

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Centrum regionu Haná pro biotechnologický
a zemědělský výzkum**

Strigolaktonová analoga s purinovým skeletem

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Martin Cukr**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martin Cukr
Název práce	Strigolaktonová analoga s purinovým skeletem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Tato práce pojednává o problematice strigolaktonů. Je zejména zaměřena na jejich význam při stimulaci růstu parazitických rostlin rodů <i>Striga</i> a <i>Orobanche</i>. V teoretické části jsou však shrnuty základní poznatky o působení strigolaktonů jak vzhledem k parazitickým rostlinám, tak i jejich vliv na růst a fylogenezi rostlin. Není opomenut ani jejich vliv na symbiózu rostlin s AM houbami. Druhá polovina práce je zaměřena na syntézu strigolaktonových analog na bázi purinu.</p>
Klíčová slova	Strigolaktony, parazitické rostliny, <i>Striga</i> , <i>Orobanche</i> , Strigolaktonová analoga
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Martin Cukr
Title of thesis	Strigolactones analogue with purine skeleton.
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>This work is dealing with problematics of strigolactones. In theoretical part is showed the brief overview of strigolactones structures, their biosynthesis and the mechanism of interaction with the plant as well as theirs effect on plant's growth and physiology. Also there is discussed relationship of strigolactones and arbuscular mykorrhiza fungi and their role during germination of parasitics plants of genus <i>Striga</i> and <i>Orobanche</i> . . In the practical part is this work focused on synthesis of novel strigolactone analogues containing purine heterocycles within theirs structure.</p>
Keywords	Strigolactones, parasitic weeds, <i>Striga</i> , <i>Orobanche</i> , Strigolactones analogue
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Tomáše Pospíšila, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci 3. srpna 2016

.....

Na tomto místě bych chtěl poděkovat Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D., vedoucímu této práce, za jeho cenné rady, bez kterých by tato práce nevznikla, za ochotu a trpělivost a také za jeho čas, který mnohdy obětoval na úkor svého volna.

Také bych chtěl poděkovat celému kolektivu laboratoře organické syntézy Centra Regionu Haná za jejich rady, pomoc a pozitivní atmosféru.

Za finanční podporu děkuji univerzitnímu grantu IGA_PrF_2016_011.

OBSAH

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část	11
2.1 Růstové regulátory	11
2.2 Přírodní strigolaktony.....	11
2.2.1 Struktura.....	11
2.2.2 Objev strigolaktonů.....	11
2.2.3 Arbuskulární mykorhizní houby.....	12
2.2.4 Vliv strigolaktonů na kořenový vzrůst	12
2.2.5 Vliv strigolaktonů na nadzemní růst rostlin.....	13
2.3 Syntetické strigolaktony	14
2.3.1 Strigolaktonové analoga	15
2.3.2 Strigolaktony jako potenciální léčiva	16
2.3.3 Strigolaktonová mimetika.....	16
2.4 Biosyntéza strigolaktonů	17
2.5 Mechanismus interakce	18
2.6 Parazitické rostliny	19
2.6.1 Mechanismus indukce klíčení parazitických semen.....	22
3 Experimentální část.....	23
3.1 Materiál a metody.....	23
3.1.1 Chemikálie	23
3.1.2 Přístroje a vybavení	23
3.1.3 Metody	24
3.2 Postupy syntézy	25
3.2.1 Příprava derivátů odvozených od anhydridů	25
3.2.2 Příprava derivátů bromacetonitrilu	26
3.2.3 Příprava derivátů kyseliny malonové	27
3.2.4 Příprava derivátů bromoctové kyseliny	28
3.2.5 Příprava derivátů chloroctové kyseliny	29
3.3 Výsledky.....	32
3.4 Diskuze	38
3.4.1 Příprava derivátu kyseliny (50).....	38
3.4.2 Příprava derivátů acetonitrilu (51).....	40

3.4.3	Příprava derivátů s využitím bromoctové kyseliny (52).....	42
3.4.4	Příprava derivátů s využitím malonové kyseliny (52).....	44
3.4.5	Příprava derivátů s využitím chloroctové kyseliny (52).....	45
4	Závěr	48
5	Seznam použité literatury	49

Seznam použitých zkratek

AcN – acetonitril

AM – arbuskulární mykorhiza

BAP – benzylaminopurin

CCD7 – karotenoidní dioxygenasa 7

CCD 8 – karotenoidní dioxygenasa 8

CDCl₃ – deuterovaný chloroform

d – dublet

D27 – β-karoten izomerasa

DCM – dichlormethan

DIBAL – diisobutylaluminiumhydrid

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

Eq – ekvivalent

ES+ – ionizace pomocí elektrospreje

Et₃N – triethylamin

EtOAc – ethylacetát

EtOH – ethanol

HPLC – vysoceúčinná kapalinová chromatografie

J – štěpící konstanta

m – multiplet

MeOH – methanol

MS – hmotnostní spektrometrie

MW – mikrovlnný reaktor

NMR – nukleární magnetická rezonance

P450 MAX 1 – enzym patřící do rodiny P450

PDR1 – druh transportéru přes membránu

PE – petrolether

ppm – parts per milion

q – kvartet

rt – pokojová teplota

s – singlet

SL – strigolakton

spp. – druh

t – triplet

TBAF – tetra-n-butylamonium fluorid

*t*Bu OK – *terc* butoxid draselný

THF – tetrahydrofuran

TLC – tenkovrstvá kapalinová chromatografie

δ – chemický posun

1. Úvod

Strigolaktony (SL) jsou nejmladší skupinou rostlinných hormonů. Pro své potencionální zemědělské a medicínské využití jsou hojně zkoumány. Vzhledem k jejich obtížné izolaci je snaha o vytvoření nových syntetických sloučenin, tzv. strigolaktonových analog a mimetik.

Strigolaktony jakožto rostlinné hormony ovlivňují růst rostlin v malých koncentracích. Během studií v posledních několika desetiletích bylo prokázáno, že SL stimulují růst parazitických rostlin rodů *Striga* a *Orobancha*. Také bylo zjištěno, že iniciují větvení hyf arbuskulárních mykorhizních hub, urychlují senescenci listů, ovlivňují větvení kořenů a vzrůst axilárních pupenů.

Cílem této práce je sepsání rešerše na téma strigolaktonů, se zaměřením na jejich vliv na fylogenezi a vývoj rostliny. V práci jsou také shrnuty poznatky o vztahu SL, parazitických rostlin a arbuskulárních mykorhizních hub. Je zde popsána biosyntéza SL a syntéza strigolaktonových analog a mimetik. Praktická část je zaměřena na syntézu strigolaktonových analog na bázi purinu.

2. Teoretická část

2.1 Růstové regulátory

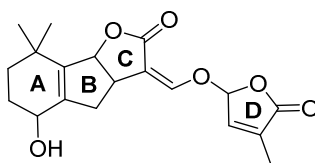
Růst rostlin ovlivňuje velké množství různých látek, z nichž jednou z nejdůležitějších skupin jsou rostlinné hormony. Do této skupiny lze zařadit auxiny, cytokininy, gibberiliny, brassinosteroidy, kyselinu abscisovou, ethylen a strigolaktony.

Rostlinné hormony, tzv. fytohormony ovlivňují růst rostlin ve velmi nízkých koncentracích (10^{-9} mol/l). Jsou transportovány pomocí cévních svazků, případně volnou difúzí mezi buňkami. Stejně jako živočišné hormony nepůsobí v místě vzniku. Na rozdíl od nich nemají vyhrazené místo účinku, jsou tedy nespecifické. Jejich účinek je často podmíněn kooperací několika hormonů.

2.2 Přírodní strigolaktony

2.2.1 Struktura

Základem všech přírodních SL je tricyklický lakton (tzv. ABC kruh), který je substituován různými substituenty. Jediným společným substituentem je α,β -nenасыcený furanon (tzv. D kruh), který je připojen k základnímu skeletu pomocí enol-etherové vazby (Obrázek 1) (Čavar et al., 2015).



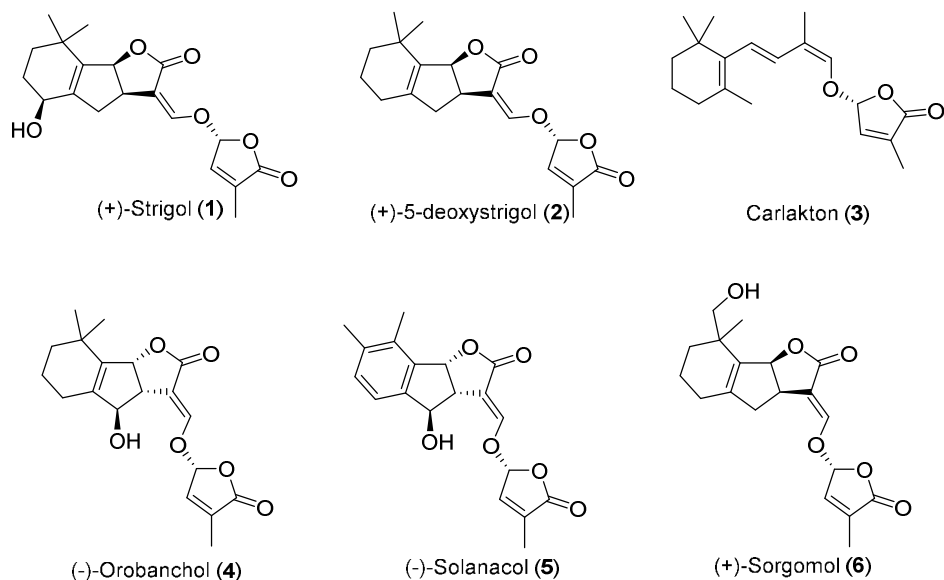
Obrázek 1: Obecné schéma strigolaktonu.

V současné době je známo bezmála 20 přírodních SL (Čavar et al., 2015). Odhaduje se, že rostlina dokáže syntetizovat několik desítek SL (Xie et al., 2010), ovšem my jsme schopni detekovat pouze některé z nich, neboť vzhledem k jejich nestabilitě může dojít k jejich rozkladu při izolaci a purifikaci (Čavar et al., 2015). Také se předpokládá, že jsme schopni detekovat pouze sloučeniny vyskytující se ve větším množství (Dvořáková and Vaněk, 2015).

2.2.2 Objev strigolaktonů

První sloučenina ze skupiny strigolaktonů byla izolována již roku 1966, kdy ji Cook a spol. izolovali z kořene bavlníku (*Gossypium* spp.) a dali jí triviální název Strigol.

Zjišťovali, která z látek bavlníku iniciuje klíčení parazitických rostlin (rodů *Striga* a *Orobanche*) přičemž zjistili, že to jsou právě strigolaktony (Cook et al., 1966). Příklady přírodních strigolaktonů jsou ukázány na obrázku 2.



Obrázek 2: Některé z přírodních strigolaktonů.

2.2.3 Arbuskulární mykorhizní houby

Roku 2005 byl popsán vztah strigolaktonů a arbuskulárních mykorhizních hub (AM hub). Pomocí biotestu se štírovníkem japonským (*lotus japonicus*) byl popsán 5-deoxystrigol jako induktor větvení hyf AM hub (Akiyama et al., 2005). O rok později bylo popsáno, že stimulace klíčení spor je založena na aktivaci energetického metabolismu v mitochondriích AM hub (Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008).

Arbuskulární mykorhizní houby jsou skupinou hub, která asociuje s kořeny většiny suchozemských rostlin. Tato interakce je výhodná jak pro rostlinu, tak pro samostatnou houbu. Houba dodává rostlině základní živiny jako fosforečnany, dusičnany a další minerály z půdy, kdežto na oplátku obdrží některé z produktů fotosyntézy rostliny (van der Heijden et al., 1998; Akiyama and Hayashi, 2006).

2.2.4 Vliv strigolaktonů na kořenový vzrůst

Některé vědce zaujala skutečnost, že SL jsou detekovány i u nemykotrofitických rostlin, např. u *Arabidopsis thaliana* (Goldwasser et al., 2008). Nejen z tohoto důvodu se očekávalo, že tyto látky budou mít i jiné vlivy na rostliny.

Koncem roku 2008 byla popsána role SL jako endogenních regulátorů růstu rostlin a to rovnou dvěma nezávislými skupinami. Roldan a spol. zjistili, že SL inhibují větvení kořenových výhonků. Skupina prof. Umehary zjistila stejné informace. Taktéž vyslovili domněnku, že SL ovlivňují nadzemní růst rostlin a komunikaci mezi sousedními rostlinami. (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008).

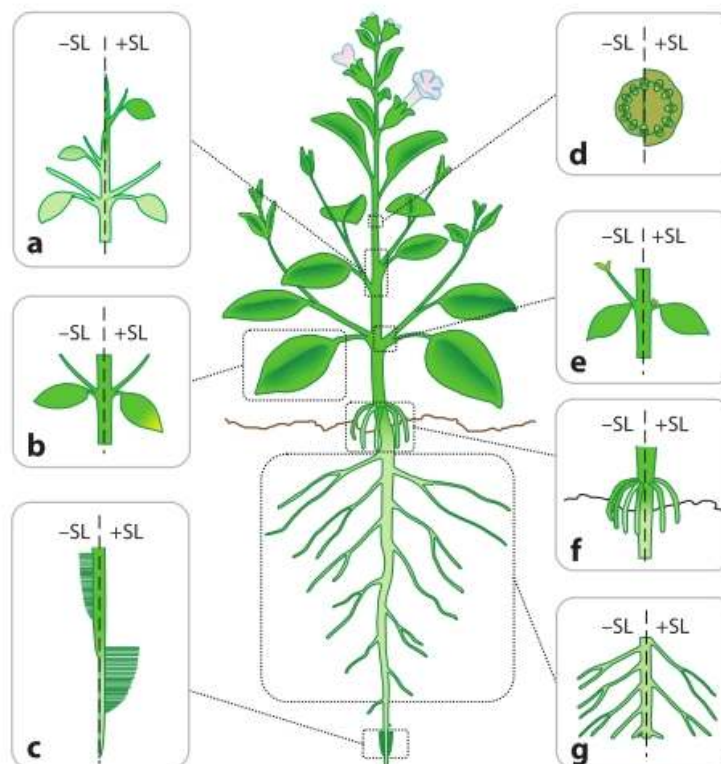
Informaci, že nedostatek SL zkracuje primární kořeny a naopak zvyšuje hustotu laterálních kořenů potvrdily roku 2011 dvě nezávislé skupiny vědců (Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011). Stejněho roku bylo zjištěno, že strigolaktony stimulují větvení kořenových vlásků (Kapulnik et al., 2011). O rok později bylo popsáno, že inhibují růst nahodilých kořenů (Kohlen et al., 2012).

