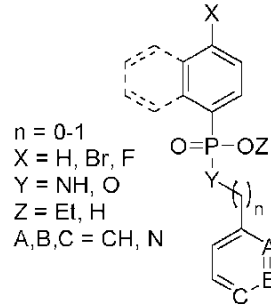


ÖZET**BİTKİ GELİŞİMİNİ MODÜLE ETMEK ÜZERE PİRABAKTİN ANALOGLARI**

- Mevcut buluş, bitki gelişimini kontrol etmek üzere kullanılabilen bileşikler ile ilgilidir.
- 5 Aslında mevcut buluş, -örneğin- tohum çimlenmesi ve/veya gözenek kapama üzerinde fizyolojik bir etkiye sahip olan ve/veya kök ve sürgün gelişimi ve organojenez üzerinde gelişimsel etkilere sahip olan pirabaktin analoglarının yeni bir sınıfını açıklar. Bu nedenle ikinci bileşikler, -örneğin- bitkilerin kuraklık stresine toleransını arttırmak gibi bitki gelişimini kontrol etmek üzere veya hasat öncesi filizlenme, patojenlere tolerans
- 10 vb. gibi fizyolojik olayları kontrol etmek üzere kullanılabilir.

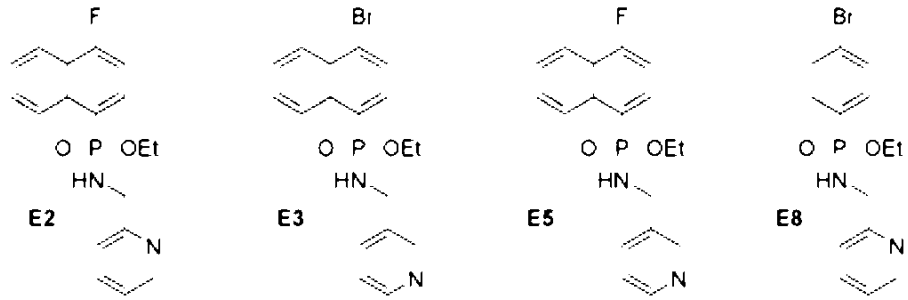
İSTEMLER

1. Formülün bir bileşiği -veya bunun bir tuzudur:-



5

2. E2, E3, E5 veya E8'e yönelik belirtildiği üzere formülün bir bileşiğidir:



10

3. İstemler 1-2'ye göre bir bileşiği sentezlemek üzere bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:

15

- uygun bir halojenli benzen veya naftalen prekürsörünün lityum halojen değişimi ve akabinde dietil fenil- veya naftilfosfonat ara ürünlerini elde etmek üzere dietilklorofosfat söndürmesi ile fosfonile edilmesi,

20

- fosfonik asit ara ürünlerini elde etmek amacıyla bazik hidroliz koşulları aracılığıyla söz konusu dietil fenil- veya naftilfosfonat ara ürünlerinin monodealkillenmesi,
- söz konusu fosfonik asit ara ürünlerinin tiyonilklorid aracılığıyla bunların karşılık gelen klorofosfonatlarına aktive edilmesi ve uygun bir benzil- ($n=1$) veya fenil- ($n=0$) amin ($Y=NH$) veya alkol ($Y=O$) aracılığıyla bazik

koşullar altında söz konusu kloridin bir nükleofilik değişiminin gerçekleştirilmesi,

- 5 - bir hidroksil grubuna yönelik kalan fosfonat alkoksi grubunun bazik, lityum hidroksit aracılı hidroliz ile değiştirilmesi.

4. Kök veya sürgün büyümesini etkilemeden spesifik olarak gözeneklerin kapanmasını indüklemek üzere bileşikler E2, E3 ve E8'in kullanımıdır.

- 10 5. Spesifik olarak tohum çimlenmesini inhibe etmek üzere bileşik E5'in kullanımıdır.

6. Bitkilere temas etmeye yönelik formüle edilen tarımsal kimyasal bir formülasyon olup, özelliği formülasyonun istemler 1-2'ye göre bir bileşiği içermesidir.

- 15 7. İstem 6'ya göre bir formülasyon olup, özelliği ayrıca bir herbisit, fungusit, pestisit, gübre veya sürfaktan arasından en az birini içermesidir.

- 20 8. Bitki gelişiminin modüle edilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği yöntemin bitkinin söz konusu formülasyon ile temas etmemesi ile karşılaştırıldığında söz konusu bitkinin gelişimini modüle etmek üzere istemler 6-7'ye göre formülasyonunun yeterli bir miktarı ile bir bitkinin temas ettirilmesini içermesidir.

- 25 9. İstem 8'e göre bir yöntem olup, özelliği söz konusu modülasyonun kuraklık stresine karşı toleransı arttırmasıdır.

TARİFNAME

BİTKİ GELİŞİMİNİ MODÜLE ETMEK ÜZERE PİRABAKTİN ANALOGLARI

Buluşun teknik sahası

5

Mevcut buluş, bitki gelişimini kontrol etmek üzere kullanılabilen bileşikler ile ilgilidir. Aslında mevcut buluş, -örneğin- tohum çimlenmesi ve/veya gözenek kapama üzerinde fizyolojik bir etkiye sahip olan ve/veya kök ve sürgün gelişimi ve organojenez üzerinde gelişimsel etkilere sahip olan pirabaktin analoglarının yeni bir sınıfını açıklar. Bu

10 nedenle ikinci bileşikler, -örneğin- bitkilerin kuraklık stresine toleransını arttırmak gibi bitki gelişimini kontrol etmek üzere veya hasat öncesi filizlenme, patojenlere tolerans vb. gibi fizyolojik olayları kontrol etmek üzere kullanılabilir.

Altyapı tekniği

15

Devam eden iklim değişiklikleri ve nüfus artışıyla birlikte mahsul verimi talepleri sürekli bir şekilde artar (International Panel on Climate Change, 2007; Tilman et al, 2011). Tarımdan CO₂-emisyonlarını minimuma indirmeye ek olarak kuraklık, tuzluluk ve artan sıcaklıklar gibi yetersiz büyüme koşullarıyla baş eden ürünlerin geliştirilmesi gereklidir.

20 Bitkilerin gelişiminin manipülasyonları veya kontrolü ve bitkilerde sinyalleme, bitkilerde tolerans yanıtını geliştirmeye ve verim üzerinde olumsuz etkiler olmaksızın değişen bir ortamda esnekliklerini sağlamaya yönelik yollardır.

