



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Dusíkatá strigolaktonová mimetika

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tomáš Dostál
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tomáš Dostál
Název práce	Dusíkatá strigolaktonová mimetika.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů a CRH
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	Diplomová práce je zaměřena na přípravu nových dusíkatých strigolaktonových mimetik a jejich biologickou aktivitu při stimulaci klíčení semen parazitických rostlin z rodu <i>Phelipanche</i> a <i>Striga</i> . Teoretická část shrnuje dosavadní poznatky o biologických vlastnostech strigolaktonů a jejich využití pro kontrolu šíření parazitického plevelu z rodu <i>Phelipanche</i> , <i>Orobanche</i> a <i>Striga</i> . V rámci experimentální části byla připravena nová strigolaktonová mimetika ve formě terciárních aminů, které ve své struktuře obsahují butenolidový kruh. V práci je dále popsáno biologické testování připravených mimetik a jejich biologická aktivita v procesu iniciace klíčení semen parazitických rostlin.
Klíčová slova	strigolakton, amin, butenolid, mimetikum, sebevražedné klíčení, <i>Phelipanche</i> , <i>Striga</i>
Počet stran	86
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Tomáš Dostál
Title of thesis	Nitrogen containing strigolactone mimics.
Type of thesis	Master's
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	The thesis is focused on the synthesis of new nitrogen-containing strigolactone mimics and their biological activity as <i>Phelipanche</i> and <i>Striga</i> parasitic-weeds germination agent. The theoretical part describes the existing knowledge about the biological features of strigolactones and their possible use in the control of parasitic weeds infection. In the practical part, the synthesis of new strigolactone mimics in a form of tertiary amines with butenolide ring is described. Also, bioassay of the prepared mimics and their biological activity as germination stimulants of <i>Striga</i> and <i>Phelipanche</i> seeds is described.
Keywords	strigolactone, amine, butenolide, suicidal germination, mimics, <i>Phelipanche</i> , <i>Striga</i>
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

.....

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA_PrF_2017_010. Chtěl poděkovat celému kolektivu CRH, Oddělení chemické biologie a genetiky, za rady a pomoc při práci v laboratoři. Zejména bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph. D. za vedení mé diplomové práce, trpělivost, vstřícnost a jeho cenné rady nejenom v oblasti organické chemie. Dále děkuji Mgr. Haně Němčákové a Mgr. Martinu Hönigovi za měření GC/HPLC-MS a Mgr. Adéle Hýlové za odborné rady a vedení při biologickém testování připravených sloučenin.

Obsah

Obsah	6
Seznam použitých zkratek	8
1. Úvod a cíle práce	8
2 Teoretická část	9
2.1. Strigolaktony a jejich úloha v rostlinné říši	9
2.3 Struktura a biosyntéza přírodních strigolaktonů	12
2.4 Syntetické strigolaktony	16
2.4.1 Strigolaktonová analoga	16
2.4.2 Strigolaktonová mimetika	18
2.5 Strigolaktony – mechanismus působení	21
2.6 Strigolaktony – receptorová signalizace	28
2.7 Možnosti kontroly parazitického plevele	30
2.7.1 Ovlivnění biosyntézy strigolaktonů	30
2.7.2 Sebevražedné klíčení parazitů	31
2.7.3 Rozklad strigolaktonů v půdě před stimulací semen	32
3. Experimentální část	33
3.1 Chemikálie	33
3.2 Biologický materiál	33
3.3 Metody	33
3.4 Syntéza nových strigolaktonových mimetik	35
3.4.1 Příprava sekundárních aminů	35
3.4.2 Příprava bromfuranonů	40
3.4.3 Příprava dusíkatých strigolaktonových mimetik	41
3.5 Biologické testování připravených sloučenin	42
3.5.1 Sterilizace a kondicionace semen	42
3.5.2 Distribuce a stimulace semen	43

3.5.2 Přidání MTT	43
3.5.3 Přidání lyzačního roztoku a měření absorbance	44
4 Výsledky	45
4.1 Syntéza strigolaktonových mimetik.....	45
4.2 Biologické testování – semena parazitické rostliny <i>Striga hermonthica</i>	62
4.2 Biologické testování – semena parazitické rostliny <i>Phelipanche ramosa</i>	64
5 Diskuze	67
5.1 Syntéza sekundárních aminů	67
5.2 Syntéza bromfuranonů.....	71
5.4 Syntéza dusíkatých strigolaktonových mimetik	71
5.5 Biologická aktivita připravených sloučenin	74
6 Závěr	78
Použitá literatura	79

Seznam použitých zkratek

- AIBN – azobisisobutyronitril
AM – arbuskulární mykorhiza
Asp – kyselina asparagová
4BD – 4-Br-debranon
Boc – t-butyloxykarbonyl
Boc₂O – di-t-butyloxykarbonyl
CPMF – 5-(4-chlorofenoxy)-3-methylfuran-2(5*H*)-on
CCD7 – karotenoidní dioxygenasa 7
CCD8 – karotenoidní dioxygenasa 8
CDCl₃ – deuterovaný chloroform
D27 – β-karoten isomerasa
d – dublet
DCM – dichlormethan
DMAP – 4-dimethyl-aminopyridin
EtOAc – ethylester kyseliny octové
ES⁺ – ionizace elektrosprejem
HCl – kyselina chlorovodíková
His – histidin
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
J – štěpící konstanta
KI – jodid draselný
K₂CO₃ – uhličitan draselný
LiAlH₄ – tetrahydridohlinitan litný
m – multiplet
MAX1 – enzym patřící do rodiny cytochromů P450
Me – methyl
MeCN – acetonitril
MeOH – methanol
MeONa – methoxid sodný
MS – hmotnostní spektrometrie
MW – mikrovlny
NaBH₄ – tetrahydridoboritan sodný

NBS – *N*-bromsukcinimid

NaH – hydrid sodný

NMR – nukleární magnetická rezonance

PE – petrolether

ppm – parts per milion

rac – racemická směs

r.t. – teplota místnosti z anglického room temperature

s – singlet

SE – směrodatná odchylka z anglického standard error

Ser – serin

t – triplet

TEA – triethylamin

THF – tetrahydrofuran

TLC – tenkovrstevná chromatografie

δ – chemický posun

1. Úvod a cíle práce

Strigolaktony jsou rostlinné hormony, které se v oblasti vědy a výzkumu dostávají čím dál tím více do popředí. Chemicky jsou tyto látky odvozené od karotenoidů a mezi jejich známé funkce patří inhibice větvení nadzemních částí rostlin, zprostředkování arbuskulární mykorhizy a iniciace klíčení semen parazitických rostlin z rodu *Striga* a *Orobanche*.

Cílem teoretické části diplomové práce je vypracování literární rešerše na téma strigolaktony a jejich úloha v rostlinné říši. Cílem experimentální části je příprava nových terciárních aminů, které ve své struktuře obsahují strigoaktonový butenolidový kruh (D-kruh) a jejich následná charakterizace prostřednictvím fyzikálně-chemických metod. Důležitou součástí praktické části bude otestování nově připravených látek v biotestu na klíčení semen parazitických rostlin *Striga* a *Orobanche* (*Phelipanche*).

Parazitické rostlin z rodu *Striga* a *Orobanche* se řadí do skupiny kořenových parazitů, jejichž životní cyklus probíhá z velké části pod zemí. Jejich semena jsou velmi malá a v půdě dokáží přebývat životaschopné i několik desítek let. K jejich klíčení dochází pouze v případě, že jsou vystaveny specifickému stimulantu klíčení – strigolaktonu. Tyto chemické stimulanty jsou produkovány kořenovým systémem hostitelských rostlin. Velmi častými hostiteli parazitických rostlin *Striga* a *Orobanche* jsou hospodářsky významné plodiny (kukuřice, rajčata, slunečnice, tabák, rýže, mrkev, čirok, zelí, nebo luštěniny). Parazitismus těchto rostlin se tak stává v zasažených oblastech obrovským existencionálním a ekonomickým problémem.

Parazitické rostliny z rodu *Striga* jsou hojně rozšířeny v oblastech Afriky, Indie, Indonésie a Nové Guinei. Výskyt parazitů z rodu *Orobanche* je lokalizován v oblastech blízkého východu, východní Evropy, západní Asie, Středozemního moře a Austrálie.

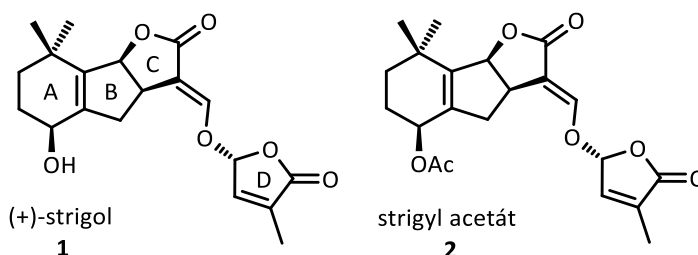
2 Teoretická část

2.1. Strigolaktony a jejich úloha v rostlinné říši

V rostlinné říši existuje nepřeberné množství chemických látek, které jsou rostlinami produkovány a vylučovány. Vznik těchto látek velice často úzce souvisí s adaptací rostliny na okolní prostředí. V závislosti na abiotický či biotický stres rostliny vyvolávají či potlačují biosyntézu daných látek. Většina těchto látek se řadí k rostlinným hormonům, jako jsou ethylén, jasmonáty, salicyláty, auxiny, cytokininy, gibereliny, atd. Některé z těchto látek jsou vylučovány ve velmi malém množství, a tak byla a je jejich izolace a identifikace obtížná a občas i náhodná. Typickým příkladem jsou strigolaktony.

V průběhu 50. let 20. století bylo prozkoumáno mnoho rostlin, s cílem nalézt stimulanty klíčení parazitických rostlin *Striga* a *Orobanche* (Brown a kol., 1951a; Brown a kol., 1951b). Podařilo se sice nalézt několik aktivních látek, avšak jejich struktura nebyla určena. Bylo však pozorováno, že v bazickém prostředí podléhají tyto látky degradaci, zatímco v mírně kyselém jsou relativně stabilní. (Brown a kol., 1952) a tak se předpokládalo, že tyto látky obsahují ve své struktuře lakton.

V polovině 60. let se Cookovi a jeho kolegům podařilo z kořenových exudátů bavlníku (*Gossypium hirsutum*) vyizolovat první látky, které stimulovaly klíčení semen parazitů z rodu *Striga* v dostatečném množství pro stanovení struktury. (Cook a kol., 1966). Jednalo se o látky nazvané (+)-strigol (**1**) a strigyl acetát (**2**) (obr. 1). O několik let později se stejnému týmu podařilo určit chemické struktury těchto látek (Cook a kol., 1972). Zajímavostí na tomto objevu je fakt, že bavlník není hostitelem pro tyto rostlinné parazity.



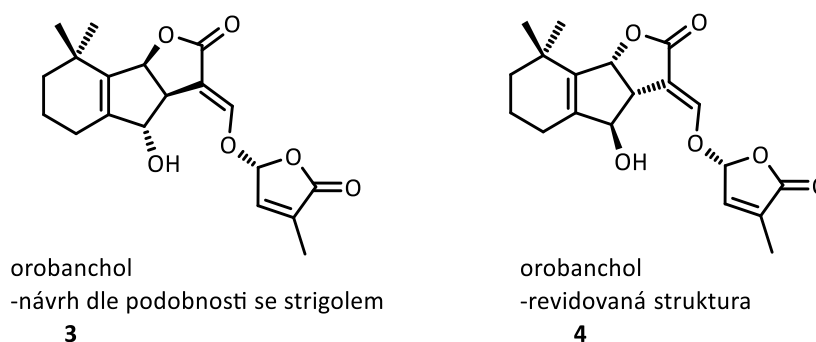
Obr. 1 – Struktury prvních vyizolovaných látek.

Když se na počátku 90. let podařilo (+)-strigol izolovat i z dalších rostlin jako je kukuřice (*Zea mays*), proso (*Panicum miliaceum*) a čirok (*Sorghum bicolor*), což jsou hostitelé

parazitických rostlin z rodu *Striga* (Siame a kol. 1993), bylo potvrzeno, že strigolaktony jsou produkovány jak hostitelskými, tak nehostitelskými rostlinami.

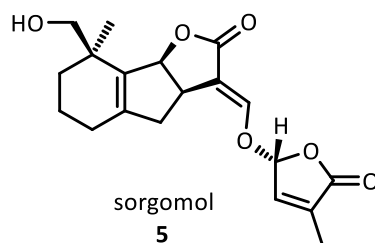
Na konci 20. století byla objevena první přírodní látka, která stimulovala klíčení semen parazitických rostlin z rodu *Orobanche* (Yokota a kol., 1998). Tento strigolakton byl vyzolován z kořenových exudátů jetele červeného (*Trifolium pretense*) a byl pojmenován orobanchol (**3**) (Obr. 2). Jeho chemická struktura byla navržena podle již známé struktury (+)-strigolu (Mori a kol., 1999).

V roce 2011 byl tento návrh přezkoumán a byla určena přesná stereochemie orobancholu, která je (-)-(3a*R*,4*R*,8b*R*,2'*R*)-orobanchol (**4**) (Obr. 2) (Ueno a kol., 2011). Od okamžiku upřesnění struktury orobancholu (**4**) dělíme strigolaktony podle připojení C-kruhu k B-kruhu na látky strigolového, respektive orobancholového typu.



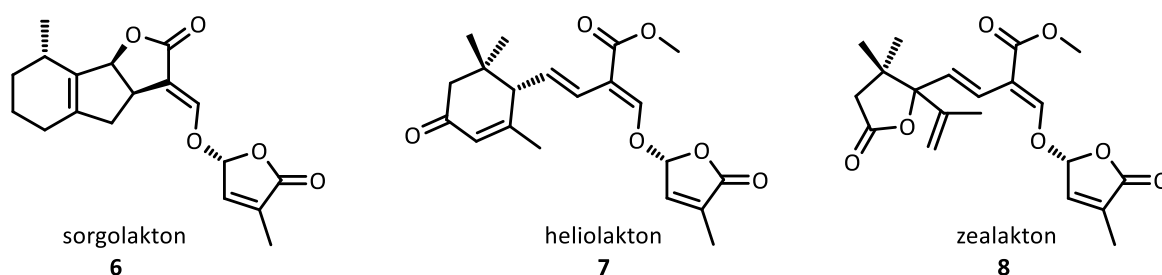
Obr. 2 – První návrh orobancholu a jeho revidovaná struktura.

Deset let po první izolaci orobancholu (**4**) byl objeven další strigolakton sorgomol (**5**) (Xie a kol. 2008). Při jeho následném testování se zjistilo, že aktivita strigolaktonů je výrazně ovlivněna kromě koncentrace i ročním obdobím, a především stereochemií a aní vycházející specifitou parazitické rostliny na daný strigolakton. Sorgomol (**5**) byl testován za identických podmínek na semenech parazitů *Striga hermonthica* a *Orobanche minor*. Parazitická rostlina *Striga hermonthica* klíčila při působení této látky až tisíckrát více než *Orobanche minor*, což je způsobeno specializací parazitických rostlin zejména rodu *Orobanche* na určitý druh hostitele, přičemž každá rostlina může produkovat strukturně rozdílné strigolaktony.



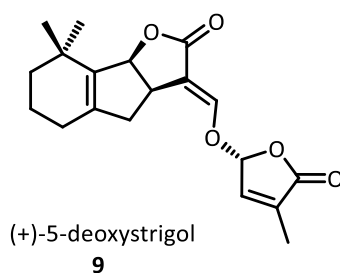
Obr. 3 – Stimulant klíčení parazitické rostliny *S. hermonthica*.

Dosud bylo vyizolováno a identifikováno okolo 18-ti dalších strigolaktonů (Dvořáková a Vaněk, 2015). Některé vybrané struktury jsou znázorněny na Obr. 4.



Obr. 4 – Vybrané struktury přírodních strigolaktonů.

Bylo však záhadou, proč rostliny vytvářejí látky (strigolaktony), které umožňují růst a vývoj parazitických rostlin a tím poškozují sami sebe. V roce 2005 Akiyama a kol. vyizolovali z leknínu japonského (*Lotus japonicus*) strigolakton 5-deoxystrigol (9) (Obr. 5) (Akiyama a kol., 2005, Akiyama a kol., 2010) a zjistili, že tato sloučenina je schopna iniciovat symbiózu mezi rostlinami a arbuskulárně mykorhytickými (AM) houbami. Další experimenty s AM houbou *Gigaspora margarita* ukázaly, že kromě zprostředkování symbiózy jsou strigolaktony silnými větvícími faktory hyf těchto hub.

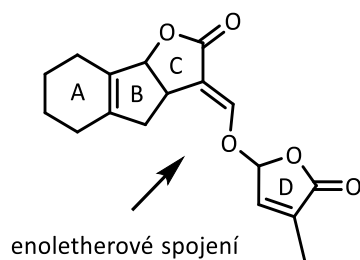


Obr. 5 – Struktura vyizolovaná z leknínu japonského.

V přírodě však existují i rostliny, které nevyužívají symbiózu s AM houbami, a i přesto strigolaktony produkují. Předpokládalo se tedy, že strigolaktony musí mít ještě jinou funkci. Ta byla objevena v roce 2008 dvěma na sobě nezávislými týmy. Tým Gomez-Roldana prováděl experimenty na mutantech hrachu (*Pisum sativum*) a tým Umehary na mutantech rýže (*Oryza sativa*) (Gomez-Roldan a kol., 2008; Umehara a kol., 2008), přičemž na obou plodinách bylo prokázáno, že strigolaktony inhibují větvení stonku rostlin.

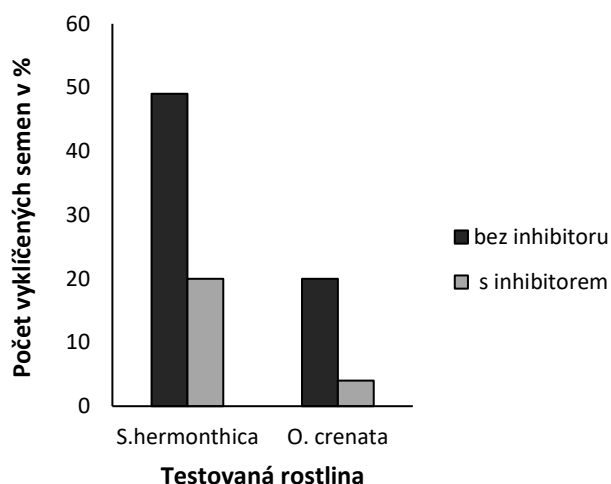
2.3 Struktura a biosyntéza přírodních strigolaktonů

Přírodní strigolaktony jsou látky, jejichž základní struktura je tvořena tricyklickým ABC skeletem a furanovým kruhem (D kruh) (Hauck a kol., 1992). Tyto dvě části jsou vzájemně spojeny prostřednictvím enoletherového můstku (Obr. 6).



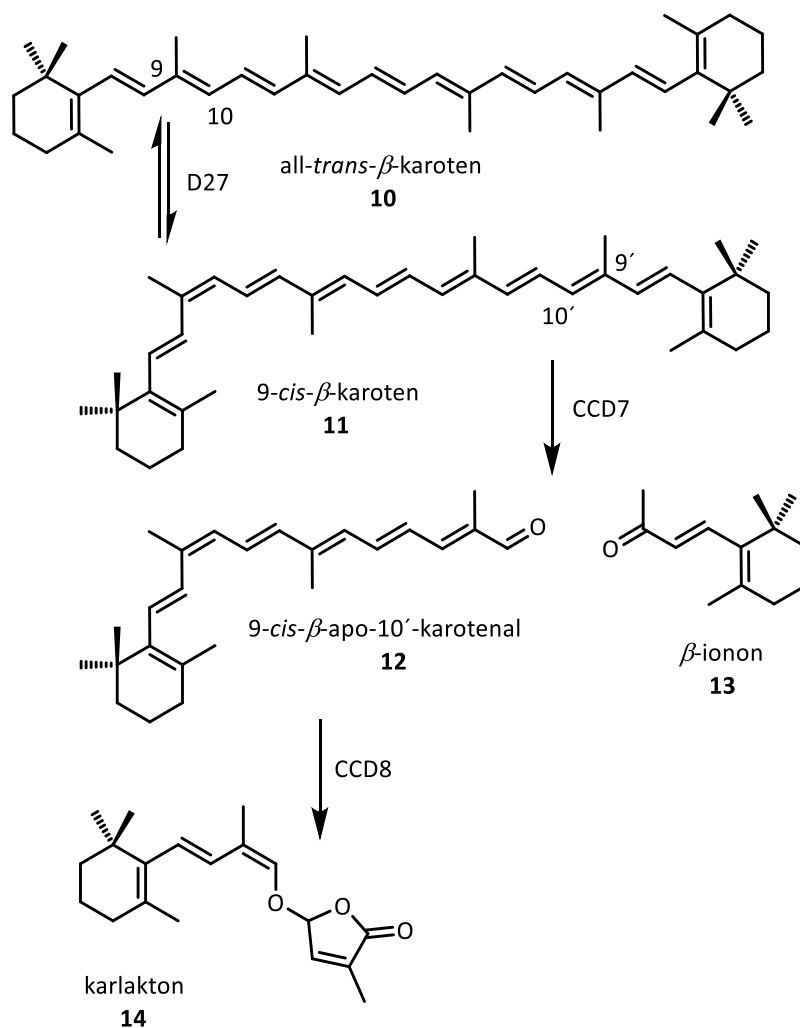
Obr. 6 – Obecná struktura přírodních strigolaktonů.

Na počátku 21. století se objevili první domněnky o tom, že by biosyntéza strigolaktonů v rostlinách mohla souviset s biosyntetickou dráhou karotenoidů. Matusova a kol. tuto domněnku potvrdili v roce 2005 (Matusova a kol., 2005). Prováděli experimenty na mutantech rýže s pozměněnou biosyntetickou dráhou karotenoidů, popř. aplikovali inhibitory karotenoidní biosyntézy. Poté odebrali a otestovali exudáty těchto rostlin v biotestu na klíčení semen parazitických rostlin *Orobancha crenata* a *Striga hermonthica*. Semena obou parazitických rostlin, u kterých nebyl použit inhibitor karotenoidní biosyntézy, klíčila mnohonásobně více, než semena s aplikovaným inhibitorem (Graf 1).



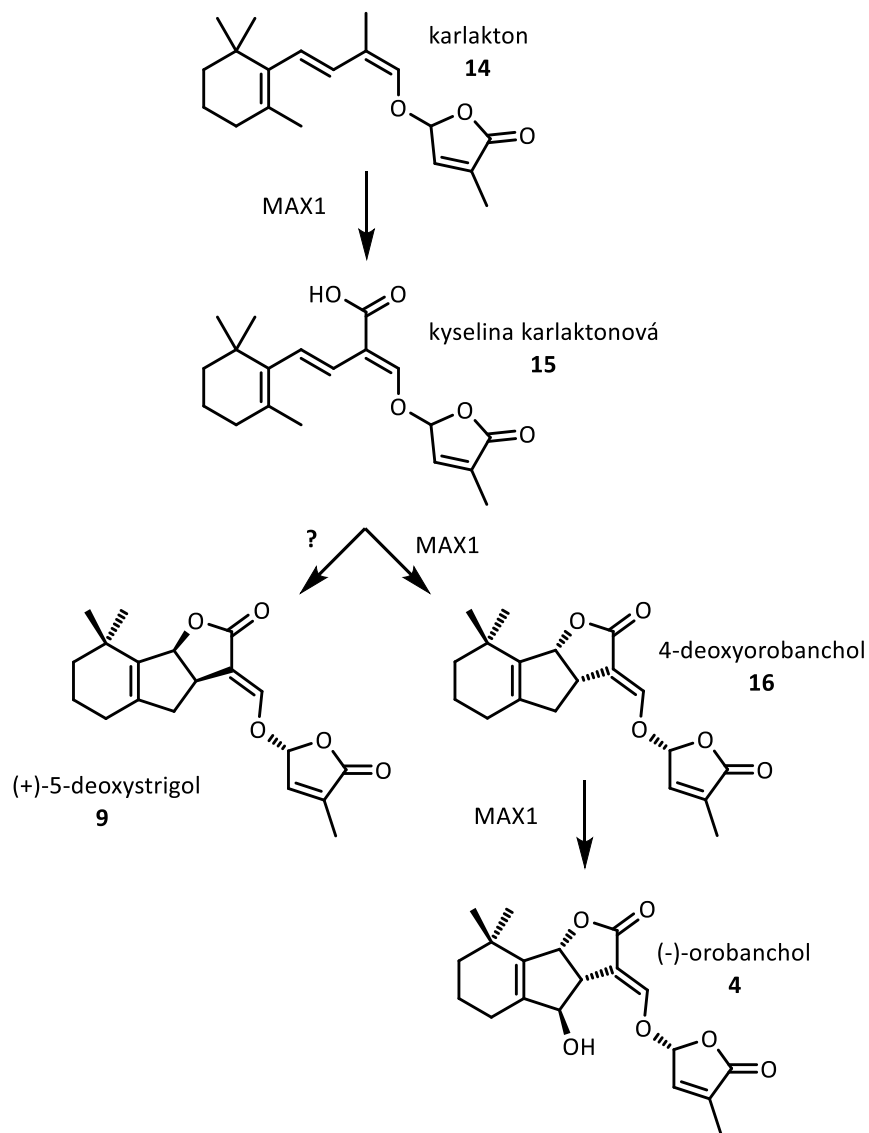
Graf 1 – Klíčivost semen parazitických rostlin *S. hermonthica* a *O. crenata* bez inhibitoru a s inhibitorem karotenoidní biosyntézy.