Kořenový vzrůst je kontrolován na základě vlivu SL na transport auxinů (Crawford et al., 2010).

2.2.5 Vliv strigolaktonů na nadzemní růst rostlin

Již roku 2001 bylo zjištěno, že strigolaktony inhibují růst axilárních pupenů (Foo et al., 2001). O čtyři roky později bylo popsáno, že urychlují stárnutí listů, tedy listovou senescenci (Snowden et al., 2005). Jejich stimulatívni účinky na druhotné tloušťnutí rostlin bylo popsáno roku 2011 (Agusti et al., 2011). O dva roky později bylo zjištěno, že nezávisle na giberelinech pozitivně ovlivňují délku internodií (de Saint Germain et al., 2013).

Funkce SL na růst rostlin jsou neustále ve stádiu výzkumu. Některé výzkumy se zabývají vztahem SL a makro či mikro prvků. Během posledních deseti let se vědci zabývají také vztahem SL a dusíku či fosforu. Je zkoumáno, zda má nedostatek fosforu a dusíku vliv na exsudaci SL, tedy na jejich uvolňování (Yoneyama et al., 2007a; Yoneyama et al., 2007b). Bylo zjištěno, že luštěniny schopné symbiózy s hlízkatými bakteriemi, které jsou schopné na základě této symbiózy dusík získat, mají produkci SL závislou pouze na nedostatku fosforu. Naopak u zbylých rostlin, které mohou být např. závislé na AM houbách, je exsudace SL stimulována nedostatkem dusíku i fosforu (Yoneyama et al., 2012).



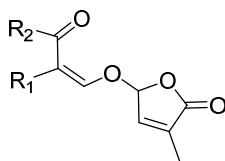
Obrázek 3: Vliv SL na rostlinu. Stimulace růstu internodií (a), urychlení listové senescence (b), stimulace větvení kořenových vlásků a růst primárních kořenů (c), druhotné tloustnutí (d), inhibice růstu axilárních pupenů (e), inhibice růstu nahodilých (f) a postranních (g) kořenů (převzato z *Al-Babili and Bouwmeester, 2015*).

2.3 Syntetické strigolaktony

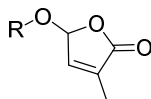
Izolace přírodních SL je přístrojově i technicky velmi náročná. Na izolaci 300 µg alectrolu bylo použito 300 000 rostlin Vigny čínské (*Vigna unguiculata*) (Mori et al., 1998). Přestože současná doba umožňuje lepší technické možnosti, stále není jednoduché přírodní SL izolovat. Syntéza přírodních strigolaktonů není taktéž jednoduchá, neboť obsahují velké množství chirálních center. Na základě těchto důvodů je snaha o syntetické deriváty SL, jejichž syntéza může být levnější. Velkou výhodou syntetických derivátů mohou být jejich potencionálně lepší vlastnosti. Tyto deriváty mohou mít lepší biologickou aktivitu, ale především mohou být stabilnější (Zwanenburg et al., 2009). Přírodní SL totiž velmi snadno podléhají hydrolýze a tudíž se rozkládají ve vodném prostředí (Mangnus and Zwanenburg, 1992).

Podle přítomnosti enol-etherové vazby dělíme syntetické deriváty na strigolaktonová analoga (Obrázek 4) a mimetika (Obrázek 5). Analoga mají enol-etherový můstek ve své struktuře, stejně jako D-kruh, zachovaný, je zde pozměněn

pouze ABC skelet. Oproti analogům u mimetik můstek není zachován, základem jejich molekuly je D-kruh.



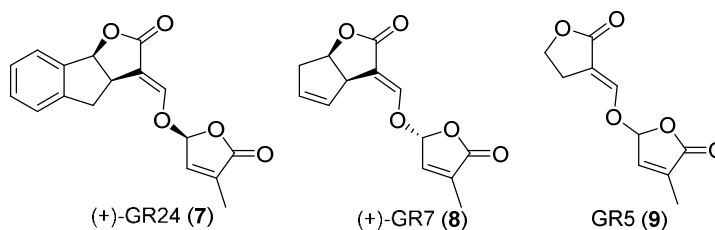
Obrázek 4: Obecné schéma Strigolaktonového analoga.



Obrázek 5: Obecné schéma strigolaktonového mimetika.

2.3.1 Strigolaktonové analoga

Jak již bylo zmíněno výše, strigolaktonové analoga mají ve své struktuře zachován zbytek C kruhu, enoetherový můstek a D kruh. Jedním z prvních syntetických strigolaktonů se stala sloučenina GR24. V této struktuře je pozměněn pouze A kruh. Další z uměle připravených strigolaktonů je struktura GR7, u které je celý A kruh odstraněn. V případě odstranění B kruhu vzniká struktura GR5. Většina z GR struktur vykazuje téměř stejnou biologickou aktivitu jako přírodní strigolaktomy. Na základě přípravy těchto struktur se očekává, že aktivní částí molekuly je právě enoetherový můstek a D kruh (Zwanenburg et al., 2016).



Obrázek 6: Struktura strigolaktonových analog GR24, GR7 a GR5.

Nejvíce se do podvědomí vědců, zabývajících se touto problematikou, dostala struktura GR24, neboť se stala standardem pro veškeré biotesty (Mangnus and Zwanenburg, 1992). GR24 bylo poprvé syntetizováno roku 1981 (Johnson et al., 1981). Syntéza vychází z 1-indanonu (**10**), který je poté konvertován na 1-oxoindanyloctovou kyselinu (**11**). Ta je následně redukována až na ABC skelet (**12**), ke kterému je poté připojen D kruh (Schéma 1). Od této doby byly popsány další tři metody přípravy GR24 (**7**) (Mangnus et al., 1992; Wigchert et al., 1999; Malik et al., 2010).

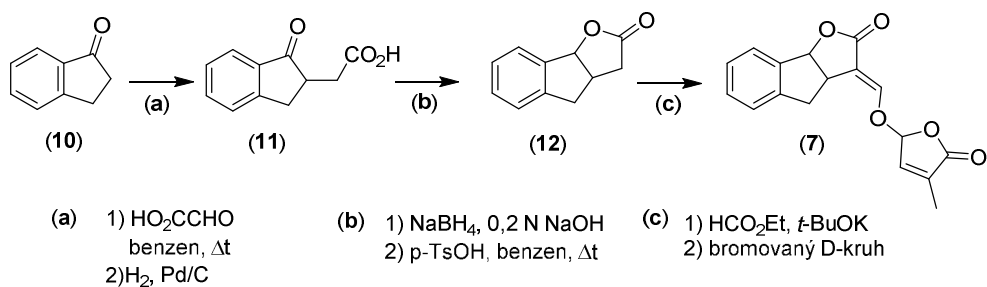
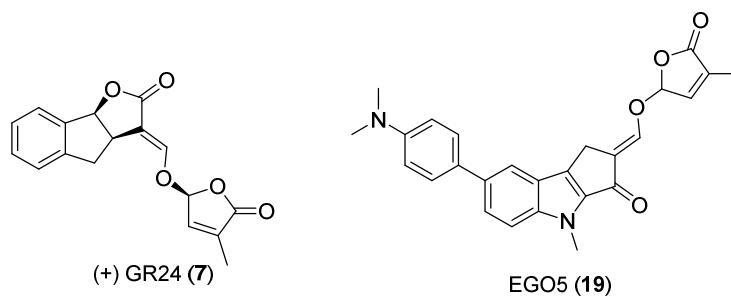


Schéma 1: Obecné schéma přípravy GR24 (Johnson et al., 1981).

2.3.2 Strigolaktony jako potenciální léčiva

Příprava syntetických derivátů otevřela nové možnosti výzkumu strigolaktonů. Roku 2012 byly SL poprvé testovány jako potencionální léčiva rakoviny. Bylo testováno několik syntetických strigolaktonových analog (Obrázek 7: Některé ze SL analog testovaných na proliferaci buněk.) u kterých se prokázala schopnost inhibice proliferace buněk. Dále byla publikována schopnost těchto strigolaktonů indukovat apoptózu buněk prsního karcinomu (Pollock et al., 2012). O dva roky později byly tyto informace doplněny a byla publikována schopnost SL inhibovat růst nádorových linií plic, prostaty, tlustého střeva, ale také melanomu, osteosarkomu a leukémie (Pollock et al., 2014). Nejnovější studie ukazují schopnost SL indukovat poškození DNA a inhibovat její opravy (Croglia et al., 2016).



Obrázek 7: Některé ze SL analog testovaných na proliferaci buněk.

2.3.3 Strigolaktonová mimetika

Druhou skupinou syntetických strigolaktonů jsou mimetika. Tyto látky ve své struktuře obsahují D kruh substituovaný různými zbytky. V současné době byly připraveny dvě skupiny mimetik., jedny obsahující fenoxyskupinu alkylovanou na D kruhu, tzv. debranony a druhé, které ve své struktuře obsahují aryloxy skupinu. Zajímavé je, že debranony nemají téměř žádnou aktivitu v klíčení parazitických

semen, ovšem ve velké míře ovlivňují nadzemní růst rostliny. Mimetika obsahující aryloxy skupinu jsou, co se týče iniciace klíčení parazitických semen, obdobně aktivní jako GR24 (Fukui et al., 2011; Zwanenburg and Mwakaboko, 2011). Syntéza mimetik spočívá v substituci bromovaného D kruhu (Schéma 2).

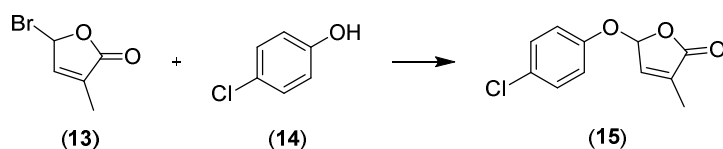


Schéma 2: Obecné schéma přípravy strigolaktonových mimetik (Fukui et al., 2011).

2.4 Biosyntéza strigolaktonů

Jak již bylo zmíněno výše, rostlinné hormony skupiny strigolaktonů se skládají z ABC skeletu a D – kruhu připojeného přes enoletherový můstek. Samotná biosyntéza (Schéma 3) této struktury byla objasněna během posledního desetiletí a to pokusy *in vitro* i *in vivo* (Seto et al., 2014).

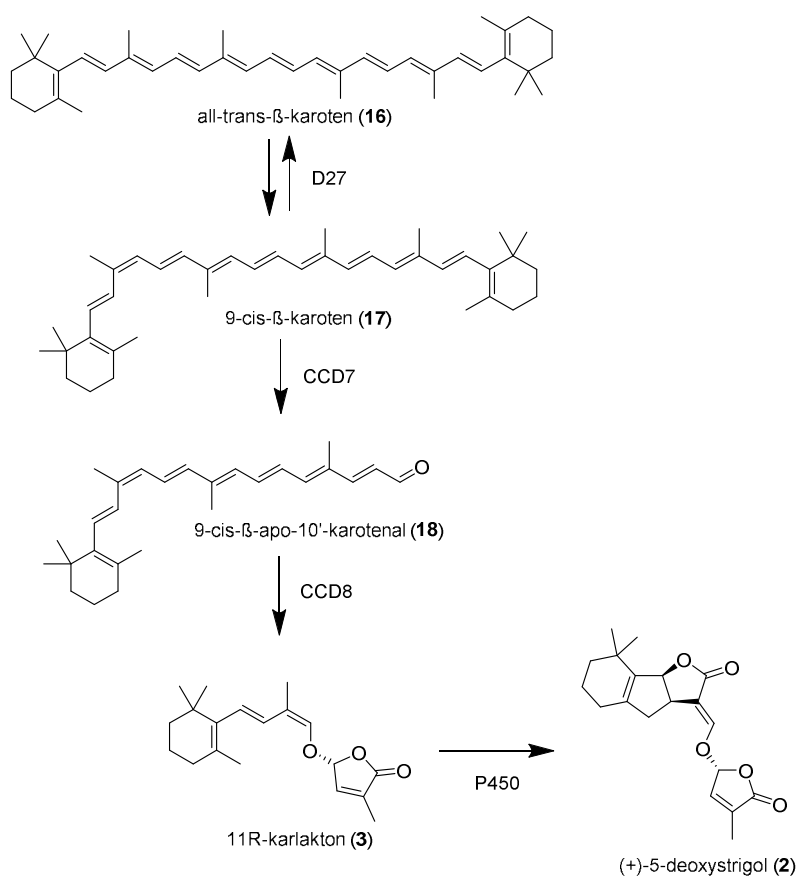


Schéma 3: Biosyntéza strigolaktonů. Nejdříve dochází k izomeraci karotenu za pomoci D27, poté za katalýzy dioxygenás (CCD7, CCD8) ke vzniku karlaktonu. Ten je poté za katalýzy cytochromu P450 konvertován na 5-deoxystrigol.

Biosyntéza probíhá v rostlinných kořenech, odkud jsou SL uvolňovány do ostatních pletiv (Akiyama et al., 2010). Na základě pokusů s karotenoidními mutanty kukuřice (*Zea mays*) a s inhibitory izoprenoidní biosyntetické cesty bylo prokázáno, že SL vznikají z karotenoidů (Matusova et al., 2005). Později byly popsány také meziprodukty a enzymy podílející se na biosyntéze. Hlavní roli při štěpení karotenoidu (**16**) na karlakton (**19**) mají dioxygenázy CCD 7, CCD 8 (Umehara et al., 2008) a karotenoid izomeráza D27 (Seto et al., 2014). Karlakton (**19**) je poté přeměněn na 5-deoxystrigol (**2**) za pomoci cytochrom P450 (Scaffidi et al., 2013).

2.5 Mechanismus interakce

Mechanismus interakce strigolaktonů s receptorem dosud nebyl přesně prozkoumán a není zcela jasný. V současné době existují dvě teorie, jak by strigolaktony mohly s receptorem interagovat (Dvořáková and Vaněk, 2015).

První z těchto mechanismů je navržen pro přirozené strigolaktony a pro analoga. Na základě reakce GR24 s nukleofilem předpokládá, že dochází k Michaelisově adici nukleofilu na enol-etherovou vazbu. Na základě této reakce dochází k eliminaci D-kruhu (Schéma 4). Tato teorie byla navržena již roku 1992. (Mangnus and Zwanenburg, 1992).