25

Bitkilerin absisik asit (ABA) gibi egzogen bitki hormonları ile işleme tabi tutulmasının stres toleransını geliştirdiğinin gösterilmesine rağmen kuraklık koşullarının etkilerine karşı bitkileri korumak üzere topikal püskürtme yoluyla ABA kullanımı, inhibe edilmiş primer kök büyümesi gibi pleiotropik yan etkiler nedeniyle kısıtlıdır (Sreenivasulu et al, 2012). Ayrıca ABA, ışığa duyarlıdır ve bitkiler ile temas ettiğinde hızlı bir şekilde ayrışır (Hao et al. 2010). Bu sorunlar, özellikle tarımdaki uygulamaları uygun hale getirmek

30 üzere yan etkiler olmadan ve daha iyi stabilite ile ABA-sinyalleme yolunu devreye sokan yeni moleküllere yönelik görüntülemeyi stimule etmiştir (Joshi-Saha et al, 2011; Melcher et al, 2009).

35

2009 yılında bir kimyasal genetik taraması, yapısal olarak ABA ile ilgili olmayan bir ABA-agonisti: pirabaktinin tanımlanmasına neden olmuştur (Park et al, 2009).

Tohumlarda ve fidelerde ABA-yanıtlarının mikrodizi analizi, pirabaktinin ABA'nın bir seçici agonisti olduğunu önermiştir (Kitahata & Asami, 2011; Park et al, 2009). Pirabaktine dirençli mutantların diğer bir taraması, bir ABA-reseptör proteinleri ailesi: PYR1/PYL/RCAR START proteinlerinin tanımlanmasını mümkün hale getirmiştir (Kitahata & Asami, 2011; Park et al, 2009). Burada sülfonamid pirobaktin ile ABA arasında belirgin herhangi bir kimyasal veya yapısal benzerliğin olmamasına rağmen bunların ikisi de PYR/PYL reseptör ailesi tarafından yönetilir (Hao et al, 2010). Ancak pirabaktin, ABA'ya yönelik açıklanan bütün yanıtları provoke etmez (Park et al, 2009; Peterson et al, 2010). Ayrıca reseptörler ile etkileşim, iki molekül arasında farklılık gösterir. Pirabaktin, reseptördeki pirabaktin bağlamanın PP2C'lerinin çekimini stimule etmediği ve böylece aşağı doğru sinyallemeye yönelik inhibitör faktörlerini uzaklaştırmadığı anlamına gelecek şekilde PYL2'nin bir antagonisti olarak işlev görür. Bu, bu reseptörün bir antagonisti olan ABA'nın aksinedir (Melcher et al, 2010a; Mosquna et al, 2011). Bu gözlem, pirabaktinin ABA-reseptörlerinin aktivitesini farklı bir şekilde modüle ettiğini ve reseptörlerin sadece bir alt grubunu hedef alabileceğini önerir. Ancak bulunuşundan itibaren pirabaktin, örneğin kuraklık koşullarında mahsul üretimini geliştirmek üzere uygulanmamıştır. Sülfonamidler aslında bitki büyümesi üzerinde negatif etkilere sahip olarak ve herbisitler olarak kullanılıyor olarak açıklanmıştır (Audus & Quastel, 1948; Crowdy & Jones, 1956). Ayrıca bitkisel dokularda pirabaktinin etkileri sınırlıdır ve ABA-agonisti aktivitesi, tohumlara spesifiktir.

Geliştirilmiş kimyasal özellikleri ile pirabaktine alternatif bileşiklere bu nedenle ihtiyaç fazladır.

25 **Şekillerin kısa açıklaması**

Şekil 1: 10 μ M konsantrasyonda ABA, pirabaktin ve farklı analogların primer kök uzaması üzerindeki etki.

Şekil 2: ABA, pirabaktin ve farklı pirabaktin analogları, ortaya çıkan yan köklerin (LR) ve yan kök primordiumun (LRP) toplamı (A) olarak veya yoğunluk değerleri (#/cm primer kök) (B) olarak temsil edilen yan kök başlamasını etkiler.

Şekil 3: ABA-, pirabaktin- veya pirabaktin analog ortamı üzerinde büyüyen solmuş *Arabidopsis thaliana* tohumlarında rastgele kök başlaması. Bileşikler, 10 μ M'de tedarik edilmiştir.

Şekil 4: Sırasıyla ABA ve pirabaktinin farklı konsantrasyonlarında çimlenme yüzdeleri.

Şekil 5: Farklı pirabaktin analoglarının 10 μ M konsantrasyonunda elde edilen çimlenme yüzdeleri.

5 Şekil 6: A. Bazal, hormon içermeyen ortamda büyüyen kontrol fidelerinin sürgün fenotipi. B. 10 μ M ABA-ortamında büyüyen fideler, yeni çıkmaya başlayan yaprakların sayısında bir azalma gösterir ve yaprak alanı daha küçüktür ve yaprakların klorofili etkilenir. C. 10 μ M pirabaktin aynı zamanda sürgün büyümesini etkiler ve kontrol fidelerinden daha kısa bir sürgün ile fideleri ortaya çıkarır. D. Fidelere yönelik ortalama sürgün alanı, ImageJ kullanılarak ölçülür. Farklı bir harf kodu olan grafikteki çubuklar büyük oranda farklı sayılara sahiptir.

10 Şekil 7: Kuru bir hava akışına 6 saat maruz bırakıldıktan sonra 10 μ M ABA veya pirabaktin analogları E1-E10 ile önceden işlenen yaprakların ortalama ağırlık kaybı.

15 Şekil 8: Kontrol gözeneklerinin nispi gözenek açıklığı, bileşiklerin yokluğunda 30 dakika boyunca takip edilmiştir. Gösterilen değerler, deneyin başlangıcında ölçülen gözenek açıklığına göredir.

20 Şekil 9: A. 10 μ M ABA hızlı bir şekilde gözenek kapanmasını indükler. B. Solüsyon içinde 10 μ M pirabaktin ile işlenen epidermal yaprak şeritleri, gözenekler üzerinde bir etki göstermiştir.

Şekil 10: A. E1, B. E2, C. E3, D. E4, E. E5, F. E6, G. E7, H. E8, I. E9, J. E10, K. D1, L. D2 ve M. D3'ün işlenmesinin akabinde nispi gözenek açıklığı. Bütün bileşikler, 10 μ M konsantrasyonda değerlendirilir.

25 **Buluşun açıklaması**

Mevcut buluş, esas olarak bir fosfonamid grubu ile pirabaktin içinde sülfonamid grubunun değiştirilmesi ile ilgilidir. Fosforun en uygun bitki büyümesine yönelik esas elementlerden biri olması nedeniyle fosfonamid fonksiyonel grubu, bitkilerin bunların alınımına yönelik daha iyi donatılması nedeniyle sülfonamidlere yönelik uygun bir alternatifir. Bitki enzimleri ile biyolojik uyumluluk, sülfatlardan çok fosfat bazlı ürünlere yönelik daha iyi adapte edilir. Sülfürün fosfor reseptörü ile sübstitüsyonuna rağmen bağlama, bunların benzer moleküler ağırlığı ve geometrisi nedeniyle muhafaza edilebilir. Ayrıca reseptörlerin bağlama kavitesinde hidrojen bağların oluşumu, 35 sülfonamid ve fosfonamid üzerinde mevcut olan iki oksijen sübstitüsyonu aracılığıyla

meydana gelebilir. İki molekül, karşılaştırılabilir bir çözünürlüğe, polariteye sahiptir ve benzer bir şekilde farklı pH'den etkilenir. Bütün bu özellikler, bu moleküllerin biyolojik aktivitesine yönelik uygundur.

