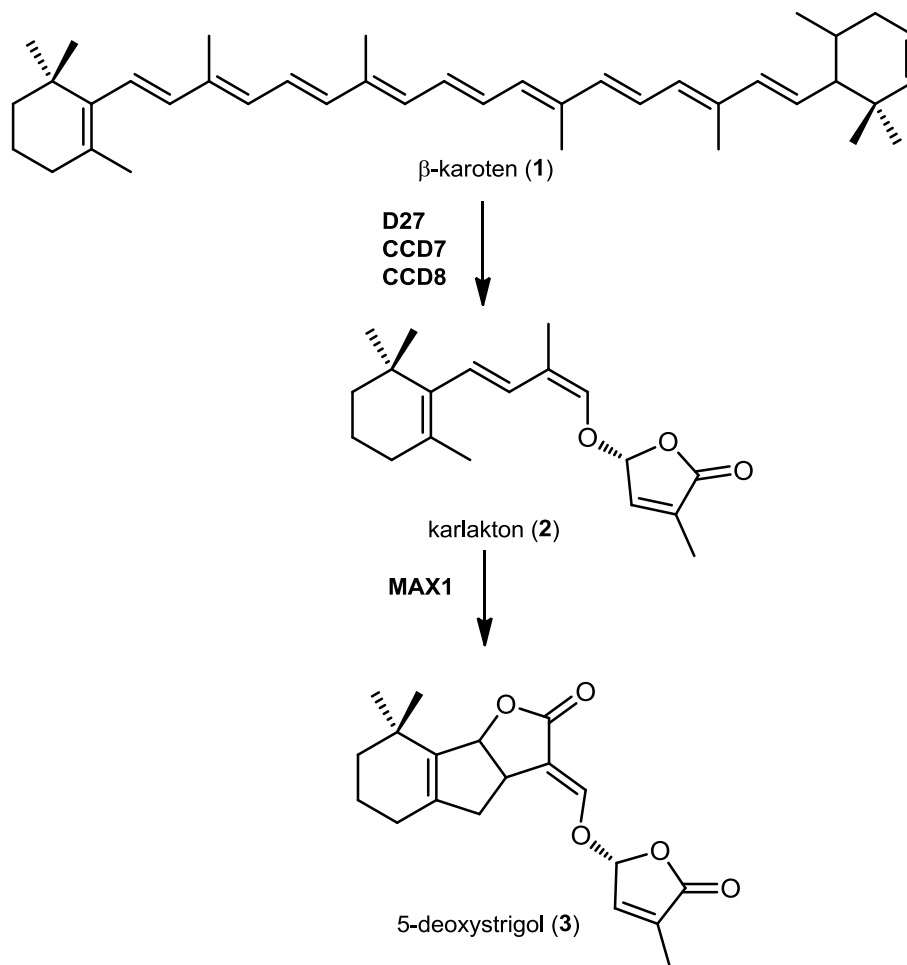
Z chemického hlediska jsou SLs charakterizovány jako seskviterpenoidní laktony (Bouwmeester *et al.*, 2003), skládající se z tříkruhového ABC skeletu. Na ten je připojen přes vinyl etherový můstek pětičlenný D-kruh (Obr 1). A-kruh obsahuje jednu nebo dvě methylové skupiny a různé kombinace hydroxylových a acetoxy-substituentů na A a B-kruhu v pozici R₁ a R₂ definují jednotlivé doposud známé SLs (Čavar, 2014).



Obr. 1: Obecná struktura SLs

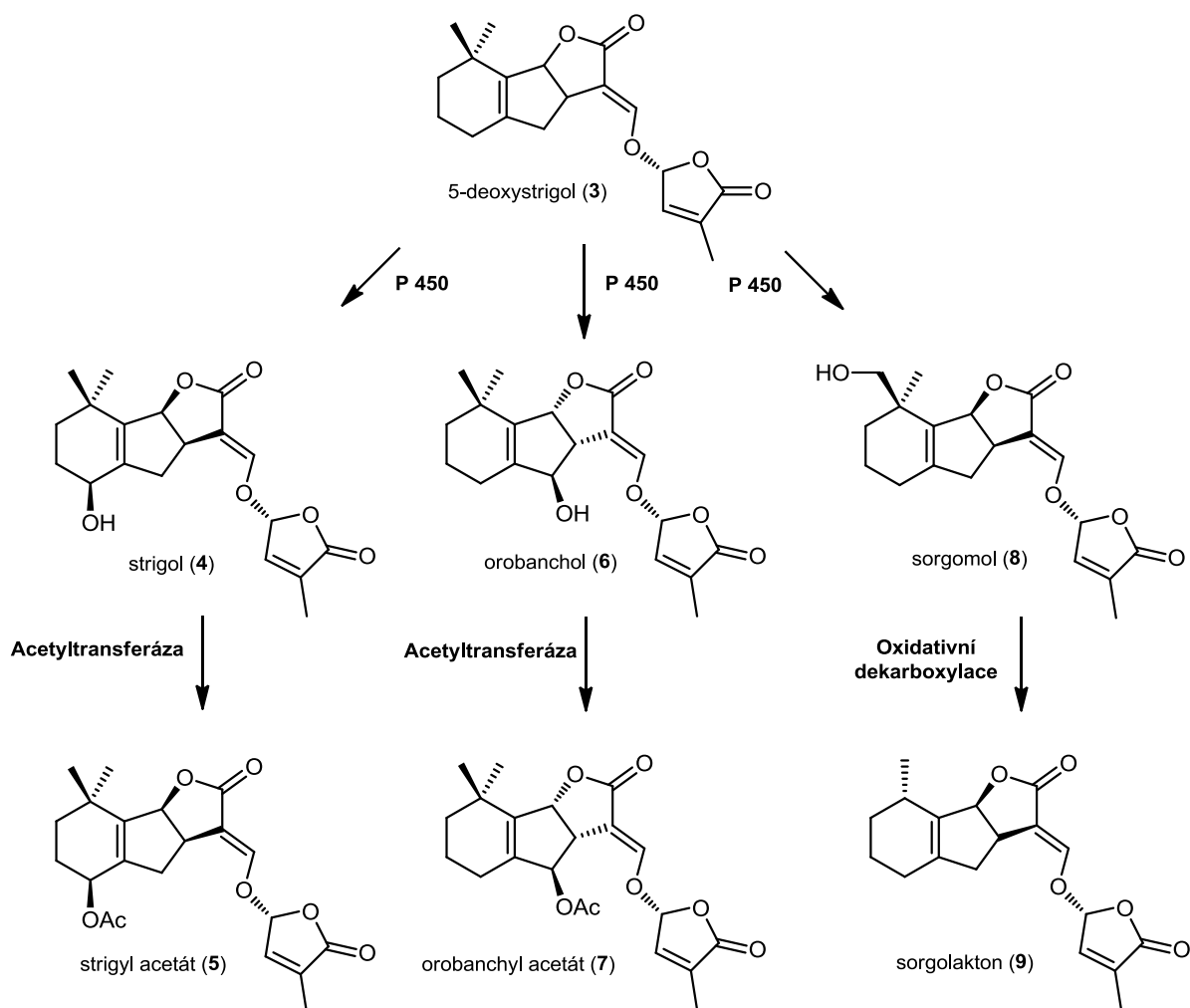
Je zřejmé, že všechny přirozeně se vyskytující SLs mají podobnou strukturu a předpokládá se, že jsou odvozeny od karotenoidů. Tomu nasvědčují experimenty prováděné na mutantních rostlinách kukuřice s inhibovanou dráhou pro biosyntézu karotenoidů. U těchto rostlin byla zaznamenána snížená hladina produkce strigolaktonů (Matusova *et al.*, 2005).

Bylo prokázáno, že pomocí β -karoten izomerázy (D27) a dvou karotenových dioxygenáz (CCD7, CCD8) dochází k izomeraci a k štěpení molekuly β -karotenu (1) za vzniku karlaktonu (2). Ten je dále za přítomnosti enzymu MAX1 konvertován na 5-deoxystrigol (3) (Obr. 2) (Alder *et al.*, 2012).