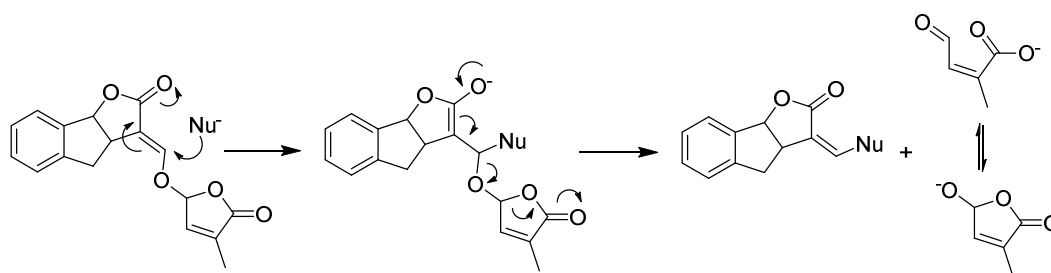


Schéma 4: Michaelisova adice nukleofilu na enol-etherovou vazbu GR24.

Druhý mechanismus byl navržen téměř o dvě dekády let později a to pro mimetika. Tento mechanismus je založen na adici nukleofilu na D-kruh (konkrétně na pozici C3), přičemž dochází k eliminaci D-kruhu na pozici C2 (Schéma 5 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) (Zwanenburg and Mwakaboko, 2011).

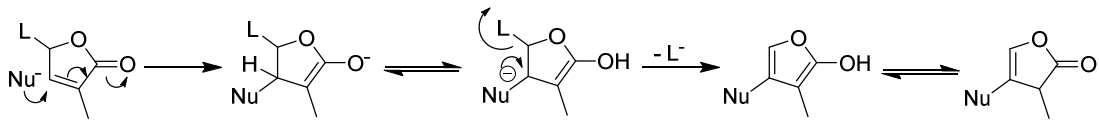
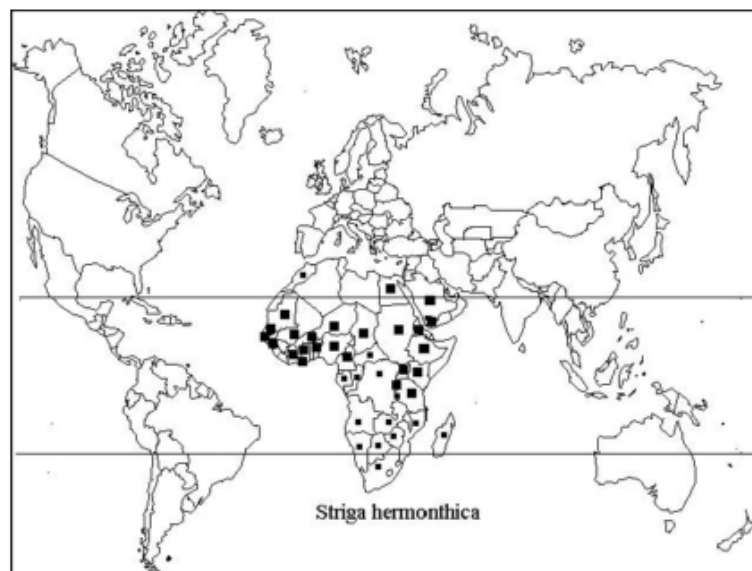


Schéma 5: Nukleofilní adice na C3 pozici D-kruhu (L představuje dobře odstupidelnou skupinu).

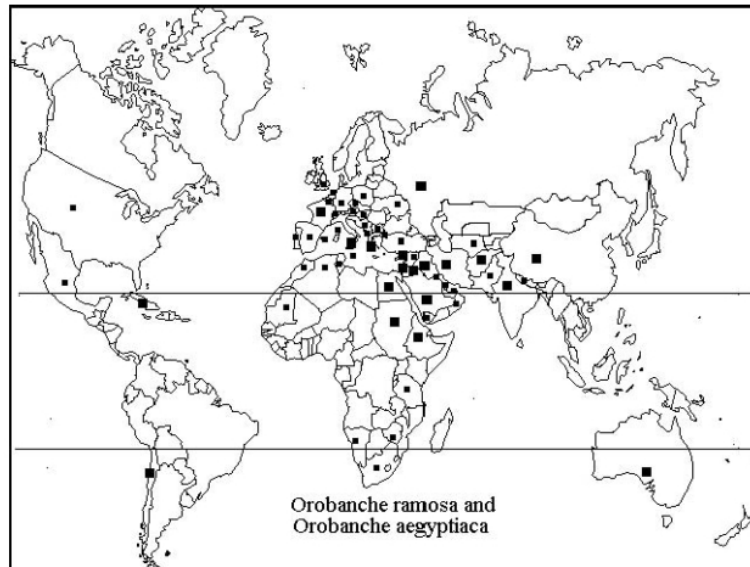
2.6 Parazitické rostliny

Jednou z nejzávažnějších biologických hrozeb, co se týče celosvětové potravy, jsou parazitické rostliny rodů *Striga*, *Orobanche*, *Alectra* a *Phelipanche* (Artuso et al., 2015). Jedná se o rody rostlin, které parazitují na zemědělsky významných plodinách, *Striga spp.* především na obilovinách (kukuřice, rýže, pšenice, žito), *Orobanche spp.* na luštěninách (čočka, fazole, hrášek, vikev) či na rajčatech, bramborech, tabáku a konopí (Humphrey et al., 2006; Rubiales et al., 2009; Zwanenburg et al., 2009).

Škody na zemědělských plodinách mnohdy bývají pro zemědělce mnohdy fatální, ztráty přesahují 7 miliard dolarů ročně (Rubiales et al., 2009). *Striga spp.* se nejvíce vyskytuje na území Afriky a Asie, nicméně některé druhy byly popsány i na území Ameriky (Obrázek 8). *Orobanche spp.* se kromě *Strigou* postižených oblastí vyskytuje také na území Evropy (Obrázek 9) (Parker, 2012).

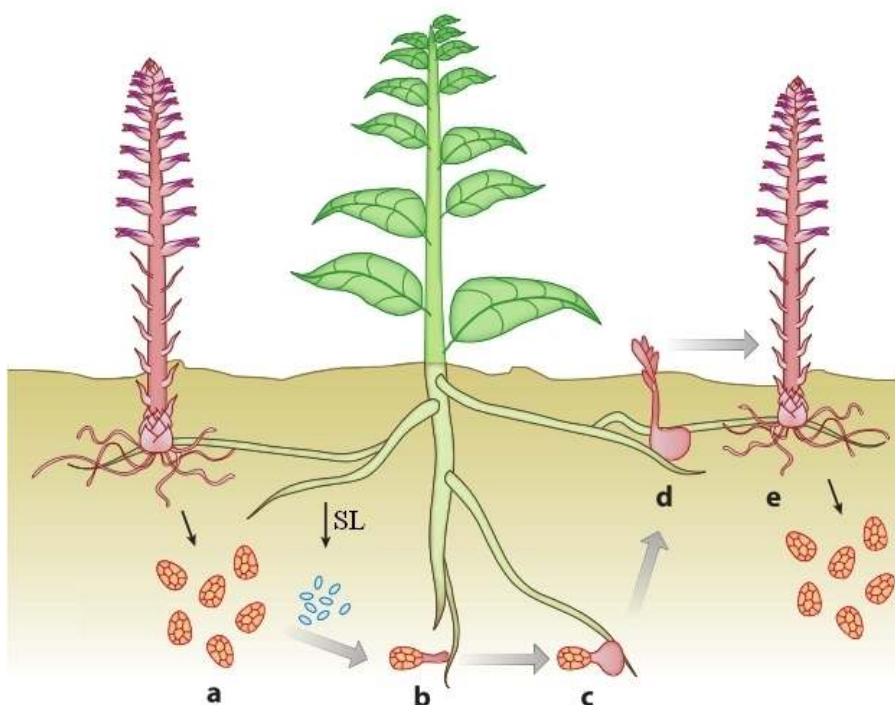


Obrázek 8: Světová distribuce *S. hermotica*. Čtvercové znaky znázorňují postižené země, čím větší je znak, tím větší jsou ztráty na zemědělsky významných plodinách (převzato z Parker, 2012).



Obrázek 9: Světová distribuce *O. ramosa* a *O. aegyptiaca*. Čtvercové znaky znázorňují postižené země, čím větší je znak, tím větší jsou ztráty na zemědělsky významných plodinách (převzato z Parker, 2012).

Ačkoliv *Striga* a *Orobanche* jsou odlišné rody parazitů a napadají odlišné plodiny na různých koutech světa, tak mají velmi podobný životní cyklus (Bouwmeester et al., 2003). Právě životní cyklus (Obrázek 10) je jejich velkou zbraní a pro nás tak velkou hrozbou. Ročně produkují několik desítek tisíc drobných a velmi odolných semínek, které čekají v půdě na vhodný čas k vyklíčení. Za nepříznivých podmínek zde dokáží přežít řadu let (Butler, 1995; Humphrey et al., 2006). Klíčení je iniciováno tzv. stimulantem klíčením, kterým jsou právě SL uvolňované hostitelskou rostlinou (Cook et al., 1966). Hostitelská rostlina uvolňuje SL do rhizosféry, ty stimulují parazitické rostliny k vyklíčení. Ihned po vyklíčení se pomocí speciálních orgánů, tzv. haustorií parazité napojí na hostitelskou rostlinu a čerpají z ní živiny, asimiláty a vodu potřebnou ke svému růstu, tím dochází k poškození hostitelské rostliny, dochází ke snížení výnosu, rostlina je oslabená a hrozí její úhyn (Butler, 1995).



Obrázek 10: Životní cyklus parazitických rostlin. Nejdříve dojde k uvolnění semen parazitických rostlin (a). V případě, že se v okolí vyskytuje rostlina uvolňující do půdy strigolaktony dojde k jejich vyklíčení (b), k následnému napojení na hostitelskou rostlinu (c) a k růstu (d). Postupem času dorůstá nová rostlina (e) (upraveno z Xie et al., 2010).

Parazitů je obtížné se zbavit, neboť poškozují hostitelské rostliny ihned po vyklíčení. Klasické pletí je neúčinné, protože k němu dochází v čase, kdy parazitům vyrůstají nadzemní části a to jsou již hostitelské rostliny poškozené (Bouwmeester et al., 2003).

Jako velmi účinná metoda se ovšem jeví tzv. sebevražedné klíčení. Tato metoda využívá jedné z mála slabin těchto rostlin a to, že po vyklíčení mají jen několik málo dnů na napojení se na hostitelské rostliny, v opačném případě dochází k jejich úhynu. Proto jsou snahy o aplikaci SL do půdy, kdy dojde k vyklíčení parazitů a v případě absence hostitelské rostliny k jejich následnému úhynu. Teprve poté se na ošetřenou půdu zasejí zemědělsky významné plodiny (Kgosi et al., 2012).

Strigolaktony mají velký potenciál, neboť se jedná o sloučeniny přirozeně se vyskytující v rhizosféře (Cook et al., 1966). Ovšem je nutné zmínit, že zatím nebyla nalezena dostatečně neselektivní sloučenina, která by stimulovala klíčení všech rodů parazitických rostlin (Čavar et al., 2015).

2.6.1 Mechanismus indukce klíčení parazitických semen

Očekává se, že klíčení parazitických semen je iniciováno napojením SL na receptorový protein (Reizelman et al., 2003). Nalezení struktury proteinu byla velká výzva, neboť by mohla objasnit mechanismus působení strigolaktonů. Některé skupiny vědců se snažily připravit fluorescenční deriváty SL (Anne Beveridge et al., 2010; Prandi et al., 2013) a pomocí nich následně identifikovat receptorový protein avšak touto cestou se heledaný protein nepodařilo nalézt.

Nakonec bylo uvažováno, že strigolaktonů by mohli mít podobný mechanismus působení jako gibbereliny. Pomocí rentgenové strukturní analýzy, kdy zjištěno že GID1 a D14 jsou si podobné. A tudíž byl protein D14 vybrán za kandidáta dalšího výzkumu. Bylo popsáno, že D14 obsahuje katalytickou triádu Ser-His-Asp (Nakamura et al., 2013), kdy tato triáda odštěpuje hydroxy D kruh (D-OH) ze strigolaktonů. Tento strigolaktonový zbytek (D-OH) pak interaguje v kavitě s proteinem způsobí změnu jeho konformace. Změna konformace spouští celou řadu procesů vedoucích až k degradaci represoru (Kagiyama et al., 2013; Nakamura et al., 2013; Zhao et al., 2013). V případě parazitických rostlin nebyl receptorový protein doposud izolován, ovšem předpokládá se jeho podobnost s proteinem DL14.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Pro syntézu byly použity tyto chemické látky nakoupeny od firmy Sigma Aldrich: triethylamin $\geq 99,5\%$, 6-chloropurin $\geq 99\%$, benzylamin 99% , bromacetonitril 97% , uhličitan draselný $99,995\%$, terc-butoxid draselný $\geq 98\%$, ethylformiát $\geq 98\%$, brom $99,99\%$, diethylester kyseliny malnové 99% , DIBAL, hydroxid sodný $\geq 85\%$, tetrahydroboritan sodný 90% , lithiualuminium hydrid 95% , 1M TBAF v THF, chlorid sodný $\geq 99\%$, síran sodný $\geq 99\%$, ethylbromacetát $\geq 98\%$, methylformiát $\geq 97\%$, dimethylsulfát $\geq 99\%$, anhydrid kyseliny izomáselné 97% , anhydrid kyseliny benzoové $\geq 95\%$, vanilin. Anhydrid kyseliny octové a vinan sodno draselný byly koupeny v čistotě p.a. od firmy Lach-ner. Chlorid sodný p.a. a manganistan draselný $> 99\%$ od společnosti Penta. Silikagel byl pořízen od firmy Grace Davison. Dále byly použity tyto sloučeniny připravené v laboratoři organické syntézy Centra Regionu Haná: ethanolát sodný, ethylchloracetát, brommethylfuranon.

Také byly použity tyto rozpouštědla: acetonitril, methanol, dimethylformamid, tetrahydrofuran, tetrachlormethan, dichlormethan, ethanol, aceton, petrolether a ethylacetát. Rozpouštědla byly dodány od firem Sigma Aldrich, Lach-ner a Penta, ve všech případech v čistotě p.a..

Pro měření spekter NMR byly použity tyto deuterované rozpouštědla dimethyl sulfoxid – d_6 $99,9\%$ D a chloroform – d $99,8\%$ D od firmy Sigma Aldrich.

3.1.2 Přístroje a vybavení

K určení struktury látek bylo využito metody nukleární magnetické rezonance měřené na přístroji JEOL 500 ECA. Měření bylo prováděno při frekvenci 500 MHz u jader ^1H a 125 MHz u jader ^{13}C s kalibrací chemických posunů pro konkrétní použité rozpouštědlo.