Od tohoto pozorování se tak odvíjel výzkum biosyntézy strigolaktonů. Bylo navrženo, že prvním krokem je reakce katalyzována izomerázou D27 (DWARF27), která způsobuje izomeraci dvojně vazby C9-C10 v all-trans- β -karotenu (**10**) (Alder a kol., 2012). Dále dochází k rozštěpení vzniklého 9-cis- β -karotenu (**11**) prostřednictvím enzymu CCD7 (Carotenoid cleavage dioxygenase 7) na β -ionon (**13**) a 9-cis- β -apo-10'-karotenal (**12**). Následně do biosyntézy vstupuje enzym CCD8 (Carotenoid cleavage dioxygenase 8), který způsobuje konverzi 9-cis- β -apo-10'-karotenalu na karlakton (**14**), což je dosud jediný známý prekurzor přírodních strigolaktonů. Při testování jeho biologické aktivity bylo zjištěno, že se nepodílí na žádné ze známých strigolaktonových funkcí (Obr. 7).



Obr. 7 – Obecné schéma biosyntézy karlaktonu.

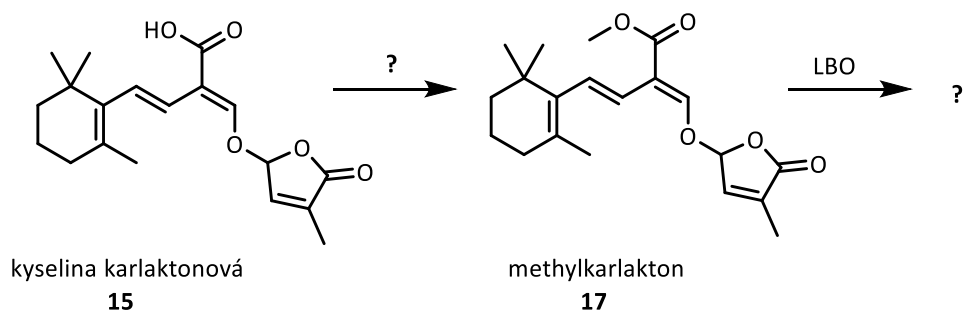
Karlakton je pak dále modifikován prostřednictvím homologních enzymů MAX1 (Zhang a kol., 2014). V rýži se nachází 5 homologních genů MAX1, které mohou tyto enzymy exprimovat. Bylo prokázáno, že jeden z homologů MAX1 katalyzuje oxidaci karlaktonu na kyselinu karlaktonovou (**15**) a následně na 4-deoxyorobanchol (ent-2'-epi-5-deoxystrigol) (**16**), což je prekurzor orobancholové rodiny strigolaktonů. Další z homologů MAX1 následně přetváří 4-deoxyorobanchol na (-)-orobanchol (**6**). Obdobným mechanismem pravděpodobně vzniká také prekurzor strigolové rodiny strigolaktonů, (+)-5-deoxystrigol (**9**) (Obr. 8).



Obr. 8 – Obecné schéma konverze karlaktonu na (-)-orobanchol a 5-deoxystrigol.

V huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) se však vyskytuje pouze jeden gen *MAX1*, a i přesto v něm dochází k syntéze strigolaktonů jako je např. (+)-strigol a (-)-orobanchol (Goldwasser a kol., 2008; Abe a kol., 2014). Tento gen stejně jako v rýži exprimuje enzym, který umožňuje konverzi karlaktonu na kyselinu karlaktonovou, avšak již nedochází k další transformaci na deoxystrigol, respektive deoxyorobanchol (Abe a kol., 2014). Bylo však pozorováno, že kyselina karlaktonová může být následně methylována dosud neznámým enzymem na methylkarlakton (methylester kys. karlaktonové) (**17**). Tato sloučenina oproti karlaktonu vykazuje mírnou aktivitu při potlačování větvení stonku, což je typická funkce strigolaktonů. V další fázi biosyntézy může docházet k oxidaci methylkarlaktonu enzymem LBO (lateral branching oxidoreductase) na dosud neidentifikovaný produkt (Obr. 9). Není

však prokazané, že strigolaktony mohou vznikat i tímto alternativním způsobem, nebo že touto cestou vzniká jen methylkarlakton a jeho deriváty.



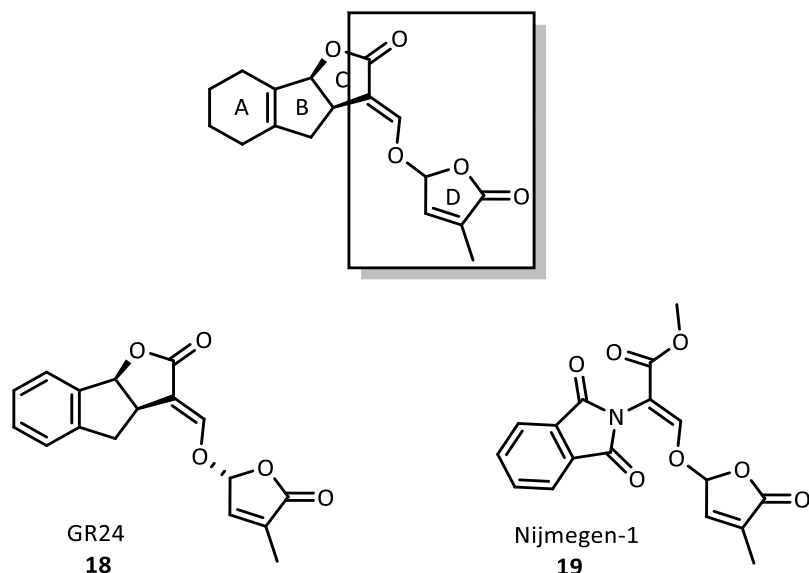
Obr. 9 – Obecné schéma konverze kyseliny karlaktonové na methylkarlakton a dosud neidentifikovaný produkt.

2.4 Syntetické strigolaktony

Strigolaktony se v rostlinách a kořenových exudátech vyskytují jen ve velmi nízkých koncentracích a během jejich purifikace často dochází k jejich degradaci. Získat je tedy ve větším množství je velmi pracné a časově náročné. Taktéž totální syntéza přírodních strigolaktonů je náročná a vzhledem k nutnosti dodržení přesné stereochemie i drahá. Tento problém lze vyřešit přípravou nových syntetických sloučenin, u kterých by zůstala zachována biologická aktivita. Takovéto látky lze z hlediska chemické struktury rozdělit na strigolaktonová analoga a strigolaktonová mimetika.

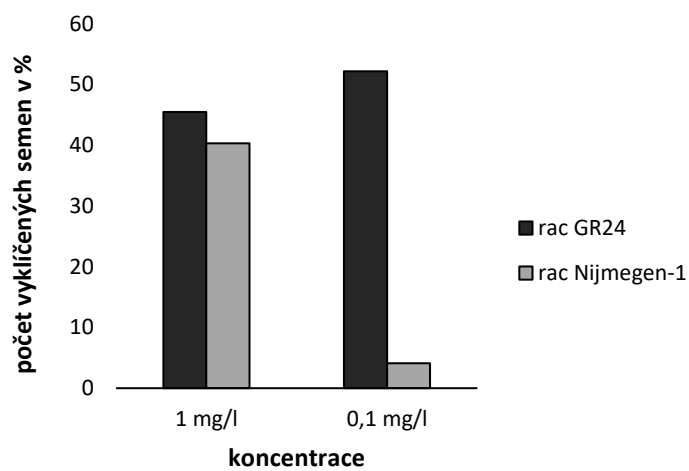
2.4.1 Strigolaktonová analoga

Nové syntetické deriváty, které svojí chemickou strukturou velmi připomínají přírodní strigolaktony jsou strigolaktonová analoga. Jedná se o sloučeniny, u kterých zůstal z původní struktury přírodních strigolaktonů zachován D-kruh, enolétherové spojení a karboxylová skupina. Nejvýznamnějšími sloučeninami této skupiny jsou GR24 (**18**) a Nijmegen-1 (**19**) (Obr. 10) (Johnson a kol., 1981; Nefkens a kol., 1997).



Obr. 10 – Vyznačení základní struktury strigolaktonových analog a struktury standardů pro biotesty na klíčení semen parazitů.

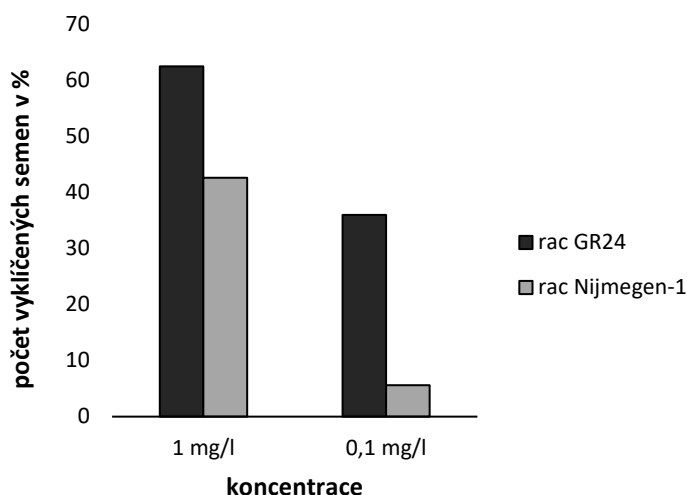
Tyto látky vykazují vysokou biologickou aktivitu, a proto jsou dodnes využívány jako pozitivní kontroly při biologickém testování klíčivosti semen parazitických rostlin rodu *Striga* (Graf 2) tak *Orobancha* (Graf 3) (Nefkens a kol., 1997; Mangnus a kol., 1992).



Graf 2 – Klíčivost semen parazita *S. hermonthica* po aplikaci GR24 a Nijmegen-1.

Při sledování aktivity jednotlivých testovaných látek u parazita *S. hermonthica* při koncentraci 1 mg/L lze pozorovat poměrně vysokou klíčivost obou testovaných látek. Při

aplikaci desetkrát nižší koncentrace došlo k mírnému zvýšení klíčivosti racemátu GR24, zatímco v případě látky Nijmegen-1 došlo téměř k vymizení aktivity (Graf 2).

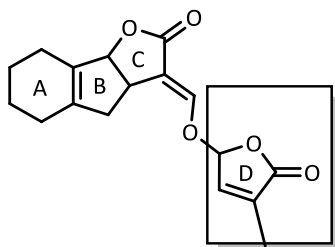


Graf 3 – Klíčivost semen parazita *O. crenata* po aplikaci GR24 a Nijmegen-1.

V Grafu 3 lze pozorovat, že u parazitické rostliny *O. crenata* při stejné koncentraci (1 mg/L) aplikované látky byla aktivita obou testovaných sloučenin opět poměrně vysoká. Při použití desetkrát nižší koncentrace došlo tentokrát ke snížení aktivity obou sloučenin. Z uvedených grafů je také patrné, že látkou s lepší aktivitou a obecnějším použitím v biotestech je látka GR24. Naproti tomu je Nijmegen-1 snáze připravitelným.

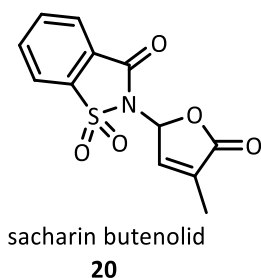
2.4.2 Strigolaktonová mimetika

Další skupinou syntetických derivátů jsou strigolaktonová mimetika. U těchto strigolaktonů zůstal z původního ABCD skeletu zachován jen D-kruh (Obr. 11). Jedná se tedy o strukturně zcela odlišné látky, a tak se předpokládá, že mechanismus působení bude také odlišný.



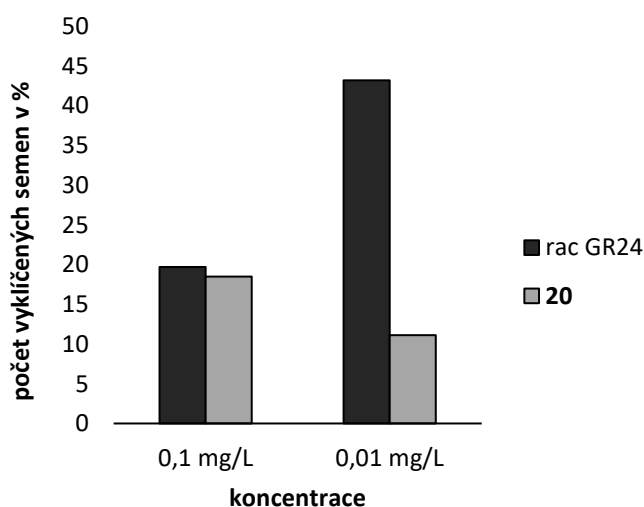
Obr. 11 – Vyznačení základní struktury strigolaktonových mimetik.

K objevení těchto sloučenin došlo zcela náhodou, když profesor Zwannenburg se svým týmem otestoval sacharin-butenolid (**20**) (Obr. 12) společně se strigolaktonovými analogy v biotestu na klíčení semen parazitů (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011).



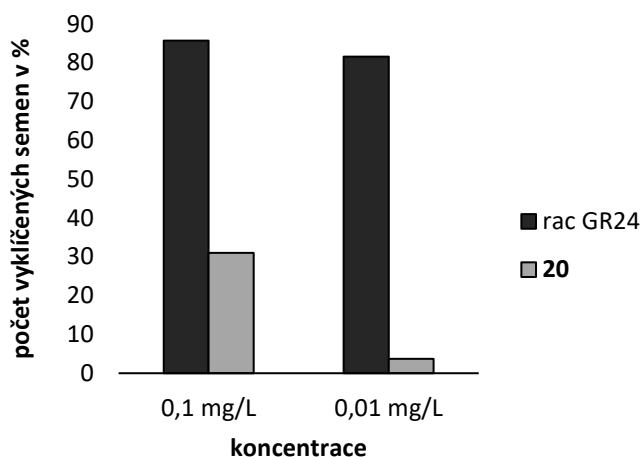
Obr. 12 – Struktura prvního testovaného strigolaktonového mimetika.

Biologická aktivita této zcela nové, strukturně odlišné látky byla překvapivě vysoká. Porovnání její aktivity se standardem GR24 je znázorněno v Grafu 4 a Grafu 5.



Graf 4 – Klíčivost semen parazita *S. hermonthica* po aplikaci GR24 a **20**.

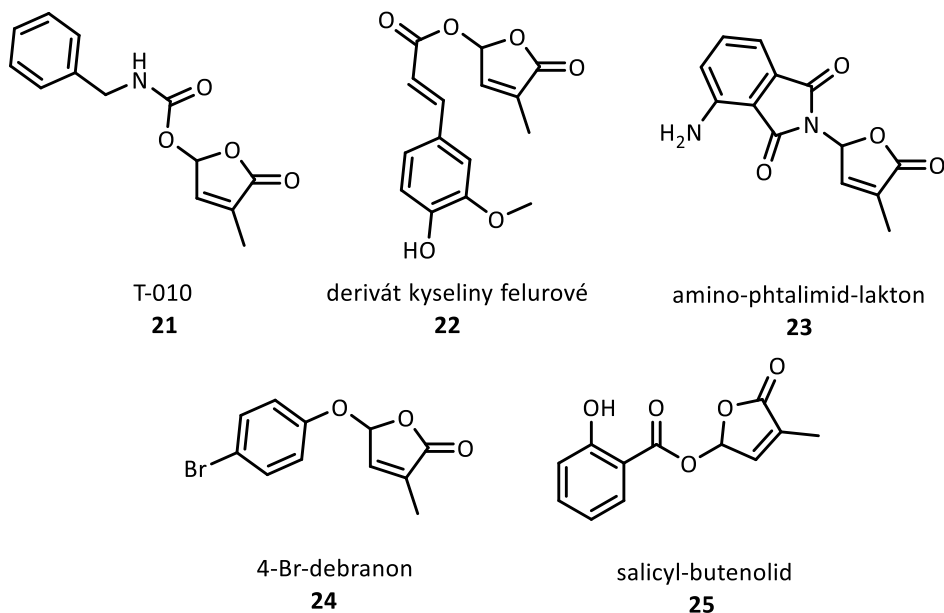
Při sledování klíčivosti testované látky **20** a racemické směsi GR24 u parazita *S. hermonthica* při koncentraci 0,1 mg/L lze pozorovat, že se její aktivita téměř shoduje s aktivitou standardu GR24. Při desetinásobném snížení koncentrace aplikovaných látek (0,01 mg/L) došlo ke zvýšení aktivity racemické směsi GR24, avšak v případě látky **20** tomu bylo obráceně.



Graf 5 – Klíčivost semen parazita *O. crenata* po aplikaci GR24 a **20**.

V Grafu 5 lze pozorovat, že u parazita *O. crenata* při koncentraci 0,1 mg/L aplikované látky, klíčila látka **20** v porovnání s pozitivní kontrolou GR24 mnohonásobně méně než u parazita *S. hermonthica*. Při desetinásobném snížení koncentrace došlo téměř k vymizení aktivity látky **20**, zatímco aktivita racemátu GR24 zůstala zachována.

Tento významný milník v přípravě strigolaktonových derivátů vedl k syntéze mnoha dalších sloučenin. Struktury některých vybraných strigolaktonových mimetik jsou zobrazeny na Obr. 12 (Zwannenbura a Mwakaboko 2011; Fukui a kol., 2013; Cala a kol. 2016; Samejima a kol., 2016).



Obr. 12 – Vybraní zástupci strigolaktonových mimetik.

Výše vyobrazené látky (Obr. 12) byly testovány na semenech parazitů z rodu *Orobanche* a *Striga*. Jako aktivní se ukázaly látky **21**, **22**, **23** a **25**.

Strigolaktonové mimetikum **21** bylo testováno na semenech parazita *S. hermonthica* a jeho klíčivost při aplikované koncentraci 0,1 mg/l dosahovala 38,1 %. Při desetinásobném snížení koncentrace aplikované látky došlo k poklesu aktivity na 9,9 %.

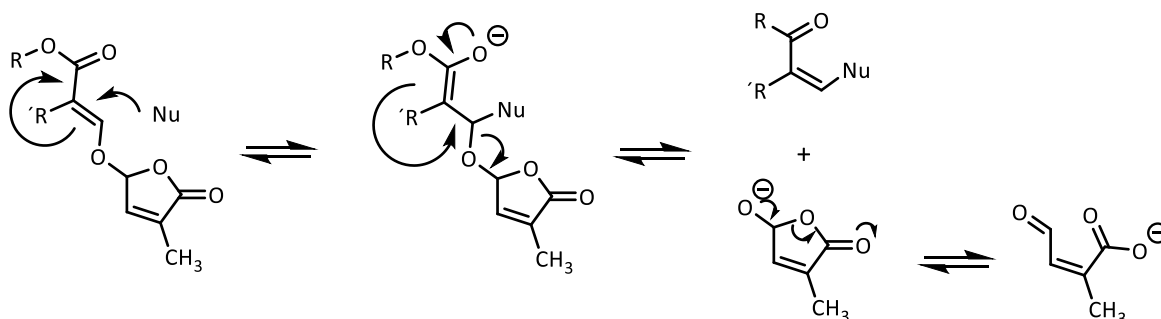
Látka **25** stimulovala klíčení semen parazitické rostliny *O. cernua* při koncentraci 0,1 mg/l z 81,7 %, zatímco klíčivost látky **22** na semenech téhož parazita při stejné koncentraci byla pouze 58,3 %. Mimetikum **23** bylo testováno na semenech parazita *O. cumana* a jeho klíčivost při koncentraci 0,1 mg/l dosahovala 80,3 %. Při stonásobném snížení koncentrace aplikované látky (0,01 mg/l) došlo u látky **21** jen k mírnému snížení aktivity (72,4 %), avšak látka **22** byla při této koncentraci téměř neaktivní (2,1 %). U látky **23** došlo při stonásobném snížení koncentrace k poklesu klíčivosti na 24,1 %.

Látka **24** byla zcela neaktivním stimulantem klíčení semen parazitů z rodu *Striga* a *Orobanche* (Fukui a kol., 2013). Při jejím dalším testování na mutanech rýže *d10* se však ukázalo, že se jedná o velmi silný inhibitor větvení stonku.

2.5 Strigolaktony – mechanismus působení

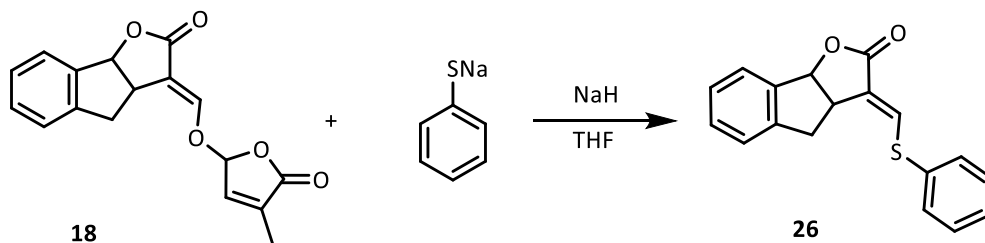
První fáze biologických procesů, kterými dochází ke klíčení semen parazitů, je interakce strigolaktonu s receptorem. V dalším kroku pak pravděpodobně dochází k modifikaci receptoru a dalším reakcím, které vedou ke klíčení semen parazitů.

I bez znalosti strigolaktonového receptoru byl první předpokládaný mechanismus navržen profesorem Zwannenburgem v roce 1992 (Mangnus a Zwanenburg, 1992). Tento mechanismus zahrnuje atak nukleofilu přítomného v receptoru semene s následnou adičně-eliminací reakcí vedoucí k odštěpení butenolidového kruhu (D-kruhu) (Obr. 13).



Obr. 13 – Předběžný mechanismus působení strigolaktonových analog a přírodních strigolaktonů.

K potvrzení tohoto hypotetického mechanismu byly provedeny reakce GR24 s thiofenolátem a α -benzylthiolátem což jsou silná nukleofilní činidla. Výsledné produkty těchto reakcí měly nahrazeny D-kruh jednotlivými nukleofily (**26**) (Obr. 14) (Mangnus a Zwanenburg, 1992).



Obr. 14 – Reakce GR24 s thiolátem sodným.

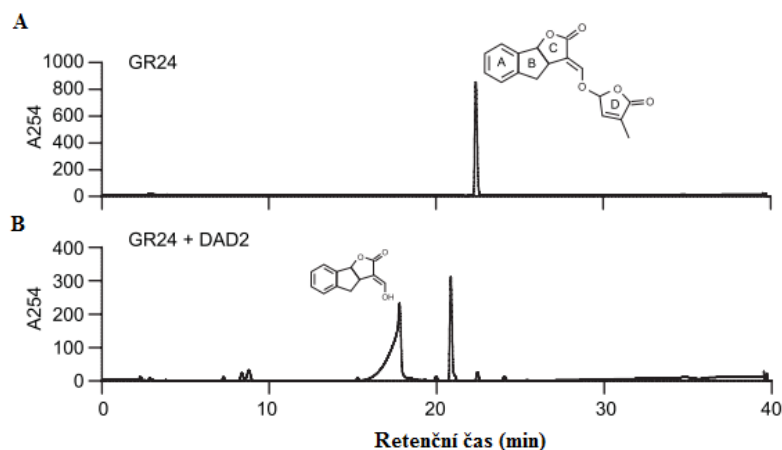
K úplnému ověření tohoto mechanismu bylo nezbytné znát interagující receptor strigolaktonů. Hlavním cílem tedy bylo nalézt tento receptor a zjistit, jakým způsobem strigolaktony zajišťují komunikaci v rostlinách.

První krůčem při jeho hledání byla identifikace genu, který se podílí na strigolaktonové signalizaci (Hamiaux a kol., 2012). Tento gen nese označení *DAD2* a byl identifikován v *petunii* v roce 2012. Produktem tohoto genu je protein DAD2. S využitím rentgenové krystalografie bylo zjištěno, že se jedná o α/β hydrolasu, složenou ze sedmi β skládaných listů a sedmi α helixů (Obr. 15). Při detailnějším zkoumání jeho krystalové struktury bylo odhaleno, že enzym DAD2 obsahuje sekvenci aminokyselin Ser-His-Asp, která je schopná přímé interakce se strigolaktonem.