- 5 Mevcut buluş bu nedenle bitki gelişiminde bulunan bir yolağı kontrol etmek üzere kullanılabilen fosfonamid içeren bileşikler ile ilgilidir. 'Bitki gelişiminde yer alan bir yolak' ifadeleri, bit bitkinin yeni organlarının ve yapılarının oluşmasına neden olan genin bir dizi geçici durumları ve protein ifadesi, biyokimyasallar ve fizyolojik koşullar ile ilgilidir.
- 10 'Bitki' ifadesi, tüm bitkileri, sürgün bitkisel organları ve/veya yapıları (örneğin, yapraklar, kökler ve yumru kökler), kökleri, çiçekleri ve çiçek organlarını, ovülleri, tohumları, meyveyi, fideleri, bitki dokusunu, hücreleri ve bunların ürünlerini içerir. Bitkilerin sınıfı genel olarak kapalı tohumlu bitkiler (tek çenekli ve çift çenekli bitkiler), açık tohumlular, eğrelti otları ve çok hücreli algleri içeren damarlı ve alt bitkilerin sınıfı kadar genişir.

15

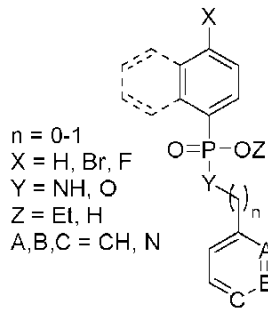
Mevcut buluş, -örneğin- tohum çimlenmesi ve/veya gözenek kapama üzerinde fizyolojik bir etkiye sahip olan ve/veya kök ve sürgün gelişimi ve organojenez üzerinde gelişimsel etkilere sahip olan pirabaktin analoglarının yeni bir sınıfını açıklar. Bu nedenle ikinci bileşikler, -örneğin- bitkilerin kuraklık stresine toleransını arttırmak gibi bitki gelişimini kontrol etmek üzere veya hasat öncesi filizlenme, patojenlere tolerans vb. gibi fizyolojik olayları kontrol etmek üzere kullanılabilir.

20

'Sürgün gelişimi' ifadesi, hücre bölünmesi ile sürgün biyokütlesinin genişlemesi, apikal meristemde hücre genişlemesi, aksiller meristem ve yeni oluşturulan dağıntık sürgünler ile ilgilidir.

25

Mevcut buluş bu nedenle formülün bir bileşimi veya bunun tuzu ile ilgilidir:

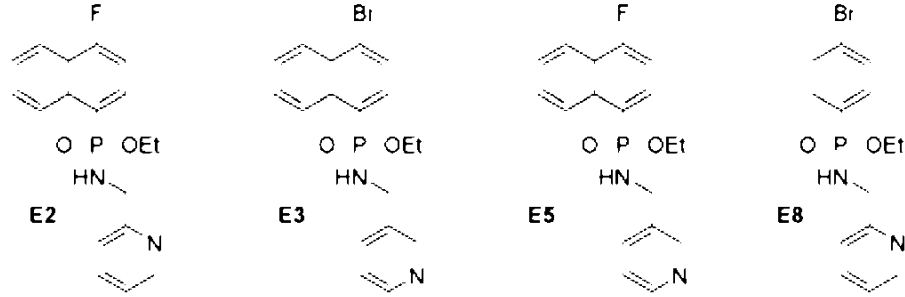


30

İkinci formül bu nedenle talep edilen bileşiklerin genel bir formülünü temsil eder.

Mevcut buluş daha spesifik olarak E2, E3, E5 veya E8 olarak gösterilen ve aşağıdaki formüle sahip olan bileşikler ile ilgilidir:

5



Mevcut buluş ayrıca yukarıda tarif edildiği üzere bir bileşiği sentezlemek üzere aşağıdaki adımları içeren bir yöntem ile ilgilidir:

10

- uygun bir halojenli benzen veya naftalen prekursorünün lityum halojen değişimi ve akabinde dietil fenil- veya naftilfosfonat ara ürünlerini elde etmek üzere dietilklorofosfat söndürmesi ile fosfonile edilmesi,

15

- fosfonik asit ara ürünlerini elde etmek amacıyla bazik hidroliz koşulları aracılığıyla söz konusu dietil fenil veya naftilfosfonat ara ürünlerinin monodealkillenmesi,

20

- söz konusu fosfonik asit ara ürünlerinin tıyonilklorid aracılığıyla bunların karşılık gelen klorofosfonatlarına aktive edilmesi ve uygun bir benzil- (n=1) veya fenil-(n=0) amin (Y=NH) veya alkol (Y=O) aracılığıyla bazik koşullar altında söz konusu kloridin bir nükleofilik değişiminin gerçekleştirilmesi. (Y=O),

25

- bir hidroksil grubuna yönelik kalan fosfonat alkoksi grubunun bazik, lityum hidroksit aracılı hidroliz ile değiştirilmesi.

Diğer bir ifadeyle mevcut buluş, yukarıda açıklandığı üzere bileşiği sentezlemek üzere, aşağıdaki adımları içeren bir yöntem ile ilgilidir (ayrıca bakınız Örnekler bölümünde:

'Bileşikler E ve D'nin bileşiklerinin ve bunların ara ürünlerinin (2, 3 ve 3') sentezine yönelik genel şema):

5 Adım 1: Lityum halojen değişimi ve akabinde dietilklorofosfat söndürülmesi aracılığıyla uygun bir halojenli benzen veya naftalenin (prekürsör **1**, bakınız Genel Şema) fosfonilasyonu. Çift litiasyonu, çift fosfonat alkilasyonu ve ortaya çıkan fosfonata alkil lityum eklenmesini önleyen substrata bağımlı sıcaklık, süre ve ekleme sırası şekilleri, örnekler bölümünde ayrıca açıklanır.

10 Adım 2: Fosfonik asitleri (ara ürün (**3**)) ortaya çıkan bazik hidroliz koşulları aracılığıyla dietil fenil veya naftilfosfonatın (adım 1'den elde edildiği üzere ara ürünler (**2**)) monodealkilasyonu. Mucha ve Xie'nin (Mucha, 2006; Xie, 2009) raporları ile uyumlu olarak tam ve temiz dönüşümler elde edilmiştir. Asit-baz ekstraksiyonu, uygun bir izolasyon yöntemi sağlar.