Čistota látek byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím (150 mm x 2,5 mm x 5 μm) s reverzní fází (Symmetry C18, Waters). Hmotnostní spektrometr byl použit Q-TOF MICRO (Waters).

Pro tenkovrstvou kapalinovou chromatografii byly použity hliníkové desky 60 WF 254 od firmy Merck. Analyty na TLC destičkách byly detekovány pomocí UV lampy od firmy Camag,

K zahuštění roztoků byla použita odparka od společnosti Hei-Tec Heidolph.

3.1.3 Metody

Průběh všech reakcí byl kontrolován pomocí TLC na hliníkových deskách Silikagel. Desky byly vyvíjeny v těchto mobilních fázích etrolether : ethylacetát = 1:1, petrolether : ethylacetát : methanol 1:1:0,1 nebo chloroform : methanol = 9:1. Vizualizace probíhala pomocí UV lampy při 254 nm, případně byly barveny v roztoku vanilinu a manganistanu draselného.

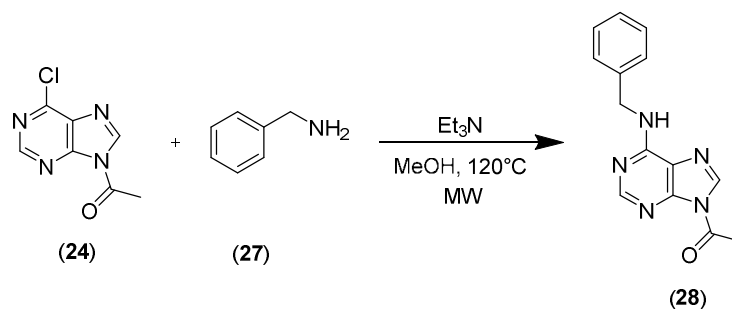


Schéma 7: Schéma přípravy 1-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)ethan-1-one.

3.2.2 Příprava derivátů bromacetonitrilu

Reakce probíhala v inertní argonové atmosféře. V předem vysušené, dvouhrdlé, baňce byl rozpuštěn 1 eq (1,00 g) 6-chloropurinu (**20**) v 25 ml DMF. Poté bylo přidáno 2,5 eq (1,25 ml) bromacetonitrilu (**29**) a 1,2 eq (0,94 g) uhličitanu draselného. Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě. Reakce byla kontrolována pomocí TLC (EtOAc : PE : MeOH = 1:1:0,1). Produkt byl následně extrahován do ethylacetátu (4x 15 ml). Organická fáze byla následně pomocí solanky a síranu sodného vysušena, přefiltrována a následně pomocí vakuové odparky zahuštěna. Výsledná látka byla pročištěna pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; petrolether : ethylacetát : methanol 4 : 1 : 0 -> 1 : 1 : 0,1).

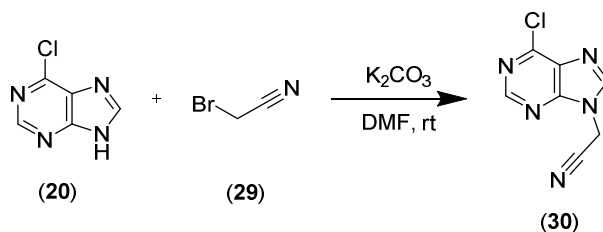


Schéma 8: Schéma přípravy 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)acetonitrile

Do předem vysušené baňky s argonovou atmosférou byl přidán 1 eq (100 mg) produktu z předchozí reakce (**30**), 5,17 ml THF a 1,5 eq (47,5 μ l) ethylformiátu (**31**). Reakce byla schlazena na 0°C, poté byl po dvou dávkách přidán *tert* butoxid draselný (2 eq, 115,59 mg). Asi po půl hodině od zreagování výchozí látky (kontrola TLC, EtOAc : PE : MeOH = 1:1:0,3) byl přidán 2x 1,5 eq (2x 51,21 μ l) dimethylsulfátu. Po skončení reakce byl produkt extrahován do ethylacetátu, organická fáze byla následně vysušena a odpařena. Produkt byl pročištěn pomocí sloupcové chromatografie s gradientem PE : EtOAc : MeOH, 4 : 1 : 0 -> 1 : 1 : 0,3. Za pomoci nukleární magnetické rezonance a vysokoúčinné kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že produkt nevznikl.

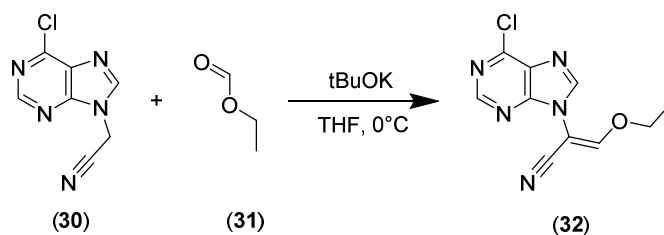


Schéma 9: (Z)-2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-ethoxyacrylonitrile.

3.2.3 Příprava derivátů kyseliny malonové

Do 100 ml trojhrdlé baňky bylo přidáno 15 ml diethylmalonátu (**33**) a 15 ml tetrachlormethanu. Poté byl za pomoci injekční stříkačky postupně přidán brom (**34**) (5,3 ml) a to tak, aby reakce neustále slabě refluxovala. Na baňku byl připojen chladič a hadička odvádějící vznikající bromovodík do vody. Po ukončení byla reakční baňka mírně zahřáta, aby se uvolnil zbytek bromovodíku. Reakce byla katalyzována světlem. Výsledný produkt vznikl v dostatečné čistotě.

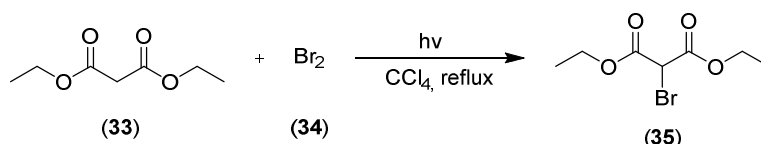


Schéma 10: Schéma přípravy diethyl 2-bromomalonate.

Ve 100 ml baňce byl postupně smíchán 1 eq (1,00 g) 6-chloropurinu (**20**), 1,3 eq (2,01 g) diethyl-2-brommalonátu (**35**), 20 ml DMF a 2,5 eq (2,24 g) uhličitanu draselného. Reakce probíhala 12 hodin. Produkt byl následně extrahován do ethylacetátu. Organická fáze byla vysušena pomocí solanky a síranu sodného, po zfiltrování byla zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl rozpuštěn v diethyletheru a následně protřepán ve vodě, což vedlo k jeho krystalizaci.

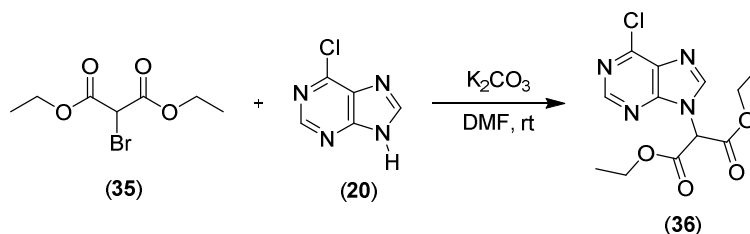


Schéma 11: Schéma přípravy diethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)malonate.

V baňce byl rozpuštěn 1 eq (105,4 mg) produktu (**36**) z předchozí reakce v 3,37 ml DCM. Baňka byla ochlazena za pomoci suchého ledu na -78°C , poté bylo po kapkách přidáno redukční činidlo DIBAL (1 eq, 0,33 ml). Po uplynutí 2 hodin byla reakce ohřáta na -20°C , poté byla zastavena za pomoci Rochellovy soli. Produkt byl

vytřepán do DCM, vysušen a odpařen. Tato reakce byla provedena s různými reakčními podmínkami a různými redukčními činidly (Tabulka 1).

Tabulka 1: Reakční podmínky využity při redukcí diethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)malonátu.

Redukční činidlo	Eq	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas [hod]
DIBAL	1	DCM	-78	2
DIBAL	2,1	DME	-10	48
NaBH ₄	0,5	DME	0	24
LiAlH ₄	1,5	THF	0	72

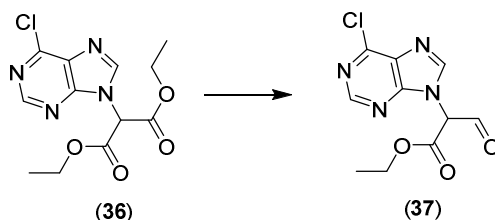


Schéma 12: Obecné schéma přípravy ethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-oxopropanoate.

3.2.4 Příprava derivátů bromoctové kyseliny

V předem vysušené dvojhrdlé baňce s argonovou atmosférou byl rozpuštěn 1 eq (2,00 g) 6-chloropurinu (20) v 15 ml DMF. Následně bylo přidáno 2,5 eq (4,49 g) uhličitanu draselného a 1,2 eq (1,73 ml) ethylbromacetátu (38). Reakce probíhala přes noc při pokojové teplotě. Produkt byl extrahován do ethylacetátu, vysušen, přefiltrován a následně odpařen. Vzorek byl následně nasorbován na silici a pročištěn pomocí sloupcové chromatografie (PE : EtOAc : MeOH, 10 : 1 : 0 -> 1 : 1 : 0,1).

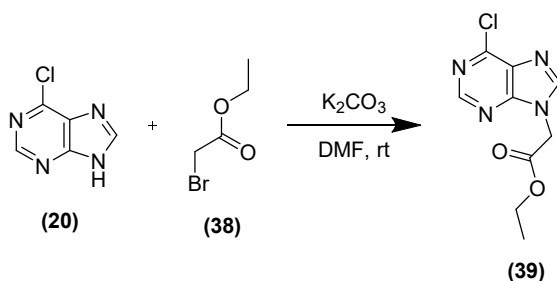


Schéma 13: Schéma přípravy ethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)acetate.

Produkt (39) z předchozí reakce (1 eq, 120 mg) byl rozpuštěn v ethanolu (3,32 ml). Poté byl přidán 1,5 eq (83 μl) benzylaminu (27) a 2 eq (139 μl) triethylaminu. Reakce

probíhala v mikrovlném reaktoru s tímto nastavením: 120°C, RT: 2 min, HT: 15 min, power: 120W, power on: max, pressure: 300. Po dokončení reakce byl produkt rozpuštěn v methanolu, rozpouštědlo bylo odpařeno. S pomocí vychlazené destilované vody došlo ke krystalizaci produktu. Ten byl následně přefiltrován.

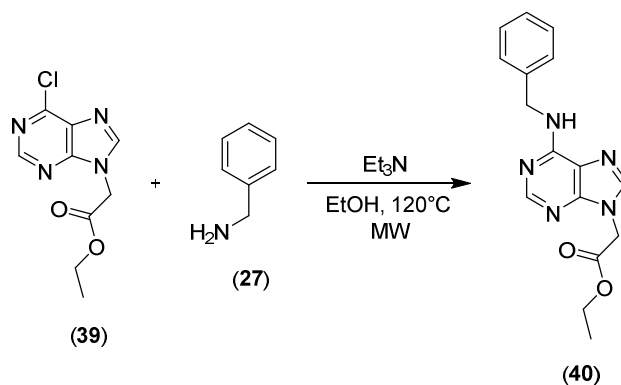


Schéma 14: Schéma přípravy ethyl 2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)acetate.

Reakce probíhala v inertní atmosféře argonu. Ve vysušené baňce byl rozpuštěn 1 eq (30 mg) produktu z předchozí reakce (40) ve 2 ml THF. Poté bylo přidáno 1,5 eq (8,94 μl) methyl formiátu (41). Reakce byla následně ochlazená na 0°C, poté byl ve dvou dávkách přidán 1,5 eq (16,2 mg) *tert* butoxidu draselného. Po asi 2,5 hodinách po kapkách přidán 1,5 eq (9,58 μl) dimethylsulfátu, po hodině přidáno ještě jednou stejné množství. Reakce probíhala přes noc. Produkt byl extrahován do ethylacetátu a následně odpařen. Za pomoci sloupcové chromatografie byl produkt pročištěn (silikagel, PE : EtOAc : MeOH, 10 : 1 : 0 \rightarrow 1 : 1 : 0,1).

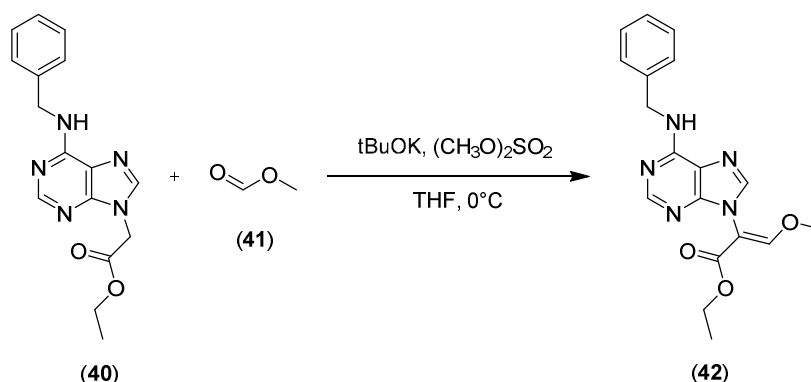


Schéma 15: Schéma přípravy ethyl (Z)-2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)-3-methoxyacrylate.

3.2.5 Příprava derivátů chloroctové kyseliny

Ve 100 ml baňce byl smíchán 1,15 eq (9,5 ml) ethylformiátu (31) v 50 ml diethyletheru. Poté byl přidán 1 eq (12,74 g) ethylchloracetátu (43). Poté byla reakce

ochlazená na 0°C a postupně přikapán ethanolát sodný (připraven smíšením, na ledu, 0,95 eq, 2,29 g, chloridu sodného a 25 ml ethanolu). Reakce probíhala přes noc. Produkt byl následně extrahován do diethyletheru, vysušen a odpařen.

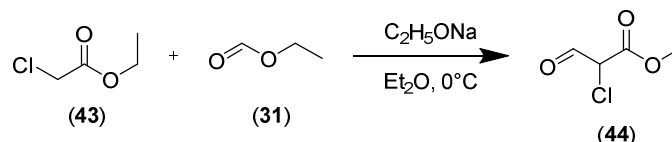


Schéma 16: Schéma přípravy ethyl 2-chloro-3-oxopropanoate.