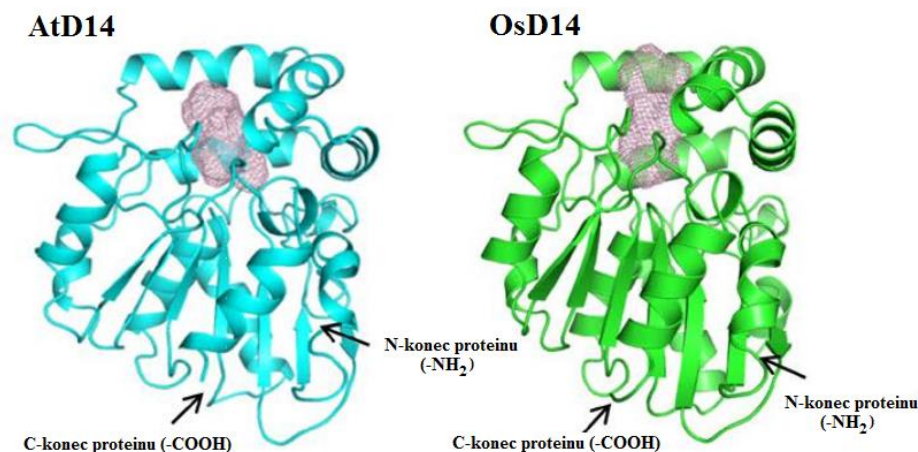
Obr. 15 – Krystalová struktura proteinu DAD2 (vytvořeno v programu PyMOL).

K ověření hypotézy, že se DAD2 opravdu zapojuje v signalizaci strigolaktonů, byly prováděny experimenty se strigolaktonovým analogem GR24 (Hamiaux a kol., 2012). Hamiaux a jeho kolegové nechali inkubovat tento protein s racemickou směsí GR24 (**18**). Následně vzorek zanalyzovali s využitím metody HPLC/MSMS a pozorovali, že se v něm nachází kromě GR24 i formylovaný ABC tricykl (Obr. 16) a neznámá látka, kterou považovali za artefakt.



Obr. 16 – (A) HPLC spektrum GR24, (B) HPLC spektrum po inkubaci GR24 s DAD2 proteinem (převzato a upraveno z Hamiaux a kol., 2012).

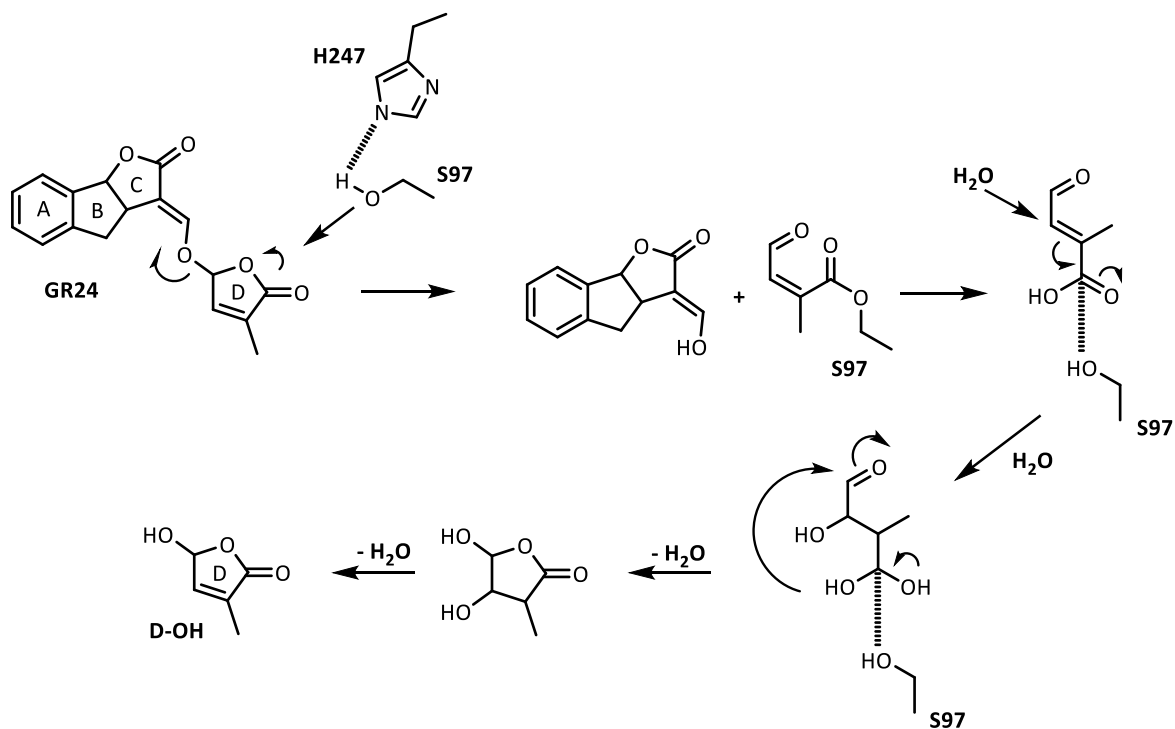
Další studie prováděné na rýži a *Arabidopsis thaliana* vedly k odhalení dalšího genu označovaného jako DWARF14 (D14) (Zhao a kol., 2013). Produktem genové exprese D14 je protein D14. K pochopení jeho funkce, jej Zhao se svým týmem vyizolovali z *A. thaliana* (AtD14) a z rýže (OsD14). Následně provedli jejich krystalizaci a jednotlivé krystalové struktury porovnali. Zjistili, že se jedná o enzymy ze stejné rodiny α/β hydrolas (Obr. 17).



Obr. 17 – Krystalové struktury proteinů AtD14 a OsD14 (převzato a upraveno ze Zhao a kol., 2013).

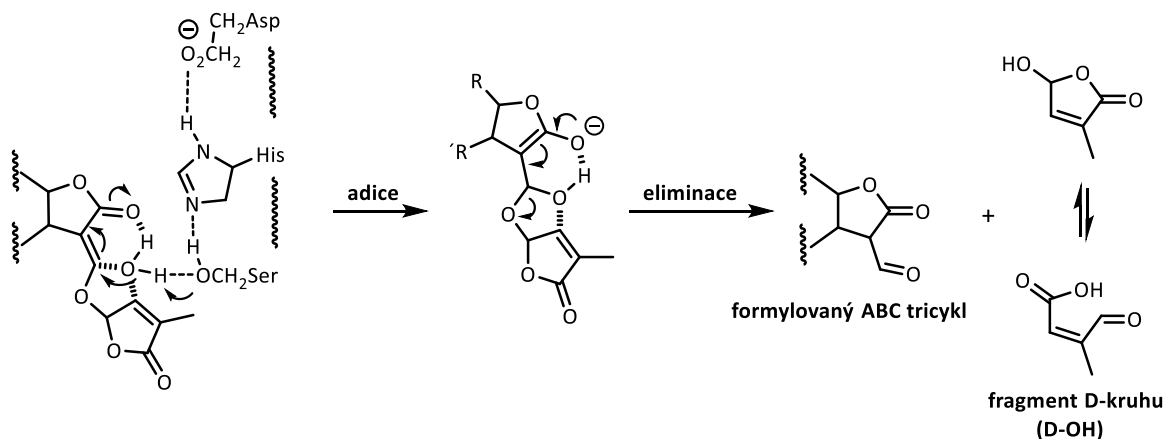
Po jejich důkladnějším prozkoumání se je rozhodli porovnat také s DAD2 proteinem. Výsledky ukázaly, že se struktury všech tří proteinů téměř celé překrývají, a tak usoudili, že se pravděpodobně jedná o ortologní proteiny. Následně byla snaha získat krystalovou strukturu D14 s navázaným analogem GR24. To se však nepodařilo, namísto toho byla získána krystalová struktura proteinu D14 s kovalentně navázaným rozkladným produktem 2,4,4-trihydroxy-3-methyl-3-butenalem. K potvrzení předpokladu, že i protein D14 je součástí strigolaktonové kaskády byly provedeny obdobné experimenty s GR24 jako v případě proteinu DAD2 (Nakamura a kol., 2013). Nakamura a kolektiv nechali opět inkubovat tento analog s proteinem D14, což vedlo opět k tvorbě formylovaného ABC tricyklu, ale navíc i k tvorbě hydroxybutenolidu (D-OH), který Hamiaux a jeho tým považovali za artefakt (Zhao a kol., 2013).

Veškeré tyto poznatky vedly k vytvoření předběžného mechanismu, ve kterém se zapojuje aminokyselinová triáda Ser-His-Asp (Zhao a kol., 2013). Po vniknutí strigolaktonu do kavity enzymu D14 dochází pravděpodobně k jeho hydrolýze, která je iniciována aminokyselinovou tirádou. Následkem je odstoupení formylovaného ABC kruhu a vznik otevřeného butenolidového kruhu s navázaným serinem (Scaffidi a kol., 2012). V další fázi pravděpodobně dochází k izomerizaci dvojně vazby a adici vody, která vede k tvorbě meziprojektu navázaného na serin enzymu D14. Na závěr probíhá eliminace vody a laktonizace D-kruhu, což vede ke vzniku hydroxy butenolidového kruhu (D-OH) (Obr. 18).



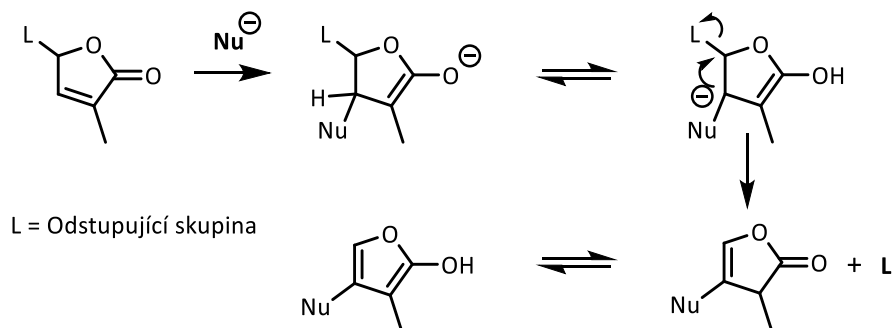
Obr. 18 – Předběžný mechanismus působení enzymu D14.

Tento mechanismu však přepokládá nukleofilní atak na karboxyl D-kruhu a zcela ignoruje mnohem smysluplnější atak nukleofilu na enoleterový můstek v takzvané Michaelově adici. Profesor Zwanenburg se svými kolegy navrhl alternativní mechanismus, který respektuje chemické chování jednotlivých částí struktury (Zwanenburg a kol., 2013). Tento navržený mechanismus počítá se zastavením rotace D-kruhu v důsledku koordinace vody mezi C a D-kruhem strigolaktonového skeletu. Díky tomu dojde ke zvýšení entropie reakce, což umožní Michaelovu adici vody na C-kruh, která způsobí při eliminačním kroku reakce odštěpení hydroxy D-kruhu od formylovaného ABC tricyklu. Vše za katalýzi již zmíněné aminokyselinové triády (Obr. 19).

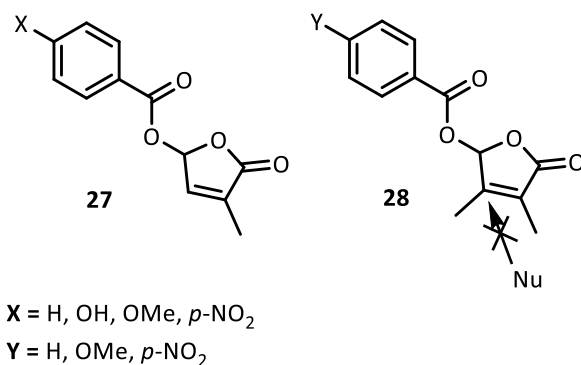


Obr. 19 – Předpokládaný mechanismus hydrolyzy strigolaktonů v D14.

Výše uvedený mechanismus lze aplikovat pouze u přírodních strigolaktonů a strigolaktonových analog, nikoli však u strigolaktonových mimetik. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.4, strigolaktonová mimetika mají z původní struktury zachován pouze D-kruh a zcela postrádají enoléterové spojení, tudíž mechanismus účinku musí být odlišný od přírodních strigolaktonů a strigolaktonových analogů. První mechanismus pro strigolaktonová mimetika byl opět navržen profesorem Zwanenburgem (Zwanenburg a Mwakaboko, 2011). Nejdříve dochází k Michaleově adici nukleofilu na D-kruh v pozici uhlíku C-4 a poté k přesmyku protonu. Závěrem je eliminována odstupující skupina (Obr. 20) K potvrzení tohoto návrhu bylo připraveno sedm 5-benzoyloxybutenolidů (**27**) (**28**) (Obr. 21) (Zwanenburg a kol., 2013). Čtyři z nich iniciovali klíčení semen parazita *S. hermonthica*. U zbylých třech byl vodíkový atom v pozici C-4 nahrazen methylem. Přítomnost methylové skupiny by měla znemožnit nukleofilní atak, tudíž by tyto sloučeniny neměly být aktivátory klíčení semen parazitických rostlin. Výsledky testů ukázaly, že tato mimetika jsou opravdu neaktivními stimulanty klíčení semen parazita *S. hermonthica*.

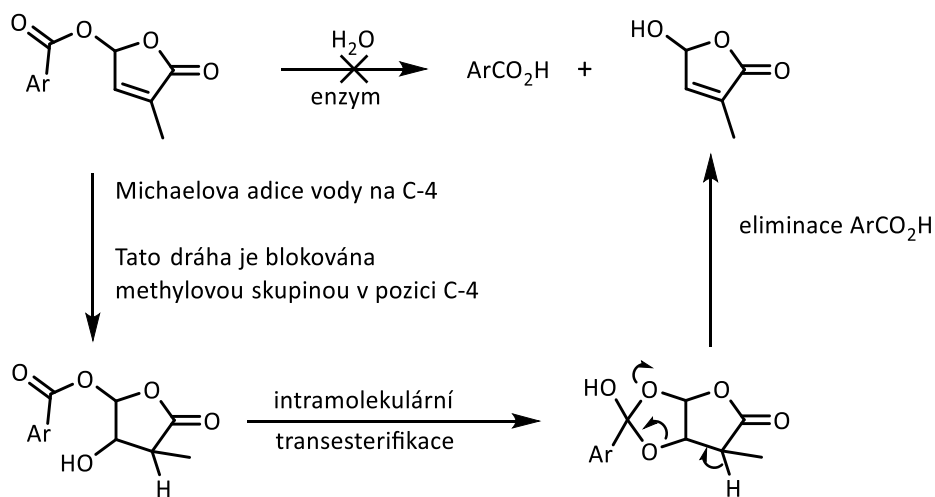


Obr. 20 – Předpokládaný mechanismus působení strigolaktonových mimetik.



Obr. 21 – Mechanismus působení strigolaktonových mimetik při přítomnosti methylové skupiny v pozici C-4.

Tento mechanismus neumožňuje vznik hydroxy D-kruhu (D-OH) a proto, když bylo prokázáno, že při hydrolyze strigolaktonů v receptoru dochází ke vzniku tohoto kruhu a že tento kruh je nezbytný pro aktivování signální dráhy byl tento mechanismus revidován (Zwannenburger a kol., 2016a). Mechanismus zahrnuje Michaelovu adici vody na D-kruh, s následnou intramolekulární transesterifikací, která vede ke vzniku hydroxy butenolidu a kyseliny s arylovým zbytkem. U sloučenin, které mají v pozici C-4 methylovou skupinu se předpokládá, že by neměly být aktivní, jelikož u nich nemůže dojít k Michaelově adici (Obr. 22).

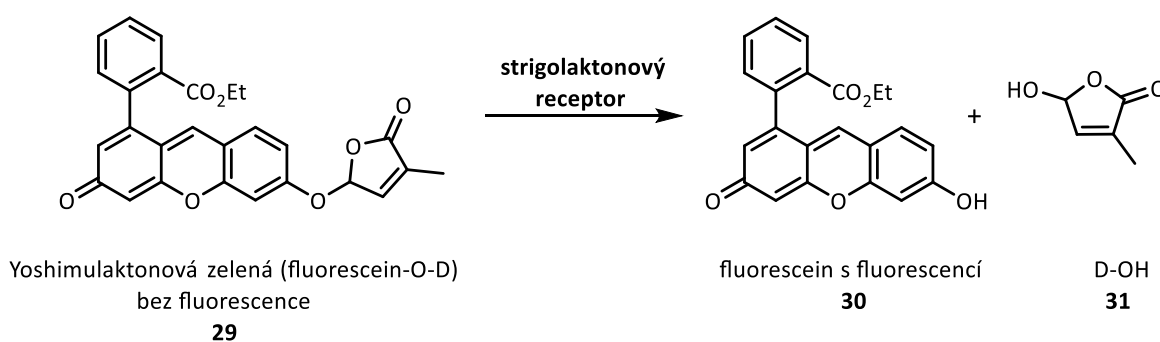


Obr. 22 – Revidovaný mechanismus působení strigolaktonových mimetik.

V případě debranonů (**24**) (Obr. 12), však musí existovat alternativní mechanismus. Jak již bylo zmíněno, tak tyto látky jsou silnými inhibitory větvení stonku a místo aroyloxy skupiny

obsahují fenoxyskupinu. V tomto případě tedy nemůže docházet k Michaelově adici vody na butenolid v pozici C-4 a následnému odštěpení hydroxy D-kruhu.

V roce 2015 bylo pozorováno, že i u fenolických sloučenin dochází rozštěpení strigolaktonu na hydroxybutenolid a zbytek molekuly (Tsuchiya a kol., 2015). Tsuchiya a kolektiv připravili strigolaktonové mimetikum s navázanou fluorescenční značkou (**29**) na bázi fluoresceinu v pozici C-5. Tuto látku aplikovali na semena parazita *S. hermonthica* a po dobu 72 hodin sledovali fluorescenci. V případě klíčení semen, došlo k odstoupení D-OH (**31**) od fluorescenční značky (**30**) (Obr. 23). Důsledkem této změny byl nárůst fluorescence. Žádný relevantní mechanismus však zatím nebyl navržen.



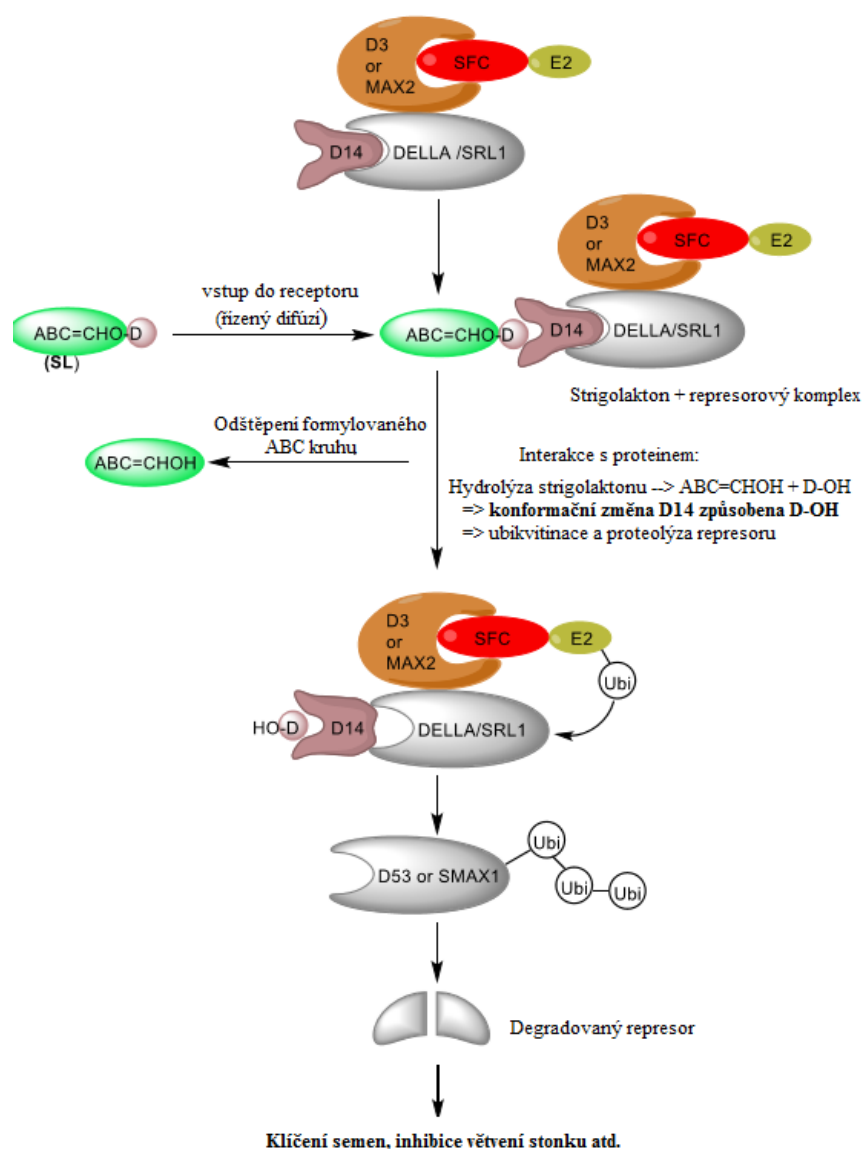
Obr. 23 – Strigolaktonové mimetikum značené fluorescenční značkou.

2.6 Strigolaktomy – receptorová signalizace

Podobně jako v případě auxinové, jasmonátové či giberelinové signalizace je transdukce signálu strigolaktomy založena na hormonem-aktivované proteolýze. Základní komponentou tohoto signalizačního mechanismu je tzv. SCF komplex (Skp, Cullin, F-box protein obsahující komplex), který se řadí mezi tzv. E3 ubikvitin ligasy umožňující polyubikvitinaci proteinů a tím jejich následnou degradaci v proteasomu.

Při porovnání krystalové struktury D14 (popř. DAD2) a giberelinového receptoru *GID1* bylo zjištěno, že D14 neobsahuje helikální víko jako je tomu v případě *GID1* (Jiang a kol., 2013; Nakamura a kol., 2013; Zhao a kol. 2013) avšak byla v enzymu D14 dokázána přítomnost aminokyselinové triády Ser-His-Asp, díky které dochází k odštěpení hydroxybutenolidu (D-OH) od zbytku molekuly strigolaktonu. První návrh strigolaktonové signální kaskády byl pak odvozen od známé giberelinové signalizace (Obr. 24) (Ueguchi-Tanaka a kol., 2007). Po vazbě D-OH do aktivního místa receptoru dojde ke změně konformace

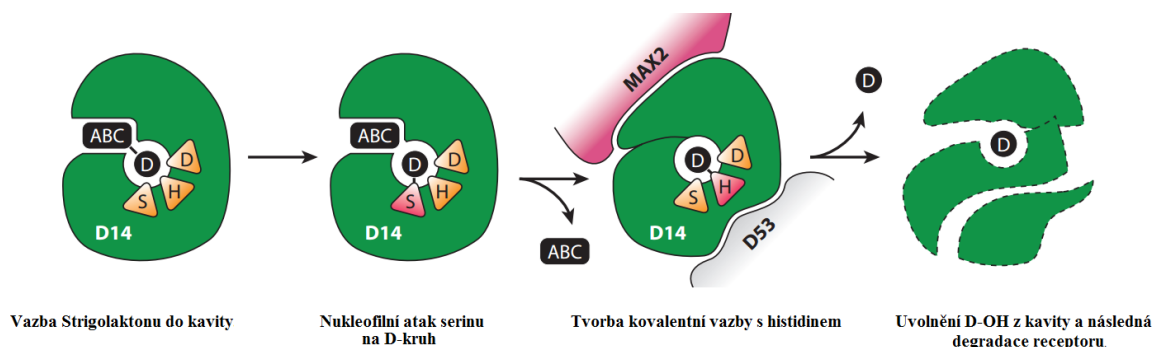
proteinu D14, který je v komplexu s proteinem SLR1 patřící do skupiny DELLA proteinů, Tato konformační změna způsobí degradaci SLR1 proteinu v proteasomu podobně jak je tomu u GID1 v případě signální dráhy giberilinů (Hedden, 2008; Murase a kol., 2008). (Obr. 24). Již Johnson v roce 1976 pozoroval, že pokud se aplikuje D-OH bez zbytku molekuly, nedojde k žádnému efektu (Johnson a kol., 1976). Tento fakt dokazuje, že pro transdukcii signálu je nezbytná i druhá část molekuly strigolaktonu, která pravděpodobně vytváří obal hydroxy D-kruhu umožňující jeho transport do kavity receptoru (Obr. 24) (Zwannenburg a kol., 2016a).



Obr. 24 – Předpokládaný mechanismus působení strigolaktonů na proteinové úrovni.

Na podzim roku 2016 došlo k významnému okamžiku. Profesor Yao se svým týmem totiž získal z *A. thaliana* krystalovou strukturu proteinu D14 v jeho aktivní formě s navázaným 4-Br-debranonem (**24**) (Yao a kol., 2016). S využitím molekulárně biologických metod připravili proteinový komplex AtD14-D3-ASK1. Nereceptorová část tohoto komplexu D3-ASK1 umožní stabilizaci receptoru AtD14 po vazbě strigolaktonu a zároveň zpomalí probíhající hydrolyzu. Toto dosud nebylo možné, jelikož receptor nebyl stabilizován.