15 Adım 3: Adım 2'den elde edildiği üzere fosfonik asitlerin (**3**) tiyoniklorid (adım 3a) aracılığıyla bunların karşılık gelen klorofosfonatlarına (**3'**) aktivasyonu. Uygun bir benzil- (n=1) veya fenil-(n=0) amin (Y=NH) veya alkol (Y=O) aracılığıyla bazik koşullar altında söz konusu kloridin nükleofilik değişimi (adım 20 3b), orta derece ila iyi verimde E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 ve E10 ve D 1, D2 ve D3 (ayrıca örnekler bölümüne bakınız) olarak gösterilen bileşikler gibi talep edilen bileşikler verir. Aktivasyon adımı ve nükleofilik değişim adımı, ara ürünün (**3'**) izole edilmesinin gerekmemesi nedeniyle kombine edilir.

25 Adım 4: Bir hidroksil grubuna yönelik kalan fosfonat alkoksi grubunun lityum hidroksit aracılı değişimi.

30 Mevcut buluş ayrıca kök veya sürgün büyümesini etkilemeden spesifik olarak gözeneklerin kapanmasını indüklemek üzere bileşiklerin 'E2', 'E3' ve 'E8") kullanımı ile ilgilidir.

'Gözenek kapanması' ifadesi, bir yaprağın gözeneginden karbon dioksit, oksijen ve su buharının geçiş oranını belirleyen bir şekilde gözenek geçirgenliğinde bir azalmaya neden olan koruyucu hücrelerde turgor basıncı kaybına refere eder.

'Kök büyümesi' ifadesi, hücre bölünmesi aracılığıyla kök biyokütlesinin genişlemesine ve primer meristemde hücre genişlemesine ve *yeni* başlatılan yan ve dağınık kök meristemlerine refere eder.

- 5 'Sürgün büyümesi' ifadesi, hücre bölünmesi ile sürgün biyokütlesinin genişlemesine, apikal meristemde hücre genişlemesine, aksiller meristeme ve *yeni* oluşturulan dağınık sürgünlere refere eder.

- 10 Hücre kapanması tipik olarak kuraklık koşulları ile indüklenir veya 1-10.000 ppm arasında bir konsantrasyonda absisik asitin bir solüsyonunun yapraklara püskürtülmesiyle normal su koşulları altında kopyalanabilir, bunun amacı suyun muhafaza edilmesidir (Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013). E2 bileşiği, E2'nin kök veya sürgün büyümesi inhibisyonunu uygulamaması ancak aksine gelecekteki kuraklık koşullarına karşı toleransı ve daha derin su kaynaklarına erişimi geliştiren düzenli kök
15 büyümesini desteklemesine yönelik temel bir fark ile bunu gerçekleştirmek üzere benzer püskürtme teknolojisi kullanılarak uygulanabilir.

- Mevcut buluş ayrıca spesifik olarak tohum çimlenmesini inhibe etmek üzere bileşiğin ('E5') kullanımı ile ilgilidir.

- 20 'Hücre çimlenmesi' ifadesi, embriyonun bir fide içinde gelişmesi sırasında etkin olmayan bir durumun aktif olarak büyüyen bir duruma geçişi ile ilgilidir. Bazı mahsüllerde kültürleme ve üreme nedeniyle tohum dormansisi kaybı, kötü tanecik kalitesi ve ekonomik kayıplara neden olarak erken çimlenmeye neden olur.

- 25 Absisik asit içeren solüsyonlar ile kaplama gibi tohum işlemlerinin ıslatma, soğurma veya diğer türleri, tohum çimlenmesini ortadan kaldırır (Zhang et al., 2010). Benzer bir yaklaşımda bileşik E5, püskürtme, imbibisyon veya kaplama solüsyonlarıyla uygulanabilir.

- 30 Mevcut buluş bu nedenle ayrıca bitkiler ile temas etmeye yönelik formüle edilen tarımsal kimyasal bir formülasyon ile ilgilidir, formülasyon yukarıda açıklandığı üzere bir bileşiği içerir.

Formülasyonlar bu nedenle tohumlar gibi bitkilerin veya bitki çoğaltma materyallerinin işlenmesine yönelik uygundur. Uygun katkı maddeleri tamponlama ajanlarını, kaplama ajanlarını, polisakkaritleri ve aşındırma ajanlarını içerir. Örnek taşıyıcılar su, aköz solüsyonlar, sulu karışımları, katı maddeler ve kuru tozları içerir. İsteğe bağlı olarak formülasyonlar ayrıca en az bir sürfaktan, herbisit, fungusit, pestisit veya gübreyi içerebilir. Bu nedenle mevcut buluş, yukarıda açıklandığı üzere herbisit, fungusit, pestisit, gübre veya sürfaktan arasından en az birini içeren bir formülasyon ile ilgilidir.

Mevcut buluş ayrıca bitki gelişiminin modüle edilmesine yönelik bir yöntem ile ilgilidir, yöntem bitkinin söz konusu formülasyon ile temas etmemesi ile karşılaştırıldığında söz konusu bitkinin gelişimini modüle etmek üzere yukarıda açıklandığı üzere formülasyonunun yeterli bir miktarı ile bir bitkinin temas ettirilmesini içerir.

'Bitki gelişimi' ifadesi, hücre bölünmesi ve hücre genişlemesi aracılığıyla bir bitkinin büyümesi ile tanımlanır. Bu prosesler, bitki gövdesinde belirli lokasyonlarda meristemler içinde koordine edilmiş ve organize edilmiş bir şekilde meydana gelir. Meristemler, bitkinin kökünde veya sürgün parçasında olmak üzere yeni organlar üretir. Meristemlerde hücre bölünmesi ve genişlemesinin kontrolü, bir bitkinin yapısını belirler. Bitki gelişimi aynı zamanda örneğin vejetatif fazdan rejeneratif faza gibi bir ontogenetik durumdan diğerine geçişi kapsar.

'Modüle etmek' ifadesi, bitki gelişimini değiştirmek, regüle etmek, etkilemek ve/veya ayarlamak anlamına gelir.

Mevcut buluş ayrıca yukarıda açıklandığı üzere bir yöntem ile ilgilidir, burada söz konusu modülasyon, kuraklık stresine karşı toleransı artırır.

'Stres' ifadesi, olumsuz çevresel koşulların neden olduğu moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik bir durum ile ilgilidir. Bir stres yanıtı, değişen çevresel koşullar ile indüklenen moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere refere eder.

'Kuraklık stresi' ifadesi, düşük su elde edilebilirliği koşullarına maruz kalan bir bitkinin fizyolojik bir durumu ile ilgilidir. Kuraklık stresi, genel olarak fiziksel ve biyokimyasal değişiklikler veya bitki yapılarının bitkisinin zarar görmesi ile birlikte meydana gelir.

Bunlar solmayı, düşük fotosentezi ve geçici olarak artan kök büyümesini, sürgün gelişiminin durdurulmasını içerir.

‘Kuraklık stresine karşı tolerans’ ifadesi, bir bitkinin kuraklık periyotlarına karşı koymak üzere maruz kaldığı genetik, biyokimyasal ve fizyolojik adaptasyonlar ile ilgilidir.