Obr. 2: Pravděpodobná biosyntéza strigolaktonů z karotenoidů

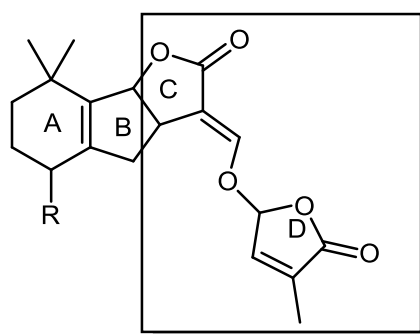
Také se předpokládá se, že 5-deoxystrigol (**3**) je prekurzorem pro tvorbu většiny doposud známých přirozeně se vyskytujících strigolaktonů (Obr. 3). Konverze 5-deoxystrigolu na strigol (**4**), orobanchol (**6**) a sorgomol (**8**) je uskutečňována skrz enzymy známé jako cytochromy P450. Ze sorgomolu (**8**) poté dochází oxidativní dekarboxylací ke vzniku sorgolaktonu (**9**). Tvorba orobanchyl acetátu (**7**) a strigyl acetátu (**5**) je katalyzována enzymem acetyltransferázou (Ruyter-Spira, 2012).



Obr. 3: Odvození přírodních SLs od 5-deoxystrigolu

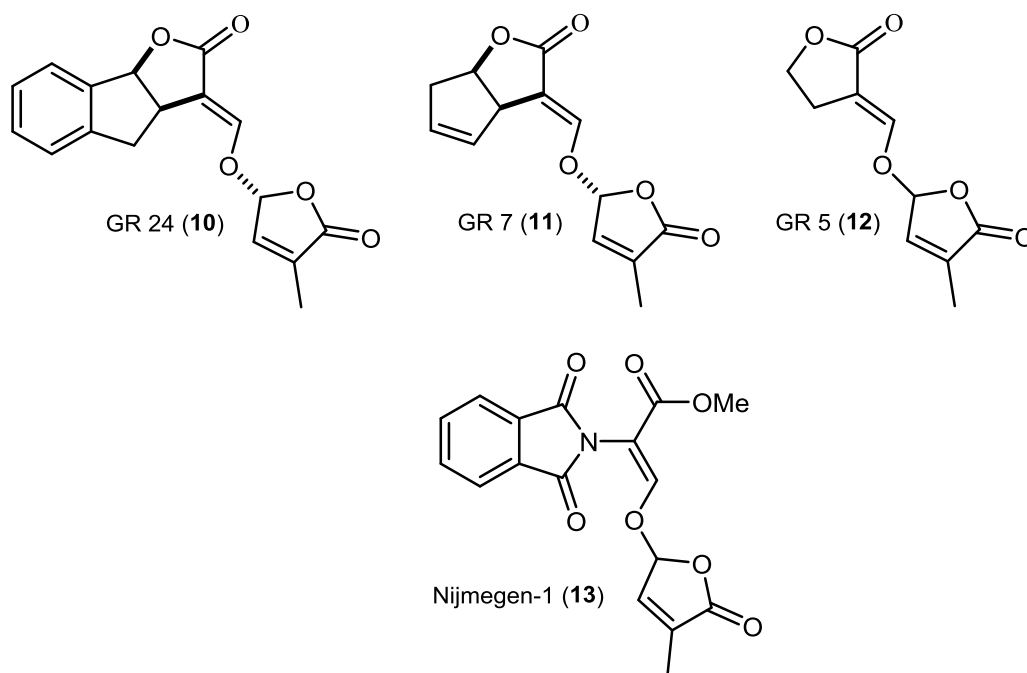
1.2.2 Strigolaktonová analoga

Kromě přírodních molekul strigolaktonů izolovaných z rostlin, byly připraveny sloučeniny syntetické, analogické strigolaktonům, mající podobnou strukturu (Obr. 4) a účinky.



Obr. 4: Obecná struktura SLs analog

Prvními úspěšně připravenými analogy byly tzv. GR-sloučeniny (Obr. 5). Nahrazením cyklohexenového A-kruhu kruhem aromatickým byl vytvořen analog strigolu, GR 24 (**10**). Vypuštěním A-kruhu a následně i B-kruhu vznikly sloučeniny GR 7 (**11**) a GR 5 (**12**) (Johnson *et al.*, 1981). Další úspěšně připravenou sloučeninou byla molekula Nijmegen-1 (NIJ-1) (**13**), u které byl modifikován celý ABC skelet (Nefkens *et al.*, 1997).



Obr. 5: Připravená SLs analoga.

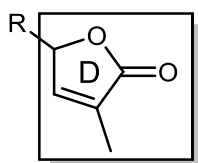
Standardními látkami i pro další oblasti výzkumu strigolaktonů se staly zejména molekuly GR 24 a NIJ-1. Vzhledem k tomu, že tyto nově připravené látky vykazují vysokou aktivitu v procesu klíčení parazitických semen (Tab. 1) a jejich cena je mnohonásobně nižší než u přírodních SLs, používají se běžně v biotestech jakožto pozitivní kontroly.

Tab. 1: Procentuální stanovení klíčivosti semen rodu *Striga hermonthica* po aplikaci vodného roztoku GR24 a NIJ-1 v koncentracích 1 a 0.01 mg/L (Nefkens *et al.*, 1997).

Stimulant	% klíčivost \pm SE	
	1 mg/L	0,01 mg/L
NIJ-1	40,3 \pm 1,7	4,1 \pm 0,9
GR-24	45,5 \pm 13,5	52,5 \pm 12,5

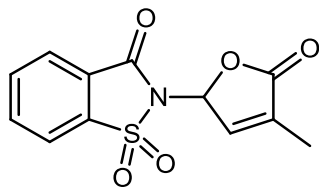
1.2.3 Strigolaktonová mimetika

Strigolaktonová mimetika nebo také látky mimikující strigolaktony, jsou chemicky připravené sloučeniny, které mají podobné vlastnosti jako přírodní SLs. Základním rozdílem oproti analogům je absence ABC skeletu. Mimetika jsou tvořena pouze butenolidovým D-kruhem s dobře odstupující skupinou v pozici R (Obr. 6). Ačkoliv jsou tyto molekuly strukturně jednodušší a jejich příprava je poměrně nenáročná, mají vysokou biologickou aktivitu.

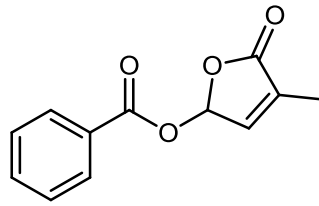


Obr. 6: Obecná struktura SLs mimetik

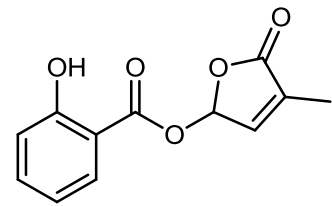
Mimetika odvozená od sacharinu (**14**), kyseliny benzoové (**15**) a salicylové (**16**) (Obr. 7) byla původně připravena s předpokladem, že nebudou podporovat klíčení parazitických semen. Hlavním důvodem této domněnky byla nepřítomnost α,β -nenasyceného karboxylového systému, který byl pokládán za klíčový v mechanismu působení SLs (kap. 1.2.4.). Testování ovšem prokázalo, že tyto látky dokážou stimulovat klíčení semen parazitů rodu jak *Striga hermonthica* (Graf 1), tak i *Orobanche crenata* (Graf 2). Nejlepší výsledky a potenciál pro další využití má látka **16**, která u rostliny *Striga hermonthica* v koncentraci 0,1 mg/L dosahovala klíčivosti 7 %, což je sice jen poloviční klíčivost v porovnání s kontrolní látkou **10** (20 %), ale stejný rozdíl byl i při koncentraci 0,01 mg/L, kdy se klíčivost látky **16** pohybovala okolo 21 %, u kontroly (**10**) okolo 43 %. U rostliny *Orobanche crenata* byla klíčivost v obou koncentracích výrazně vyšší (látka **16**: 82 % v 0,1 mg/L; 72 % v 0,01 mg/L; kontrola GR 24: 86 % v 0,1 mg/L; 82 % v 0,01 mg/L) (Zwanenburg and Mwakaboko, 2011). Na základě těchto překvapivých výsledků byl navržen nový mechanismus působení mimetických derivátů v rostlinách (kap. 1.2.4.).



derivát sacharinu (14)