Následně bylo pozorováno, že v průběhu hydrolyzy dochází k rozštěpení D-kruhu, ze kterého vzniká meziproduct, který se může kovalentně vázat na histidin z aminokyselinové triády (de Saint Germain a kol., 2016; Yao a kol., 2016). Tato vazba pravděpodobně způsobí destabilizaci receptoru, jeho konformační přeměnu či jiné povrchové změny nezbytné pro biologickou aktivitu. Poté postupně dochází k uzavírání vzniklého intermediátu uvnitř receptoru AtD14 a tím k postupnému zmenšování jeho kavity. Následně je zmíněný meziproduct konvertován na D-OH a poté uvolněn z kavity receptoru. Nakonec dochází k proteolytickému rozštěpení receptoru v proteasomu (Obr. 25).



Obr. 25 – Interakce strigolaktonu s receptorem (převzato a upraveno z Waters a kol., 2017).

2.7 Možnosti kontroly parazitického plevele

Jedním z cílů vědců zabývajících se strigolaktony je nalézt způsob, jak lze efektivně kontrolovat růst parazitického plevele. V současné době je známo několik způsobů, kterými se lze vypořádat s parazitickými rostlinami a zvýšit tak výnosy hospodářských plodin.

2.7.1 Ovlivnění biosyntézy strigolaktonů

Jednou z možností kontroly parazitického plevele je snížení množství strigolaktonů vylučovaných do rhizosféry, kde dochází ke stimulaci klíčení semen parazitických rostlin.

Toho lze dosáhnout křížením rostlin, popř. cílenou mutagenezí genů zapojujících se v biosyntéze či transportu strigolaktonů. Tento způsob se ukázal jako efektivní řešení problému parazitismu u rajčat, fazolí, hrachu, kukuřice či rýže (Fernandez-Aparicio a kol., 2014; Jamil a kol., 2011; Yoneyama a kol., 2015). Na druhou stranu, nízké koncentrace strigolaktonů mohou mít negativní vliv na ostatní oblasti hospodářství, popř. na AM mykorhizu, čímž je tato metoda velmi limitována. Toto omezení by mohlo být pravděpodobně překonáno cílenou mutagenezí konkrétních buněk, pletiv nebo orgánů, avšak jedná se o velmi složitý a finančně náročný postup.

Díky poznatkům o transkripčních procesech strigolaktonové biosyntézy byla navržena alternativní metoda. Principem je vzájemná záměna jednotlivých strigolaktonových typů během biosyntézy. Například klíčivost semen parazitické rostliny *S. hermonthica* je výrazně ovlivněna druhem strigolaktonu. Bylo pozorováno, že tento parazit upřednostňuje strigolový typ strigolaktonů před orobancholovým, avšak u *S. gesnerioides* je tomu naopak (Cardoso a kol., 2014; Tsuchiya a kol., 2015). Zhang se svým týmem pozoroval, že v rýži karlakton oxidasa způsobuje konverzi kyseliny karlaktonové na 4-deoxyorobanchol, což je prekurzor orobancholové rodiny strigolaktonů (Zhang a kol., 2014). Tudíž pokud by byl tento enzym zaveden například do čiroku, tak by mohlo dojít ke konverzi produkce strigolaktonů strigolové rodiny do orobancholové, čímž by se tak čirok stal téměř nedetekovatelný pro parazita *S. hermonthica*. Tato metoda není v současné době zatím proveditelná, jelikož nejsou dosud známy všechny enzymy podílející se na diverzifikaci strigolaktonů (např. hydroxylaci ABC kruhu, konverzi kyseliny karlaktonové na (+)-deoxystrigol, atd.). (Jamil a kol., 2012; Cardoso a kol., 2014).

2.7.2 Sebevražedné klíčení parazitů

Další možností je sebevražedné klíčení parazitických rostlin. Tato metoda využívá stimulant klíčení, který se aplikuje v nepřítomnosti hostitelské rostliny do půdy kontaminované parazitickými semeny. Poté dojde ke klíčení semen a vývoji parazita, který bez přítomnosti hostitele umírá na „vyhladovění“.

Egley a Dale v roce 1970 testovali tímto způsobem ethylen. Výsledky experimentů ukázaly, že se jedná o velmi účinnou látku iniciující klíčení semen parazitické rostliny *S. hermonthica* (Egley a Dale 1970). Od jeho využití se však muselo nakonec upustit. Při dalších testováních bylo zjištěno, že tento fytohormon stimuluje klíčení semen jen některých parazitů, a navíc jeho samotná aplikace je finančně náročná (Egley a kol., 1990).

V 80. letech Eplee a Norris prováděly experimenty se strigolaktonovými analogy GR7 a GR24. Testování bylo prováděno na semenech parazitické rostliny *S. hermonthica*. Laboratorní výsledky byly povzbudivé, ale reálnému použití bránila nestabilita látek v půdě. (Eplee a Norris, 1987).

V roce 2016 profesor Zwannenburg a kolektiv aplikovali racemické směsi strigolaktonů Nijmegen-1 a Nijmegen-1-Me na tabáková pole zamořená semeny parazitické rostliny *Orobancha ramosa* (Zwannenburg a kol., 2016b). Tyto pokusy prokázali, že při dodržení všech nutných podmínek je sebevražedné klíčení metoda, která je použitelná v praxi na velkých plochách. V některých lokalitách docházelo k redukci výskytu parazitů o více než 95 %. Další výhodou této metody je pomalá degradace těchto stimulantů v půdě, díky čemuž se snižuje riziko jejich potenciální fytotoxicity při kontaktu s vysazenou plodinou. Ovšem další vývoj metody je nutný pro optimalizaci postupů a zajištění efektivity v prostředích s různým klimatem.

2.7.3 Rozklad strigolaktonů v půdě před stimulací semen

Jak bylo zmíněno, strigolaktomy mohou velice snadno podléhat hydrolyze, a to především v bazickém pH. Ukázalo se však, že tato z pohledu aplikací negativní vlastnost může být i ku prospěchu. Neboť v okamžiku, kdy jsou strigolaktomy vyloučeny kořenovým systémem do půdy o zásaditém pH, dochází k jejich relativně rychlému rozkladu. Díky tomu nemohou pak tyto látky stimulovat klíčení semen parazitů.

Aby mohla být tato myšlenka uskutečněna, je potřeba znát biologický poločas rozpadu daného strigolaktonu. Profesor Zwannenburg pozoroval, že jeho hodnota výrazně klesá s rostoucím pH, a že rovněž závisí na struktuře strigolaktonu (Kannan a Zwannenburg, 2014; Kannan a kol., 2015; Mangus a Zwannenburg, 1992). Byly tedy prováděny experimenty strigolaktonových analogů GR24 a Nijmegen-1 s různými bazickými roztoky. Jako nejefektivnější deaktivátory těchto látek se ukázal roztok tetraboritanu sodného (borax) o pH 9,2-9,3 a roztok thiomocoviny, která je silným nukleofilním činidlem, a tudíž způsobí hydrolyzu strigolaktonů přesně podle dříve navrženého mechanismu (Obr. 13). Při laboratorních pokusech s rajčaty bylo prokázáno, že použití těchto dvou roztoků je velice efektivním a levným řešením kontroly klíčení parazitického plevelu, a navíc pokud koncentrace těchto roztoků nepřesáhne hodnotu 5 mM, nejsou toxické pro ostatní rostliny. Nevýhodou této metody je nutnost opakovaného použití uvedených roztoků, což vede k postupnému zvyšování pH půdy a jejímu nadměrnému hnojení.

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Použité chemikálie byly zakoupeny od firem Sigma Aldrich, VWR, Litolab, Lachner a Penta. Pro organickou syntézu byly použity tyto látky: ethyl acetát (EtOAc), petrolether (PE), aceton, chloroform (CHCl_3), deuterovaný chloroform (CDCl_3), deuterovaný dimethyl sulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$), dichlormethan (DCM), acetonitril (MeCN), uhličitan draselný (K_2CO_3), bromcyklopentan, 2-brompropan, *N*-bromsukcinimid (NBS), azobisisobutyronitril (AIBN), tetrahydroboritan sodný (NaBH_4), tetrachlormethan (CCl_4), tetrahydrofuran (THF), ethyl chlorformiát, hydrid sodný (NaH), síran sodný bezvodý, chlorid sodný (NaCl), diethylether (Et_2O), tetrahydridohlinitan litný (LiAlH_4), kyselina chlorovodíková, jodmethan, di-*t*-butyloxykarbonyl (Boc_2O), hydroxid sodný (NaOH), triethylamin (TEA), fenylacetaldehyd, acetaldehyd, methanol (MeOH), jodid draselný (KI), hydrogenuhlíčan sodný, formamid, benzylamin, anilin, *o*-methoxyanilin, *m*-methoxyanilin, *p*-methoxyanilin, chlorid amonný, 25% vodný roztok amoniaku, *N*-methyl-*p*-kyanoanilin, *m*-kyanoanilin, methoxid sodný (MeONa), paraformaldehyd, morfolin, benzen, pentan, benzofenon, sodík (Na), hydrid vápenatý (CaH_2). Tetrahydrofuran (THF) byl sušen nad sodíkem (Na) v přítomnosti indikátoru benzofenonu. Dichlormethan a acetonitril byl sušen nad hydridem vápenatým a oddestilovány. Ostatní rozpouštědla byla sušena pomocí aktivovaného molekulového síta (3\AA).

Pro biologické testování bylo použito těchto chemikálií: Triton X-100, Savo, sterilní voda, 100 mM HEPES (pH 7,5), Plant preservative mixture (PPM™) od firmy Plant Cell technology, aceton, sterilní agarosa, MTT 5g/l, lyzační roztok (10% (v/v) Triton X-100 a 0,04% (v/v) HCl v isopropanolu).

3.2 Biologický materiál

Biologické testování připravených sloučeniny bylo prováděno na semenech parazita *Striga hermonthica* (Súdán 2007, hostitelská rostlina neznámá) a *Phelipanche ramosa* (Francie 2015, hostitelská rostlina – brukev řepka (*Brassica napus*)).

3.3 Metody

Průběh reakcí byl sledován pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách od firmy Merck (Silikagel 60 WF 254). Pro čištění produktů bylo využito silikagelu

od firmy Sigma Aldrich (velikost částic 230-400 mesh; velikost pórů 60 Å). Připravené sloučeniny byly analyzovány pomocí metody nukleární magnetické rezonance (NMR). Jednotlivá spektra byla získána při frekvenci 125 MHz (^{13}C) a 500 MHz (^1H) na přístroji JEOL 500 ECA od firmy JEOL Ltd. K měření byla použita tato rozpouštědla: deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6) a deuterovaný chloroform (CDCl_3). Chemické posuny byly kalibrovány na konkrétní rozpouštědlo ($\delta^1\text{H}$ (DMSO- d_6) = 2.45 ppm; $\delta^{13}\text{C}$ (DMSO- d_6) = 40.11 ppm; $\delta^1\text{H}$ (CHCl_3) = 7.25 ppm; $\delta^{13}\text{C}$ (CDCl_3) = 77.2 ppm). Čistota látek byla stanovena s využitím metody HPLC (150 mm x 2,1 mm, 5 μm , Symmetry C18, Waters) s UV detektorem. Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Q-TOF MICRO (Waters) a případně GC-MS methodou na přístroji Thermo-Finnigan TraceGC ultra s hmotnostním spektrometrem Thermo-Finnigan Polaris Q. K odpaření rozpouštědel bylo využito vakuových odparek od firmy Heidolph Instruments. Syntéza s využitím mikrovln probíhala v mikrovlnném reaktoru CEM Discover SP. Bromace furanonů byla prováděna při vlnové délce 365 nm s využitím UV lampy UVP BLAK-RAY™ B-100AP (100 W). Semena parazitických rostlin byla inkubována v termostatu INOVA 42. Elementární analýza byla prováděna na přístroji Thermo Finnigan Flash-1112 series EA. Absorbance vyklíčených semen byla získána pomocí multidetekčního readeru Synergy H1 od firmy BioTek.

3.4 Syntéza nových strigolaktonových mimetik

3.4.1 Příprava sekundárních aminů

3.4.2.1 Příprava *N*-methylanilinu (postup A)

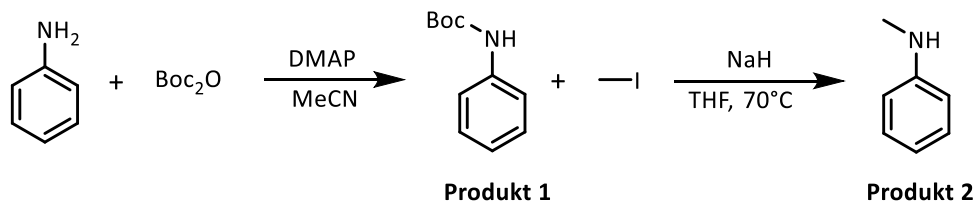


Schéma 1 – Schéma přípravy *N*-methylanilinu.

Do vysušené dvouhrdlé baňky s argonem byl postupně přidán anilin (160 mmol), suchý acetonitril (160 ml) a Boc₂O (240 mmol). Po 5 minutách míchání byl k roztoku přidán DMAP (16 mmol) a reakce byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 4 hodin. Její průběh byl sledován pomocí TLC. Po 4 hodinách byla k reakční směsi přidána 1 M kyselina chlorovodíková (100 ml). Reakční směs byla extrahována ethyl acetátem (3 x 40 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 40 ml) a poté vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Surový produkt (**Produkt 1**) (Schéma 1) byl rekrystalizován z ethyl acetátu.

Do vysušené dvouhrdlé baňky s argonem byl přidán hydrid sodný (3 mmol) a suchý tetrahydrofuran (10 ml). Po chvíli míchání byl k roztoku přidán **Produkt 1** (2,5 mmol) a za 10 minut následně jodmethan (2,75 mmol). Reakce byla zahřáta na teplotu 70 °C, míchána při této teplotě 3 hodiny a její průběh byl kontrolován pomocí TLC (PE : EtOAc; 1:1). Poté byla reakční směs ponechána zchladnout na teplotu místnosti a byla k ní pomalu přikapávána 6 M kyselina chlorovodíková (9 ml). Pak byla reakční směs opět zahřáta na teplotu 70 °C a při této teplotě míchána 2 hodiny. Po zchladnutí byla reakce zneutralizována 1 M hydroxidem sodným na pH 7. Reakční směs byla extrahována diethyletherem (3 x 10 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 10 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Surový produkt (**Produkt 2**) (Schéma 1) byl přečištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 10:1 → 3:1; R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,75) (Kim a kol., 1975)

3.4.2.2 Příprava *N*-methylbenzylaminu (postup B)

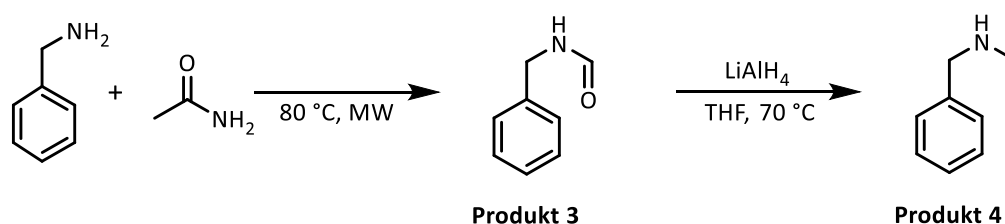


Schéma 2 – Schéma přípravy *N*-methylbenzylaminu.

Do reakční zkumavky byl přidán benzylamin (1 mmol) a formamid (1 mmol). Reakční zkumavka byla vložena do mikrovlnného reaktoru a reakční směs byla míchána po dobu 30 minut při teplotě 80 °C. Maximální tlak byl nastaven na 260 PSI (18 barů) a maximální výkon na 300 W. Poté byla kyveta vyjmuta z reaktoru a reakční směs byla přelita z reakční zkumavky do jednohrdlé baňky. Reakční směs byla míchána při teplotě 80 °C přes noc. Získaný surový produkt (**Produkt 3**) (Schéma 2) byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; dichlormethan : ethyl acetát; 15:1 → 4:1; R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,5).

Produkt 3 (15 mmol) rozpuštěný v suchém tetrahydrofuranu (40 ml) byl přidán do dvouhrdlé vysušené baňky s argonem. Reakční směs byla míchána po dobu 10 minut při teplotě 0 °C a poté k ní byl po částech přidán tetrahydridohlinitan litný (45 mmol). Roztok byl následně zahříván při teplotě 70 °C po dobu 2 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (PE : EtOAc; 3:1). Po odreagování byla reakční směs zchlazena na teplotu 0 °C a byl k ní přikapáván nasycený roztok chloridu amonného (15 ml). Roztok byl poté zfiltrován a reakční směs byla extrahována dichlormethanem (2 x 40 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 20 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrovány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Surový produkt (**Produkt 4**) (Schéma 2) byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; dichlormethan : ethyl acetát : 25% vodný roztok amoniaku; 3:1:0,01 → 0:1:0,05; R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,5) (Lebleu a kol., 2014).

3.4.2.3 Příprava *N*-methylanizidinů (postup C)

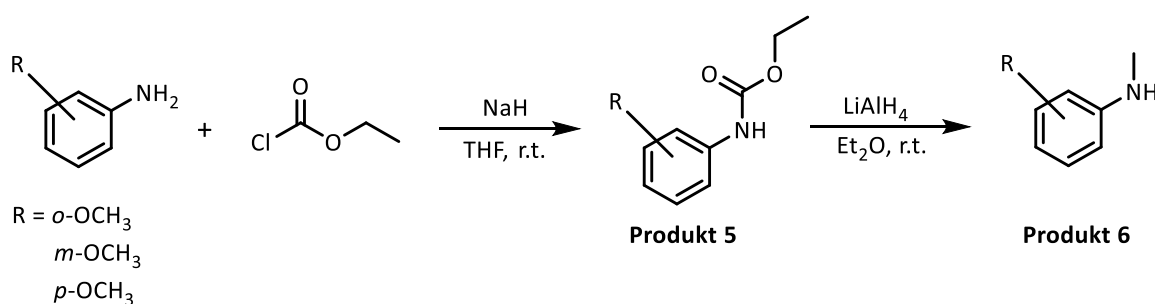


Schéma 3 – Schéma přípravy *N*-methylanizidinů.

Do vysušené dvouhrdlé baňky s inertní atmosférou (argon) byl přidán suchý tetrahydrofuran (80 ml). Rozpouštědlo bylo ochlazeno v ledové lázni na teplotu 0 °C a byl přidán methoxyanilin (24 mmol) a hydrid sodný (34 mmol). Po 10 minutách míchání byl k roztoku přidán ethyl chlorformiát (29 mmol). Po dalších 5 minutách byla odstraněna ledová lázeň a reakční směs byla ohřáta na laboratorní teplotu. Reakce probíhala až do úplné konverze (4 h) a její průběh byl kontrolován pomocí TLC (PE : EtOAc; 3:1). Následně byla reakční směs znovu ochlazena v ledové lázni na teplotu 0 °C a byla k ní přikapána voda (40 ml). Reakční směs byla dále extrahována diethyletherem (3 x 40 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 30 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Rozpouštědlo bylo odpařeno prostřednictvím vakuové odparky a surový produkt (**Produkt 5**) (Schéma 3) byl vyčištěn sloupcovou chromatografií (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 15:1 → 5:1; R_f (PE : EtOAc; 3 :1) = 0,45).

Produkt 5 (18 mmol) byl dán do vysušené dvouhrdlé baňky s argonem. Následně k němu byl přidán suchý diethylether (80 ml). Roztok byl zchlazen v ledové lázni na teplotu 0 °C a po 10 minutách míchání byl pomalu přidán tetrahydridohlinitan litný (36 mmol). Následně byla ledová lázeň odstraněna a reakční směs byla ponechána se ohřát na laboratorní teplotu. Reakční směs byla míchána 4 hodiny a její průběh byl sledován pomocí TLC (PE : EtOAc; 4:1). Poté byla reakční směs opět zchlazena v ledové lázni na teplotu 0 °C a byla k ní pomalu přikapávána 1 M kyselina chlorovodíková (40 ml). Reakční směs byla extrahována diethyletherem (3 x 40 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 30 ml), poté vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce a surový produkt (**Produkt 6**)

(Schéma 3) byl přečištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 10:1 → 5:1; R_f (PE : EtOAc; 3 : 1) = 0,38) (Wesely a Swoboda, 1951).

3.4.2.4 Příprava *N*-methyl-*m*-kyanoanilinu (postup D)



Schéma 4 – Schéma přípravy *N*-methyl-*m*-kyanoanilinu.

Do vysušené baňky s argonem byl přidán suchý methanol (13,5 ml), methoxid sodný (1,25 mmol), *m*-kyanoanilin (2,5 mmol) a parformaldehyd (3,5 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 5 hodin při laboratorní teplotě a poté byla zchlazena na 0 °C. Následně byl po částech přidán tetrahydridoboritan sodný (2,5 mmol). Roztok byl dále míchán při teplotě 70 °C po dobu 20 minut. Poté byla reakční směs ponechána zchladnout laboratorní teplotu a byl k ní přikapán 10% hydroxid sodný (15 ml). Reakční směs byla extrahována ethyl acetátem (2 x 15 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 15 ml), poté vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrvány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Surový produkt byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 15:1 → 3:1; R_f (PE : EtOAc; 3:1) = 0,4) (Barluenga a kol., 1984).

3.4.2.5 Příprava *N*-benzylanilinu, *N*-ethylanilinu a *N*-ethylbenzylaminu (Postup E)

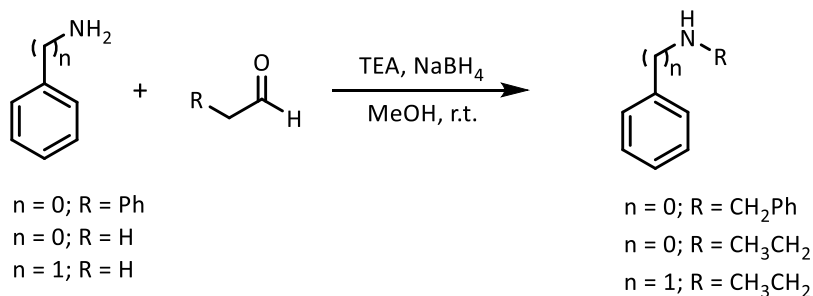


Schéma 5 – Schéma přípravy *N*-benzylanilinu, *N*-ethylanilinu a *N*-ethylbenzylaminu.

Do vysušené jednohrdlé baňky s argonem byl přidán suchý methanol (3,6 ml), anilin (4,7 mmol), aldehyd (4,7 mmol) a triethylamin (6,6 mmol). Reakční směs byla míchána 4,5 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl roztok ochlazen v ledové lázni na teplotu 0 °C a byl k němu pomalu přikapáván tetrahydridoboritan sodný (4,7 mmol). Reakční směs byla míchána dalších 10 minut při teplotě 0 °C a následně 30 minut při laboratorní teplotě. Dále byla k reakční směsi přikapána voda (5 ml). Reakční směs byla extrahována hexanem (2 x 10 ml). Spojené organické fáze byly protřepány s nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 10 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové odparky a surový produkt byl přečištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 15:1 → 3:1; R_f (PE : EtOAc; 3:1) = 0,45).

3.4.2.6 Příprava *N*-isopropylanilinu a *N*-cyklopentylanilinu (Postup F)

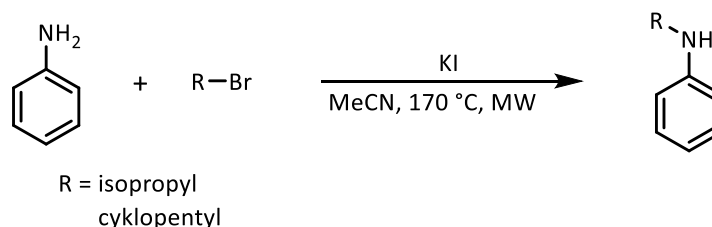


Schéma 6 – Schéma přípravy *N*-isopropalanilinu a *N*-cyklopentylanilinu.

Do reakční zkumavky byl přidán bezvodý acetonitril (15 ml), anilin (6,3 mmol), bromalkyl (2,1 mmol) a jodid draselný (0,53 mmol). Reakční zkumavka byla vložena do mikrovlnného reaktoru a reakční směs byla míchána po dobu 15 min při teplotě 170 °C. Maximální tlak byl nastaven na 250 PSI (17 barů) a maximální výkon na 300 W. Po ukončení zahřívání byla reakční zkumavka vyjmuta z reaktoru a k reakční směsi byl přilít dichlormethan (2 x 10 ml). Organická fáze byla nejprve protřepána nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 10 ml) a poté nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 10 ml). Následně byla organická fáze vysušena bezvodým síranem sodným a zfiltrována. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Surový produkt byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 15:1 → 8:1; R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,6) (Romera a kol., 2004).

3.4.2 Příprava bromfuranonů

3.4.2.1 Redukce anhydridu (Postup G1)

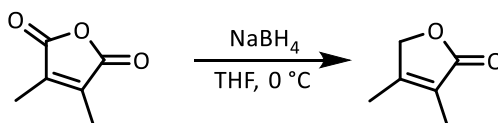


Schéma 8 – Schéma redukce anhydridu.