Mevcut buluş bu noktada aşağıdaki sınırlayıcı olmayan örnekler ile açıklanacaktır.

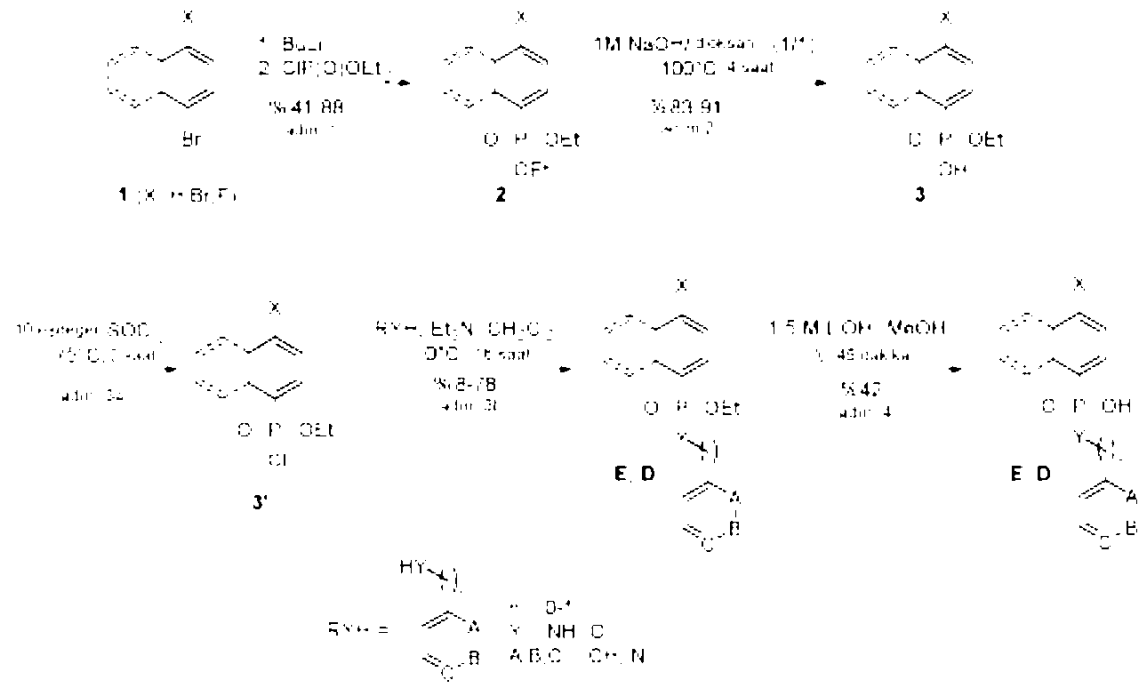
Örnekler

10

Materyal ve Yöntemler

1. Mevcut buluşun fosfonamid analoglarının sentezi

13 fosfonamid analogunun (E1-E10 ve D1-D3 olarak gösterilir, bakınız şekillerde ‘E’ ve ‘D’) kimyasal sentezi ve yapıları ayrıca bunların yapay ara ürünleri (2, 3 ve 3’), aşağıda gösterildiği üzere ‘Bileşiklerin (E ve D) ve bunların ilgili ara ürünlerinin (2, 3 ve 3’) sentezine yönelik genel şema’ içinde gösterilir:



20

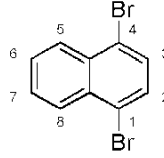
Bileşikler E ve D'nin bileşiklerinin ve bunların ilgili ara ürünlerinin (2, 3 ve 3') sentezine yönelik genel şema

Organik yapay yöntemlere yönelik genel yorumlar:

Dietil eter ve tetrahidrofuran, kullanımdan önce sodyum benzofenon ketil veya sodyumdan damıtılmıştır. Ticari olarak temin edilebilir solventler ve reaktifler, aksi belirtilmediği sürece Sigma-Aldrich veya Acros'dan satın alınmıştır ve tekrar saflaştırılmadan kullanılmıştır. Reaksiyon karışımlarının saflaştırılması, silika jel (Acros, partikül boyutu 0.035-0.070 mm, gözenek çapı yaklaşık 6 nm) ile doldurulan bir cam kolon kullanılarak kolon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Solvent sistemleri, silika jel (Merck, Kieselgel 60 F254, önceden kaplanmış 0.25 mm) ile kaplanmış cam plakalar üzerinde başlangıç TLC analizi ile belirlenmiştir. TLC plakalarının üzerinde bileşiklerin görüntülenmesi, UV ışıkla veya KMnO_4 solüsyonu veya esas iyodin ile renklendirme ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek çözünürlüklü ^1H -NMR (300 MHz) ve ^{13}C -NMR (75 MHz) spektrumları, oda sıcaklığında bir Jeol Eclipse FT 300 spektrometresi üzerinde çalıştırılmıştır. Pik atamaları, DEPT, 2D-HSQC ve 2D-COSY spektrumları aracılığıyla elde edilmiştir. Bileşikler, döteryumlanmış kloroform içinde seyreltilmiştir. Düşük çözünürlüklü kütlü spektrumları, elektron sprey iyonizasyon geometrisi (ESI 70V) ile bir Agilent 1100 Serisi LC/MSD tipi SL kütle spektrometresi üzerinde doğrudan enjeksiyon aracılığıyla ve bir kütle seçimli dedektör (kuadropol) kullanılarak kaydedilmiştir. IR-spektrumu, bir Perkin-Elmer BX FT-IR spektrometresinden elde edilmiştir. Bütün bileşikler, bir ATR (Azaltılmış Toplam Yansıma) yardımcısı ile saf formda analiz edilmiştir.

1,4-dibromonaftalenin sentezi (bir naftil çekirdeği içeren Prekursör (1) burada $\text{X}=\text{Br}$)

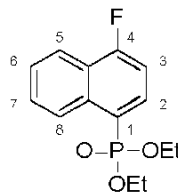
100 ml bir balonun içinde 5,00g (0,039 mol, 1 eşdeğeri) naftalen, 75 ml diklorometan içinde çözünür. Balon, inert atmosferin içine yerleştirilir ve -30°C 'ye soğutulur akabinde 25,00 g (0,156 mol, 4 eşdeğeri) Br_2 damlatılarak eklenir. Bromin eklenmesi tamamlandıktan on beş dakika sonra reaksiyon, oda sıcaklığında 72 saat daha devam etmiştir. Reaksiyon, 1M NaHSO_3 kullanılarak söndürülür. Organik faz, MgSO_4 aracılığıyla kurutulur ve uçucu maddeler buharlaştırılır. Bileşik, %70'lik bir verim sağlayacak şekilde yavaşça hekzanlar eklenerek soğuk diklorometan (-18°C) kullanılarak kristalize edilir. Ana sıvıdan ilave bir %17'lik kısım, hekzanlar kullanılarak kolon kromatografisi ile geri kazanılabilir.



¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.67 (4H, m, C₂H_{arom}, C₃H_{arom}, C₆H_{arom}, C₇H_{arom});
 5 8.22-8.28 (2H, m, C₅H_{arom}, C₈H_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 122.7 (2x C_qBr);
 127.9 (C₅H_{arom}, C₈H_{arom}); 128.3 (C₆H_{arom}, C₇H_{arom}); 130.2 (C₂H_{arom}, C₃H_{arom}); 133.0 (2x
 C_qC_qBr). **IR (cm⁻¹)** v_{max}: 1584; 1492. **MP:** 74.3-75.3 °C (hekzanlar). **Verim:** %87.

**Dietil 4-fluoronaft-1-ilfosfonatın sentezi: ara ürünün (2) sentezine yönelik genel
 10 yöntem, burada X=F'dir**

Kuru bir 250 ml balonun içinde 3,00g (13,3 mmol, 1 eşdeğeri) 1-bromo-4-
 fluoronaftalen, 150 ml kuru dietil eter içinde çözünür. Karışım, inert atmosfer altına
 yerleştirilir ve -78°C'ye soğutulur. Akabinde 10 ml (0,020 mol, 1,5 eşdeğeri) bir 2M BuLi
 15 solüsyonu buna yavaşça eklenir. Reaksiyonun 1 saat boyunca devam etmesinden
 sonra -78°C'de 3,44 g (0,020 mol, 1,5 eşdeğeri) dietilklorofosfat eklenir ve karışım oda
 sıcaklığına ısıtılır. 1 saat sonra oda sıcaklığında reaksiyon, 200 ml aköz doymuş
 amonyum klorid kullanılarak söndürülür ve diklorometan aracılığıyla üç kere özütlenir.
 20 Kombine edilen organik fraksiyonlar, MgSO₄ kullanılarak kurutulur ve uçucu maddeler
 buharlaştırılır. Saflaştırma, kolon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve
 bileşik, sarı bir yağ olarak %88 verimde izole edilmiştir.

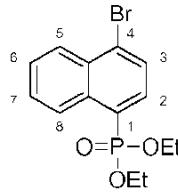


¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.31 (6H, t, J=7.2Hz, 2x CH₃); 4.01-4.27 (4H, m, 2x CH₂);
 7.20 (1H, dxdxd, J=10.2Hz, 7.7Hz, 2.8Hz, C₂H_{arom}); 7.59-7.71 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.20
 (1H, dxd, J=8.0Hz, 6.1Hz, CH_{arom}); 8.25 (1H, dxd, J=8.0Hz, 5.8Hz, C₃H_{arom}); 8.52
 (1H, d, J=8.0Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.4 (2x CH₃, d, J=6.9Hz); 62.3
 (2x CH₂, d, J=5.8Hz); 108.6 (C₂H_{arom}, dxd, J=20.2Hz, 17.9Hz); 120.7 (C_qP, dxd,
 30 J=186.9Hz, 4.6Hz); 121.2 (CH_{arom}, d, J=6.9Hz); 124.1 (C_q C_qP, t, J=15.0Hz); 126.6

(CH_{arom}, t, J=3.5Hz); 126.8 (CH_{arom}); 128.5 (CH_{arom}); 134.6 (C_q C_qF, dxd, J=12.7Hz, 4.6Hz); 135.5 (C₃H_{arom}, t, J=9.8Hz); 162.1 (C_qF, dxd, J=259.6Hz, 4.6Hz). **¹⁹F-NMR (282MHz, CDCl₃):** δ 114.30. **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 19.00. **MS (ESI): m/z (%):** 565 (2M+H⁺, 35), 283 (M+H⁺, 100). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1164 (P-OEt); 1234 (P=O); 1628; 1600; 1573; 1509. **Kromatografi:** hekzanlar/EtOAc 50/50 R_f= 0.25. **Verim:** %88.

Dietil 4-bromonaft-1-ilfosfonatın sentezi: ara ürünün (2) sentezine yönelik genel yöntem, burada X=Br, H'dir

10 Kuru bir 250 ml balonun içinde 3,00g (10 mmol, 1 eşdeğeri) 1,4-dibromonaftalen, 150 ml kuru dietil eter içinde çözünür. Karışım, inert atmosfer altına yerleştirilir ve -78°C'ye soğutulur. Akabinde 5,5 ml (0,011 mol, 1,1 eşdeğeri) bir 2M BuLi solüsyonu yavaşça içine damlatılır. Reaksiyon -30°C'de 30 dakika boyunca devam ettikten sonra 3,44 g (0,020 mol, 1,5 eşdeğeri) eklenir, karışım -78°C'ye soğutulur ve -78°C'de dietileter içinde 17,26g (0,1mol, 10 eşdeğeri) dietilklorofosfat içeren 250 ml balona bir kanül aracılığıyla eklenir. Karışım oda sıcaklığına ısıtılır ve 1 saat sonra 200 ml su kullanılarak soğutulur. Bileşik, diklorometan ile üç kere özütlenir, kombine edilen organik fraksiyonlar, 1M NaOH ile üç kere yıkanır, MgSO₄ kullanılarak kurutulur ve uçucu maddeler buharlaştırılır. Saflaştırma, kolon kromatografisi kullanılarak 20 gerçekleştirilmiştir ve bileşik, beyaz bir katı olarak %74 verimde izole edilmiştir.

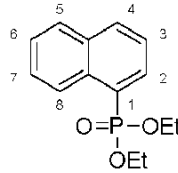


¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.31 (6H, t, J=7.2Hz, 2x CH₃); 4.01-4.28 (4H, m, 2x CH₂); 7.66 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.87 (1H, dxd, J=7.7Hz, 2.8Hz, C₃H_{arom}); 8.08 (1H, dxd, J=16.0Hz, 7.7Hz, C₂H_{arom}); 8.32-8.37 (1H, m, CH_{arom}); 8.53-8.57 (1H, m, CH_{arom}). **¹³C-NMR. (75MHz, CDCl₃):** δ 16.4 (2x CH₃, d, J=6.9Hz); 62.5 (2x CH₂, d, J=4.9Hz); 124.9 (C_qP, d, J=184.6Hz); 127.2 (CH_{arom}, d, J=3.5Hz); 127.9 (CH_{arom}); 128.0 (CH_{arom}); 128.3 (CH_{arom}); 129.0 (C₃H_{arom}, d, J=17.3Hz); 129.6 (C_qBr, d, J=4.6Hz); 132.2 (C_q C_qP, d, J=13.9Hz); 133.8 (C_q C_qBr, d, J=11.5Hz); 134.6 (C₂H_{arom}, d, J=9.2Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 18.96. **MS (ESI): m/z (%):** 685/687/689 (2M+H⁺, 15/30/15), 343/345 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1165 (P-OEt); 1248 (P=O); 1617; 1560;

1503; 1477. **MP:** 56.4-56.9 °C (EtOAc). **Kromatografi:** hekzanlar/EtOAc 60/40 Rf= 0.23. **Verim:** %74

5 **Dietil naft-1-ilfosfonatın sentezi: X=H olacak şekilde bir naftil çekirdeği içeren ara ürün (2)**

Dietil(4-bromonaftil)fosfonatın sentezine yönelik kullanılanla benzer bir prosedür kullanılmıştır. Lityum halojen değişimi, 90 dakika boyunca -40°C'de gerçekleştirilir. Başlangıç materyali olarak 1 g (4,83 mmol, 1 eşdeğeri) 1-bromonaftalen kullanılmıştır. Bileşik, sarı bir yağ olarak %67 verimde elde edilmiştir. Bunun LC'ye göre saflığı %95 olmuştur.