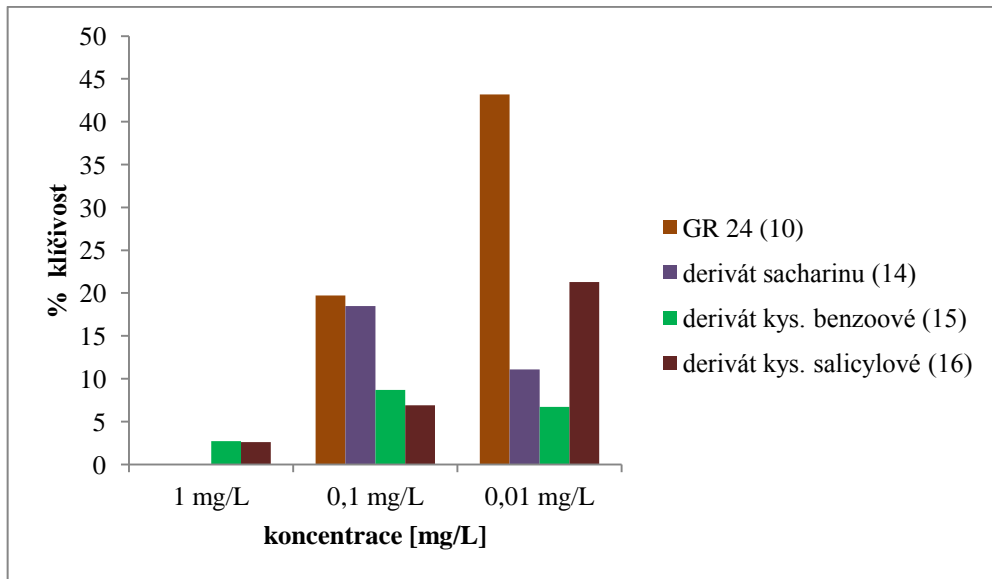


derivát kys. benzoové (15)

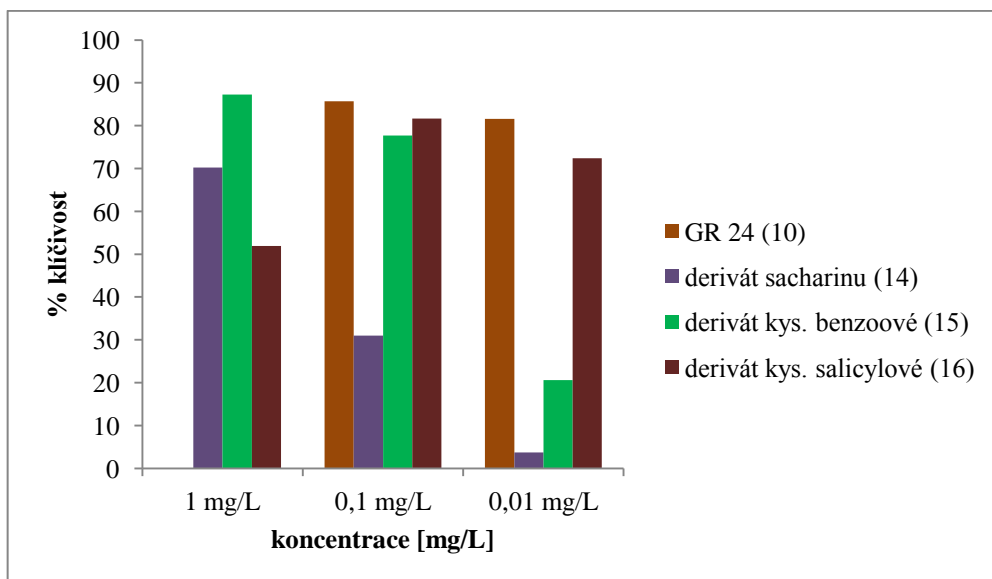


derivát kys. salicylové (16)

Obr. 7: Připravená SL mimetika



Graf 1: Procentuální stanovení klíčivosti semen rodu *Striga hermonthica* po aplikaci roztoku stimulantu GR24, derivátu sacharinu, kys. benzoové a kys. salicylové v koncentracích 1; 0,1 a 0,01 mg/L. GR 24 v koncentraci 1 mg/L nebyla testována (Zwanenburg and Mwakaboko, 2011).

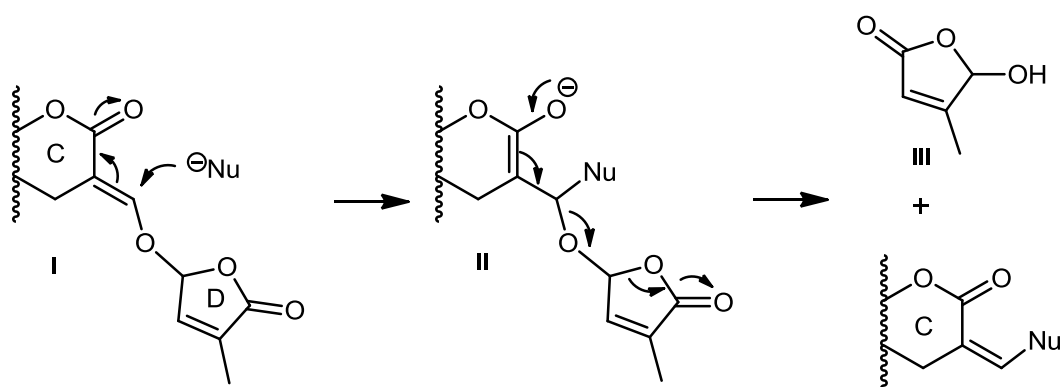


Graf 2: Procentuální stanovení klíčivosti semen rodu *Orobanche cernua* po aplikaci roztoku stimulantu GR24, derivátu sacharinu, kys. benzoové a kys. salicylové v koncentracích 1; 0,1 a 0,01 mg/L. GR 24 v koncentraci 1 mg/L nebyla testována (Zwanenburg and Mwakaboko, 2011).

1.2.4 Účinek působení strigolaktonů

Po objasnění prvních strigolových struktur se začalo také pátrat po tom, jak tyto látky v rostlinách fungují, a která část molekuly je pro jejich aktivitu nepostradatelná. Na základě doposud získaných výsledků byly navrženy dva možné způsoby působení SLs.

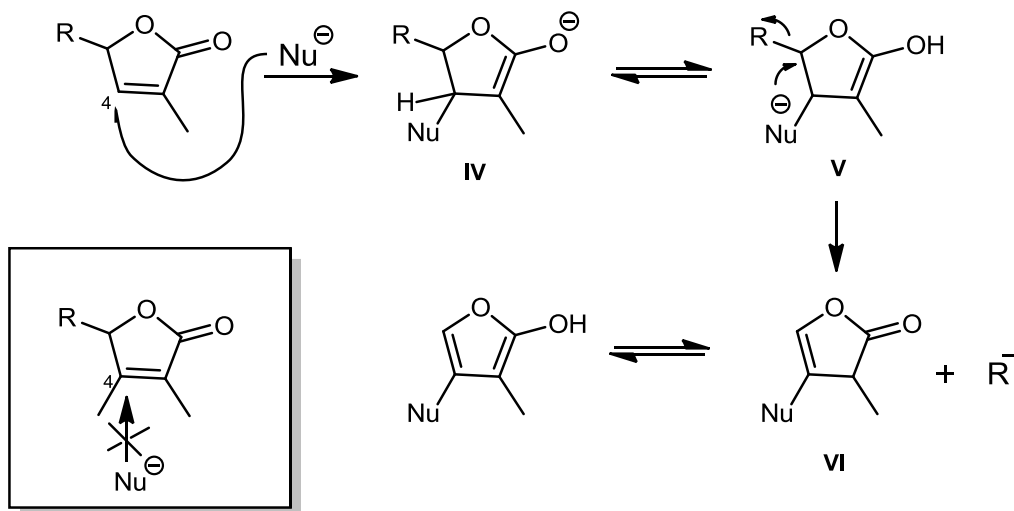
U přírodních SLs a analogů se předpokládá, že nukleofilní skupina přítomná v receptorovém místě semene, napadá β -pozici v α,β -nenasyceném karboxylovém systému a dochází tak k Michaelově adici (**I**). Nukleofil se připojí na vinyl etherový můstek (**II**) a dojde k eliminaci D-kruhu (**III**) (Obr. 8). Právě tato chemická změna může být impulzem pro započnutí klíčení semene či inhibici větvení (Mangnus and Zwanenburg, 1992).