Do vysušené baňky s inertní atmosférou (argon) byl dán anhydrid (1 mmol) a následně suchý tetrahydrofuran (100 ml). Roztok byl zchlazen v ledové lázni na 0 °C. Poté byl k reakční směsi přidán tetrahydridoboritan sodný (2,5 mmol). Reakční směs byla míchána při teplotě 0 °C a kontrolována pomocí TLC (PE : EtOAc; 1:1) až do úplné konverze (3 hodiny). Po třech hodinách byla k reakční směsi přidána voda (50 ml). Následně byla reakční směs okyselena kyselinou chlorovodíkovou na pH 1. Produkt byl extrahován ethyl acetátem (2 x 50 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 40 ml), následně vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce a surový produkt byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát, 1:1; R_f (PE : EtOAc; 1 : 1) = 0,5).

3.4.2.2 Redukce anhydridu (Postup G2)

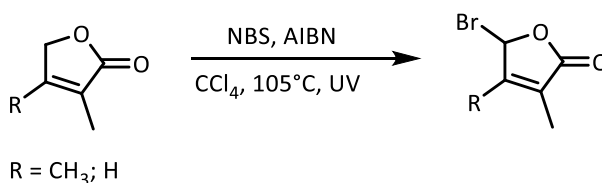


Schéma 8 – Obecné schéma bromace furanonu.

Do vysušené dvouhrdlé baňky s argonem byl přidán tetrachlormethan (100 ml) a následně furanon (19 mmol) (Matsuo a Shindo, 2011). Po chvíli míchání byl k roztoku přidán AIBN (0,115 mmol) a NBS (21 mmol). Reakční směs byla zahřáta v olejové lázni na 105 °C a ozařována UV lampou (vlnová délka 365 nm). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (PE : EtOAc; 1:1) až do úplné konverze. Po ukončení reakce byl roztok ochlazen na 0 °C

a po 20 minutách zfiltrován. Tetrachlormethan byl odpařen na vakuové odparce. Získaný produkt byl vyčištěn na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 4:1 → 1:1; R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,5).

3.4.3 Příprava dusíkatých strigolaktonových mimetik

(Postup H1)

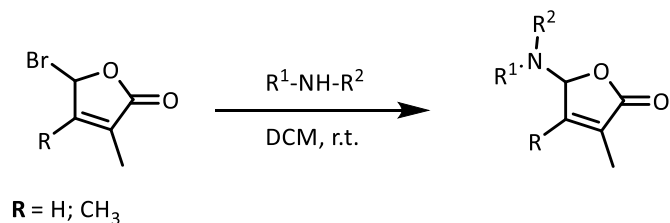


Schéma 9 – Schéma přípravy strigolaktonových mimetik – bez použití báze.

Do vysušené dvouhrdlé baňky s argonem byl přidán suchý dichlormethan (15 ml), bromfuranon (1 mmol) a sekundární amin (1,5 mmol). Reakce probíhala 6 hodin za laboratorní teploty a její průběh byl kontrolován pomocí TLC (PE : EtOAc; 1:1). Po skončení reakce byl dichlormethan odpařen na vakuové odparce.

(Postup H2)

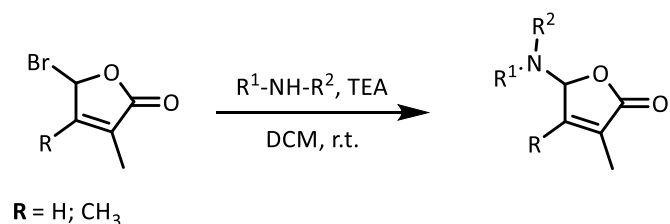


Schéma 10 – Schéma přípravy strigolaktonových mimetik – s použitím triethylaminu.

Do vysušené dvouhrdlé baňky byl přidán dichlormethan (10 ml) a triethylamin (2 mmol). Po chvíli míchání byl k roztoku přidán bromfuranon (1 mmol) a sekundární amin (1,5 mmol). Reakce probíhala 24 hodin za laboratorní teploty. Její průběh byl sledován

pomocí TLC (PE : EtOAc; 3:1). Po 24 hodinách bylo na vakuové odparce odpařeno rozpouštědlo.

(Postup H3)

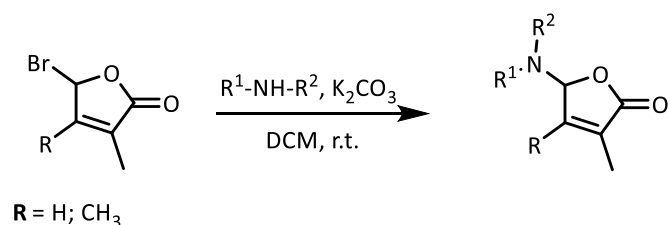


Schéma 11 – Schéma přípravy strigolaktonových mimetik – s použitím uhličitanu draselného.

Do vysušené dvouhrdlé baňky s argonem byl přidán suchý dichlormethan (10 ml), bromfuranon (1 mmol), sekundární amin (1,5 mmol) a uhličitan draselný (1,1 mmol). Reakce probíhala při laboratorní teplotě a byla kontrolována pomocí TLC (PE : EtOAc; 3:1) až do úplné konverze. Následně byla k reakční směsi přidána voda (10 ml) a reakční směs byla extrahována dichlormethanem (2 x 10 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného (2 x 10 ml), poté vysušeny bezvodým síranem sodným a zfiltrány. Dichlormethan byl odpařen na vakuové odparce. Dimethylové produkty ($R = CH_3$) byly vyčištěny na sloupcové chromatografii (silikagel; petrolether : ethyl acetát; 15:1 → 3:1; R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,4 – 0,6). Monomethylové produkty ($R = H$) byly rozpuštěny v ethyl acetátu, zfiltrány a odpařeny na vakuové odparce. Surové produkty byly rekrystalovány ze směsi benzen : petan (R_f (PE : EtOAc; 1:1) = 0,3 – 0,6) (Fukui a kol., 2011).

3.5 Biologické testování připravených sloučenin

Biologické testování bylo prováděno na semenech parazitů *Striga hermonthica* a *Phelipanche ramosa* podle standardizovaného protokolu (Pouvreau a kol., 2013).

3.5.1 Sterilizace a kondicionace semen

Do 25 ml plastové falkony byl přidán 100% Triton X-100 (250 μ l) a 10% Savo (5 ml). Zkumavka byla doplněna sterilní vodou do 25 ml. Do čisté kádinky byla navážena semena

parazitické rostliny (250 mg). K semenům byl nalit sterilizační roztok a vzniklá suspenze byla míchána 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl ve flowboxu přes fritu odsát sterilizační roztok a semena byla promyta sterilní vodou (10 x 20 ml). K semenům bylo přidáno 15 ml sterilní vody a roztok se semeny byl přelit do 50 ml plastové falkony. Falkona byla doplněna do 50 ml sterilní vodou. K roztoku se semeny byl přidán HEPES (na koncentraci 1 mM) a PPM (50 µl). Falkona byla zatažena parafilmem, zabalena do alobalu a vložena do inkubátoru. Semena parazitické rostliny *S. hermonthica* byla inkubována 4 dny při teplotě 27 °C. Semena parazitické rostliny *P. ramosa* byla inkubována 8 dní při teplotě 21 °C.

3.5.2 Distribuce a stimulace semen

Po uplynutí doby inkubace byla z falkony se semeny odlita polovina média. Ke zbylé části média byla přilita sterilní 0,1% agarosa (25 ml), přidán HEPES (na koncentraci 1 mM) a PPM (50 µl).

Dále byly připraveny zásobní roztoky testovaných látek. Každá z testovaných látek byla rozpuštěna v acetonu (výsledná koncentrace roztoku 10^{-2} M; u pozitivní kontroly GR24 výsledná koncentrace 10^{-3} M). Následně byly vzniklé roztoky 100x zředěny sterilní vodou.

Následně byla připravena zředovací 96-jamková destička. Do celé desky kromě řady A bylo napipetováno opakovací pipetou 90 µl 1% acetonu. Do jamek A1-A3 bylo napipetováno automatickou pipetou 90 µl 1% acetonu a 10 µl standardu GR24. Do jamek A4-A12 bylo napipetováno 100 µl testovaných látek. Na 8-kanálovou pipetu bylo nasazeno jen 6 sterilních špiček a vždy 10 µl roztoku bylo přepipetováno do následující jamky (A4 do B4 poté B4 do C4 atd., čímž v každé další jamce byl roztok 10x zředěnější).

Do všech jamek čisté 96-jamkové desky bylo opakovací pipetou napipetováno 50 µl suspenze semen. Automatickou pipetou bylo k semenům připipetováno 10 µl testovaných látek ze zředovací desky a 40 µl sterilní vody. Připravená deska byla zatažena parafilmem a opět vložena do inkubátoru. Semena parazitické rostliny *S. hermonthica* byla inkubována 4 dny při teplotě 27 °C. Semena parazitické rostliny *P. ramosa* byla inkubována 4 dny při teplotě 21 °C.

3.5.2 Přidání MTT

Po uplynutí doby inkubace bylo ve flowboxu do všech jamek 96-jamkové desky se semeny napipetováno opakovací pipetou 10 µl roztoku MTT (5 g/l). Deska byla zatažena parafilmem

a vložena do inkubátoru. *S. hermonthica* byla inkubována 1 den při teplotě 27 °C. Semena parazitické rostliny *P. ramosa* byla inkubována 1 den při teplotě 21 °C.

3.5.3 Přidání lyzačního roztoku a měření absorbance

Po uplynutí doby inkubace bylo pod binokulární lupou spočítáno procento vyklíčených semen v jamkách s pozitivní kontrolou GR24 a celkový počet semen v 10-ti náhodně vybraných jamkách. Následně bylo do všech jamek přidáno 100 µl lyzačního roztoku. 96-jamková deska byla zatažena parafilmem a vložena do inkubátoru. Semena obou parazitických rostlin byla inkubována při teplotě 21 °C po dobu 24 hodin.

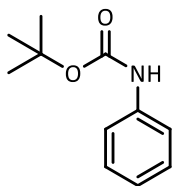
Následně byl na spektrofotometru ve všech jamkách změřen rozdíl absorbancí 570 a 690 nm. Z naměřených hodnot u kontroly GR24 byl v programu MS Office Excel 2016 vytvořen graf závislosti rozdílu absorbancí na procentu vyklíčených semen a vytvořena křivka lineární regrese. Z vytvořeného grafu byla získána rovnice pro výpočet procenta vyklíčených semen z naměřených hodnot rozdílu absorbancí.

4 Výsledky

4.1 Syntéza strigolaktonových mimetik

Dle postupů uvedených v kapitole 3.4 byly připraveny výchozí látky – sekundární aminy (34-44), bromfuranony (45, 46) a strigolaktonová mimetika (47-74).

Tert-butyl-fenylkarbamát (32)



Postup A, výtěžek: 93 %, bílá pevná amorfní látka.

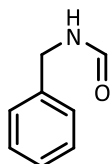
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.42 (s, 9H; 3 x CH_3); 6.87 – 6.91 (m, 1H, H_{Ar}); 7.15 – 7.22 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.35 – 7.41 (m, 2H, 2x H_{Ar}); 9.27 (bs, 1H, NH).

MS (ES+; m/z, %): 194.31 [M+1] (100).

HPLC čistota: 99 %.

Bod tání: 133-138 °C, literatura 134-137 °C (Navas a kol., 1998).

N-benzylformamid (33)



Postup B, výtěžek: 89 %, žlutá kapalina.

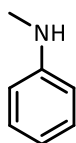
^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) δ (ppm): 4.23 (s, 2H, CH_2); 6.47 (bs, 1H, NH); 7.22 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_{Ar}); 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) δ (ppm): 42.9 (CH_2); 126.6 (CH_{Ar}); 127.0 (2 x CH_{Ar}); 128.2 (2 x CH_{Ar}); 140.9 (C_{qAr}); 158.1 (C=O).

MS (ES+; m/z, %) 136.21 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

N-methylanilin (34)



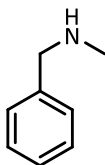
Postup A, výtěžek: 67 %, žlutá kapalina.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 2.84 (m, 3H, N- CH_3); 3.72 (bs, 1H, NH); 6.61 – 6.64 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.70 – 6.74 (m, 1H, H_{Ar}); 7.18 – 7.22 (m, 1H, H_{Ar}).

MS (ES+; m/z, %): 108.04 [M+1] (96).

HPLC čistota: 99 %.

***N*-methylbenzylamin (35)**



Postup B, výtěžek 91 %, světle zelená pevná amorfnní látka.

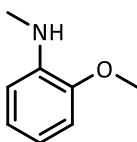
¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.43 (bs, 1H, NH); 2.45 (s, 3H, N-CH₃); 3.74 (s, 2H, CH₂); 7.22 – 7.35 (m, 5H, 5 x H_{Ar}).

¹³C (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 36.0 (CH₃); 56.0 (CH₂); 126.9 (CH_{Ar}); 128.1 (2 x CH_{Ar}); 128.3 (2 x CH_{Ar}); 140.1 (C_{qAr}).

MS (ES+; m/z, %): 122.23 [M+1] (100).

HPLC čistota: 98 %.

***N*-methyl-*o*-methoxyanilin (36)**



Postup C, výtěžek: 86 %, pevná bílá amorfnní látka.

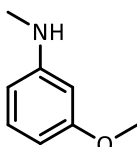
¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 2.87 (s, 3H, N-CH₃); 3.85 (s, 3H, O-CH₃); 4.39 (bs, 1H, NH); 6.61 – 6.64 (m, 1H, H_{Ar}); 6.70 – 6.71 (m, 1H, H_{Ar}); 6.77 – 6.79 (m, 1H, H_{Ar}); 6.89 – 6.93 (m, 1H, H_{Ar}).

¹³C (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 30.5 (N-CH₃); 55.4 (O-CH₃); 109.3 (CH_{Ar}); 109.6 (CH_{Ar}); 116.5 (CH_{Ar}); 121.4 (CH_{Ar}); 139.3 (C_{qAr}); 147.0 (C_{qAr}).

MS (ES+; m/z, %): 137.99 [M+1] (48).

HPLC čistota: 94 %.

***N*-methyl-*m*-methoxyanilin (37)**



Postup C, výtěžek: 81 %, pevná bílá amorfnní látka.

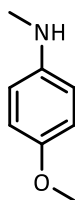
¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 2.84 (s, 3H, N-CH₃); 3.76 (bs, 1H, NH); 3.82 (s, 3H, O-CH₃); 6.21 – 6.36 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.13 – 7.18 (m, 1H, H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 30.8 (N- CH_3); 55.2 (O- CH_3); 98.4 (CH_{Ar}); 102.4 (CH_{Ar}); 105.80 (CH_{Ar}); 130.1 (CH_{Ar}); 151.0 (C_{qAr}); 161.0 (C_{qAr}).

MS (ES+, m/z, %): 137.98 [M+1] (48).

HPLC čistota: 100 %.

N-methyl-*p*-methoxyanilin (38)



Postup C, výtěžek: 86 %, pevná bílá amorfní látka.

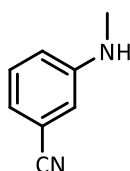
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 2.81 (s, 3H, N- CH_3); 3.50 (bs, 1H, NH); 3.78 (s, 3H, O- CH_3); 6.59 – 6.65 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.83 – 6.88 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 31.6 (N- CH_3); 55.9 (O- CH_3); 113.7 (2 x CH_{Ar}); 115.0 (2 x CH_{Ar}); 144.0 (C_{qAr}); 152.1 (C_{qAr}).

MS (ES+, m/z, %): 137.98 [M+1] (48).

HPLC čistota: 100 %.

N-methyl-*m*-kyanoanilin (39)



Postup D, výtěžek, 68 %, bezbarvá kapalina.

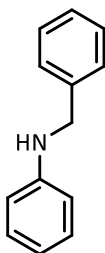
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 2.71 – 2.77 (m, 3H, N- CH_3); 4.21 (bs, 1H, NH); 6.70 – 6.75 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.84 – 6.86 (m, 1H, H_{Ar}); 7.15 (t, $J = 7,64$ Hz, 1H, H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 30.2 (N- CH_3); 112.5 (CN); 114.2 (CH_{Ar}); 117.0 (CH_{Ar}); 119.9 (CH_{Ar}); 120.1 (CH_{Ar}); 129.9 (C_{qAr}); 149.7 (C_{qAr}).

MS (ES+, m/z, %): 133.06 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

***N*-benzylanilin (40)**



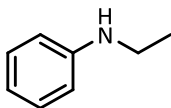
Postup E, výtěžek 83 %, bezbarvá kapalina.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 4.11 (bs, 1H, *NH*); 4.36 (s, 2H, *N-CH*₂); 6.68 – 6.70 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.76 – 6.79 (m, 1H, H_{Ar}); 7.21 – 7.47 (m, 7H, 7 x H_{Ar}).

MS (ES^+ , m/z , %): 184.43 [$\text{M}+1$] (100).

HPLC čistota: 95 %.

***N*-ethylanilin (41)**



Postup E, výtěžek 46 %, žlutá kapalina.

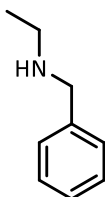
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.28 (t, $J = 7,03$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 3.18 (q, $J = 7,34$ Hz, 2H, *N-CH*₂); 3.54 (bs, 1H, *NH*); 6.63 – 6.65 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.71 – 6.75 (m, 1H, H_{Ar}); 7.19 – 7.23 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 15.0 (CH_3); 38.5 (CH_2); 112.8 (2 x CH_{Ar}); 117.3 (CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 148.5 (C_{qAr}).

MS (ES^+ , m/z , %): 121.96 [$\text{M}+1$] (100).

HPLC čistota: 95 %.

***N*-ethylbenzylamin (42)**



Postup E, výtěžek: 53 %, žlutá kapalina.

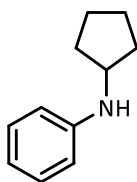
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.27 (t, $J = 7,03$ Hz, 3H, *N-CH*₂- CH_3); 1.52 (bs, 1H, *NH*); 2.66 (q, $J = 7,03$ Hz, 2H, *N-CH*₂); 3.77 (s, 2H, *Ph-CH*₂); 7.21 – 7.35 (m, 5H, 5 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 15.1 (CH_3); 43.7 (*N-CH*₂); 54.0 (*Ph-CH*₂); 126.9 (CH_{Ar}); 128.2 (2 x CH_{Ar}); 128.4 (2 x CH_{Ar}); 140.6 (C_{qAr}).

MS (ES^+ , m/z , %): 136.13 [$\text{M}+1$] (100).

HPLC čistota: 89 %.

N-cyklopentylanilin (43)



Postup F, výtěžek: 83 %, žlutá kapalina.

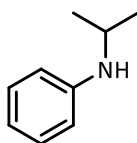
^1H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.50 – 1.85 (m, 6H, CH₂); 2.09 – 2.16 (m, 2H, CH₂); 3.70 (bs, 1H, NH); 3.84 – 3.91 (m, 1H, CH); 6.67 – 6.70 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.76 – 6.79 (m, 1H, H_{Ar}); 7.24 – 7.28 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 24.2 (2 x CH₂); 33.7 (2 x CH₂); 54.8 (CH); 113.3 (2 x CH_{Ar}); 117.0 (CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 148.2 (C_{qAr}).

MS (ES⁺, m/z, %): 162.19 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

N-isopropylanilin (44)



Postup F, výtěžek: 76 %, bezbarvá kapalina.

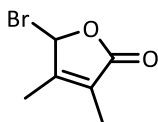
^1H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.23 (d, $J = 6,42$ Hz, 6H, 2 x CH₃); 3.49 (bs, 1H, NH); 3.61 – 3.68 (m, 1H, CH); 6.59 – 6.62 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 6.67 – 6.71 (m, 1H, H_{Ar}); 7.16 – 7.20 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 23.1 (2 x CH₃); 44.3 (N-CH); 113.3 (2 x CH_{Ar}); 117.0 (CH_{Ar}); 129.4 (2 x CH_{Ar}); 147.6 (C_{qAr}).

MS (ES⁺, m/z, %): 136.30 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

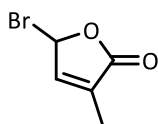
5-brom-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (45)



Postup G2, výtěžek: kvantitativní, oranžová olejovitá kapalina.

^1H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.88 (s, 3H, O-CH-C-CH₃); 2.09 (s, 3H, C(O)-C-CH₃); 6.67 (s, 1H, Br-CH).

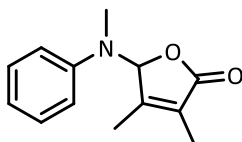
5-brom-3-methylfuran-2(5H)-on (46)



Postup G2, výtěžek: kvantitativní, oranžová olejovitá kapalina.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz), δ (ppm): 2.04 (s, 3H, CH_3); 6.73 – 6.76 (m, 1H; Br-CH); 7.14 – 7.19 (m, 1H; C=CH).

3,4-dimethyl-5-(methyl(fenyl)amino)furan-2(5H)-on (47)



Postup H3, výtěžek 83 %, bílá pevná amorfnní látka.

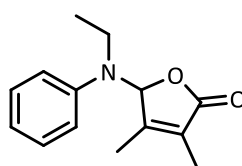
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.90 – 1.91 (m, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.97 – 1.98 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.69 (s, 3H, N- CH_3); 6.14 (s, 1H, O-CH-N); 6.97 – 7.00 (m, 1H, H_{Ar}); 7.1 – 7.11 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.28 – 7.32 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.9 (O-CH-C- CH_3); 12.1 (C(O)-C- CH_3); 30.6 (N- CH_3); 94.5 (O-CH); 118.1 (2 x CH_{Ar}); 121.8 (CH_{Ar}); 127.7 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (C_{qAr}); 149.2 (C-C(O)); 154.4 (C-CH-O); 173.1 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 218.44 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

5-(ethyl(fenyl)amino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (48)



Postup H3, výtěžek 71 %, bezbarvá kapalina.

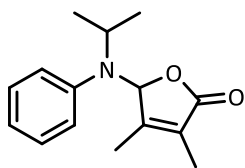
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.00 (t, $J = 7,03$ Hz, 3H, N- CH_2 - CH_3); 1.86 – 1.87 (m, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.93 – 1.95 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 3.00 – 3.06 (m, 1H, N- $\text{CH}_\alpha\text{H}_\beta$); 3.27 – 3.33 (m, 1H, N- $\text{CH}_\alpha\text{H}_\beta$); 6.02 (s, 1H, O-CH-N); 6.98 – 7.01 (m, 1H, H_{Ar}); 7.10 – 7.14 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.25 – 7.29 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8 (O-CH-C- CH_3); 12.3 (C(O)-C- CH_3); 14.2 (N- CH_2 - CH_3); 41.6 (N- CH_2); 96.1 (O-CH); 120.8 (2 x CH_{Ar}); 122.6 (CH_{Ar}); 127.7 (C_{qAr}); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 146.8 (C-C(O)); 154.4 (C-CH-O); 173.2 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 232.79 [M+1] (85).

HPLC čistota: 96 %.

5-(isopropyl(fenyl)amino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (49)



Postup H3, výtěžek 74 %, bezbarvá kapalina.

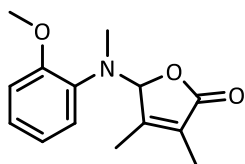
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.11 (d, $J = 6,72$ Hz, 3H, N-CH- CH_3); 1.22 (d, $J = 6,72$ Hz, 3H, N-CH- CH_3); 1.73 (s, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.79 (s, 3H, C(O)-C- CH_3); 3.47 (p, $J = 6,72$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 5.86 – 5.88 (m, 1H, O-CH-N); 7.10 – 7.14 (m, 3H, 3 x H_{Ar}); 7.21 – 7.26 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.7 (O-CH-C- CH_3); 12.4 (C(O)-C- CH_3); 22.2 (CH- CH_3); 23.2 (CH- CH_3); 52.6 (N-CH); 96.5 (O-CH); 125.5 (2 x CH_{Ar}); 127.7 (CH_{Ar}); 127.9 (2 x CH_{Ar}); 128.6 (C_{qAr}); 144.2 (C-C(O)); 154.7 (C-CH-O); 173.6 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 246.90 [M+1] (100).

HPLC čistota: 96 %.

5-((2-methoxyfenyl)(methyl)amino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (51)



Postup H3, výtěžek: 69 %, bílá pevná amorfní látka.

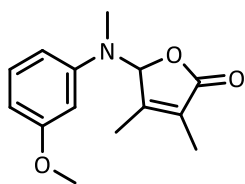
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.87 – 1.88 (m, O-CH-C- CH_3); 2.00 – 2.02 (m, C(O)-C- CH_3); 2.58 (s, 3H, N- CH_3); 3.86 (s, 3H, O- CH_3); 6.00 (s, 1H, O-CH-N); 6.88 – 6.93 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.06 – 7.10 (m, 1H, 2 x H_{Ar}); 7.21 – 7.23 (m, 1H, H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8 (O-CH-C- CH_3); 12.1 (C(O)-C- CH_3); 32.5 (N- CH_3); 55.6 (O- CH_3); 96.7 (O-CH); 111.6 (CH_{Ar}); 121.1 (CH_{Ar}); 122.83 (CH_{Ar}); 124.8 (CH_{Ar}); 127.1 (C_{qAr}); 138.4 (C_{qAr}); 152.6 (C-C(O)); 155.1 (C-CH-O); 173.4 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 248.85 [M+1] (100).