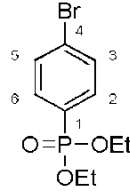


15 **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.31 (6H, t, J=7.2Hz, 2x CH₃); 4.01-4.28 (4H, m, 2x CH₂); 7.51-7.65 (3H, m, C₃H_{arom}, 2x CH_{arom}); 7.85-7.95 (1H, m, CH_{arom}); 8.04 (1H, d, J=8.3, CH_{arom}); 8.25 (1H, dxd, J=16.5Hz, 7.2Hz, C₂H_{arom}); 8.52 (1H, d, J=8.3Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.4 (2x CH₃, d, J=6.9Hz); 62.3 (2x CH₂, d, 4.6Hz); 124.6 (C_qP, d, J=182.3Hz); 124.6 (C₃H_{arom}, d, J=16.2Hz); 126.5 (CH_{arom}); 126.7 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.5 (CH_{arom}); 128.9 (CH_{arom}); 132.8 (C_q C_qP, d, 11.5Hz); 133.8 (CH_{arom}, d, J=3.5Hz); 134.2 (CHC_qCH, d, 10.4Hz); 134.8 (C₂H_{arom}, d, J=9.2Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 19.80. MS (ESI): m/z (%): 265 (M+H⁺, 100); 529 (2M+H⁺, 90). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1163 (P-OEt); 1240 (P=O); 1477; 1508; 1571; 1591. **Kromatografi:** hekzanlar/EtOAc 50/50 Rf= 0.23. **Verim:** %67.

25

Dietil 4-bromofenilfosfonatın sentezi: X=Br olacak şekilde bir fenil çekirdeğini içeren ara ürün (2)

30 Dietil(4-bromonaftil)fosfonatın sentezine yönelik kullanılanla benzer bir prosedür kullanılmıştır. Başlangıç materyali olarak 1,5 g (6,36 mmol, 1 eşdeğeri) 1,4-dibromobenzen kullanılmıştır ve ürün, sarı bir yağ olarak %41 verimde elde edilmiştir. Bunun LC'ye göre saflığı %90 olmuştur.



¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.32 (6H, t, J=6.9Hz, 2x CH₃); 4.01-4.19 (4H, m, 2x CH₂); 7.59-7.72 (4H, m, 4x CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.4 (2x CH₃, d, J=6.9Hz); 62.4 (2x CH₂, d, J=5.8Hz); 127.5 (C_qP, d, J=195.0Hz); 127.6 (C_qBr, d, J=3.5Hz); 131.9 (2x CHC_qBr, d, J=15.0Hz); 133.4 (2x CHC_qP, d, J=10.4Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 18.39. **MS (ESI): m/z (%):** 585/587/589 (2M+H⁺, 12/24/12), 293/295 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1164 (P-OEt); 1248 (P=O); 1646; 1580; 1478; 1443. **Kromatografi:** hekzanlar/EtOAc 60/40 R_f= 0.23. **Verim:** %41

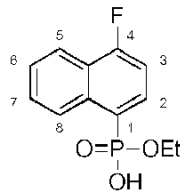
10

Ara ürünlerin (3) sentezine yönelik genel prosedür: arilfosfonik asitler

100 ml bir balonun içinde 1g fosfonat (ara ürün 2), 25 ml dioksan içinde çözünür. Buna 25 ml 1M NaOH solüsyonu eklenir. Reaksiyon, 4 saatlik bir periyot boyunca reflükse ısıtılır. Ortaya çıkan karışım, diklorometan kullanılarak yıkanır. Aköz faz, HCl kullanılarak 1 değerinde pH'ye asitleştirilir. Ürün, diklorometanın üç fraksiyonu kullanılarak özütlenir. Kombine edilen organik fazlar, tuzlu su ile yıkanır, MgSO₄ kullanılarak kurutulur ve konsantre edilir. Dioksanın kalan kısmı, yüksek vakum ile uzaklaştırılmıştır.

20

Etil 4-fluoronaft-1-ilfosfonat: X=F olacak şekilde bir naftil çekirdeği içeren ara ürün (3)

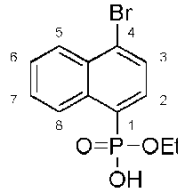


25

Bileşik, %83 verimde beyaz kristaller olarak elde edilir. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.24 (3H, t, J=6.9Hz, CH₃); 4.04 (2H, m, CH₂); 7.08 (1H, m, C₂H_{arom}); 7.59 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.08-8.16 (2H, m, C₃H_{arom}, CH_{arom}); 8.50 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.3 (CH₃, d, J=6.9Hz); 62.2 (CH₂, d, J=5.8Hz); 108.4 (C₂H_{arom}, t,

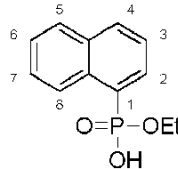
J=19.0Hz); 121.2 (CH_{arom}, d, J=5.8Hz); 121.4 (C_qP, dxd, J=193.8Hz, 3.5Hz); 124.0 (C_qC_qP, t, J=15.0Hz); 126.8 (2x CH_{arom}); 128.5 (CH_{arom}); 134.4-134.7 (C₃H_{arom}, C_qC_qF, m); 162.0 (C_qF, dxd, J=259.0Hz, 4.6Hz). **¹⁹F-NMR (282MHz, CDCl₃):** δ -114.14. **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 19.90. **MS (ESI): m/z (%):** 509 (2M+H⁺, 100), 255 (M+H⁺, 50). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1162 (P-OEt); 1628; 1600; 1573; 1509; 2623 (POOH). **MP:** 80.9-81.3 °C (dioksan). **Verim:** %83.