Obr. 8: Pravděpodobný mechanismus působení SLs a analog

Bylo provedeno několik experimentů, při kterých došlo k nahrazení butenolidového D-kruhu jinou odstupující skupinou. Tato záměna zapříčinila ztrátu aktivity molekuly. Na základě těchto výsledků se usuzuje, že příslušný butenolid hraje nepostradatelnou roli pro biologickou aktivitu strigolaktonů (Hassanali, 1984).

Vzhledem k tomu, že SL mimetika postrádají vinyl etherový můstek, je pravděpodobný mechanismus účinku jiný. Proto byl navržen alternativní mechanismus působení (Obr. 9), který také zahrnuje počáteční Michaelovu adici tentokrát přímo na butenolidový kruh (**IV**), následný přesmyk protonu (**V**) a eliminaci skupiny R (**VI**). Aby tento mechanismus mohl fungovat, musí být substituent R dobře odstupující skupinou (Mangnus and Zwanenburg, 1992).



Obr. 9: Pravděpodobný mechanismus působení SL mimetik

K potvrzení této teorie také přispěla práce profesora Zwanenburga, který nahradil vodíkový atom v poloze C-4 methylovou skupinou (Obr. 9). Tato změna znemožnila nukleofilní atak v předpokládaném mechanismu adice-eliminace a látka skutečně ztratila schopnost podporovat klíčení semen rodu *Striga hermonthica* (Zwanenburg *et al.*, 1994).

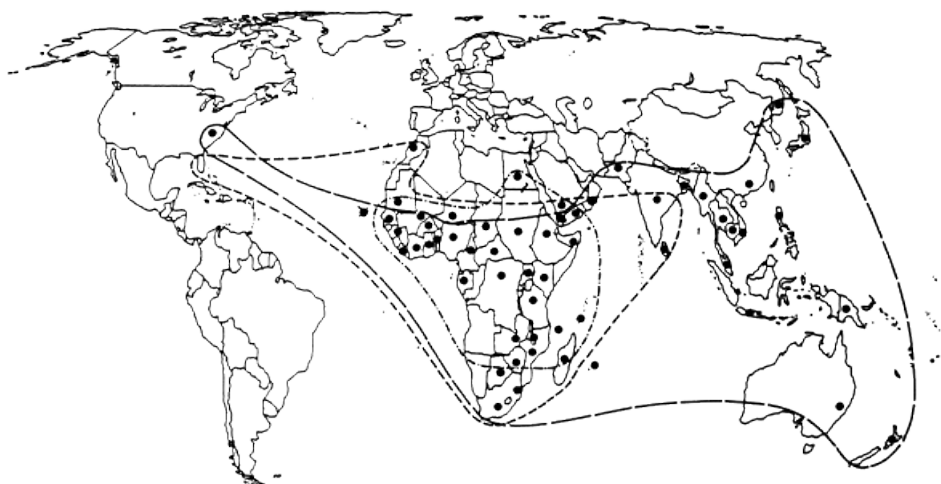
1.3 Parazitické rostliny

Orobanche a *Striga* jsou dvouděložné rostliny čeledi Zárázovité (*Orobanchaceae*), které jsou schopny parazitovat na celé škále hospodářsky významných plodin. Za jedno vegetační období dokážou vyprodukovat 50 000 až 200 000 semen. Ty se dále mohou rozšiřovat z jednoho pole na druhé, uchycené na farmářských nástrojích či pomocí kontaminovaných semen zakoupených na místních trzích (Berner *et al.*, 1994). V důsledku toho narůstá nekontrolovatelné šíření těchto parazitů, a to především v oblastech, kde jsou tyto plodiny hlavním zdrojem obživy.

1.3.1 *Striga* spp.

Striga jsou obligátní hemiparazitické fotosyntetizující rostliny. Na svých hostitelích jsou závislé z důvodu neschopnosti přijímat anorganické látky.

Striga napadají především hospodářky významné obilniny v subtropických oblastech Afriky, Indie či Indonésie (Obr. 10).



World wide distribution of important *Striga* species

- countries with reported *Striga* occurrences
- — *Striga asiatica* - - - - *Striga gesnerioides* - . . . - *Striga hermonthica*

Obr. 10: Celosvětové rozšíření parazitických rostlin rodu *Striga* spp. (staženo z https://www.uni-hohenheim.de/www380/380b/science/supraregional/images/Dist_Orob.gif, dne 15. 5. 2015)

Nejdestruktivnějšími rody jsou *S. hermonthica* (Obr. 11), *S. asiatica* a *S. gesnerioides*, které poškozují kukuřici, proso, fazole, čirok či rýži (Parker, 2013).



Obr. 11: *Striga hermonthica* (staženo z <https://troz.uni-hohenheim.de/millet-sorghum-research00?&L=1>, dne 14. 5. 2015)

1.3.2 *Orobanche* spp.

Orobanche spp. (syn. *Phelipanche*) jsou obligátní holoparazité, kteří neumí fotosyntetizovat. Postrádají jak schopnost tvorby organických látek, tak příjem látek anorganických. Jsou plně závislí na přítomnosti hostitele.

Obdobně jako rostliny rodu *Striga*, způsobují i *Orobanche* nevyčísitelné škody na mnoha plodinách. Vyskytují se nejčastěji v oblasti Středomořího moře, severní a východní Evropě a severní Africe, ze které se dostávají až do Asie.

Největší škody způsobují rostliny *O. ramosa* (Obr. 12) a *O. aegyptiaca* napadající rajčata, brambory, lilek, fazole, čočku, cizrnu, okurky, kapustu či slunečnici (Parker and Riches, 1993). Dalším významným zástupcem je *O. crenata*, která využívá jako hostitele především obilí a luštěniny.

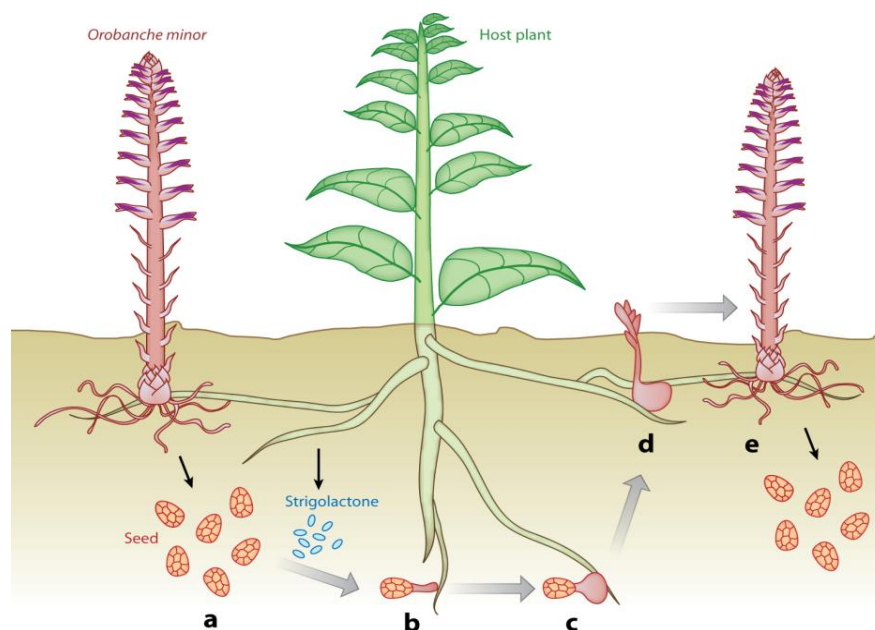



Obr. 12: *Orobanche ramosa* (staženo z http://www.apatita.com/herbario/Orobanchaceae/Orobanche_ramosa_subsp_mutellii.html, dne 14. 5. 2015)

1.3.3 Životní cyklus parazitických rostlin rodu *Striga* a *Orobanche*

Životní cyklus rostlin *Strigy* a *Orobanche* je velice podobný a specifický. Jedná se o kořenové parazity, kteří většinu svého života prožívají pod zemí (Xie *et al.*, 2010). Zde, v podobě velice malých semen (0,3 mm), dokážou v dormantním stavu přežít 15 až 20 let. K započnutí klíčení, potřebují chemický impuls v podobě strigolaktonu či jiného stimulačního faktoru, který do půdy vyloučí jejich potenciální hostitelská rostlina. Jakmile se tak stane, vytvoří se klíček, který se postupně prodlužuje, dokud nedojde k primárnímu

kontaktu s hostitelem. Poté se začne vyvíjet specializovaný orgán, tzv. haustorium, který proniká do kořenového systému a napojuje se na cévní systém rostliny. Skrz něj poté parazit rostlině odebírá vodu a potřebné živiny (Thuring, 1996). Po nějaké době výhonek prorůstá napovrch, kvete a produkuje nová semena. Tím se uzavírá celý životní cyklus parazitické rostliny (Obr. 13).