HPLC čistota: 99 %.

5-((3-methoxyfenyl)(methyl)amino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (52)



Postup H3, výtěžek: 71 %, bílá pevná amorfní látka.

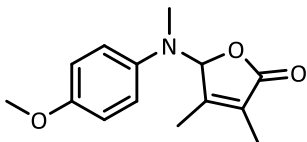
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.89 – 1.90 (m, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.96 – 1.98 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.68 (s, 3H, N- CH_3); 3.79 (s, 3H, O- CH_3); 6.15 (s, 1H, O-CH-N); 6.51 – 6.54 (m, 1H, H_{Ar}); 6.62 (t, $J = 2,14$ Hz, 1H, H_{Ar}); 6.67 – 6.69 (m, 1H, H_{Ar}); 7.20 (t, $J = 8,25$ Hz, 1H, H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8 (O-CH-C- CH_3); 12.0 (C(O)-C- CH_3); 30.4 (N- CH_3); 55.3 (O- CH_3); 94.2 (O-CH); 104.2 (CH_{Ar}); 106.5 (CH_{Ar}); 110.3 (CH_{Ar}); 127.7 (CH_{Ar}); 130.0 (C_{qAr}); 150.7 (C_{qAr}); 154.3 (C-C(O)); 160.6 (C-CH-O); 173.0 (C(O)).

MS (ES^+ , m/z, %): 248.84 [M+1] (100).

HPLC čistota: 99 %.

5-((4-methoxyfenyl)(methyl)amino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (53)



Postup H3, výtěžek: 76 %, pevná bílá amorfní látka.

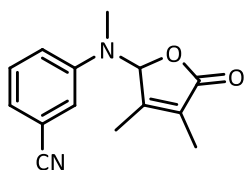
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.87 (s, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.97 (s, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.64 (s, 3H, N- CH_3); 3.77 (s, 3H, O- CH_3); 5.94 (s, 1H, O-CH-N); 6.82 – 6.85 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.09 – 7.10 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8 (O-CH-C- CH_3); 12.1 (C(O)-C- CH_3); 34.2 (N- CH_3); 55.6 (O- CH_3); 96.4 (O-CH); 114.5 (2 x CH_{Ar}); 121.8 (2 x CH_{Ar}); 127.6 (C_{qAr}); 142.9 (C_{qAr}); 154.4 (C-C(O)); 155.6 (C-CH-O); 173.2 (C(O)).

MS (ES^+ , m/z, %): 248.77 [M+1] (100).

HPLC čistota: 97 %.

3-((3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)(methyl)amino)benzonitril (54)



Postup H3, výtěžek: 68 %, žlutá kapalina.

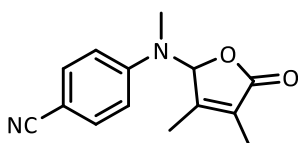
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.88 (s, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.96 (s, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.68 (s, 3H, N- CH_3); 6.11 (s, 1H, O-CH-N); 7.19 – 7.21 (m, 1H, H_{Ar}); 7.26 – 7.31 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.34 – 7.38 (m, 1H, H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.9 (O-CH-C- CH_3); 12.0 (C(O)-C- CH_3); 32.2 (N- CH_3); 92.9 (O-CH); 113.2 (CN); 118.9 (C_{qAr}); 120.3 (CH_{Ar}); 121.5 (CH_{Ar}); 124.6 (CH_{Ar}); 128.1 (C_{qAr}); 130.2 (CH_{Ar}); 149.7 (C-C(O)); 153.8 (C-CH-O); 172.6 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 243.49 [M+1] (100).

HPLC čistota: 97 %.

4-((3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)(methyl)amino)benzonitril (55)



Postup H3, výtěžek: 83 %, světle růžová pevná amorfní látka.

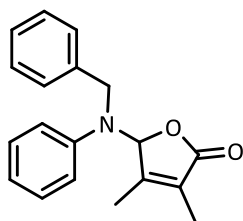
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.90 – 1.92 (m, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.97 – 1.99 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.75 (s, 3H, N- CH_3); 6.21 (s, 1H, O-CH-N); 7.05 – 7.07 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.56 – 7.59 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.9 (O-CH-C- CH_3); 12.0 (C(O)-C- CH_3); 31.7 (N- CH_3); 91.6 (O-CH); 103.3 (CN); 115.9 (2 x CH_{Ar}); 119.4 (C_{qAr}); 128.4 (C_{qAr}); 133.6 (2 x CH_{Ar}); 152.3 (C-C(O)); 153.5 (C-CH-O); 172.4 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 243.55 [M+1] (100).

HPLC čistota: 99 %.

5-(benzyl(fenyl)amino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (58)



Postup H3, výtěžek: 68 %, bílá pevná amorfnní látka.

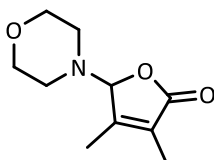
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.82 (s, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.87 (s, 3H, C(O)-C- CH_3); 4.31 – 4.33 (m, 2H, N- CH_2); 6.16 (s, 1H, O-CH-N); 6.97 – 6.99 (m, 1H, H_{Ar}); 7.10 – 7.11 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.17 – 7.31 (m, 7H, 7 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.8 (O-CH-C- CH_3); 12.4 (C(O)-C- CH_3); 51.6 (CH_2); 95.1 (O-CH); 120.5 (CH_{Ar}); 122.8 (C_{qAr}); 127.2 (2 x CH_{Ar}); 127.9 (2 x CH_{Ar}); 128.1 (CH_{Ar}); 128.5 (2 x CH_{Ar}); 129.2 (2 x CH_{Ar}); 137.9 (C_{qAr}); 147.4 (C-C(O)); 154.4 (C-CH-O); 173.0 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 294.65 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

3,4-dimethyl-5-morpholinofuran-2(5H)-on (59)



Postup H3, výtěžek: 46 %, žlutá pevná látka.

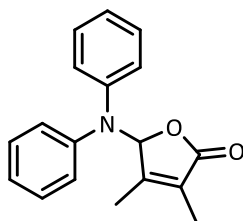
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.82 (s, 3H, O-CH-C- CH_3); 1.92 (s, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.63 – 2.68 (m, 4H, 2 x CH_2); 3.66 – 3.68 (m, 4H, 2 x CH_2); 5.33 (s, 1H, O-CH-N).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 8.7 (O-CH-C- CH_3); 12.2 (C(O)-C- CH_3); 47.3 (2 x CH_2); 66.9 (2 x CH_2); 98.5 (O-CH); 127.5 (C-C(O)); 153.7 (C-CH-O); 173.1 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 198.33 [M+1] (100).

HPLC čistota: 100 %.

5-(difenylamino)-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (60)



Postup H3, výtěžek: 73 %, bílá pevná amorfnní látka.

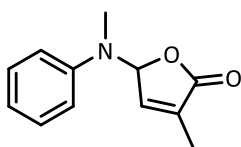
^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ (ppm): 1.67 – 1.69 (m; 3H; O-CH-C- CH_3); 1.92 – 1.93 (m; 3H; O=C-C- CH_3); 6.49 (s; 1H; O-CH-N); 7.07 – 7.11 (m; 6H; 6 x H_{Ar}); 7.26 – 7.29 (m; 4H; 4 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ (ppm): 8.6 (O-CH-C- CH_3); 12.7 (C(O)-C- CH_3); 92.6 (O-CH); 124.0 (C_{qAr}); 124.6 (C_{qAr}); 128.5 (CH_{Ar}); 129.3 (CH_{Ar}); 145.5 (C-C(O)); 153.7 (C-CH-O); 172.9 (C(O)).

MS (ES^+ , m/z, %): 280.71 [$\text{M}+1$] (100).

HPLC čistota: 100 %.

3-methyl-5-(methyl(fenyl)amino)furan-2(5H)-on (61)



Postup H3, výtěžek: 73 %, bezbarvá kapalina.

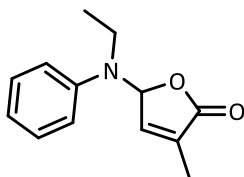
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.99 – 2.00 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.79 (s, 3H, NH- CH_3); 6.31 – 6.33 (m, 1H, O-CH-N); 6.85 – 6.86 (m, 1H, CH=C); 6.96 – 7.00 (m, 1H, H_{Ar}); 7.07 – 7.11 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.27 – 7.31 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.9 (C(O)-C- CH_3); 33.7 (N- CH_3); 92.9 (O-CH); 118.2 (2 x CH_{Ar}); 121.91 (CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 134.4 (C_{qAr}); 143.8 (C-C(O)); 148.7 (C-CH-O); 172.8 (C(O)).

MS (EI, m/z, %): 203.11 [M^+] (65).

Čistota (dle NMR): 90 %.

5-(ethyl(fenyl)amino)-3-methylfuran-2(5H)-on (62)



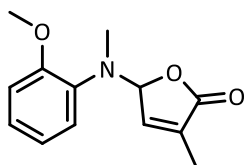
Postup H3, výtěžek: 48 %, žlutohnědá kapalina.

^1H (CDCl_3 500 MHz) δ (ppm): 1.06 (t, $J = 7,34$ Hz, 3H, N- CH_2 - CH_3); 1.94 – 1.96 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 3.29 (bs, 2H, N- CH_2); 6.22 – 6.24 (m, O-CH-N); 6.82 – 6.85 (m, 1H, CH_3 -C-CH); 6.98 – 7.01 (m, 1H, H_{Ar}); 7.10 – 7.15 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.27 – 7.32 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

MS (EI, m/z, %): 217.03 [M^+] (85).

Čistota (dle NMR): 95 %.

5-((2-methoxyfenyl)(methyl)amino)-3-methylfuran-2(5H)-on (65)



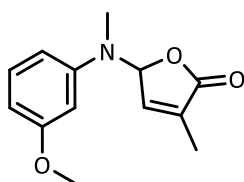
Postup H3, výtěžek: 31 %, žlutohnědá pevná amorfnní látka.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.88 – 1.90 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.66 (s, 3H, N- CH_3); 3.78 (s, 3H, O- CH_3); 6.11 – 6.13 (m, 1H, O- CH-N); 6.82 – 6.87 (m, 3H, 2 x H_{Ar} ; 1 x C= CH); 6.96 – 7.05 (m, 1H, H_{Ar}); 7.18 – 7.20 (m, 1H, H_{Ar}).

MS (EI, m/z, %): 216.99 [M^+] (89).

Čistota (dle NMR): 75 %.

5-((3-methoxyfenyl)(methyl)amino)-3-methylfuran-2(5H)-on (66)



Postup H3, výtěžek: 81 %, hnědá pevná amorfnní látka.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.83 – 1.84 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.61 (s, 3H, N- CH_3); 3.63 (s, 3H, O- CH_3); 6.19 (s, 1H, O- CH-N); 6.35 – 6.37 (m, 1H, H_{Ar}); 6.43 – 6.45 (m, 1H, H_{Ar}); 6.49 – 6.53 (m, 1H, H_{Ar}); 6.73 – 6.74 (m, 1H, CH_3 -C- CH); 7.01 – 7.05 (m, 1H, H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.9 (C(O)-C- CH_3); 35.5 (N- CH_3); 55.3 (O- CH_3); 92.6 (O- CH); 104.3 (CH_{Ar}); 106.7 (CH_{Ar}); 110.4 (CH_{Ar}); 130.0 (CH_{Ar}); 134.4 (C_{qAr}); 143.7 (C_{qAr}); 150.0 (C-C(O)); 160.6 (C- CH-O); 172.7 (C(O)).

MS (EI, m/z, %): 216.96 [M^+] (93).

Elementární analýza CHN:

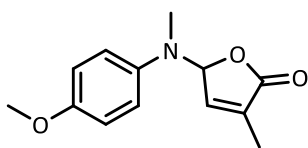
sumární vzorec $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3$

změřeno: C 66,01 %; H 6,35 %; N 6,33 %.

teoreticky: C 65,74 %; H 5,98 %; N 6,39 %.

Čistota (dle NMR): 99 %.

5-((4-methoxyfenyl)(methyl)amino)-3-methylfuran-2(5H)-on (67)



Postup H3, výtěžek 79 %, hnědá pevná amorfnní látka.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.96 – 1.97 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.76 (s, 3H, N- CH_3); 3.79 (s, 3H, O- CH_3); 6.12 – 6.14 (m, 1H, O- CH-N); 6.81 – 6.83 (m, 2H, H_{Ar} ; 1 x $\text{CH}_3\text{-C-CH}$); 6.84 (m, 1H, H_{Ar}); 7.07 – 7.1 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.8 (C(O)-C- CH_3); 35.6 (N- CH_3); 55.6 (O- CH_3); 94.8 (O-CH); 114.4 (2 x CH_{Ar}); 122.1 (2 x CH_{Ar}); 134.2 (C_{qAr}); 142.1 (C_{qAr}); 143.9 (C-C(O)); 155.8 (C-CH-O); 172.9 (C(O)).

MS (EI, m/z, %): 216.97 [M^+] (46).

Elementární analýza CHN:

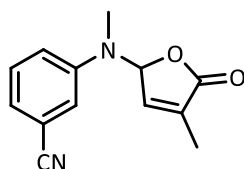
sumární vzorec $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3$

změřeno: C 66,54 %; H 6,39 %; N 6,38 %.

teoreticky: C 65,74 %; H 5,98 %; N 6,39 %.

Čistota (dle NMR): 99 %.

3-((3,4-dimethyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)(methyl)amino)benzonitril (68)



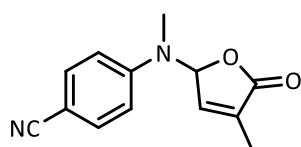
Postup H3, výtěžek: 43 %, žlutá kapalina.

^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.80 – 1.82 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.61 (s, 3H, N- CH_3); 6.16 (bs, 1H, O- CH-N); 6.74 – 6.75 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-C-CH}$); 7.02 – 7.40 (m, 4 x H_{Ar}).

MS (EI, m/z, %): 227.95 [M^+] (66).

Čistota (dle NMR): 86 %.

4-(methyl(4-methyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)amino)benzonitril (69)



Postup H3, výtěžek: 53 %, světle růžová pevná amorfnní látka.

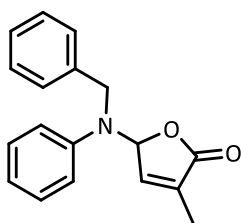
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 2.02 – 2.04 (m, 3H, C(O)-C- CH_3); 2.84 (s, 3H, N- CH_3); 6.37 – 6.39 (m, 1H, O- CH-N); 6.88 – 6.90 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-C-CH}$); 7.04 – 7.07 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.56 – 7.59 (m, 2H, 2 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.9 (C(O)-C- CH_3); 32.9 (N- CH_3); 89.9 (CH-O); 103.4 (CN); 115.9 (2 x CH_{Ar}); 119.4 (CH_{Ar}); 133.6 (2 x CH_{Ar}); 135.1 (C_{qAr}); 142.7 (C-C(O)); 151.7 (C-CH-O); 172.0 (C(O)).

MS (EI, m/z, %): 227.94 [M^+] (71).

Čistota (dle NMR): 95 %.

5-(benzyl(fenyl)amino)-3-methylfuran-2(5H)-on (72)



Postup H3, výtěžek: 81 %, bílá pevná amorfnní látka.

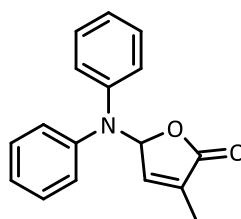
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.87 – 1.88 (m, 3H, C(O)C- CH_3); 4.39 (s, 2H, N- CH_2); 6.41 (s, 1H, O- CH-N); 6.70 (s, 1H, CH_3 -C- CH); 6.97 – 6.99 (m, 1H, H_{Ar}); 7.07 – 7.09 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.23 – 7.34 (m, 7H, 7 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.8 (C(O)-C- CH_3); 51.9 (N- CH_2); 92.1 (CH-O); 118.5 (2 x CH_{Ar}); 122.2 (CH_{Ar}); 126.9 (2 x CH_{Ar}); 127.3 (CH_{Ar}); 128.8 (2 x CH_{Ar}); 129.3 (2 x CH_{Ar}); 134.2 (C_{qAr}); 138.7 (C_{qAr}); 143.3 (C-C(O)); 147.9 (C-CH-O); 172.8 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 280.67 [$\text{M}+1$] (100).

HPLC čistota: 96 %.

5-(difenylamino)-3-methylfuran-2(5H)-on (74)



Postup H3, výtěžek: 83 %, šedá pevná amorfnní látka.

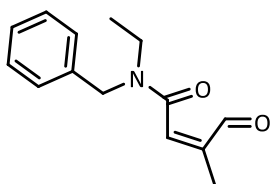
^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.74 – 1.76 (m, 3H, O=C-C- CH_3); 6.61 – 6.63 (m, 1H, O- CH-N); 6.73 – 6.75 (m, 1H, CH_3 -C- CH); 7.3 – 7.5 (m, 4H, 4 x H_{Ar}); 7.08 – 7.11 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.24 – 7.29 (m, 4H, 4 x H_{Ar}).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 10.5 (C(O)-C- CH_3); 89.7 (CH-O); 123.8 (CH_{Ar}); 124.3 (CH_{Ar}); 129.1 (CH_{Ar}); 133.3 (C_{qAr}); 143.1 (C-C(O)); 144.8 (C-CH-O); 173.0 (C(O)).

MS (ES+, m/z, %): 280.71 [$\text{M}+1$] (70).

Čistota (dle NMR): 99 %.

N-benzyl-*N*-methyl-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enamid (75)



Postup H3, výtěžek: 13 %, žlutá kapalina, směs rotamerů (R1 : R2; 1 : 2).

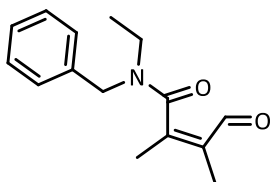
^1H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.10 – 1.12 (m, 3H, CH₂-CH₃, R1); 1.13 – 1.15 (m, 3H, CH₂-CH₃, R2); 1.89 – 1.91 (m, 3H, C(O)-C-CH₃, R1); 2.06 – 2.07 (m, 3H, C(O)-C-CH₃, R2); 2.93 – 3.03 (m, 2H, N-CH₂, R1); 3.32 – 3.33 (m, 2H, N-CH₂, R2); 3.44 – 3.51 (m, 2H, Ph-CH₂, R1); 4.70 (bs, 2H, Ph-CH₂, R2); 5.95 – 5.99 (m, 1H, CH=C, R1); 6.06 – 6.07 (m, 1H, CH=C, R2); 7.10 – 7.15 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.28 – 7.36 (m, 8H, 8 x H_{Ar}); 9.61 – 9.63 (m, 1H, (C(O)H, R1); 9.66 – 9.68 (s, 1H, N-C(O)H, R2).

^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 10.1 (C(O)H-C-CH₃, R1); 11.4 (CH₂-CH₃, R1); 13.5 (CH₂-CH₃, R2); 39.1 (N-CH₂, R1); 41.9 (N-CH₂, R2); 46.3 (Ph-CH₂, R1); 51.7 (Ph-CH₂, R2); 127.0 (CH_{Ar}); 127.4 (CH_{Ar}); 127.9 (CH_{Ar}); 128.1 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 128.4 (CH_{Ar}); 128.5 (CH_{Ar}); 128.6 (CH_{Ar}); 128.8 (Cq_{Ar}); 129.1 (Cq_{Ar}); 134.4 (C(O)-C-CH₃, R1); 134.9 (C(O)-C-CH₃, R2); 151.6 (N-C-C-CH₃, R1); 151.9 (N-C-C-CH₃, R2); 170.2 (N-C(O), R1); 170.9 (N-C(O), R2); 191.3 (C-C(O)H, R1); 191.2 (C-C(O)H, R2).

MS (ES⁺, m/z, %): 246.28 [M+1] (100).

HPLC čistota: 98 %.

N-benzyl-*N*-ethyl-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enamid (76)



Postup H3, výtěžek: 18 %, žlutá kapalina, směs rotamerů (R1 : R2; 0,7 : 1).

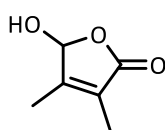
^1H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.08 (t, $J = 7,03$ Hz, 3H, CH₂-CH₃, R1); 1.13 (t, $J = 7,03$ Hz, 3H, CH₂-CH₃, R2); 1.75 – 1.76 (m, 3H, C(O)H-C-CH₃, R1); 1.78 – 1.79 (m, 3H, C(O)H-C-CH₃, R2); 2.08 – 2.09 (m, 3H, N-C-C-CH₃, R1); 2.15 – 2.16 (m, 3H, N-C-C-CH₃, R2); 3.13 – 3.20 (m, 2H, N-CH₂, R1); 3.38 – 3.53

(m, 2H, N-CH₂, R2); 4.50 (bs, 2H, Ph-CH₂, R1); 4.69 (bs, 2H, Ph-CH₂, R2); 7.09 – 7.13 (m, 2H, 2 x H_{Ar}); 7.26 – 7.36 (m, 8H, 8 x H_{Ar}); 9.68 (s, 1H, (C(O)H, R1); 9.72 (s, 1H, N-C(O)H, R2).
¹³C (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 10.0 (C(O)H-C-CH₃); 11.5 (CH₂-CH₃, R1); 13.3 (CH₂-CH₃, R2); 18.7 (N-C(O)H-C-CH₃); 38.8 (N-CH₂, R1); 41.9 (N-CH₂, R2); 46.3 (Ph-CH₂, R1); 51.5 (Ph-CH₂, R2); 127.0 (CH_{Ar}); 127.4 (CH_{Ar}); 127.9 (CH_{Ar}); 128.1 (CH_{Ar}); 128.3 (CH_{Ar}); 128.5 (CH_{Ar}); 128.6 (CH_{Ar}); 128.7 (CH_{Ar}); 128.9 (C_{qAr}); 129.1 (C_{qAr}); 134.4 (C(O)-C-CH₃, R1); 134.9 (C(O)-C-CH₃, R2); 151.7 (N-C-C-CH₃, R1); 151.8 (N-C-C-CH₃, R2); 170.2 (N-C(O), R1); 170.7 (N-C(O), R2); 191.0 (C-C(O)H, R1); 191.1 (C-C(O)H, R2).

MS (ES⁺, m/z, %): 246.36 [M+1] (100).

HPLC čistota: 89 %

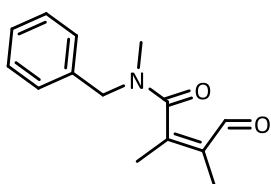
5-hydroxy-3,4-dimethylfuran-2(5H)-on (77)



¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.87 – 1.89 (m, O-CH-C-CH₃); 1.97 – 1.99 (m, 3H, C(O)-C-CH₃); 6.08 (s, 1H, O-CH-O); 6.88 – 6.91 (m, 1H, OH).

MS (ES⁺, m/z, %): 129.00 [M+1] (100).

N-benzyl-N,2,3-trimethyl-4-oxobut-2-enamid (78)



Postup H3, výtěžek: 33 %, oranžová kapalina, směs rotamerů (R1 : R2; 0,55 : 1).

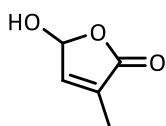
¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.70 – 1.71 (m, 3H, C(O)-C-CH₃, R1); 1.72 – 1.74 (m, 3H, C(O)-C-CH₃, R2); 2.07 – 2.08 (m, 3H, N-C-C-CH₃, R1); 2.09 – 2.10 (m, 3H, N-C-C-CH₃, R2); 2.77 (s, 3H, N-CH₃, R2); 2.91 (s, 3H, N-CH₃, R1); 4.39 (bs, 2H, N-CH₂, R1), 4.61 (s, 2H, N-CH₂, R2); 7.05 – 7.07 (m, 1H, H_{Ar}); 7.21 – 7.31 (m, 9H, H_{Ar}); 9.60 (s, 1H, C(O)H, R2); 9.65 (s, 1H, C(O)H, R1).

^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 11.5 (C(O)H-C- CH_3); 18.5 (N-C(O)H-C- CH_3); 38.8 (N- CH_3 , R2); 41.8 (N- CH_3 , R1); 46.0 (Ph- CH_2 , R1); 51.2 (Ph- CH_2 , R2); 127.1 (CH_{Ar}); 127.3 (CH_{Ar}); 127.7 (CH_{Ar}); 128.0 (CH_{Ar}); 128.4 (CH_{Ar}); 128.5 (CH_{Ar}); 128.7 (CH_{Ar}); 128.8 (CH_{Ar}); 129.0 (C_{qAr}); 129.1 (C_{qAr}); 134.8 (C(O)H-C- CH_3 , R1); 135.0 (C(O)H-C- CH_3 , R2); 151.9 (N-C-C- CH_3 , R1); 152.1 (N-C-C- CH_3 , R2); 170.1 (N-C(O), R1); 170.6 (N-C(O), R2); 191.2 (C-C(O)H, R2); 191.3 (C-C(O)H, R1).

MS (ES+, m/z, %): 246.36 [M+1] (100).

HPLC čistota: 96 %.