Do předem vysušené baňky s argonovou atmosférou byl přidán aceton (5 ml) a poté v něm rozpuštěn 1 eq (100,0 mg) produktu z předchozí reakce (44). Poté byl přidán 1 eq (106,2 mg) uhličitanu draselného a 1 eq (136,1 mg) bromovaného D-kruhu (13). Reakce probíhala přes noc. Produkt byl následně extrahován do ethylacetátu, vysušen a zahuštěn pomocí vakuové odpary. Za pomoci sloupcové chromatografie byl produkt vyčištěn (silikagel, PE : EtOAc, 40 : 1 -> 3 : 1).

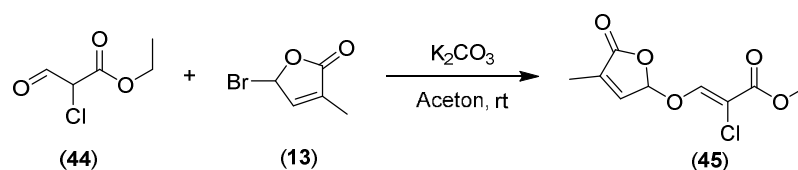


Schéma 17: Schéma přípravy ethyl (Z)-2-chloro-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylate.

V 50 ml vysušené baňce s argonovou atmosférou byly smíchány 2 eq (30 mg) produktu z předchozí reakce (45) a 1 eq (23,9 mg) 6-chloropurinu (20). Směs byla následně rozpuštěna ve 2 ml THF. Poté byly přidány 2 eq (194 μl) TBAF, po promíchání byla reakční směs ochlazená na -50°C. Při snížené teplotě reakce probíhala 48 hodin. Směs produktů byla pročištěna pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, PE : EtOAc : MeOH, 10 : 1 : 0 -> 1 : 1 : 0,1).

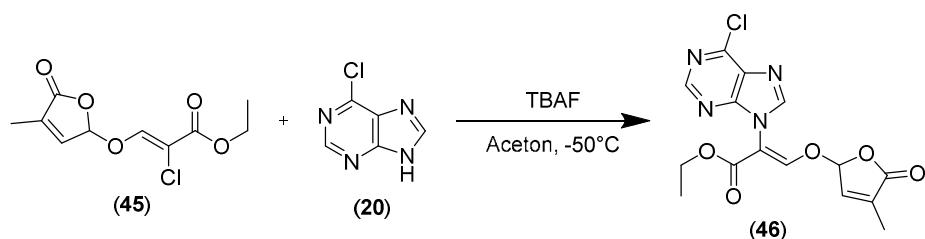


Schéma 18: Schéma přípravy ethyl (Z)-2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylate.

K 1 eq (30 mg) surové směsi z předchozí reakce (46) bylo přidáno 1,5 eq (13,9 μ l) benzylaminu (27) a 2 eq (23,8 μ l) triethylaminu. Ke směsi byly přidány 2 ml ethanolu. Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru za následujících podmínek: 120°C, RT: 2 min, reakční čas 15 min, výkon 120 W, maximální tlak 300 psi

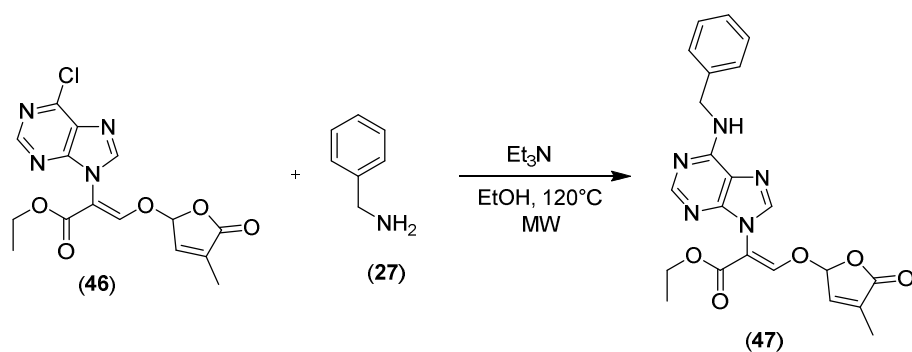


Schéma 19: Schéma přípravy ethyl (Z)-2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylate.

3.3 Výsledky

Prvně byla v rámci této bakalářské práce snaha připravit strigolaktonové deriváty s purinovým skeletem s využitím anhydridů organických kyselin. Acylace zbytku kyseliny na purinový skelet byla relativně snadná (**24**, **25**, **26**), ovšem problém vznikl při alkylationi purinu na 6. pozici (**28**). Místo kýženého produktu vznikl benzylaminopurin (**48**).

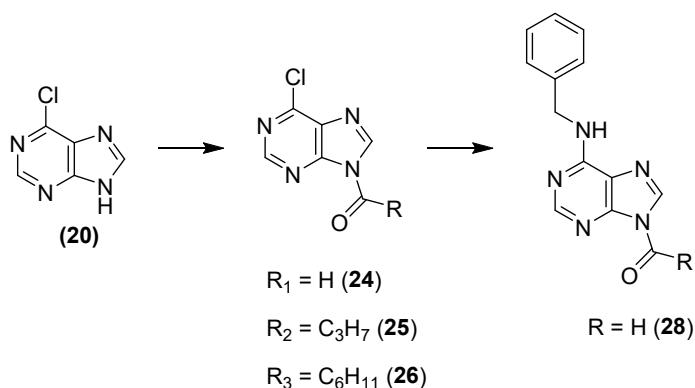
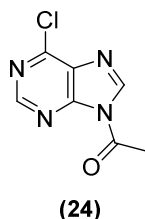


Schéma 20: Schéma vzniku derivátů s využitím anhydridů kyselin.

1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)ethan-1-one

Výtěžek: 59 %, bílá krystalická látka

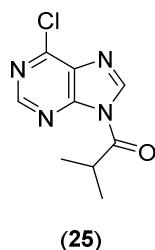


^1H NMR (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 2,89 (s, 3H); 8,93 (s, 1H); 9,11 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 ; 125 MHz) δ (ppm): 21,7; 130,7; 147,1; 148,2; 151,8; 155,4; 172,6.

1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-2-methylpropan-1-one

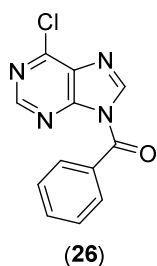
Výtěžek: 67 %, bílá krystalická látka



^1H NMR (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 1,26 (d, $J = 6,72$ Hz, 1H); 4,14 (sept, $J = 6,74$ Hz, 6H); 8,92 (s, 1H); 9,11 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 ; 125 MHz) δ (ppm): 9,0; 46,0; 145,9; 150,5; 151,1; 152,0; 153,5; 174,8.

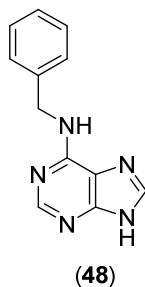
(6-chloro-9H-purin-9-yl)(phenyl)methanone



Výtěžek: 10 %

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 7,55 – 7,61 (m, 5H); 8,75 (s, 1H); 9,01 (s, 1H).

N-benzyl-9H-purin-6-amine



Výtěžek: 67 – 80 %, bílá krystalická látka

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 4,19 (d, $J = 5,81$ Hz, 1H); 4,65 (s, 2H); 7,15 - 7,27 (m, 5H); 8,05 (s, 1H); 8,11 (s, 1H); 12,90 (s, 1H).

MS (ES $^+$), m/z: 226,03 [M+1].

Další zvolenou metodou přípravy strigolaktonových derivátů byla alkylace bromacetonitrilu (29) na purin (20). Při analýze NMR bylo zjištěno, že připravena látka (30) dále nereagovala.

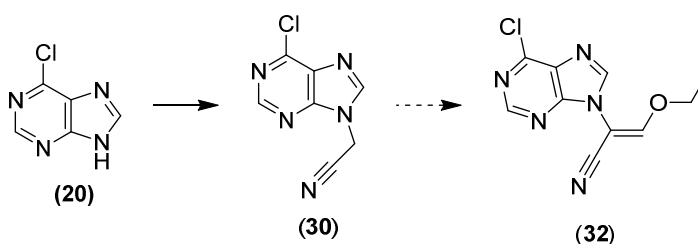
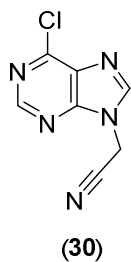


Schéma 21: Schéma vzniku derivátů acetonitrilu

2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)acetonitrile



Výtěžek: 35 %, bílá krystalická látka

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 5,56 (s, 2H); 8,69 (s, 1H); 8,84 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 ; 125 MHz) δ (ppm): 31,9; 115,8; 131,2; 147,1; 149,9; 151,8; 152,6.

Při reakcích využívající deriváty kyseliny malonové byl nejdříve připraven diethyl-2-brommalonát (**35**). Tento produkt byl následně alkylován na 6-chloropurin, poté byla snaha o redukci jedné z karboxylové skupina malonátu na skupinu aldehydovou. Přestože byla tato reakce vyzkoušena několikrát s různými podmínkami a redukčními činidly (DIBAL, KOH, NaBH₄, LiAlH₄), tak vždy s neúspěšným koncem.

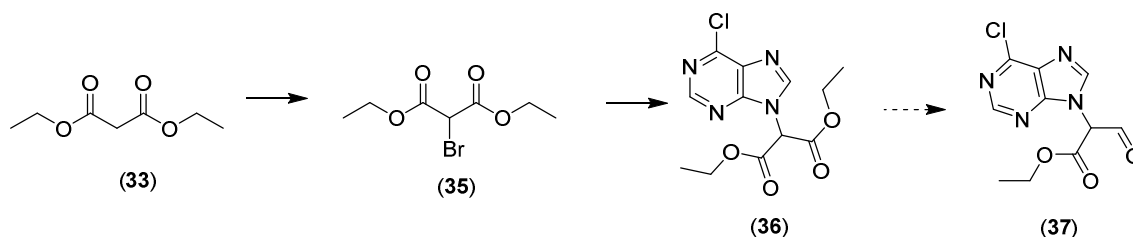
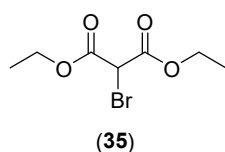


Schéma 22: Schéma vzniku derivátů malonové kyseliny.

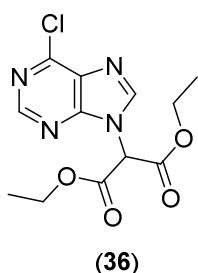
diethyl 2-bromomalonate



Výtěžek: 83 %, kapalina

¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 1,29 (t, *J* = 5,58 Hz, 6H); 4,28 (q, *J* = 9,78 Hz, 4H); 4,81 (s, 1H).

diethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)malonate



Výtěžek: 78 %

¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 1,32 (t, *J* = 7,03 Hz, 6H); 4,33 (q, *J* = 7,34 Hz, 4H); 6,23 (s, 1H); 8,54 (s, 1H); 8,73 (s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃; 125 MHz) δ (ppm): 14,0; 58,4; 63,7; 130,5; 145,2; 151,1; 151,5; 152,4; 163,8.

MS (ES⁺), *m/z*: 213,4 [M+1].

Čistota: 94,26 %

Dále bylo využito derivátů bromoctové kyseliny. Byly připraveny dva meziprodukty (**39**) a (**40**). Při snaze navázat ethylfotmiát (**31**) ovšem došlo u výchozí látce k přesmyku ethylové skupiny za skupinu methylovou.

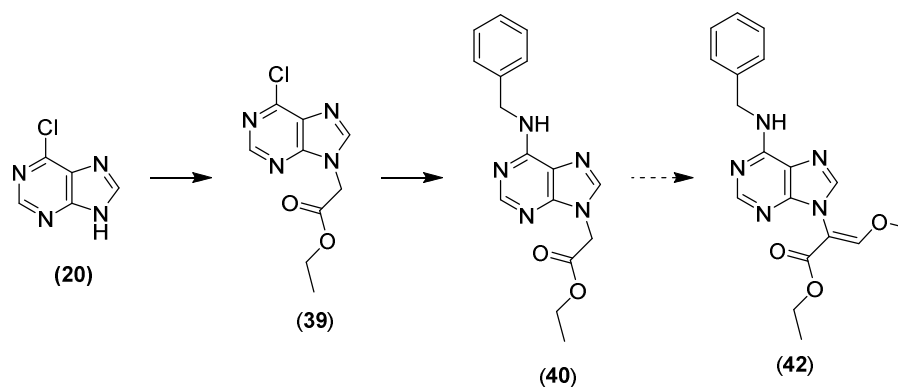
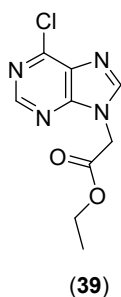


Schéma 23: Schéma reakcí využívajících ethyl derivát bromoctové kyseliny.

ethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)acetate

Výtěžek: 29 %, bílá krystalická látka

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 1,17 (t, $J=7,34$ Hz, 3H); 4,14 (q, $J=7,03$ Hz, 2H); 5,23 (s, 2H); 8,64 (s, 1H); 8,76 (s, 1H).



$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 ; 125 MHz) δ (ppm): 14,5; 45,3; 62,2; 131,0; 148,3; 149,7; 152,1; 152,5; 167,9.

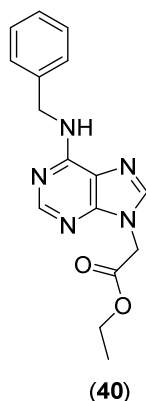
MS (ES+), m/z : 240,98 [M+1].

Čistota: 99,50 %

ethyl 2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)acetate

Výtěžek: 90 %, bílá krystalická látka

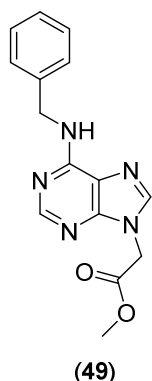
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz) δ (ppm): 1,17 (t, $J=7,82$ Hz, 3H); 3,42 (s, 1H); 4,12 (q, $J=7,03$ Hz, 2H); 4,66 (s, 2H); 5,03 (s, 2H); 7,13 – 7,33 (m, 5H); 8,09 (s, 1H); 8,14 (s, 1H).



MS (ES+), m/z : 311,94 [M+1].

Čistota: 97,18 %

methyl 2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)acetate



^1H NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) δ (ppm): 1,19 (s, 3H); 3,65 (s, 2H); 4,65 (s, 1H); 5,05 (s, 2H); 7,17 - 7,32 (m, 5H); 8,09 (s, 1H); 8,13 (s, 1H).

MS (ES⁺), *m/z*: 297,90 [M+1].

Posledními provedenými reakcemi k přípravě strigolaktonových derivátů byly reakce s využitím chlorderivátů octové kyseliny. Nejprve zreagoval ethylchloracetát (43) a ethanolát sodný za vzniku ethyl-2-chlor-3-oxopropanoátu (44). Následně byl aldolovou kondenzací připojen D kruh (45). Celá struktura byla na alkylována na 6-chlorpurin (46). Posledním krokem bylo připojení benzylaminu (27). Kromě konečného produktu (47) by mohl mít potencionální biologickou aktivitu také meziproduct (45).