 Xie X, et al. 2010.
Annu. Rev. Phytopathol. 48:93–117

Obr. 13: Životní cyklus *Orobanche minor*

a) Klíčení semen je vyvoláno strigolaktony produkovanými hostitelskou rostlinou, b) Klíček napadá kořenový systém hostitele a napojuje se na něj skrz haustorium, c-d) Parazit se pod zemí rozrůstá a během několika týdnů či měsíců se objeví výhonek, e) Parazit produkuje mnoho malých semínek, které přežívají v půdě po mnoho let (převzato z Xie et al., 2010).

1.4 Metody kontroly růstu parazitů rodu *Striga* a *Orobanche*

V posledních několika letech dochází k velkému zamořování polí různými druhy parazitických rostlin rodu *Striga* a *Orobanche*. Primárním cílem výzkumu je vyvinout metodu, která bude levná, snadno aplikovatelná a především vysoce účinná v eradikaci tohoto plevelu.

Mezi stěžejní body kontrolních strategií růstu těchto parazitických rostlin lze zahrnout inhibici klíčení, eliminaci semen z půdy či redukci produkce stimulačních látek (Runyon *et al.*, 2009). Bylo vyzkoušeno ruční pletí, šlechtění hospodářských plodin, vysazování rezistentních plodin či používání herbicidů, ale bohužel ani jeden z těchto způsobů nebyl dostatečně účinný (Zwanenburg *et al.*, 2009).

Hlavním důvodem neúspěšnosti je jednak velice sofistikovaný životní cyklus parazitů, a jednak produkce mnoha malých, dlouho přežívajících semen, která se snadno šíří do okolí (Bebawi *et al.*, 1984). Kompletní vymýcení semen z půdy je tedy prakticky nemožné.

1.4.1 Sebevražedné klíčení

Jednou z nejúčinnějších metod v boji proti parazitickému plevelu se osvědčila tzv. metoda sebevražedného klíčení, pomocí níž bylo zredukováno více než 90 % parazitické populace rostliny *Striga asiatica* v Severní a Jižní Karolíně (USA). K vymýcení byl použit růstový regulátor ethylen (Eplee, 1981), který má vysokou schopnost podporovat klíčení parazitických semen rostlin rodu *Striga*. Pakliže je vyvoláno klíčení semen bez přítomnosti hostitele, dojde po vyčerpání živin v semenech během pár dní k jejich úhynu (Rodenburg *et al.*, 2005).

Praktická aplikace ethylenu zahrnuje vstřikování tohoto plynu do půdy za vysokého tlaku pomocí speciálních přístrojů. Jeho aplikace se provádí v pravidelných časových intervalech do hloubky cca 10-20 cm, a to minimálně 1 týden před vysetím plodin. Je ale nezbytné, aby se na poli nevyskytovali žádní potencionální hostitelé parazitů (Logan and Stewart, 1991).

Přestože je tato metoda účinná, pro nejvíce postižené oblasti Afriky či Indonésie je z důvodů potřeby speciálního přístrojového vybavení, a s tím spojených vysokých finančních nákladů, zatím nepoužitelná (Goldwasser and Rodenburg, 2013).

Kromě ethylenu byly rovněž provedeny pokusy se strigolaktonovými analogy, jako jsou GR 24 (**10**) a GR 7 (**11**). Tyto sloučeniny se ovšem ukázaly být pro tuto metodu nevhodné vzhledem ke svému postupnému rozkladu v půdě (Kgosi *et al.*, 2012).

Další variantou v boji proti parazitickému plevelu je výroba a použití strigolaktonových mimetik. Jelikož je jejich příprava jednodušší, a tím i ekonomičtější než v případě analog, naskytá se zde mnoho možností, jak je strukturně modifikovat. Cílem je najít vhodné a stabilní látky, použitelné v boji proti parazitickému plevelu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál a metody

2.1.1 Chemikálie

K syntéze látek byly použity chemikálie: thiophenol a benzyl mercaptan od společnosti Fluka; phenylethyl mercaptan od společnosti Acros Organic; triethylamine (TEA) a kyselina *meta*-peroxybenzoová (*m*CPBA) od společnosti Sigma Aldrich. Síran sodný bezvodý, petrolether (PE), diethyl ether, dichlormethan (DCM), ethylacetát (EtOAc), aceton od firmy Lachner. Jednomethylový i dvoumethylový brom butenolid byl připraven v laboratoři organické syntézy, látky GR 24 a NIJ-1 byly darem od prof. Zwanenburga (Radboud University Nijmegen).

2.1.2 Biologický materiál

Pro biologické testování byla použita semena rodu *Striga hermonthica* (Súdán, 1994).

2.1.3 Metody

Průběh chemických reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Pro tuto metodu byly použity hliníkové TLC desky Silikagel 60 W F₂₅₄ od společnosti Merck. Použité mobilní fáze jsou uvedeny níže u jednotlivých postupů. Analyty na TLC destičkách byly detekovány UV lampou společnosti Camag při vlnové délce 254 nm a pomocí barvicích roztoků vanilinu a manganistanu draselného (KMnO₄).

Pro purifikaci látek sloupcovou chromatografií byl použit Silikagel Davisil LC60A 40-63 micron od společnosti Grace Davison. Čistota látek byla ověřena pomocí HPLC na koloně (150 mm x 2,5 mm x 5 μm) s reverzní fází (Symmetry C18, Waters) v gradientu methanol/uhličitan amonný (pH = 4) při průtoku 0,3 ml/min a 20 °C.

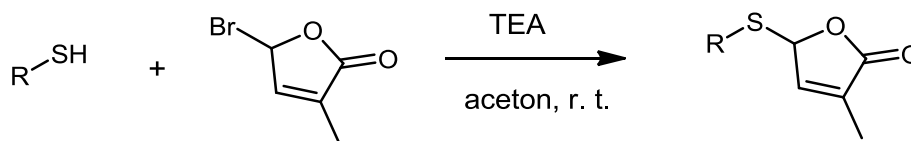
Spektra nukleární magnetické rezonance byla změřena na přístroji Jeol 500 ECA, měřícího při frekvenci 500 MHz pro jádro ¹H a 125 MHz pro jádro ¹³C. Kalibrace chemických posunů byla provedena na signál deuterovaného chloroformu (CDCl₃) $\delta^1\text{H} = 7,25 \text{ ppm}$, $\delta^{13}\text{C} = 77,2 \text{ ppm}$.

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Q-TOF MICRO od společnosti Waters.

Pro biologické testování byly použity filtrační disky společnosti Whatman. Semena byla inkubována v termostatu INOVA 42 a hodnocena pomocí binokulárního mikroskopu značky Motic Microscopy (SMZ 16 TL).

2.2 Syntéza

2.2.1 Příprava sirných sulfidových mimetik



Obr. 14: Obecné reakční schéma přípravy sirných mimetik

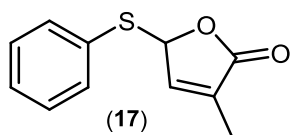
Reakce byla provedena v bezvodém prostředí v inertní atmosféře argonu. Do baňky byl přidán brom butenolid (1 eq.) rozpuštěný v suchém acetonu (0,1 M). Poté byl k roztoku přidán TEA (1 eq.) a následně i sirný derivát (1 eq.). Reakční směs byla míchána do dalšího dne při laboratorní teplotě. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (PE/EtOAc 1:1).

Po skončení reakce byl roztok rozpuštěn ve vodě a poté extrahován do dichlormethanu. Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem chloridu sodného a následně vysušena pomocí bezvodého síranu sodného. Vysušená organická fáze byla zfiltrována a zakoncentrována na vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie v elučním gradientu od 15:1 do 1:1 (PE/EtOAc).

3-methyl-5-(phenylthio)furan-2(5H)-one (17)

Výtěžek: 14 %, světle žlutá krystalická látka

HPLC čistota: 88 %



^1H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.95 (s, 3H); 5.69 (m, $J = 1.83$ Hz, 1H); 7.20 – 7.21 (m, $J = 1.83$ Hz, 1H); 7.57 - 7.62 (m, 2H); 7.70 – 7.73 (m, 1H); 7.91 – 7.94 (m, 2H).