5-hydroxy-3-methylfuran-2(5H)-on (79)



^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.96 – 1.98 (m, 3H, CH_3); 6.10 – 6.11(m, 1H, O- CH -O); 6.81 – 6.84 (m, 1H, C= CH).

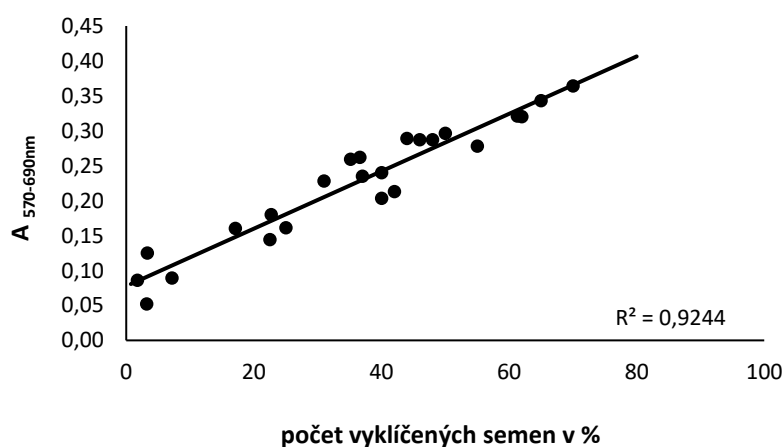
MS (ES+, m/z, %): 114.64 [M+1] (100).

4.2 Biologické testování – semena parazitické rostliny *Striga hermonthica*

Tabulka 1 – Rozdíl absorbancí odpovídající procentu vyklíčených semen parazitické rostliny *S. hermonthica* po aplikaci standardu GR24.

GR24			
klíčivost (%)	A 570-690 nm	klíčivost (%)	A 570-690 nm
40	0,20	62	0,32
35	0,26	44	0,29
42	0,21	40	0,24
61	0,32	31	0,23
70	0,36	17	0,16
46	0,29	23	0,18
65	0,34	25	0,16
55	0,28	23	0,14
37	0,24	2	0,09
50	0,30	7	0,09
48	0,29	3	0,13
37	0,26	3	0,05

Z hodnot uvedených v Tabulce 1 byl vytvořen graf závislosti rozdílu absorbancí (570-690 nm) na procentu vyklíčených semen (Graf 6) a získána rovnice pro výpočet procenta vyklíčených semen (Rovnice 1). Průměrný počet semen v jedné jamce byl $59 \pm 4,3$ (spočítána semena v 10 jamkách).



Graf 6 – Závislost rozdílu absorbancí (570-690 nm) na procentu vyklíčených semen parazitické rostliny *S. hermonthica* po aplikaci standardu GR24 a znázornění křivky lineární regrese.

$$\text{Procento vyklíčených semen} = \frac{\text{Rozdíl absorbancí (570–690 nm)} - 0,0777}{0,0041}$$

Rovnice 1 – Výpočet procenta vyklíčených semen z rozdílu naměřených absorbancí u parazitické rostliny *S. hermonthica*.

Tabulka 2 – Rozdíl absorbancí a jemu odpovídající procento vyklíčených semen parazitické rostliny *S. hermonthica* po aplikaci jednotlivých strigolaktonových mimetik při koncentraci 10^{-5} M a 10^{-6} M.

Testovaná látka	Testovaná koncentrace					
	10 ⁻⁵ M			10 ⁻⁶ M		
	A ₅₇₀₋₆₉₀	klíčivost (%)	SE (±)	A ₅₇₀₋₆₉₀	klíčivost (%)	SE (±)
46	0,05	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
47	0,06	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
48	0,05	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
50	0,06	0,0	0,00	0,08	0,9	2,1
51	0,08	0,0	0,00	0,08	0,3	3,6
52	0,05	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
53	0,05	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
54	0,05	0,0	0,00	0,07	0,0	0,0
57	0,07	0,0	0,00	0,04	0,0	0,0
58	0,05	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
59	0,05	0,0	0,00	0,05	0,0	0,0
60	0,06	0,0	0,00	0,06	0,0	0,0
65	0,06	0,0	0,00	0,05	0,0	0,0
66	0,06	0,0	0,00	0,05	0,0	0,0
68	0,12	10,3	3,50	0,07	0,0	0,0
71	0,25	42,6	5,30	0,14	14,5	5,3
73	0,05	0,0	0,00	0,07	0,0	0,0

– SE – směrodatná odchylka (z anglického standard error)

Tabulka 3 – Rozdíl absorbancí odpovídající procentu vyklíčených semen parazitické rostliny *S. hermonthica* po aplikaci standardu GR24 (aplikovaná koncentrace 10^{-5} až 10^{-10} M).

koncentrace	A ₅₇₀₋₆₃₀	Klíčivost (%)	SE (±)
10^{-5} M	0,27	56,7	3,3
10^{-6} M	0,29	58,8	5,8
10^{-7} M	0,27	43,0	5,0
10^{-8} M	0,25	44,1	5,6
10^{-9} M	0,16	21,8	2,6
10^{-10} M	0,09	3,8	1,8

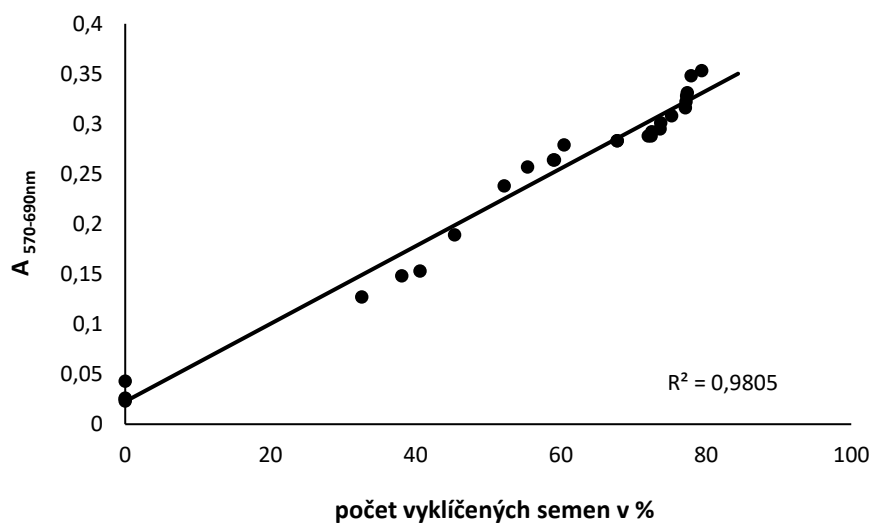
– SE – směrodatná odchylka (z anglického standard error)

4.2 Biologické testování – semena parazitické rostliny *Phelipanche ramosa*

Tabulka 4 – Rozdíl absorbancí odpovídající procentu vyklíčených semen parazitické rostliny *P. ramosa* po aplikaci standardu GR24.

GR24			
Klíčivost (%)	A ₅₇₀₋₆₃₀	Klíčivost (%)	A ₅₇₀₋₆₃₀
0	0,03	68	0,28
0	0,02	72	0,29
0	0,04	72	0,29
0	0,03	73	0,29
33	0,13	74	0,30
38	0,15	74	0,30
41	0,15	75	0,31
45	0,19	77	0,32
52	0,24	77	0,32
55	0,26	77	0,33
59	0,26	77	0,33
59	0,26	78	0,35
60	0,28	79	0,35
68	0,28		

Z hodnot uvedených v Tabulce 4 byl vytvořen graf závislosti rozdílu absorbancí (570-690 nm) na procentu vyklíčených semen (Graf 7) a zikána rovnice pro výpočet procenta vyklíčených semen (Rovnice 2). Průměrný počet semen v jedné jamce byl $93 \pm 7,3$ (spočítána semena v 10 jamkách).



Graf 7 – Závislost rozdílu absorbancí (570-690 nm) na procentu vyklíčených semen parazitické rostliny *P. ramosa* po aplikaci standardu GR24 a znázornění křivky lineární regrese.

$$\text{Procento vyklíčených semen} = \frac{\text{Rozdíl absorbancí (570–690 nm)} - 0,0227}{0,388}$$

Rovnice 2 – Výpočet procenta vyklíčených semen z rozdílu naměřených absorbancí u parazitické rostliny *P. ramosa*.

Tabulka 5 – Rozdíl absorbancí a jemu odpovídající procento vyklíčených semen parazitické rostliny *P. ramosa* po aplikaci jednotlivých strigolaktonových mimetik při koncentraci 10^{-5} M a 10^{-6} M.

Testovaná látka	Testovaná koncentrace					
	10^{-5} M			10^{-6} M		
	A ₅₇₀₋₆₉₀	klíčivost (%)	SE (±)	A ₅₇₀₋₆₉₀	klíčivost (%)	SE (±)
46	0,03	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
47	0,02	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
48	0,03	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
50	0,03	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
51	0,03	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
52	0,02	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0
53	0,02	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
54	0,03	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0
57	0,10	20,9	1,2	0,03	0,0	0,0
58	0,02	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
59	0,05	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
60	0,29	67,7	8,9	0,09	18,5	2,5
65	0,09	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0
66	0,08	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0
68	0,19	42,6	6,9	0,04	0,0	0,0
71	0,25	58,8	4,9	0,15	33,3	4,0
73	0,03	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0

– SE – směrodatná odchylka (z anglického standard error)

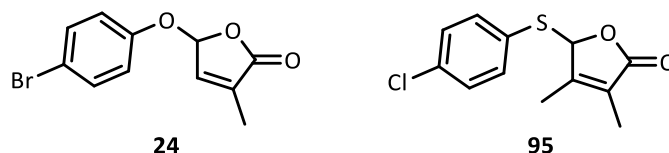
Tabulka 6 – Rozdíl absorbancí a jemu odpovídající procento vyklíčených semen parazitické rostliny *P. ramosa* po aplikaci standardu GR24 (aplikovaná koncentrace 10^{-5} až 10^{-10} M).

koncentrace	A ₅₇₀₋₆₃₀	Klíčivost (%)	SE (±)
10^{-5} M	0,34	78,3	4,1
10^{-6} M	0,29	73,1	2,6
10^{-7} M	0,32	76,7	3,7
10^{-8} M	0,26	56,5	0,6
10^{-9} M	0,28	67,0	0,8
10^{-10} M	0,15	39,2	0,7

– SE – směrodatná odchylka (z anglického standard error)

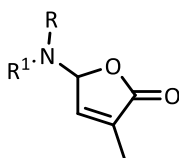
5 Diskuze

Dosud byla připravena různá kyslíkatá (kapitola 2.4.2.) (Obr. 12) a sírná strigolaktonová mimetika (Boyer a kol, 2012). Ukázalo se, že sírné mimetikum, které připravil Boyer se svým týmem je velmi aktivním stimulantem klíčení semen parazita *Phelipanche ramosa* (klíčivost $72 \pm 2 \%$) (Obr. 28) (Boyer a kol., 2014).



Obr. 28 – Příklad struktury kyslíkatého a sírného strigolaktonového mimetika.

Dosavadní výsledky biologických aktivit strigolaktonových mimetik ukazují, že tyto struktury mají velký potenciál, a tudíž rozšíření jejich portfolia a prověření závislosti aktivity na struktuře je žádoucí. Strigolaktonová mimetika, v jejichž struktuře se butenolidový kruh jedním ze substituentů terciálního aminu tak rozšíří strukturní portfolio strigolaktonových mimetik (Obr. 29).



Obr. 29 – Obecná struktura navržených strigolaktonových mimetik.

5.1 Syntéza sekundárních aminů

Pro přípravu nových strigolaktonových mimetik byla zvolena substituce bromu v brombutenolidu sekundárním aminem.

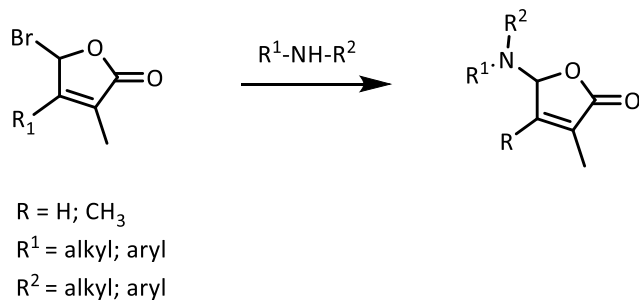


Schéma 12 – Obecné schéma přípravy dusíkatých strigolaktonových mimetik.

Jelikož ne všechny uvažované sekundární aminy jsou snadno komerčně dostupné, byly připraveny alkylačními postupy z anilinů, respektive benzylaminů. Pro přípravu jednotlivých sekundárních aminů byly z literatury zvoleny postupy klasické organické syntézy poskytující co největší výtěžky. Obecně byly vybrány metody založené buď na alkylationi ochráněné aminoskupiny nebo na redukci amidu či imidu připraveného z vybraného primárního aminu.

Prvním použitým postupem přípravy bylo využití *tert*-butylkarbonylové chránící skupiny pro omezení dvounásobné alkylace na dusíku (Kim a kol., 1975). Ochráněné aminy byly poté alkylovány jodmethanem a následně byla chránící skupina (-Boc) odstraněna v kyselém prostředí. Tento postup fungoval velmi dobře pro *N*-methylanilin (**33**) (výtěžek 67 %) (Schéma 13).

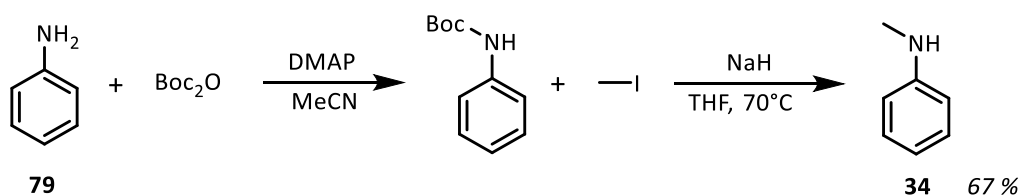


Schéma 13 – Obecné schéma přípravy *N*-methylanilinů.

Pro přípravu *N*-methylbenzylaminu (**35**) bylo nutno použít jinou metodu, protože se nepodažilo za daných podmínek namethylovat ochráněný benzylaminu. Proto byl benzylamin (**80**) při teplotě 80 °C v mikrovlnném reaktoru ponechán reagovat s formamidem za vzniku amidu (**33**), který byl následně redukován tetrahydrihohlitanem litným na *N*-methylbenzylamin (**35**) (výtěžek 91 %) (Schéma 14) (Lebleu a kol., 2014).

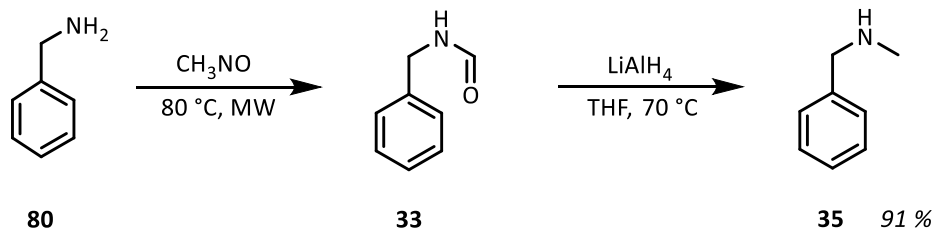


Schéma 14 – Obecné schéma methylace 80.

Pro orientační představu o vlivu substituentů na aromatickém kruhu v případě derivátů odvozených od anilinu byly připraveny *N*-methylované anisidiny a *N*-methyl derivát *m*-kyanoanilinu.

Deriváty anisidinů s methoxy skupinou vyznačující se kladným mesomerním efektem byly připraveny od všech polohových isomerů (*-o*, *-m*, *-p*) a to redukcí karbamátů připravených z příslušného anisidinu (**81-83**) a ethyl chlorformiátu (výtěžky 81-86 %) (Schéma 15) (Wesely a Swoboda, 1951).

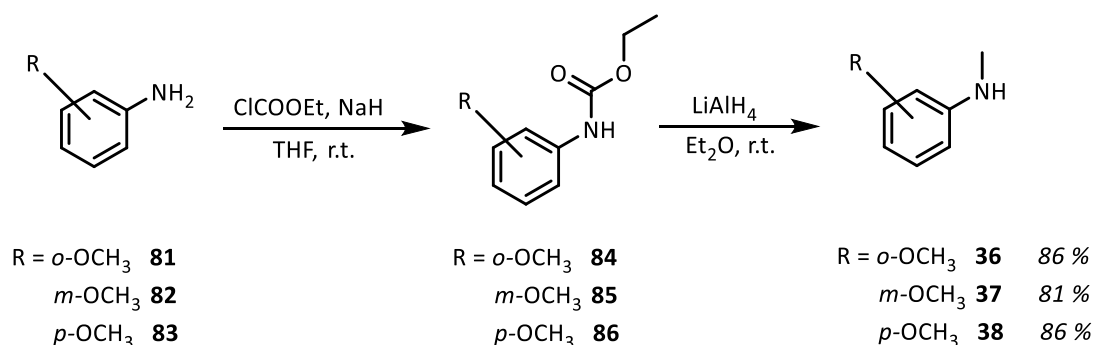


Schéma 15 – Obecné schéma methylace 81, 82 a 83.

N-methylkyanoanilin jako zástupce derivátů se substituentem se záporným mezomerním efektem byl připraven redukcí iminu připraveného z *m*-kyanoanilinu (**87**) a paraformaldehydu (výtěžek 68 %) (Schéma 16) (Barluenga a kol., 1984).

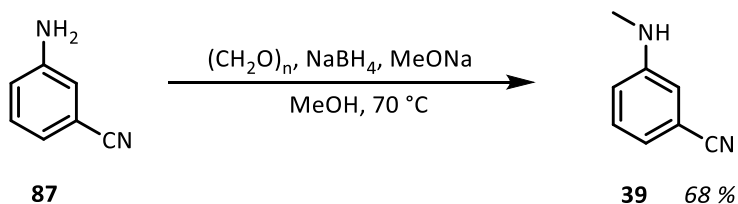


Schéma 16 – Obecné schéma methylace 87.

Další skupina aminů byla zaměřena na otestování stérického vlivu substituentů. Byly připraveny ethylové varianty od anilinu (**78**) a benzylaminu (**79**). Dále byly připraveny deriváty anilinu s rozvětveným alkylem (cyklopentylem a isopropylem) a anilin s aromatickým zbytkem (benzyl).

N-ethylanilin (**41**), *N*-ethylbenzylamin (**42**) a *N*-benzylanilin (**40**) byly připraveny redukcí iminu připraveného z příslušného primárního aminu (anilin, benzylamin) a aldehydu (acetaldehyd, benzaldehyd) (výtěžky 46-83 %) (Schéma 17).

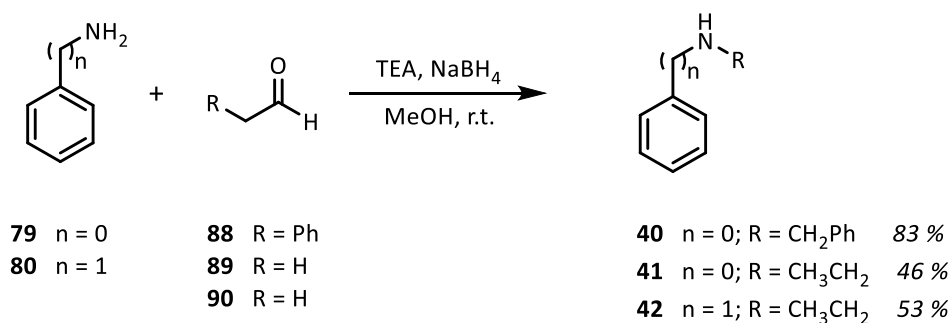


Schéma 17 – Obecné schéma přípravy **40**, **41** a **42**.

N-isopropylanilin (**44**) a *N*-cyklopentylanilin (**43**) byly připraveny alkyací anilinu (**79**) příslušným bromderivátem v mikrovlnném reaktoru (výtěžky 76–83 %) (Schéma 18) (Romera a kol., 2004).

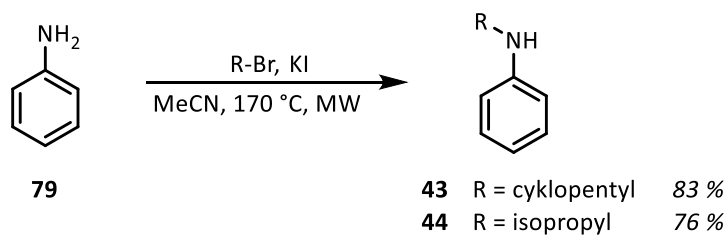


Schéma 18 – Obecné schéma přípravy **43** a **44**.

Celkem bylo připraveno 11 aminů, které byly společně s komerčními amimy (difenylamin, morfolin, *N*-methyl-*p*-kyanoanlin) použity pro přípravu strigolaktonových mimetik.

5.2 Syntéza bromfuranonů

Příprava brombutenolidových kruhů byla provedena pomocí radikálové bromace příslušného furan-2(5H)-onu (**92** a **93**) (Matsuo a Shindo, 2011) *N*-bromsukcinimidem v kvantitativních výtěžcích. 3-Methylfuran-2(5H)-on (**93**) je komerčně dostupný, dimethylový derivát (**91**) byl připraven redukcí z anhydridu dimethylmaleinové kyseliny (**94**) ve výtěžku 99 % (Schéma 19).

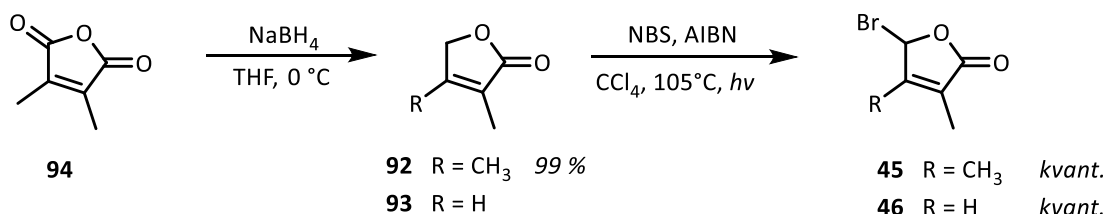


Schéma 19 – Obecné schéma přípravy **45** a **46**.

5.4 Syntéza dusíkatých strigolaktonových mimetik

Pro přípravu samotných strigolaktonových mimetik bylo použito nejčastěji používaného postupu při syntéze těchto mimetik (Fukui a kol., 2011). Standardním postupem je reakce brom či chlorbutenolidu s příslušným nukleofilem za přítomnosti báze v různých rozpouštědlech, nejčastěji v acetonu či dichlormethanu.

Bylo vyzkoušeno několik protokolů pro reakce brombutenolidu s příslušným aminem v dichlormethanu. Při reakci bez přítomnosti báze, která měla být nahrazena přebytkem aminu, ovšem nedocházelo vůbec k žádné reakci, stejně jak při použití triethylaminu jako báze (Schéma 20).

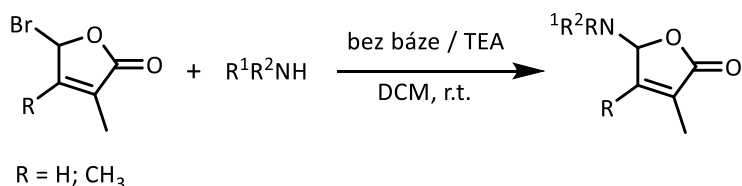


Schéma 20 – Obecné schéma reakce bromfuranonu se sekundárním aminem.

Pouze při použití *N*-cyklopentylanilinu (**43**) byla pozorována komplexní směs indukující rozklad produktů. Při použití *N*-methyl (**35**) a *N*-ethylbenzylaminu (**42**) místo předpokládaných produktů vznikaly amidy (**75**, **76**, **78**).

Při přípravě mimetik s monomethylovým butenolidem byla pozorována nestabilita produktů, která znemožnila využití sloupcové chromatografie jak na silice, tak na reverzní fázi. Taktéž při pokusech o rekrystalizaci docházelo k rozpadu mimetika na amin a hydroxybutenolid (**78**). Surové produkty byly získány ve výtěžcích 31-83 % (Tabulka 7). Vzhledem ke stabilitě látek při měření hmotnostních spekter na GC/MS lze uvažovat o vakuové destilaci jako o možné metodě čištění. Tuto metodu však při malých množstvích připravených látek nebylo, vzhledem k dostupné instrumentaci, možné vyzkoušet. Čistota monomethylových mimetik tak byla odhadnuta z NMR a ověřena pomocí elementární analýzy.

U některých produktů byla také pozorována degradace při skladování při teplotě -20 °C. Další produkty se pak vůbec nepodařilo izolovat, kde pomocí TLC a NMR bylo možné pozorovat jen komplexní směs látek indukující rozpad za reakčních podmínek. Při použití *N*-ethylbenzylaminu vznikaly amidy (**75**) (**76**) pro oba bromfuranonové kruhy (**45**) (**46**) v případě *N*-methylbenzylaminu vznikal amid (**78**) pouze u dimethylového kruhu (**45**) (Schéma 22). Vznik příslušného *N*-methyl-*N*-benzylamidu při reakci s monomethylovým kruhem nebyl pozorován. Při této reakci docházelo ke vzniku směsi mnoha látek, pravděpodobně v důsledku degradace reakčních komponent.