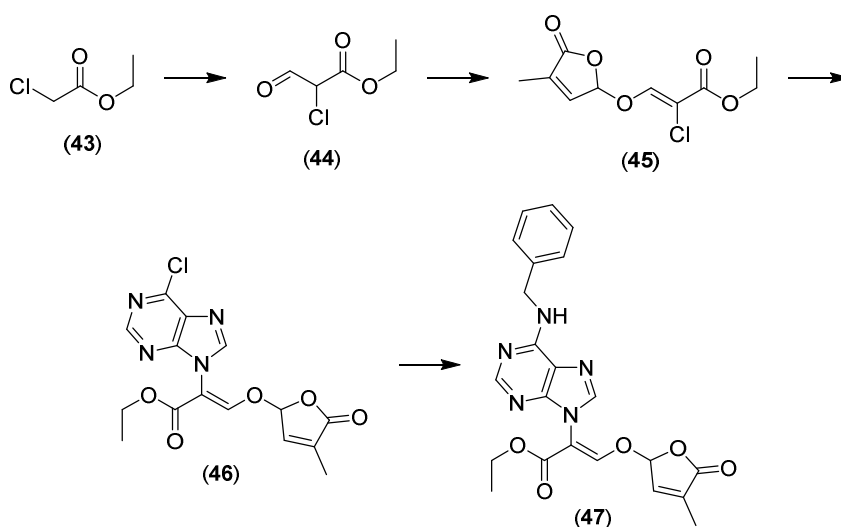
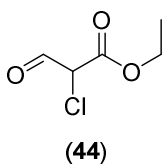


Schéma 24: Schéma vzniku derivátů chloroctové kyseliny.

ethyl 2-chloro-3-oxopropanoate



Výtěžek: 29 %, čirá kapalina

^1H NMR (CDCl₃; 500 MHz) δ (ppm): 1,26 – 1,34 (m, 3H); 4,22 – 4,30 (m, 2H); 4,72 (s, 1H); 9,48 (s, 1H).

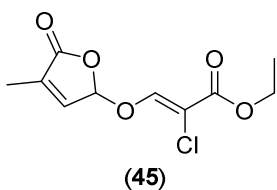
^{13}C NMR (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 14,2; 61,7; 77,1; 163,1; 188,6.

Čistota: 100,00 %

ethyl (Z)-2-chloro-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylate

Výtěžek: 44 %

^1H NMR (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 1,31 (t, $J = 6,11$ Hz, 3H); 2,02 (s, 3H); 4,27 (q, $J = 7,03$ Hz, 2H); 6,19 (s, 1H); 6,98 (s, 1H); 7,86 (s, 1H).



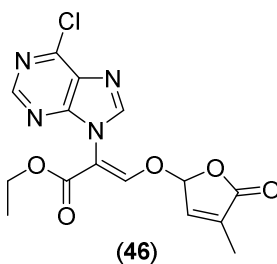
^{13}C NMR (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 10,9; 14,2; 62,1; 100,0; 107,5; 136,2; 141,1; 150,9; 162,7; 170,3.

MS (ES+), m/z : 247,56 [M+1].

ethyl (Z)-2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-((5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylate

Surová směs

MS (ES+), m/z : 365,56 [M+1].



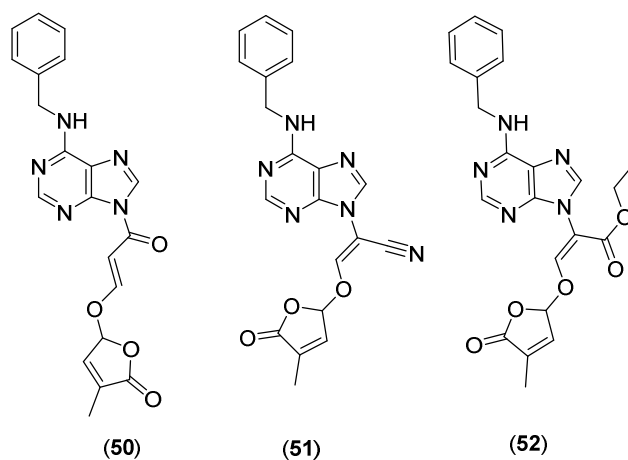
3.4 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo připravit nová strigolaktonová analoga mající ve své struktuře purinový heterocyklus. Za cíl byly vybrány dva základní strukturní motivy lišící se připojením purinového skeletu na základní motiv strigolaktonových analog. Základním motivem SL analog je myšleno spojení α,β nenasyceného karboxylu s D-kruhem přes enoletherový můstek.

První strukturní motiv reprezentovaný strukturou **(50)** je charakteristický připojením purinu v pozici *N9* na karboxylovou funkci strigolaktonového zbytku za vzniku amidu karboxylové kyseliny.

U druhého zamýšleného strukturního motivu nových analog je purin připojen přes dusík v pozici 9 na α uhlík α,β nenasyceného karboxylu za vzniku trisubstituované dvojné vazby. (Obrázek 11).

Tato analoga byla připravována pro svou potenciální biologickou aktivitu jakožto stimulatory klíčení parazitických rostlin rodů *Striga* a *Orobanche*.



Obrázek 11: Cíle syntézy, strigolaktonová analoga obsahující purinový skelet.

3.4.1 Příprava derivátu kyseliny (50)

Při přípravě derivátu **(50)** bylo zamýšleno využít acylaci purinu pomocí anhydridu příslušné kyseliny **(53)** (Nishikawa et al., 1986) a substituci alkoholové části enoletheru (Kondratov et al., 2005) (Schéma 25).

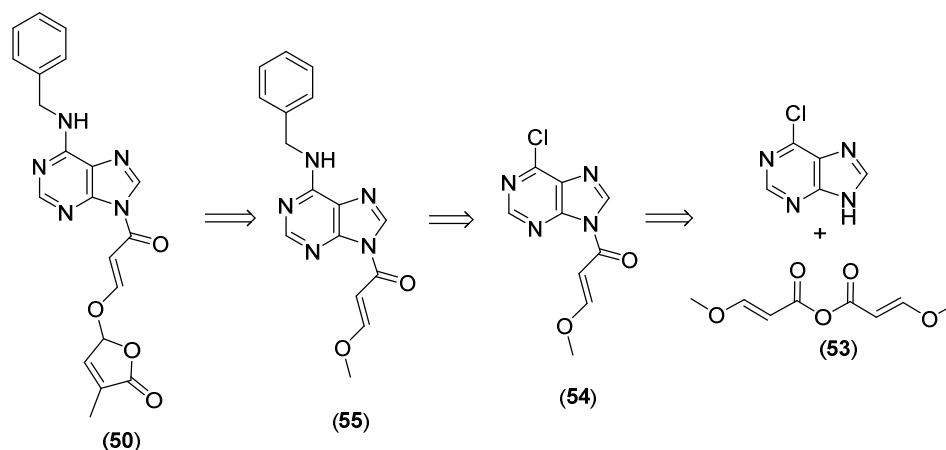


Schéma 25: Retrosyntéza derivátu 50.

Před přípravou strukturně složitějšího anhydridu (**53**), byl postup otestován na jednoduchých modelových anhydridech kyselin octové, izomáselné a benzoové. Reakce byla provedena s refluxujícím acetonitrilu za přítomnost báze. Výtěžky pro alifatické kyseliny byly průměrné (67 respektive 59%), kdežto u kyseliny benzoové byl výtěžek velmi slabý (10%) (Schéma 26).

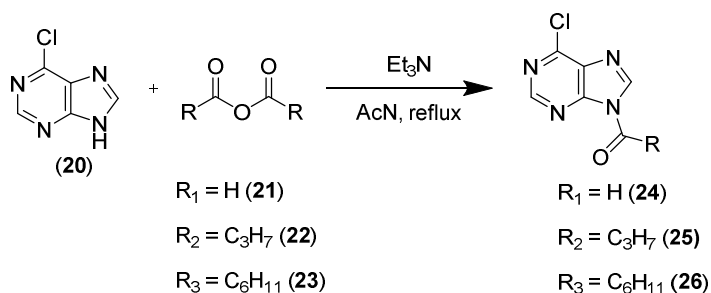


Schéma 26: Schéma přípravy acylovaných 6-chlorpurinů.

Následně byl proveden modelový experiment s cílem ověřit podmínky substituce 6-chlor-9-acetylpurinu v pozici 6 benzylaminem. Byly použity standardní podmínky využívající se při přípravě 6-aminoalkyl-9-substituovaných purinů v mikrovlném reaktoru. (Schéma 27).

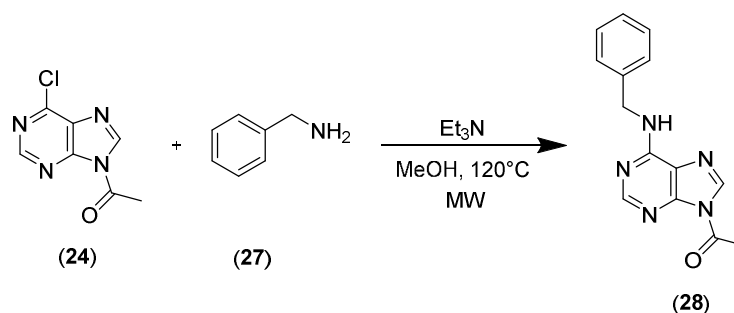


Schéma 27: Podmínky reakce 6-chlor-9-acylpurinu s benzylaminem.

Při analýze NMR bylo zjištěno, že kýžený produkt **(28)** nevznikl, místo toho byl při každém pokusu jako jediný produkt identifikován 6-benzylaminopurin **(48)** (Schéma 28) a to ve výtěžku 67 – 80 %.

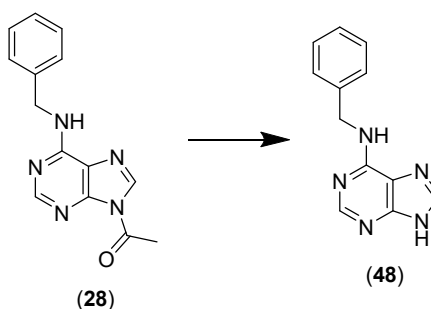


Schéma 28: Schéma rozkladu 28 na BAP.

Vzhledem k odštěpování acylu od purinu při alkylačním kroku bylo od pokusu připravit strigolaktonový analog prvního typu upuštěno a pozornost byla zaměřena na přípravu druhého strukturního motivu.

3.4.2 Příprava derivátů acetonitrilu (51)

Jako první možnost přípravy strigolaktonového analogu s purinem v α -pozici nenasyceného karboxylu byla vybrána možnost alkylovat substituovaný acetonitril pomocí aldolové kondenzace a dále obdobným postupem jak výše zmíněný analog prvního strukturního typu (Schéma 29).

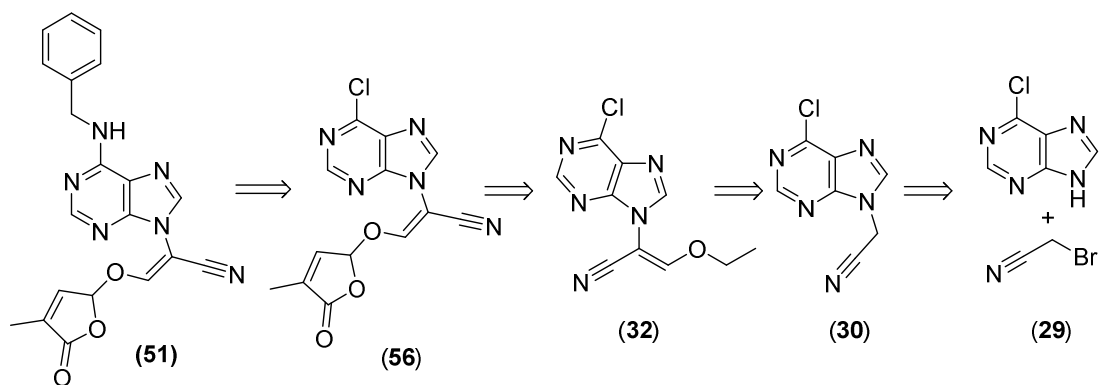


Schéma 29: Restrosyntetická analýza přípravy SL analoga odvozeného od acetonitrilu.

Nejdříve byl ponechán reagovat bromacetonitril s 6-chloropurinem v DMF za přítomnosti báze za vzniku odpovídajícího 9-substituovaného derivátu (35%) (**30**) jako vedlejší produkt byl též vyizolován 7-substituovaný purin (20%) (Schéma 30).

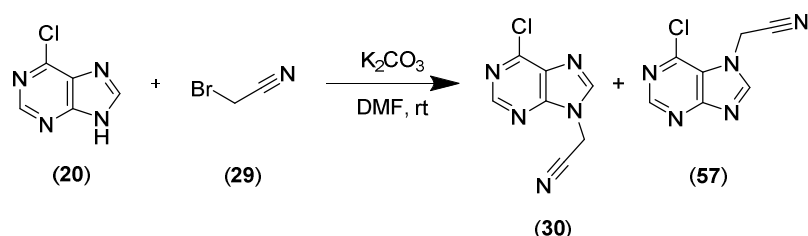


Schéma 30: Příprava 9-acetonitril-6-chlorpurinu.

Produkt (**30**) byl následně rozpuštěn v suchém tetrahydrofuranu, poté byl přidán *tert.*butoxid draselný a ethylformiát (**31**). Na základě analýzy NMR bylo zjištěno, že chtěný produkt aldolové kondenzace (**32**) nevznikl (Schéma 31) a byla při každém pokusu vyizolována zpět výchozí látka. Ačkoliv nebyly použity další podmínky se na základě experimentů s deriváty esteru kyseliny octové (viz níže) předpokládá, že vůbec nedochází k deprotonaci α -uhlíku, pravděpodobně z důvodů stericko-elektronového vlivu purinu.

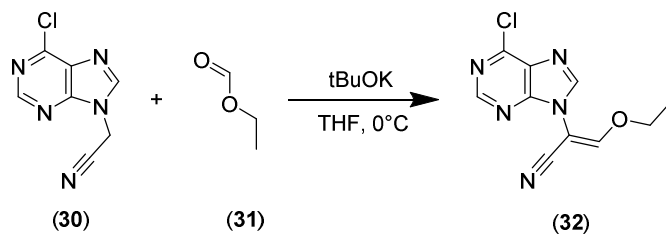


Schéma 31: Podmínky aldolové kondenzace.