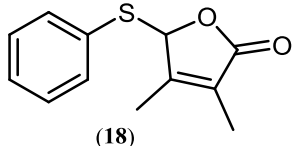
^{13}C (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 11.2, 91.6, 129.5, 129.8, 134.9, 135.2, 136.2, 138.3, 171.0.

MS (ES⁺), m/z : 255.82 [M+1]

3,4-dimethyl-5-(phenylthio)furan-2(5H)-one (18)

Výtěžek: 61 %, světle žlutá olejovitá kapalina

HPLC čistota: 100 %



^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.67 (s, 3H); 2.03 (s, 3H); 5.91 (s, 1H); 7.28 – 7.33 (m, 3H); 7.48 – 7.50 (m, 2H).

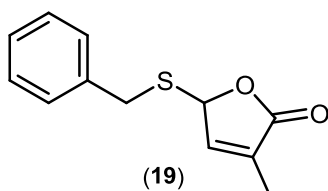
^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.6, 12.7, 88.4, 126.2, 129.1, 129.7, 134.1, 155.2, 172.8.

MS (ES+), m/z : 220.83 [M+1]

5-(benzylthio)-3-methylfuran-2(5H)-one (19)

Výtěžek: 17 %, světle žlutá krystalická látka

HPLC čistota: 84 %



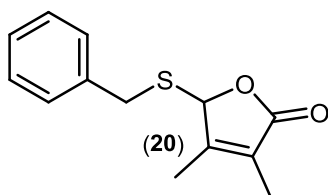
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.91 (s, 3H); 3.85 (d, $J = 13.45$ Hz, 1H); 3.97 (d, $J = 13.45$ Hz, 1H); 5.76 (s, 1H); 6.87 (s, 1H); 7.26 – 7.33 (m, 5H).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.8, 34.9, 82.5, 127.6, 128.9, 129.3, 132.0, 136.7, 145.3, 173.1.

MS (ES+), m/z : 236.83 [M+1]

5-(benzylthio)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-one (20)

Výtěžek: 7 %, bílá krystalická látka



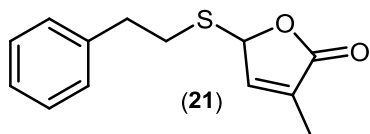
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.79 (s, 3H); 1.85 (s, 3H); 3.77 (d, $J = 13.45$ Hz, 1H); 3.89 (d, $J = 13.45$ Hz, 1H); 5.62 (s, 1H); 7.26 – 7.31 (m, 5H).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8, 12.5, 34.1, 85.3, 125.7, 127.6, 128.7, 129.3, 136.8, 156.4, 173.2.

3-methyl-5-(phenethylthio)furan-2(5H)-one (21)

Výtěžek: 7 %, žlutá olejovitá kapalina

HPLC čistota: 99 %



^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.94 (s, 3H); 2.66 – 2.89 (m, 4H); 5.90 (d, $J = 1.82$ Hz, 2H); 6.89 (d, $J = 1.53$ Hz, 2H); 7.18 – 7.31 (m, 5H).

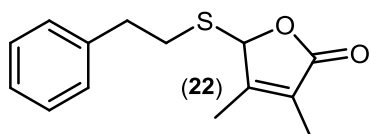
^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.7, 29.8, 32.2, 36.5, 84.2, 126.7, 128.7, 131.9, 139.7, 145.4, 173.0.

MS (ES+), m/z : 235.08 [M+1]

3,4-dimethyl-5-(phenethylthio)furan-2(5H)-one (22)

Výtěžek: 19 %, průhledná olejovitá kapalina

HPLC čistota: 100 %

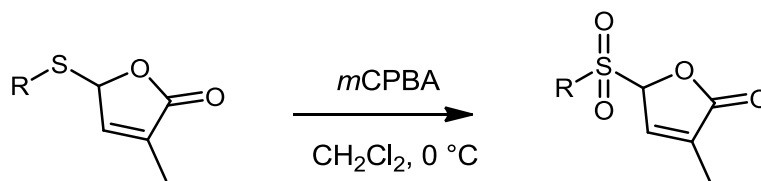


^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.84 (s, 3H); 1.97 (s, 3H); 2.77 – 2.87 (m, 2H); 2.91 – 2.94 (m, 2H); 5.71 (s, 1H); 7.17 – 7.23 (m, 3H); 7.27 – 7.30 (m, 2H).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8, 12.6, 31.3, 36.4, 86.8, 125.8, 126.7, 128.7, 139.8, 156.2, 173.1.

MS (ES+), m/z : 248.85 [M+1]

2.2.2 Oxidace sulfidových mimetik na sulfonové deriváty



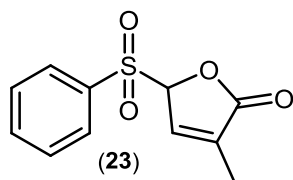
Obr. 15: Obecné reakční schéma přípravy sulfonových mimetik

Reakce byla prováděna v bezvodém prostředí a pod inertní atmosférou argonu. Do vychlazené směsi (0 °C) nově připraveného sirného derivátu (1 eq.) s dichlormethanem (0,1 M) byla přidána *m*CPBA (2 eq.). Reakce byla ponechána se ohřát na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Průběh byl kontrolován pomocí TLC (PE/EtOAc 1:1).

K reakční směsi byl přidán hydrogenuhličitan sodný a produkt byl vyextrahován do diethyl etheru. Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem chloridu sodného a následně vysušena pomocí bezvodého síranu sodného. Směs byla zfiltrována

a rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Výsledný produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie v elučním gradientu od 15:1 do 1:1 (PE/EtOAc).

3-methyl-5-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one (23)



Výtěžek: 9 %, žlutá olejovitá kapalina

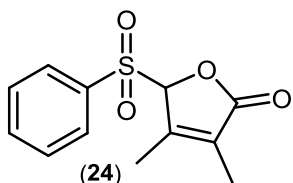
HPLC čistota: 75 %

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1.82 (s, 3H); 6.1 (p, $J = 1.83$ Hz, 1H); 6.94 (p, $J = 1.83$ Hz, 1H); 7.28 – 7.52 (m, 5H).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 10.6, 29.8, 85.8, 129.2, 130.2, 132.1, 134.1, 144.9, 172.8.

MS (ES+), m/z : 206.9 [M+1]

3, 4-dimethyl-5-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one (24)



Výtěžek: 39 %, bílá krystalická látka

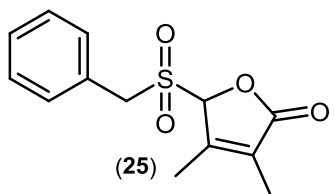
HPLC čistota: 95 %

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1.81 (s, 3H); 2.28 (s, 3H); 5.52 (s, 1H); 7.58 (t, $J = 7.79$ Hz, 2H); 7.71 (t, $J = 7.49$ Hz, 1H); 7.91 (d, $J = 7.95$ Hz, 2H).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 9.1, 13.4, 93.3, 129.4, 129.7, 135.1, 135.3, 150.6, 171.4.

MS (ES+), m/z : 252.78 [M+1]

5-(benzylsulfonyl)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-one (25)



Výtěžek: 4 %, žlutá olejovitá kapalina

HPLC čistota: 99 %

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1.91 (s, 3H); 2.09 (s, 3H); 4.29 (d, $J = 14.06$ Hz, 2H); 4.58 (d, $J = 14.06$ Hz, 2H); 5.34 (s, 1H); 7.41 – 7.49 (m, 5H).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 9.2, 13.2, 29.8, 58.8, 88.4, 126.8, 129.4, 129.6, 131.2, 150.1, 171.5.

MS (ES+), m/z : 266.9 [M+1]

2.3 Biologické testování

Pro testování klíčivosti byl použit standardizovaný biotest v Petriho miskách podle protokolu publikovaným v roce 1992 Mangnusem *et al.*

2.3.1 Sterilizace semen

Použitá semena rodu *Striga hermonthica* byla nejdříve sterilizována v roztoku chlornanu sodného (2 g aktivního chlóru/100 ml) a detergentu Tritonu X-100 (1% v/v). Po 5 minutách míchání byla semena z roztoku odstraněna pomocí filtrace přes fritu. Semena byla několikrát promyta destilovanou vodou a ponechána 3 h na vzduchu schnout.