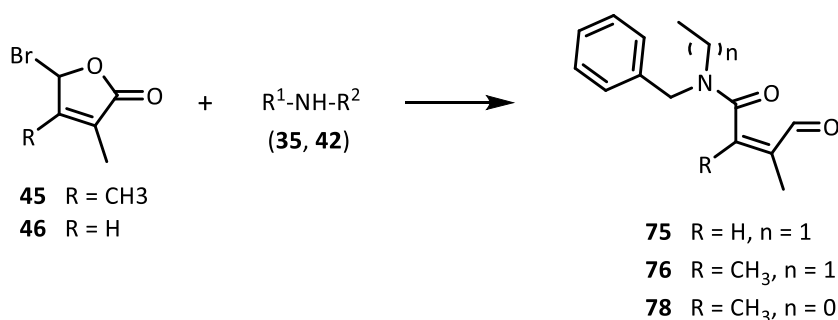


Schéma 22 – Obecné schéma reakce brombutenolidů s **35** a **42**.

Tyto produkty pravděpodobně vznikají nukleofilním atakem sekundárního aminu na karbonylový uhlík butenolidového kruhu s následným otevřením laktonu a eliminací bromidového iontu (Schéma 23) v závislosti na nukleofilicitě aminu (Sloan a Koch, 1983).

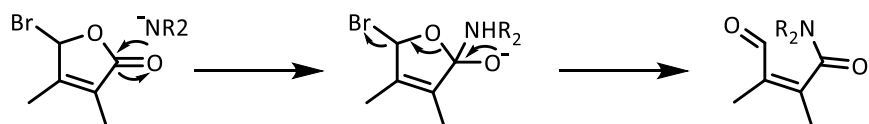


Schéma 23 – Předpokládané schéma vzniku amidů **75**, **76** a **78**.

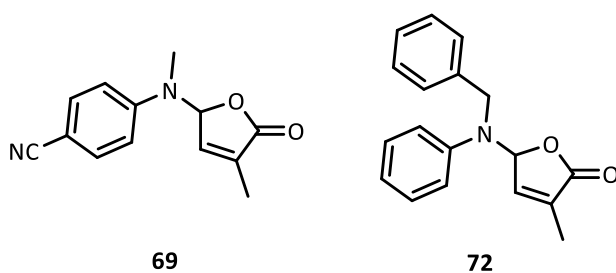
5.5 Biologická aktivita připravených sloučenin

Biologická aktivita nových strigolaktonových mimetik byla otestována ve standardizovaném biotestu (Pouvreau a kol., 2013).

Postup provedení je uveden v kapitole 3.5. K testování látek byla použita semena parazitických rostlin *Striga hermonthica* a *Phelipanche ramosa*. Jako pozitivní kontrola byla aplikována sloučenina GR24 v koncentračním gradientu 10^{-5} až 10^{-10} M. Biologické testování bylo prováděno na začátku dubna.

Klíčivost kontroly GR24 u parazitické rostliny *S. hermonthica* se pohybovala v rozmezí od 3,8 % do 56,7 % v závislosti na zvyšování koncentrace. V případě parazitické rostliny *P. ramosa* se klíčivost kontroly GR24 pohybovala od 39,2 % do 78,3 %. Spolehlivost biotestu byla ověřena negativní kontrolou (1% aceton), u které nebylo pozorováno žádné klíčení ani u jedné parazitické rostliny. Taktéž nulové klíčení bylo pozorováno při testování všech sekundárních aminů použitých pro přípravu strigolaktonových mimetik.

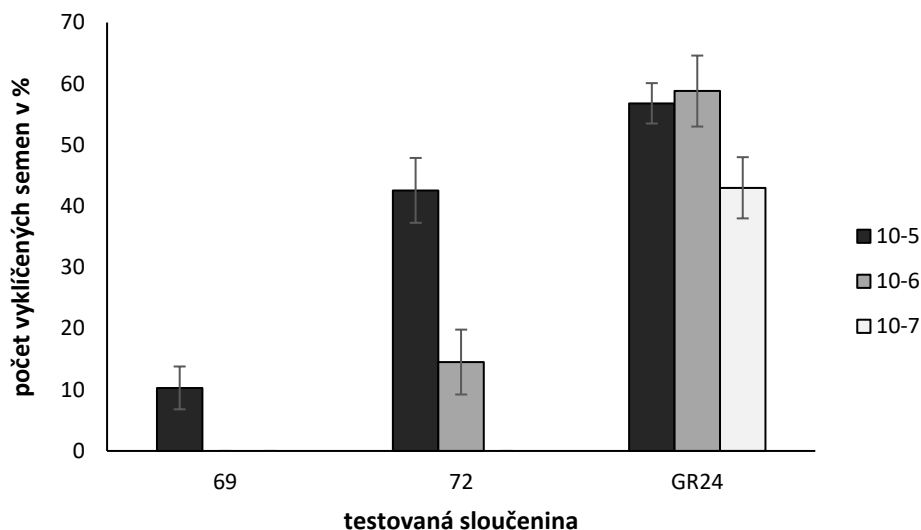
Při testování látek na semenech parazitické rostliny *S. hermonthica* se jako aktivní ukázaly pouze zástupci monomethylových strigolaktonových mimetik **69** a **72** (Obr. 30).



Obr. 30 – Struktury aktivních připravených strigolaktonových mimetik u parazitické rostliny *S. hermonthica*.

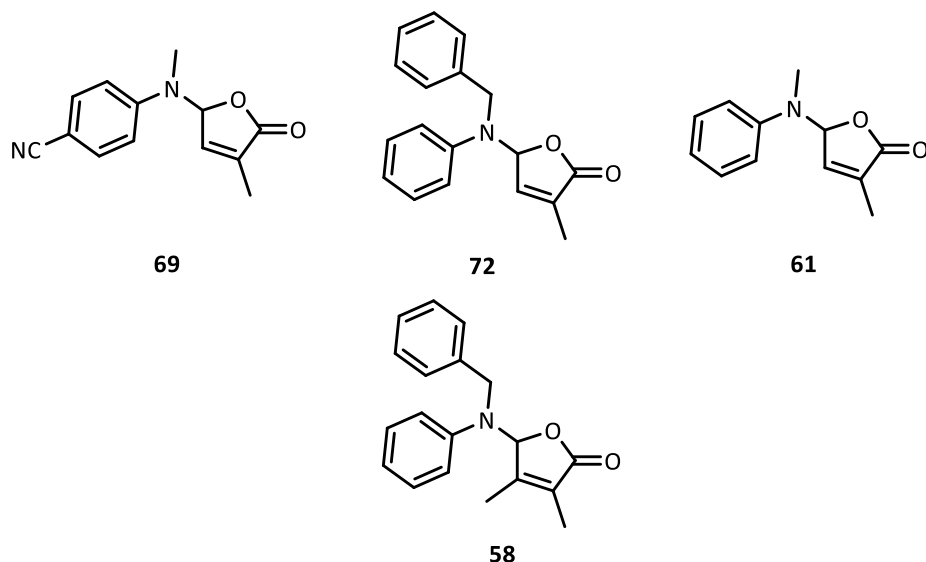
Výchozí sekundární aminy, dimethylová strigolaktonová mimetika a ostatní monomethylové deriváty byly zcela neaktivními stimulanty klíčení semen parazitické rostliny *S. hermonthica*. Látka **72** stimulovala klíčení semen parazita *S. hermonthica* při

koncentraci 10^{-5} M ze 42,6 %, což odpovídá třem čtvrtinám aktivity standardu GR24 při stejné koncentraci. Po desetinásobném snížení koncentrace (10^{-6} M) aplikované látky, již byla klíčivost sloučeniny **72** pouze 14,5 %. V porovnání s kontrolou GR24 při stejné koncentraci se tedy jedná jen o čtvrtinovou aktivitu (Graf 8). Strigolaktonové mimetikum **69** se ukázalo být aktivní jen při aplikované koncentraci 10^{-5} M a to pouze z 10,3 %. V porovnání se standardem GR24 při stejné koncentraci je tedy tato aktivita pouze pětina (Graf 8). Při aplikování látek v koncentraci 10^{-7} M již klíčila jen pozitivní kontrola GR24.



Graf 8 – Klíčivost nových strigolaktonových mimetik **69** a **72** v porovnání s pozitivní kontrolou GR24 (semena parazitické rostliny *S. hermonthica*).

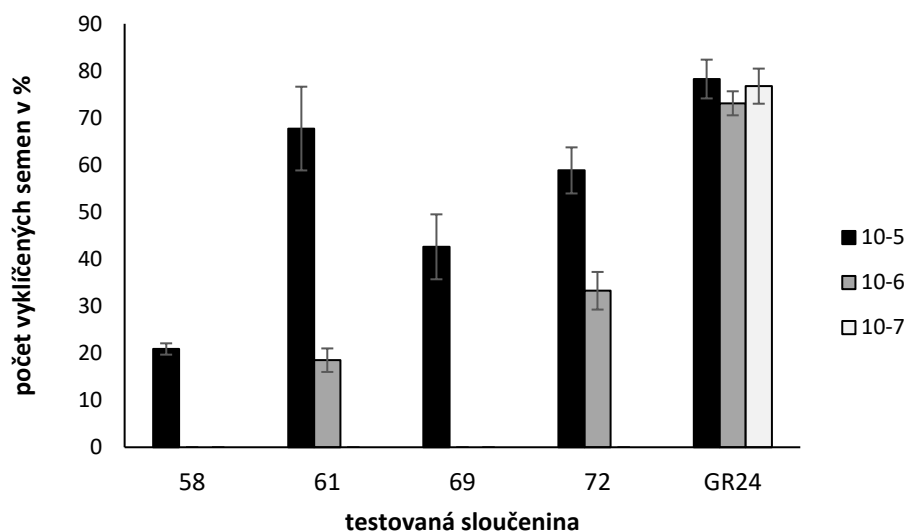
Př testování připravených látek na semenech parazitické rostliny *P. ramosa* se jako aktivní ukázaly opět látky **69** a **72** a navíc ještě látky **58** a **61** (Obr. 31).



Obr. 31 – Struktury aktivních připravených strigolaktonových mimetik u parazitické rostliny *S. hermonthica*.

Výchozí sekundární aminy a ostatní připravená mimetika byly zcela neaktivní. Látka **72** při aplikované koncentraci 10^{-5} M opět vykazovala tříčtvrtinovou aktivitu pozitivní kontroly GR24 (58,8 %). Při desetinásobném snížení koncentrace aplikované látky došlo ke snížení aktivity na 33,3 %, což odpovídá přibližně polovině aktivity standardu GR24 při stejné koncentraci (Graf 9). Strigolaktonová mimetika **58** a **69** se ukázala být aktivní jen při aplikované koncentraci 10^{-5} M. Látka **58** i přesto, že se jedná o dimethylové mimetikum, které by mělo být zcela neaktivním stimulantem klíčení parazitických rostlin, stimulovala klíčení semen parazita *P. ramosa* z 20,9 %, což odpovídá čtvrtinové aktivitě pozitivní kontroly GR24 (Graf 9). Strigolaktonové mimetikum **69** vykazovalo poloviční aktivitu GR24 při stejné koncentraci (42,6 %). Při desetinásobném snížení koncentrace již byly tyto látky zcela neaktivní (Graf 9).

Látka **61** vykazovala při testované koncentraci 10^{-5} M nejvyšší aktivitu ze všech testovaných sloučenin (67,7 %) a dosahovala 85 % aktivity standardu GR24 při stejné koncentraci. Při desetinásobném snížení koncentrace (10^{-6} M), již byla aktivita jen 18,5 % což je pouze čtvrtina aktivity GR24. Při koncentraci 10^{-7} M vykazovala aktivitu jen pozitivní kontrola GR24 (Graf 9).



Graf 9 – Klíčivost nových strigolaktonových mimetik **58**, **61**, **69** a **72** v porovnání s pozitivní kontrolou GR24 (semena parazitické rostliny *P. ramosa*).

Biologická aktivita připravených sloučenin **69** a **72**, které se ukázaly být aktivními stimulanty klíčení semen parazita *S. hermonthica*, byla porovnána s aktivitou strigolaktonového mimetika (**25**) připraveného profesorem Zwanenburgem (Zwanenburg a kol., 2013). Klíčivost látky **72** (43 %) je sice při aplikované koncentraci 10^{-5} M srovnatelná s aktivitou mimetika **25** (37 %), avšak při desetinásobném snížení koncentrace (10^{-6} M) je již klíčivost látky **72** jen 15 %, zatímco u látky **25** došlo naopak k mírnému nárůstu aktivity (43 %). Biologická aktivita látky **69** (10 %) je již při koncentraci 10^{-5} M zanedbatelná oproti aktivitě látky **25**. Jak již bylo zmíněno, při desetinásobném snížení koncentrace je aktivita látky **69** nulová.

Jelikož se strigolaktonové mimetikum **25** připravené profesorem Zwanenburgem ukázalo být velmi aktivní, kromě *S. hermonthica*, i u parazitické rostliny *P. ramosa*, bylo vybráno ke srovnání s aktivitami látek **58**, **61**, **69**, **72**. Biologická aktivita látek **61**, **69** a **72** sice dosahovala poměrně vysokých hodnot (43 – 68 %) při koncentraci 10^{-5} M, avšak klíčivost látky **25** při stejné koncentraci byla vyšší (78 %). Při desetinásobném snížení koncentrace (10^{-6} M) došlo k výraznému poklesu aktivit všech připravených mimetik (**61**, **69**, **72**). Aktivita látky **25** však klesla při této koncentraci pouze o čtvrtinu (60 %) a navíc při stonásobném snížení koncentrace (10^{-7} M) stimulovala klíčení semen parazita *P. ramosa* stále z 55 %.

6 Závěr

Bylo připraveno 11 dimethylových a 9 monomethylových nových dusíkatých strigolaktonových mimetik, které byly následně otestovány v biotestu na klíčení semen parazitických rostlin z rodu *Striga* a *Phelipanche*. Látky **58**, **61**, **69** a **72** iniciovali klíčení semen parazita *P. ramosa* (klíčivost 18,5 – 67,7 %). U parazitické rostliny *S. hermonthica* stimulovali klíčení semen pouze látky **69** a **72** (klíčivost 10,3 – 42,6 %). Porovnání aktivit těchto nových látek s již známým strigolaktonovým mimetikem ukázalo, že tyto látky jsou jen průměrnými iniciátory klíčení semen parazitických rostlin. Většina připravených látek je navíc velmi málo stabilní. Aplikace těchto látek v metodě sebevražedného klíčení je vzhledem k jejich aktivitě a zejména celkové nestabilitě nepravděpodobná. Nadruhou stranu jejich aktivita v dalších oblastech strigolaktonového účinku prozatím nebyla prozkoumána a na příkladu debranonů je patrné, že klíčení semen parazitických rostlin není ten nejzásadnější ukazatel pro hodnocení aktivity strigolaktonových mimetik.

Použitá literatura

Abe S., Sado A., Tanaka K., Kisugi T., Asami K., Ota S., Kim HI., Yoneyama K., Xie X., Ohnishi T., Seto Y., Yamaguchi S., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T. (2014) Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in *Arabidopsis* and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. *PNAS*. **111**, 18084-18089.

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

Barluenga J., Bayón A. M., Asensio G. (1984) A New and Specific Method for the Monomethylation of Primary Amines. *Journal of the Chemical Society*. **20**, 1334-1335.

Boyer F. D., de Saint G. 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.

Boyer F. D., de Saint G. A., Pouvreau J. B., Clave' G., Pillot J. P., Roux A., Rasmussen A., Depuydt S., Laressergues D., Frei Dit Frey N., Heugebaert T. S., Stevens C. V., Geelen D., Goormachtig S., Rameau C. (2014) New strigolactone analogs as plant hormones with low activities in the rhizosphere. *Mol Plant*. **7**, 675-690.

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

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

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

Cala A., Ghooray K., Fernández-Aparicio M., Molinillo J. M., Galindo J.C., Rubiales D., Macías F.A. (2016) Phthalimide-derived strigolactone mimics as germinating agents for seeds of parasitic weeds. *Pest. Manag. Sci.* **72**, 2069-2081.

Cardoso C., Charnikhova T., Jamil M., Delaux P. M., Verstappen F., Amini M., Laressergues D., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. (2014) Differential activity of *Striga hermonthica* seed germination stimulants and *Gigaspora rosea* hyphal branching factors in rice and their contribution to underground communication. *PLOS ONE*. **9**, e104201.

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

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

Charnikhova T. V., Gaus K., Lumbroso A., Sanders M., Vincken J. P., De Mesmaeker A., Ruyter-Spira C. P., Screpanti C., Bouwmeester H. J. (2017) Zealactones. Novel natural strigolactones from maize. *Phytochemistry*. **137**, 123-131.

de Saint Germain A., Clave G., Badet-Denisot M. A., Pillot J. P., Cornu D. Le Caer J. P., Burger M., Pelissier F., Retailleau P., Turnbull C., Bonhomme S., Chory J., Rameau C., Boyer F. D. (2016) An histidine covalent receptor and butenolide complex mediates strigolactone perception. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 787-794.

Dvořáková M. a Vaněk T. (2015) Strigolaktony – struktura a funkce v rostlinách. *Chem. Listy*. **109**, 762-769.

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

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

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

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

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

Fernandez-Aparicio M., Kisugi T., Xie X., Rubiales D., Yoneyama K. (2014) Low strigolactone root exudation: a novel mechanism of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) resistance available for faba bean breeding. *J. Agric. Food. Chem.* **62**, 7063-7071.

Goldwasser Y., Yoneyama K., Xie K., Yoneyama K. (2008) Production of Strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanche aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul.* **55**, 21-28.

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

Hamiaux C., Drummond R. S., Janssen B. J., Ledger S. E., Cooney J. M., Newcomb R. D., Snowden K. C. (2012) DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr Biol* **22**, 2032-2036.

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

Hedden P. (2008) Gibberellins close the lid. *Nature.* **456**, 455-456.

Jamil M., Rodenburg J., Charnikhova T., Bouwmeester H. J. (2011) Pre-attachment *Striga hermonthica* resistance of New Rice for Africa (NERICA) cultivars based on low strigolactone production. *New Phytol.* **192**, 964-975.

Jamil M., Charnikhova T., Houshyani B., van Ast A., Bouwmeester H. J. (2012) Genetic variation in strigolactone production and tillering in rice and its effect on *Striga hermonthica* infection. *Planta.* **235**, 473-84.

Jiang L., Liu X., Xiong G., Liu H. Chen F., Wang L., Meng X., Liu G., Yu H., Yuan Y., Yi W., Zhao L., Ma H., He Y., Wu Z., Melcher K., Qian Q., Xu H. E., Wang Y., Li J. (2013) DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signaling in rice. *Nature.* **504**, 401-405.

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

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

Kannan C. a Zwanenburg B. (2014) A novel concept for the control of parasitic weeds by decomposing germination stimulants prior to auction. *Crop. Prot.* **61**, 11-15.

Kannan C., Aditi P., Zwanenburg B. (2015) Quenching the action of germination stimulants using borax and thiourea, a new method for controlling parasitic weeds: A proof of concept. *Crop Prot.* **70**, 92-96.

Kim S., Lee J. I., Yi K. Y. (1985) New Amino-protective Reagents for *t*-Butoxycarbonylation and Benzyloxycarbonylation of Amines and Amino Acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **58**, 3570-3575.

- Lebleu T., Kotsuki H., Maddaluno J., Legros J. (2014) Formylation of amines through catalyst- and solvent-free transamidation reaction. *Tetrahedron Lett.* **55**, 362-364.
- 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 *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol. J.* **139**, 920-934.
- Mangnus E. M., Zwanenburg B. (1992) Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobancha* seeds by strigol and its synthetic analogs. *Agric. Food Chem. J.* **40**, 1066-1070.
- Matsuo K., Shindo M. (2011) Efficient synthesis of karrikinolide via Cu(II)-catalyzed lactonization. *Tetrahedron Lett.* **67**, 971-975.
- Murase K., Hirano Y., Sun T. P., Hakoshima T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature.* **456**, 459-463.
- Nakamura H., Xue Y. L., Miyakawa T., Hou F., Qin H. M., Fukui K., Shi X., Ito E., Ito S., Park S. H., Miyauchi Y., Asano A., Totsuka N., Ueda T., Tanokura M., Asami T. (2013) Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat. Commun.* **4**, 2613.
- Navas F. 3rd, Tang F. L., Schaller L. T., Norman M. H. (1998) Analogues of the potential antipsychotic agent 1192U90: amide modifications. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 811-823.
- Nefkens G. H. L., Thuring J. F., Beenackers F. M., Zwanenburg B. (1997) Synthesis of a Phthaloylglycine-Derived Strigol Analogue and Its Germination Stimulatory Activity toward Seeds of the Parasitic Weeds *Striga hermonthica* and *Orobancha crenata*. *Agric. Food Chem. J.* **45**, 2273-2277.
- Pouvreau J. B., Gaudin Z., Auger B., Lechat M. M., Gauthier M., Delavault P., Simier P. (2013) A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods.* **9**, 32.

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

Romera J. L., Cid J. M., Trabanco A. A. (2004) Potassium iodide catalysed monoalkylation of anilines under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* **45**, 8797-8800.

Samejima H., Takikawa H., Sasaki M., Sugimoto Y., Babiker A. G. (2016) Practicality of the suicidal germination approach for controlling *Striga hermonthica*. *Pest. Manag. Sci.* **72**, 2035.

Scaffidi A., Waters M. T., Bond C. S., Dixon K. W., Smith S. M., Ghisalberti E. L., Flematti G. R. (2012) Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3743-3746.

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

Sloan K. B., Koch S. A. M. (1983) Effect of nucleophilicity and leaving group ability on the SN2 reactions of amines with (acyloxy) alkyl alpha-halides: a product distribution study. *Org. Chem. J.* **48**, 635-640.

Tsuchiya Y., Yoshimura M., Sato Y., Kuwata T. S., Holbrook-Smith D., Zhang H., McCourt P., Itami K., Kinoshita T., Hagihara S. (2015) Probing strigolactone receptors in *Striga hermonthica* with fluorescence. *Science.* **349**, 864-898.

Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Katoh E., Ohmiya H., Asano K., Saji S., Hongyu X., Ashikari M., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M. (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell.* **19**, 2140-2155.

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

Ueno K., Furumoto T., Umeda S., Mizutani M., Takikawa H., Batchvarova R., Sugimoto Y. (2014) Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry.* **108**, 122-128.

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

Waters M. T., Gutjahr C.2, Bennett T., Nelson D. C. (2017) Strigolactone Signaling and Evolution. *Annu Rev Plant Biol.* **68**, 8.1-8.31.

Wessely F., Swoboda W. (1951) Zur Darstellung Reiner Sekundärer Und Tertiärer Amine. *Monatshefte Fur Chemie.* **82**, 621-627.

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

Yao R., Ming Z., Yan L., Li S., Wang F. Ma S., Yu C., Yang M., Chen L., Chen L., Li Y., Yan C., Miao D., Sun Z., Yan J., Sun Y., Wang L., Chu J., Fan S., He W., Deng H., Nan F., Li J., Rao Z., Lou Z., Xie D. (2016) DWARF14 is a non-canonical hormone receptor for strigolactone. *Nature.* **536**, 469-473.

Yoneyama K, Kisugi T, Xie X, Yoneyama K. (2013). Chemistry of strigolactones: Why and how do plants produce so many strigolactones? V *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, **1**, 373-79.

Yoneyama K., Arakawa R., Ishimoto K., Kim H. I., Kisugi T., Xie X., Nomura T., Kanampiu F., Yokota T., Ezawa T., Yoneyama K. (2015) Difference in *Striga*-susceptibility is reflected in strigolactone secretion profile, but not in compatibility and host preference in arbuscular mycorrhizal symbiosis in two maize cultivars. *New Phytol.* **206**, 983-989.

Zhang Y., van Dijk A. D., Scaffidi A., Flematti G. R., Hofmann M., Charnikhova T., Verstappen F., Hepworth J., van der Krol S., Leyser O., Smith S. M., Zwanenburg B., Al-Babili S., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. J. (2014) Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1028-1033.

Zhao L. H., Zhou X. E., Wu Z. S., Yi W., Xu Y., Li S., Xu T. H., Liu Y., Chen R. Z., Kovach A., Kang Y., Hou L., He Y., Xie C., Song W., Zhong D., Xu Y., Wang Y., Li J., Zhang C., Melcher K., Xu H. (2013) Crystal structures of two phytohormone signal-transducing α/β hydrolases: karrikin-signaling KAI2 and strigolactone-signaling DWARF14. *Cell Res.* **23**, 436-439.

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., Nayak S. K., Charnikhova T. V., Bouwmeester H. J. (2013) New strigolactone mimics: structure-activity relationship and mode of action as germinating stimulants for parasitic weeds. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 5182-5186.

Zwanenburg B., Pospíšil T., Zeljkovic A. C. (2016a) Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta.* **243**, 1311-1326.

Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Kannan C. (2016b) Suicidal germination for parasitic weed control. *Pest. Manag. Sci.* **72**, 2016-2025.