3.4.3 Příprava derivátů s využitím bromoctové kyseliny (52)

Paralelně s derivátem odvozeným od acetonitrilu byl připravován derivát odvozený od kyseliny octové (Schéma 32)

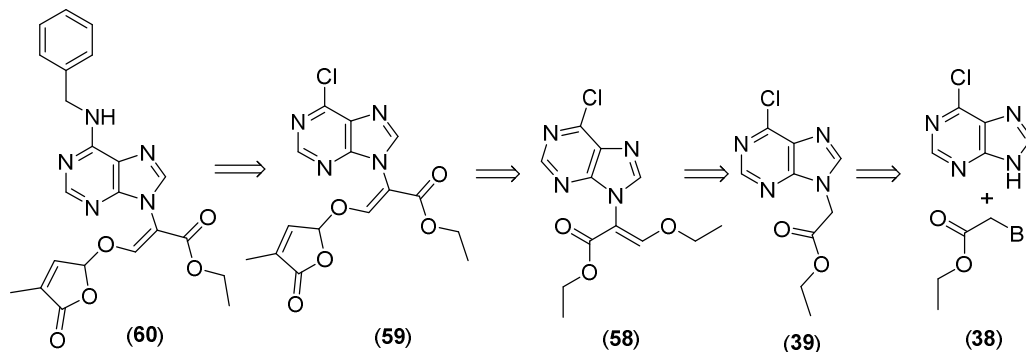


Schéma 32: Restrosyntetická analýza přípravy SL analoga od esteru kyseliny octové.

Nejprve byl na alkylován 6-chlorpurin ethylbromacetátem za vzniku N^9 -substituovaného derivátu (39) s výtěžkem 29 %, N^7 -derivát vnikal jen ve velmi malém množství (3 %). (Schéma 33)

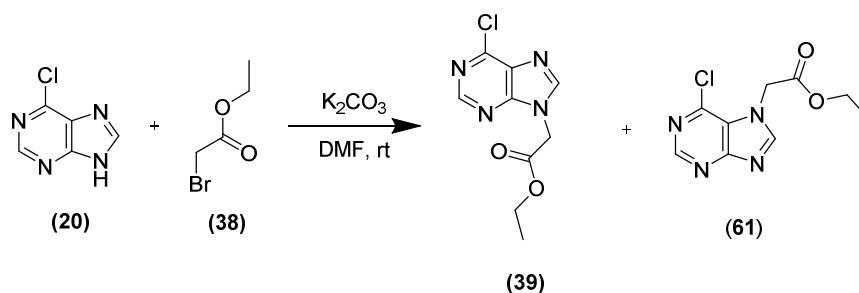


Schéma 33: Příprava 9-ethylacetat-6-chlorpurinu.

V případě tohoto derivátu byl z modelových důvodů pozměněn původně zamýšlený postup a produkt (39) byl rovnou alkylován benzylaminem za vzniku látky (40) s výborným výtěžkem 90 % (Schéma 34).

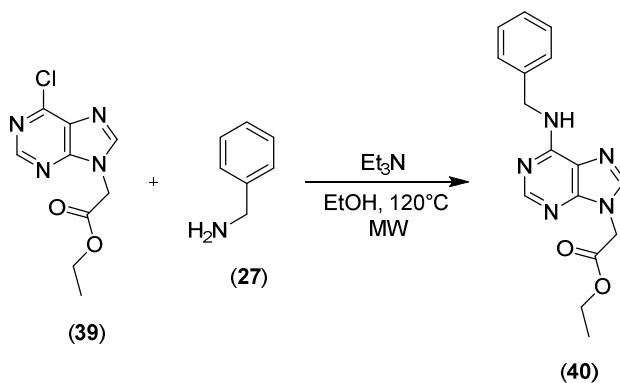


Schéma 34: Podmínky reakce 9-ethylacetatu-6-chlorpurinu s benzylaminem.

K připravenému produktu (40) v suchém THF byl přidán methyl formiát a tercbutoxid draselný. Podle teoretického mechanismu bylo očekáváno, že dojde k deprotonizaci α -uhlíku ethylacetátu a k následnému napojení methylformiátu takzvanou aldolovou kondenzací (Schéma 35). Bohužel produkt aldolové kondenzace (42) nebyl pozorován. Jediným vyizolovaným produktem byl methyl ester výchozí látky, který vznikl transesterifikací díky přítomnosti dimethylsulfátu v reakční směsi.

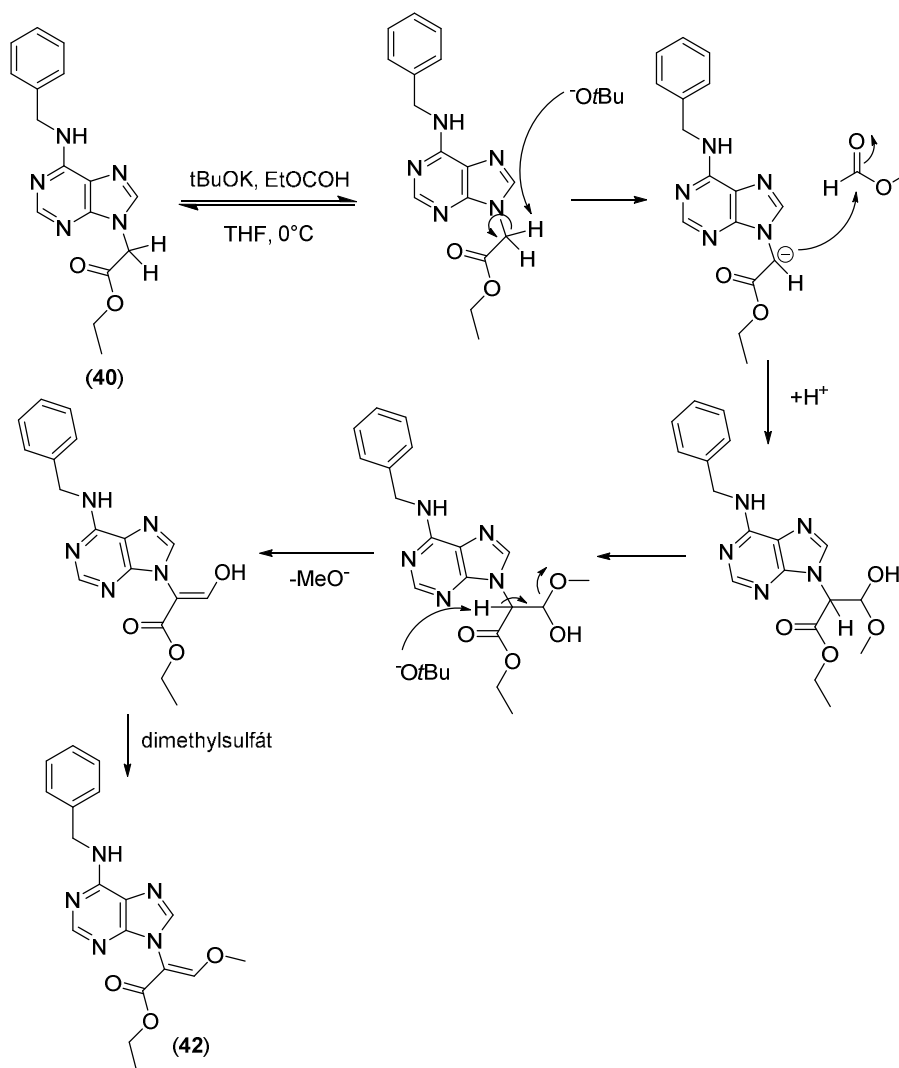


Schéma 35: Reakční schéma aldolové kondenzace.

Reakce byla opakována, s cílem zjistit zda dochází k deprotonaci na α -uhlíku. Při této variantě byla po přidání $t\text{BuOK}$ namísto methylformiátu přidána deterovaná voda respektive CH_3OD . (Schéma 36).

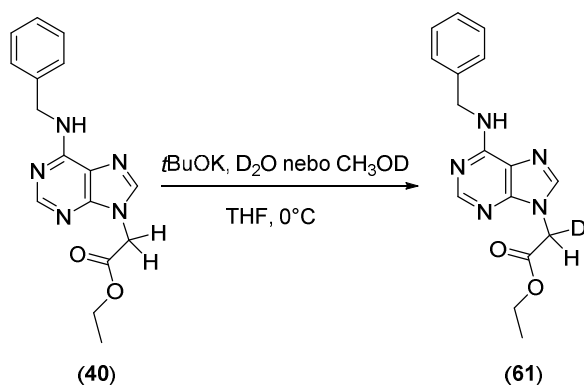


Schéma 36: Schéma deprotonizace 9-ethylacetatu-6-chloropurinu.

Žádná inkorporace deuteria však nebyla pozorována, z čehož lze vyvodit závěr, že k deprotonizaci vůbec nedochází pravděpodobně z důvodů strukturně-elektronických vlivu purinu.

3.4.4 Příprava derivátů s využitím malonové kyseliny (52)

Další zvolenou metodou k přípravě strigolaktonových analog bylo použití diesteru kyseliny malonové. Tento postup měl poskytnout stejný strigolaktonový derivát, který byl zamýšlen připravit pomocí ethyl esteru kyseliny octové (Schéma 37).

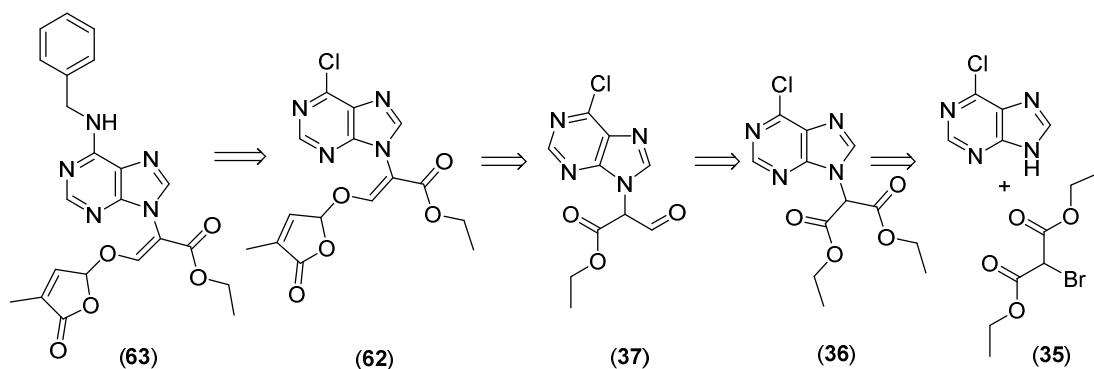


Schéma 37: Restrosyntetická analýza přípravy SL analoga odvozeného od diesteru kyseliny malonové.

Nejdříve bylo nutno připravit nabromovaný tento diethyl malonát. (35). Radikálová bromace brómem v refluxujícím CCl_4 při současném ozařování reakční směsi ultrafialovým zářením (365 nm) poskytla chtěný produkt s izolovaným výtěžkem 83% (Schéma 38).

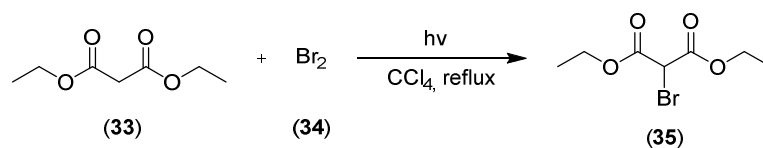


Schéma 38: Reakční podmínky bromace diethyl malonátu.

Bromderivát diesteru malonové kyseliny (**35**) byl následně alkylován na purin. Reakce proběhla za standartních podmínek za laboratorní teploty relativně snadno za vzniku 78 % látky (**36**) (Schéma 39).

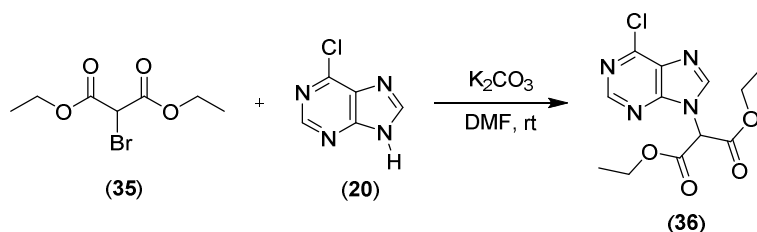


Schéma 39: Schéma přípravy diethyl 2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)malonátu.

Dalším krokem byla redukce jedné z karboxylových skupin malonové kyseliny. Tato reakce byla provedena několikrát s různými redukčními činidly (DIBAL, NaBH₄, LiAlH₄) a s různými reakčními podmínkami (Tabulka 2), ovšem ve všech případech za rozkladu výchozí látky a vzniku velmi komplexní směsi (Tabulka 2).

Tabulka 2: Různé podmínky redukce jedné z karboxylových skupin malonátu.

Redukční činidlo	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas [hod]	Výtěžek (%)
DIBAL	DCM	-78	2	0
DIBAL	DME	-10	48	0
NaBH ₄	DME	0	24	0
LiAlH ₄	THF	0	72	0

3.4.5 Příprava derivátů s využitím chloroctové kyseliny (**52**)

Poslední cestou přípravy strigolaktonových analog s purinovým skeletem která byla zkoušena v rámci této práce je využití derivátů chloroctové kyseliny (Schéma 40).

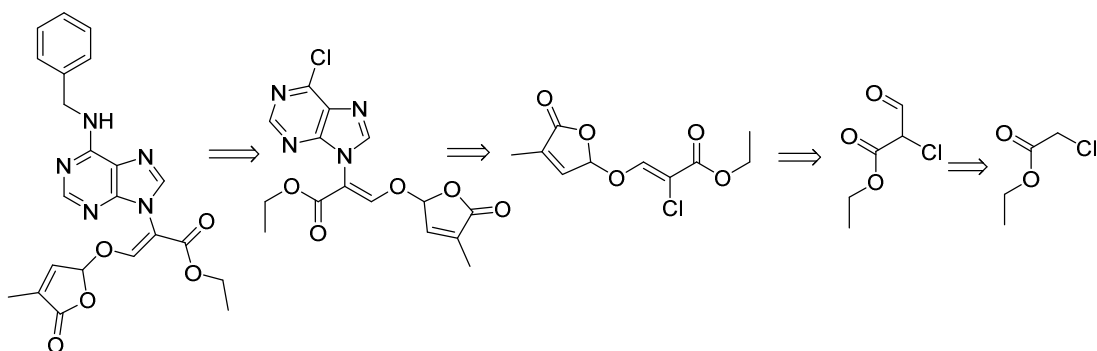


Schéma 40: Restrosyntetická analýza přípravy SL analoga odvozeného od esteru kyseliny octové.