2.3.2 Prekondicionování semen

Do Petriho misky byly vloženy dvě vrstvy filtračních papírů (9 cm v průměru) a navlhčeny 6 ml destilované vody. Na ně bylo umístěno 30 filtračních disků ze skelného vlákna o průměru 5 mm.

Semena byla rozložena na disky (cca 25 semen na disk), zakryta druhou vrstvou filtračních disků. Petriho misky byly uzavřeny parafilmem, vloženy do uzavíratelných polyethylenových sáčků a inkubovány ve tmě při 23 °C po dobu 2 týdnů.

2.3.3 Příprava roztoku stimulantu

Roztok stimulantu byl připraven z testované látky rozpuštěné v acetonu a doplněného destilovanou vodou na objem tak, aby vznikl zásobní roztok o koncentraci 10^{-6} mol/L s objemovým obsahem acetonu 0,1 % (v/v). Z takto připraveného roztoku byly postupným ředěním získány roztoky stimulantu o koncentracích 10^{-7} a 10^{-8} mol/L a objemovým obsahem acetonu 0,01 % respektive 0,001 % (v/v).

Negativní kontrolou byla destilovaná voda s objemovým obsahem acetonu 0,1 % a 0,001 % (v/v). Jako pozitivní kontrola sloužily roztoky látek GR-24 a NIJ-1 připravené stejným postupem jako testované látky.

2.3.4 Aplikace stimulantu

Po inkubaci byly disky vyjmuty, vyskládány na filtrační papír a ponechány na vzduchu schnout po dobu 2 hodin. Petriho misky byly vyčištěny a na ně umístěna nová dvouvrstva filtračních papírů (9 cm v průměru, 8 cm vnitřní průměr), která byla navlhčena 2 ml destilované vody. Vysušené disky se semeny byly vloženy doprostřed Petriho misky. Na ně bylo aplikováno 100 μ l připraveného roztoku stimulantu. Misky byly uzavřeny

a vloženy do polyethylenových sáčků. Semena byla inkubována ve tmě při 27 °C po dobu 6 dní.

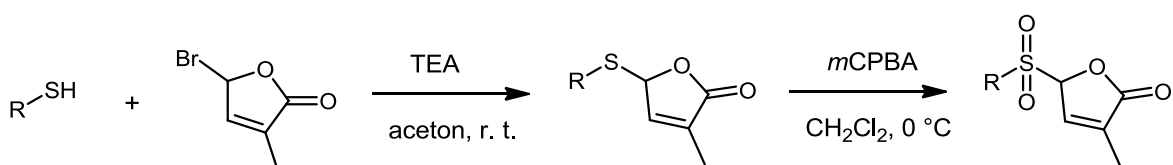
2.3.5 Hodnocení

Po inkubaci byla semena počítána pod binokulárním mikroskopem a bylo stanoveno procento klíčivosti.

VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Syntéza strigolaktonových mimetik

V experimentální části této bakalářské práce bylo připraveno 9 sirných strigolaktonových mimetik. Syntéza probíhala ve dvou krocích. V prvním kroku reagoval sirný derivát s brom butenolidem v přítomnosti báze (TEA) za laboratorní teploty. V kroku druhém byl tento nový sulfidový derivát oxidován pomocí kyseliny *meta*-peroxybenzoové při 0 °C za vzniku příslušného sulfonového derivátu (Obr. 16).



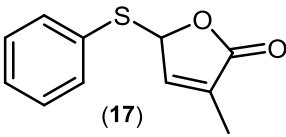
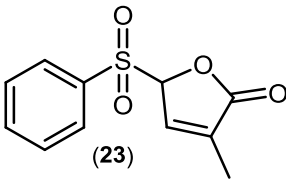
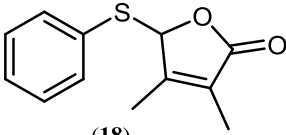
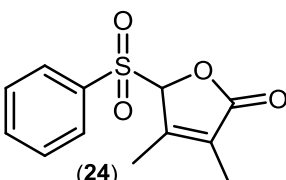
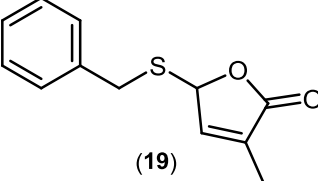
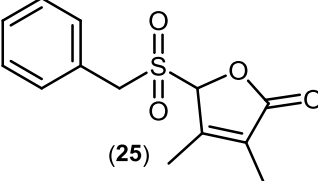
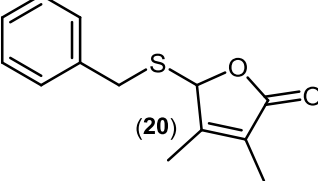
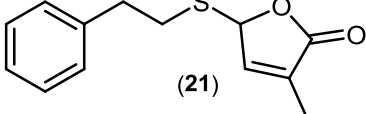
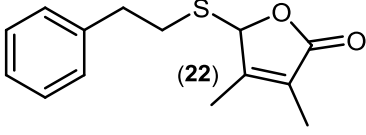
Obr. 16: Obecné schéma syntézy sulfidových a sulfonových butenolidů

U látek **23** a **25** byl postup syntézy upraven v porovnání s původním postupem (kap. 2.2.1). Prvním krokem byla příprava sulfidového derivátu, která byla provedena dle původního postupu, avšak reakční směs nebyla rozpuštěna ve vodě a extrahována do diethyl etheru, ale byl z ní pomocí vakuové odparky odpařen aceton. Takto zakonzentrovaná směs byla rozpuštěna v CH₂Cl₂, ochlazená a okamžitě k ní byla přidána *m*CPBA.

Tento zrychlený postup poskytl daleko nižší výtěžky (Tab. 2, produkty **23** a **25** versus **24**), ale zmenšil počet purifikačních kroků při porovnání s izolovanými výtěžky sulfidových prekurzorů (Tab. 2, produkty **17** a **20**). Je zřejmé, že optimalizace reakčních podmínek je nutná zejména v prvním kroku této syntézy.

Reakční výtěžnost jednotlivých sulfidových a sulfonových derivátů se mezi sebou značně liší (Tab. 2). Důvodem jsou doposud neoptimalizované reakční podmínky. Primárním cílem bylo tyto látky připravit v dostatečném množství pro jejich charakterizaci a otestování klíčivosti parazitických semen rodu *Striga* a *Orobanche* (celkem cca 5-7 mg).

Tab. 2: Reakční výtěžky sulfidových a sulfonových derivátů

Sulfidová mimetika	Výtěžek %	Sulfonová mimetika	Výtěžek %
 (17)	14	 (23)	9
 (18)	61	 (24)	39
 (19)	17	 (25)	4
 (20)	7		
 (21)	7		
 (22)	19		

3.2 Testování klíčivosti semen

U připravených látek **17-25** byla testována schopnost vyvolat klíčení semen rodu *Striga hermonthica* podle standardizovaného biologického testu (kap. 2.3).

Pro věrohodnost testu byla použita negativní kontrola destilované H₂O bez obsahu stimulantu, u níž ke klíčení nedošlo. Jako pozitivní kontrola byly použity látky NIJ-1 (**13**) a GR 24 (**10**). Klíčivost semen kontrolních látek odpovídá publikované literatuře pro danou roční dobu, ve které bylo testování prováděno (duben).

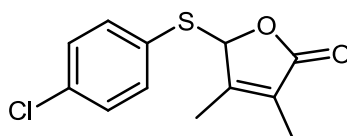
Ze všech připravených jednomethylových derivátů byl aktivní pouze derivát odvozený od thiophenolu (**17**), který při koncentraci 10⁻⁶ mol/L dosahoval klíčivosti 4,7 %. Ve srovnání s kontrolními látkami NIJ-1 (23,2 %) a GR 24 (55,8 %) jde bohužel o slabou

aktivitu (Tab. 3). Z dvoumethylových derivátů nebyl aktivní žádný. Tento výsledek odpovídá navrženému mechanismu působení SLs mimetik v rostlině (kap. 1.2.4.). V přítomnosti methylové skupiny na C-4 pozici nemůže dojít k předpokládané Michaelově adici na D-kruh, a tudíž není předán signál pro započnutí klíčení semene.

Tab. 3: Procentuální stanovení klíčivosti semen rodu *Striga hermonthica* po aplikaci stimulačních roztoků v koncentracích 10^{-6} , 10^{-7} a 10^{-8} mol/L.

Stimulant	% Klíčivost \pm SE		
	10^{-6} mol/L	10^{-7} mol/L	10^{-8} mol/L
GR 24	55,8 \pm 9,2	35,4 \pm 12	5,5 \pm 3,7
NIJ-1	23,2 \pm 5,5	15,1 \pm 0,4	1,3 \pm 1
17	4,7 \pm 0,2	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0

Přestože připravené látky vykazovaly minimální aktivitu v iniciaci klíčení, dá se jejich aktivita předpokládat v jiných oblastech působení strigolaktonů. Již dříve byl vytvořen strukturně podobný sirný derivát (**26**) (Obr. 17), který vykazoval vysokou účinnost v procesu inhibice větvení nadzemních částí rostlin. Bohužel tato látka nebyla nikdy testována na iniciaci klíčení semen parazitických rostlin rodu *Striga* a *Orobancha* (Boyer *et al.*, 2012).



sirný derivát (**26**)

Obr. 17: Vysoce aktivní sirný derivát

Lze se tedy domnívat, že by připravené látky **17-25** mohly inhibici taktéž způsobovat, a tím by mohly být dále využívány pro kontrolu stavby rostlinného těla.

Tyto mimetické deriváty budou taktéž testovány na semenech rostlin rodu *Orobanche*, u kterých by mohly vykazovat vyšší aktivitu v stimulaci klíčení oproti rostlinám rodu *Striga* (kap. 1.2.3).

ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byla vypracována rešerše na téma strigolaktony. V teoretické části byly stručně shrnuty dosavadní poznatky o významu strigolaktonů jakožto rostlinných hormonů, jejich strukturních variant a jejich účinku na parazitické rostliny rodu *Orobancha* a *Striga*. V praktické části bylo připraveno 6 sulfidových a 3 sulfonové mimetické deriváty, u kterých byla pomocí biotestu stanovena míra schopnosti vyvolat klíčení parazitických semen rodu *Striga hermonthica*.

Důvodem pro syntézu těchto látek byla jednoduchá syntéza a předpokládaná aktivita v procesu iniciace klíčení semen. Nejúčinnější látkou v biologickém testu byla látka **17** a to v koncentraci 10^{-6} mol/L. Ostatní testované látky neprokázaly žádnou aktivitu. Na základě strukturní podobnosti s již dříve připraveným sírným derivátem, účinným jako inhibítorem větvení nadzemních částí rostlin, se dá usuzovat podobná aktivita i u látek **17-25**.

Biotest založený na inhibici větvení mutantních rostlin hrachu je ve fázi příprav a všechny nově vytvořené mimetické deriváty budou dále podrobeny tomuto testování.

POUŽITÁ LITERATURA

- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S.** (2012) The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 355:1348-1351.
- Bebawi F. F., Eplee R. E., Harris C. E., Norris R. S.** (1984) Longevity of sitchweed (*Striga asiatica*) seed. *Weed Sci*, 32:494-497.
- Berner D. K., Cardwell K. F., Faturoti B. O., Ikie F. O., Williams O. A.** (1994) Relative roles of wind, crop seeds, and cattle in dispersal of *Striga* spp. *Plant Dis*, 78:402-406.
- Bouwmeester H. J., Matusova R., Zhongkui S., Beale M. H.** (2003) Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 6:358-364.
- Boyer F. D., de Saint Germain A., Pillot J. P., Pouvreau J. B., Chen V. X., Ramos S., Stévenin A., Simier P., Delavault P., Beau J. M., Rameau C.** (2012) Structure activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching. *Plant Physiol*, 159:1524-1544.
- Butler L. G.** (1995) Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and its crop host. A new dimension in allelochemistry. In: Inderjit K. M., Dakshimi M., Enhelling F. A. (eds.) Allelopathy, organisms, processes and applications, *American Chemical Society*, Washington, DC, 158-166.
- Ćavar S., Zwanenburg B., Tarkowski P.** (2014) Strigolactones: occurrence, structure, and biological activity in the rhizosphere. *Phytochem Rev*, DOI. 10.1007/s11101-014-9370-4.
- Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E., Egley G. H.** (1966) Germination stimulant of witchweed (*S. lutea* Lour): isolation and properties of a potential stimulant. *Science*, 54:1189–1190.
- Eplee R. E.** (1981) *Striga*'s status as a plant parasite in the United States. *Plant Disease*, 65:951-954.

- Goldwasser Y., Rodenburg J.** (2013) Integrated agronomic management of parasitic weed seed banks. In: Joel D. M., Gressel J., Musselman L. J. (eds.) *Parasitic Orobanchaceae – Parasitic mechanisms and control strategies*, Springer, 393-408.
- Hassanali A.** (1984) Strigol analogues: synthetic achievements and prospect. In: Ayensu E. S., Doggett H., Keynes R. D., Marton-Lefevre J., Musselman L. J., Parker C., Pickering A. (eds.) *Striga: biology and control*. ICSU Press, Paris, 125-132.
- Johnson A. W., Dowda G., Hassanali A., Knox J., Monaco S., Razawi Z., Rosebery G.** (1981) The Preparation of synthetic analogues of Strigol. *J Chem Soc, Perkin Trans. 1*, 1734–1743.
- Kgosi R. L., Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Murdoch A.** (2012) Strigolactone analogues induce suicidal seed germination of *Striga* spp. in soil. *Weed Research*, 52:197-203.
- Logan D. C., Stewart G. R.** (1991) Role of ethylene in germination of the hemiparasite *Striga hermonthica*. *Plant Physiol*, 97:1435-1438.
- 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.** (1992) Tentative molecular mechanisms for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by stigol and its synthetic analogues. *J Agric Food Chem*, 40:1066-1070.
- Matsui J., Bando M., Kido M., Takeuchi Y., Mori K.** (1999) Synthetic disproof of the structure proposed for alectrol, the germination stimulant from *Vigna unguiculata*. *Eur. J Org Chem*, 2195–2199.
- Matusova R., Rani K., Verstappen F. W., Franssen M. C., Beale M. H., Bouwmeester H. J.** (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol*, 139:920-934.

- Mori K., Matsui J., Bando M., Kido M., Takeuchi Y.** (1998) Synthetic disproof against the structure proposed for alectrol, the germination stimulant from *Vigna unguiculata*. *Tetrahedron Lett*, 39:6023–6026.
- 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 toward seeds of the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata*. *J Agric Food Chem*, 45:2273–2277.
- Parker C.** (2013) The parasitic weeds of the *Orobanchaceae*. In: Joel D. M., Gressel J., Musselman L. J. (eds.) *Parasitic Orobanchaceae – Parasitic mechanisms and control strategies*, Springer, 313-334.
- Parker C., Riches C. R.** (1993) *Parasitic weeds of the world: Biology and control*. CAB International, Wallingford, UK, 332.
- Proust H., Hoffmann B., Xie X., Yoneyama K., Schaefer D. G., Yoneyama K., Nogué F., Rameau C.** (2011) Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 138:1531-1539.
- Rodenburg J., Bastiaans L., Weltzien E., Hess D. E.** (2005) How can field selection for *Striga* resistance and tolerance in sorghum be improved? *Field Crop Res*, 93:34-50.
- Runyon J. B., Tooker J. F., Mescher M. C., De Moraes C. M.** (2009) Parasitic plants in agriculture: chemical ecology of germination and host-plant location as targets for sustainable control: a review. In: Lichtouse E. (ed.) *Sustainable agriculture reviews*, Springer, 123-126.
- Ruyter-Spira C., Al-Babili S., van der Krol S., Bouwmeester H.** (2012) The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci*, 18:72-83.
- Siame B. A., Weerasuriya Y., Wood K., Ejeta G., Butler L. G.** (1993) Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica* from host plants. *J Agric Food Chem*, 41:1486–1491.
- Thuring J. W.** (1996) Synthesis and bioactivity of germination stimulants for the seeds of parasitic weeds a molecular study. Nijmegen, 1-4.

Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. (2010) The Strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol*, 48:93–117.

Yoneyama K., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. (2013) Induction of germination. In: Joel D. M., Gressel J., Musselman L. J. (eds.) *Parasitic Orobanchaceae – Parasitic mechanisms and control strategies*, Springer, 172.

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. In: Pieterse A. H., Verkleij J. A. C., 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.

Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Reizelman A., Anilkumar G., Sethumadhavan D. (2009) Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag Sci*, 65:478-491.