Nejprve byl ponechán reagovat ethylchloracetát s ethanolátem sodným za vzniku ethyl-2-chlor-3-oxopropanoátu (**44**) ve výtěžku 29 %..

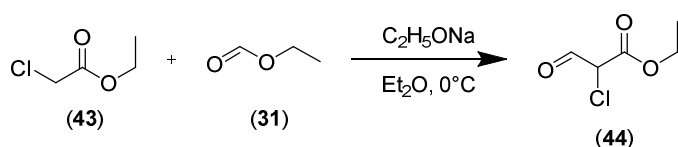


Schéma 41: Reakční podmínky vzniku ethyl 2-chloro-3-oxopropanoátu.

Tento produkt následně převeden v bazickém prostředí na enol, který byl zachycen bromovaným D-kruhem za vzniku klíčového prekursoru (**45**) (44% výtěžek) (Schéma 42). Produkt (**45**) je sám o sobě strigolaktonovým analogem a po optimalizaci jeho syntézy bude i on otestován v biologických testech na strigolaktonovou aktivitu.

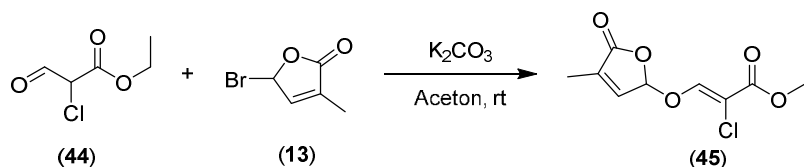


Schéma 42: Reakční podmínky vzniku ethyl (Z)-2-chloro-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylátu.

Produkt (**45**) byl alkylován 6-chlorpurinem v acetonu při -50°C za přítomnosti tetrabutylamonium fluoridu (Schéma 43). Při HPLC analýze surové reakční směsi, byla zjištěna přítomnost čtyř majoritních látek, při čemž jedna z nich měla molekulovou hmotnost odpovídající produktu (**46**). Obsah této látky podle HPLC byl 20%.

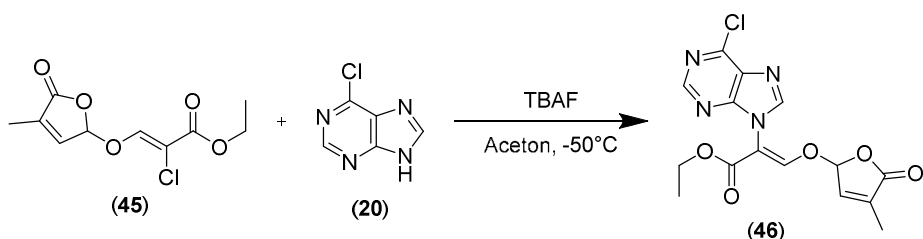


Schéma 43: Reakční podmínky vzniku ethyl (Z)-2-(6-chloro-9H-purin-9-yl)-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylatu.

Při pokusu o vyčištění na sloupcové chromatografii však docházelo k úplnému rozkladu přítomných látek a tak pro další reakci byla využita surová reakční směs s potenciálním obsahem produktu (46) 20 %.

Tato surová směs byla ponechána reagovat v mikrovlnném reaktoru s benzylaminem (Schéma 44).

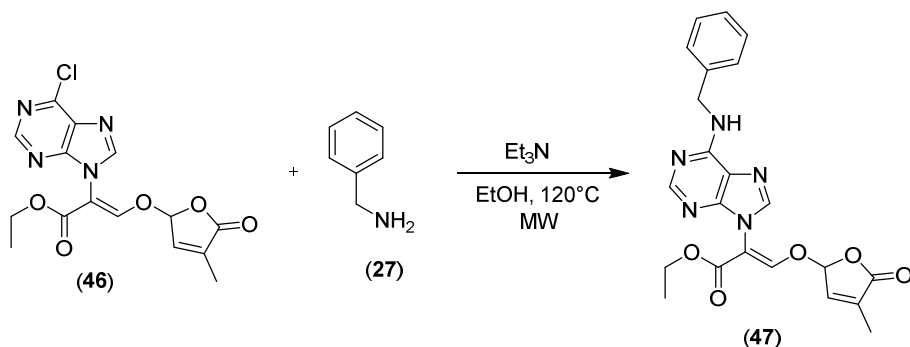


Schéma 44: Reakční podmínky vzniku ethyl (Z)-2-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)-3-((4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)oxy)acrylatu.

V tomto případě pomocí HPLC/MS analýzy surové reakční směsi byl identifikován jediný produkt a to konkrétně benzylamino purin (BAP). Vzhledem ke skutečnosti že výchozí směs neobsahovala volný 6-chlorpurin (dle HPLC/MS analýzy) se předpokládá, že vzniklý BAP pochází z hydrolyzy původně chtěného produktu (47) a tudíž další optimalizací přípravy látky (46) a (47) by mělo být možné se dostat k chtěným strigolaktonovým analogům.

Další možností je provést alkylation látku (45) přímo benzylaminopurinem.

4 Závěr

V rámci této práce byla vypracována literární rešerše, ve které byly stručně shrnuty dosud známé informace o strigolaktonech. Jsou zde popsány účinky SL na růst a vývoj rostliny, vztah SL a arbuskulárních mykorhizních hub. Dále je popsána interakce mezi strigolaktony a parazitickými rostlinami rodů *Striga* a *Orobanche*. Je zde shrnuta jejich biosyntéza, a nastíněna základní syntéza strigolaktonových analogů a mimetik.

V rámci praktické části je popsán postup syntézy strigolaktonových analog obsahující purinový heterocyklus.

Bohužel žádná z vyzkoušených syntetických cest neposkytla chtěný finální produkt, ale nakonec byl objeven postup, který by mohl po další optimalizaci opravdu poskytnout chtěné látky.

Během syntézy bylo připraveno nové analogum (45), které sice neobsahuje purinový skelet, ale bude v budoucnu otestován na strigolaktonovou aktivitu.

5 Seznam použité literatury

- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, et al** (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 20242–20247
- Akiyama K, Hayashi H** (2006) Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot* **97**: 925–931
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H** (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824–7
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H** (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* **51**: 1104–17
- Al-Babili S, Bouwmeester HJ** (2015) Strigolactones, a Novel Carotenoid-Derived Plant Hormone. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 161–86
- Anne Beveridge C, Kyojuka J, Anne C, Dominique Bergmann by C, Fleming AJ** (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway This review comes from a themed issue on Growth and Development Edited. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 34–39
- Artuso E, Ghibaudi E, Lacey B, Marabello D, Vinciguerra D, Lombardi C, Koltai H, Kapulnik Y, Novero M, Occhiato EG, et al** (2015) Stereochemical Assignment of Strigolactone Analogues Confirms Their Selective Biological Activity. *J Nat Prod* **78**: 2624–2633
- Besserer A, Becard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N** (2008) GR24, a Synthetic Analog of Strigolactones, Stimulates the Mitosis and Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora rosea* by Boosting Its Energy Metabolism. *PLANT Physiol* **148**: 402–413
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N** (2006) Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLoS Biol* **4**: e226
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH** (2003) Secondary metabolite signalling in host–parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 358–364
- Butler L** (1995) Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and its crop host - A new dimension in allelochemistry. *ACS Symp Ser* **582**: 158–168
- Ćavar S, Zwanenburg B, Tarkowski P** (2015) Strigolactones: occurrence, structure, and biological activity in the rhizosphere. *Phytochem Rev* **14**: 691–711
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH** (1966) Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**: 1189–

- Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Muller D, Domagalska MA, Leyser O** (2010) Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**: 2905–2913
- Croglio M, Haake J, Ryan C, Wang V, Lapier J, Schlarbaum J, Dayani Y, Artuso E, Prandi C, Koltai H** (2016) Analogs of the novel phytohormone, strigolactone, trigger apoptosis and synergize with PARP inhibitors by inducing DNA damage and inhibiting DNA repair. *Oncotarget* **7**: 13984–14001
- Dvořáková M, Vaněk T** (2015) strigolaktony - struktura a funkce v rostlinách.pdf. *Chem List* **762–769**
- Foo E, Turnbull CGN, Beveridge CA** (2001) Long-Distance Signaling and the Control of Branching in the *rms1* Mutant of Pea. *PLANT Physiol* **126**: 203–209
- Fukui K, Ito S, Ueno K, Yamaguchi S, Kyojuka J, Asami T** (2011) New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 4905–4908
- Goldwasser Y, Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K** (2008) Production of Strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobancha aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul* **55**: 21–28
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, et al** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–94
- van der Heijden M, Klironomos J, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders I** (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69–72
- Humphrey AJ, Galster AM, Beale MH** (2006) Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat Prod Rep* **23**: 592–614
- Johnson AW, Gowada G, Hassanali A, Knox J, Monaco S, Razavi Z, Rosebery G** (1981) The preparation of synthetic analogues of strigol. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **1734**
- Kagiyama M, Hirano Y, Mori T, Kim S-Y, Kyojuka J, Seto Y, Yamaguchi S, Hakoshima T** (2013) Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes to Cells* **18**: 147–160
- Kapulnik Y, Delaux P-M, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Winer S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combier J-P, Bécard G, Belausov E, et al** (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* **233**: 209–216
- Kgosi RL, Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Murdoch AJ** (2012) Strigolactone analogues induce suicidal seed germination of *Striga* spp. in soil. *Weed Res* **52**: 197–203

- Kohlen W, Charnikhova T, Lammers M, Pollina T, Tóth P, Haider I, Pozo MJ, de Maagd RA, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ, et al** (2012) The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytol* **196**: 535–47
- Kondratov IS, Gerus II, Kacharov AD, Gorbunova MG, Kukhar VP, Fröhlich R** (2005) New derivatives of trifluoroacetyl acetaldehyde and trifluoroaldol. *J Fluor Chem* **126**: 541–548
- Malik H, Rutjes FPJT, Zwanenburg B** (2010) A new efficient synthesis of GR24 and dimethyl A-ring analogues, germinating agents for seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* spp. *Tetrahedron* **66**: 7198–7203
- Mangnus EM, Dommerholt FJ, Jong RLP De, Zwanenburg B** (1992) Improved synthesis of strigol analog GR24 and evaluation of the biological activity of its diastereomers.
- Mangnus EM, Zwanenburg B** (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by strigol and its synthetic analogs. *J Agric Food Chem* **40**: 1066–1070
- Matusova R, Rani K, Verstappen F, Franssen M, Beale M, Bouwmeester H** (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
- Nakamura H, Xue Y-L, Miyakawa T, Hou F, Qin H-M, Fukui K, Shi X, Ito E, Ito S, Park S-H, et al** (2013) Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms3613
- Nishikawa S, Mizutani H, Kumazawa Z, Kashimura N** (1986) Improved palladium-catalyzed coupling of 6-chloropurine with terminal acetylenes by protecting the hydrogen in the n9-position with an acetyl group. *Agric Biol Chem* **50**: 2377–2379
- Parker C** (2012) Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed Sci* **60**: 269–276
- Pollock C, McDonough S, Wang V, Lee H, Ringer L, Li X, Prandi C, Lee R, Feldman A, Koltai H** (2014) Strigolactone analogues induce apoptosis through activation of p38 and the stress response pathway in cancer cell lines and in conditionally reprogrammed primary prostate cancer cells. *Oncotarget* **5**: 1683–1698
- Pollock CB, Koltai H, Kapulnik Y, Prandi C, Yarden RI** (2012) Strigolactones: a novel class of phytohormones that inhibit the growth and survival of breast cancer cells and breast cancer stem-like enriched mammosphere cells. *Breast Cancer Res Treat* **134**: 1041–1055

- Prandi C, Rosso H, Lace B, Occhiato EG, Oppedisano A, Tabasso S, Alberto G, Blangetti M** (2013) Strigolactone Analogs as Molecular Probes in Chasing the (SLs) Receptor/s: Design and Synthesis of Fluorescent Labeled Molecules. *Mol Plant* **6**: 113–127
- Reizelman A, Wigchert SC, Del-Bianco C, Zwanenburg B** (2003) Synthesis and bioactivity of labelled germination stimulants for the isolation and identification of the strigolactone receptor. *Org Biomol Chem* **1**: 950–9
- Rubiales D, Verkleij J, Vurro M, Murdoch AJ, Joel DM** (2009) Parasitic plant management in sustainable agriculture. *Weed Res* **49**: 1–5
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, et al** (2011) Physiological Effects of the Synthetic Strigolactone Analog GR24 on Root System Architecture in Arabidopsis: Another Belowground Role for Strigolactones? *PLANT Physiol* **155**: 721–734
- de Saint Germain A, Ligerot Y, Dun EA, Pillot J-P, Ross JJ, Beveridge CA, Rameau C** (2013) Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins. *PLANT Physiol* **163**: 1012–1025
- Scaffidi A, Waters MT, Ghisalberti EL, Dixon KW, Flematti GR, Smith SM** (2013) Carlactone-independent seedling morphogenesis in Arabidopsis. *Plant J* **76**: 1–9
- Seto Y, Sado A, Asami K, Hanada A, Umehara M, Akiyama K, Yamaguchi S** (2014) Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 1640–1645
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ** (2005) The Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746–59
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al** (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200
- Wigchert SC, Kuiper E, Boelhouwer GJ, Nefkens GH, Verkleij JA, Zwanenburg B** (1999) Dose-response of seeds of the parasitic weeds Striga and Orobanche toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *J Agric Food Chem* **47**: 1705–10
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K** (2010) The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 93–117
- Yoneyama K, Xie X, Kim H Il, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K** (2012) How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production

and exudation? *Planta* **235**: 1197–207

Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K (2007a) Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**: 125–32

Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H (2007b) Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**: 1031–8

Zhao L., Zhou X., Wu Z., Yi W, Xu Y, Li S, Xu T., Liu Y, Chen R., Kovach A, et al (2013) Crystal structures of two phytohormone signal-transducing alpha / beta hydrolases: karrikin-signaling KAI2 and strigolactone-signaling DWARF14. *Cell Res* **23**: 436–439

Zwanenburg B, Mwakaboko AS (2011) Strigolactone analogues and mimics derived from phthalimide, saccharine, p-tolylmalondialdehyde, benzoic and salicylic acid as scaffolds. *Bioorg Med Chem* **19**: 7394–400

Zwanenburg B, Mwakaboko AS, Reizelman A, Anilkumar G, Sethumadhavan D (2009) Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag Sci* **65**: 478–91

Zwanenburg B, Pospíšil T, Čavar Zeljković S (2016) Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta* **243**: 1311–1326