Etil 4-bromonaft-1-ilfosfonat: X=Br olacak şekilde bir naftil çekirdeği içeren ara ürün (3)



Bileşik, %91 verimde beyaz kristaller olarak elde edilir. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.22 (3H, t, J=6.9Hz, CH₃); 4.02 (2H, m, CH₂); 7.56-7.64 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.70 (1H, dxd, J=7.7Hz, 2.8Hz, C₃H_{arom}); 7.93 (1H, dxd, J=16.5Hz, 7.7Hz, C₂H_{arom}); 8.30 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 8.49 (1H, d, J=9.4Hz, CH_{arom}); 12.42 (1H, s, OH). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.2 (CH₃, d, J=5.8Hz); 62.3 (CH₂, d, J=5.8Hz); 125.2 (C_qP, d, J=191.5Hz); 127.3 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.8 (CH_{arom}); 128.0 (CH_{arom}); 128.2 (CH_{arom}); 128.8 (C₃H_{arom}, d, J=17.3Hz); 129.3 (C_qBr, d, J=4.6Hz); 132.1 (C_qC_qP, d, J=13.9Hz); 133.6 (C₂H_{arom}, d, J=10.4Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 19.16. **MS (ESI): m/z (%):** 629/631/633 (2M+H⁺, 50/100/50), 315/317 (M+H⁺, 70/70). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1162 (P-OEt); 1561; 1503; 1474; 2598 (PO-OH). **MP:** 125.8-126.5 °C (dioksan). **Verim:** %91.

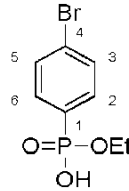
Etil naft-1-ilfosfonat: X=H olacak şekilde bir naftil çekirdeği içeren ara ürün (3)



Bileşik, %90 verimde turuncu bir yağ olarak elde edilir. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.24 (3H, t, J=7.2Hz, CH₃); 4.06 (2H, m, CH₂); 7.43 (1H, txd, J=7.4Hz, 3.7Hz, C₃H_{arom});

7.54 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.82-7.87 (1H, m, CH_{arom}); 7.98 (1H, d, J=8.3Hz, CH_{arom}); 8.51 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 8.19 (1H, dxd, J=16.5Hz, 7.4Hz, C₂H_{arom}); 10.31 (1H, s, OH). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.3 (CH₃, d, J=5.8Hz); 62.1 (CH₂, d, J=5.8Hz); 124.5 (C₃H_{arom}, d, J=17.3Hz); 125.3 (C_qP, d, J=190.4Hz); 126.4 (CH_{arom}); 126.9 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.5 (CH_{arom}); 128.7 (CH_{arom}); 132.7 (C_qC_qP, d, J=11.5Hz); 133.3 (CHC_qCH, d, J=10.4Hz); 133.5 (CH_{arom}); 133.7 (C₂H_{arom}, d, J=9.2Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 20.96. **MS (ESI): m/z (%):** 473 (2M+H⁺, 100), 237 (M+H⁺, 40). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1154 (P-OEt); 1478; 1508; 1572; 1592; 2577 (PO-OH). **Verim:** %90.

- 10 **Etil 4-bromofenilfosfonat: X=Br olacak şekilde bir fenil çekirdeğini içeren ara ürün (3)**

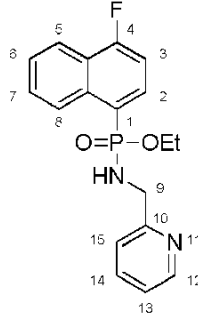


- 15 Bileşik, %90 verimde berrak bir yağ olarak elde edilir. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.26 (3H, t, J=7.2Hz, CH₃); 4.02 (2H, ~quin, CH₂); 7.53-7.66 (4H, m, 4x CH_{arom}); 11.26 (1H, s, OH). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.3 (CH₃, d, J=6.9Hz); 62.3 (CH₂, d, J=5.8Hz); 127.4 (C_qBr, d, J=3.5Hz); 128.0 (C_qP, d, J=195.0Hz); 131.7 (2x CHC_qBr, d, J=16.2Hz); 133.0 (2x CHC_qP, d, J=10.4Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 19.04. **MS (ESI): m/z (%):** 529/531/533 (2M+H⁺, 50/100/50), 265/267 (M+H⁺, 50/50). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1162 (P-OEt); 1648; 1581; 1560; 1479; 2603 (PO-OH). **Verim:** %90.

Ara ürünlerin (3) bileşiklere (E ve D) dönüşümüne yönelik genel prosedür

- 25 25 ml bir balonun içinde fosfonik asitin 1 eşdeğeri, SOCl₂'nin 10 eşdeğeri ile karıştırılır. Reaksiyon, inert atmosferin altına yerleştirilir ve 2 saatlik bir periyot boyunca reflükse ısıtılır. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra uçucu maddeler buharlaştırılır ve kalıntı, 20 ml kuru diklorometan içinde yeniden çözünür. İnert atmosfer, yeniden sağlanır ve aminin 1 eşdeğeri ve trietilaminin 1 eşdeğeri 0°C'de eklenir. Ortaya çıkan karışım, 16
- 30 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılır bundan sonra 20 ml aköz doymuş NaHCO₃ ile söndürülür. Bileşik, diklorometanın üç parçası ile özütlenir ve kombine edilen organik fazlar, kurutulur (MgSO₄) ve konsantre edilir.

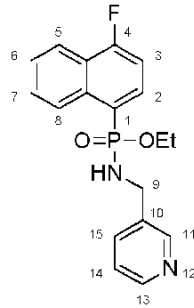
Etil *N*-(piridin-2-ilmetil)-*P*-(4-fluoronaft-1-il)fosfonamidat ('E2' olarak isimlendirilir)



5

0,5 g fosforik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %57 verimde sarı kristallerin izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.34 (3H, q, J=6.8Hz, CH₃); 4.11-4.32 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7.06-7.18 (3H, m, 3x CH_{arom}); 7.48-7.65 (3H, m, 3x CH_{arom}); 8.07-8.18 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.44 (1H, m, CH_{arom}); 8.68 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=5.8Hz); 45.8 (NHCH₂); 61.1 (OCH₂, d, J=4.6Hz); 108.5 (C₂H_{arom}, t, J=17.9Hz); 121.2 (CH_{arom}, d, J=5.8Hz); 121.6 (CH_{arom}); 122.2 (CH_{arom}); 123.2 (C_qP, d, J=169.6Hz); 124.0 (C_qC_qP, d, J=16.2Hz); 126.6 (CH_{arom}); 126.7 (CH_{arom}); 128.3 (CH_{arom}); 134.3 (C₃H_{arom}, t, J=8.7Hz); 134.8 (C_qC_qF, dxd, J=12.7Hz, 5.8Hz); 136.5 (CH_{arom}); 149.0 (C₁₂H_{arom}); 157.7 (CH₂C_q, d, J=5.8Hz); 161.7 (C_qF, d, J=259.6Hz). **¹⁹F-NMR (282MHz, CDCl₃):** δ 115.36. **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 22.12. **MS (ESI): m/z (%):** 345 (M+H⁺, 100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1162 (P-OEt); 1509; 1571; 1594; 1628; 3193 (NH). **MP:** 58.7-59.5 °C (Et₃N). **Kromatografi:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f=0.21. **Verim:** %57.

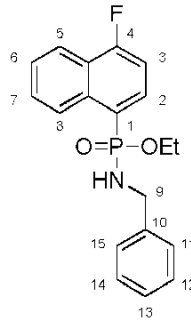
20 **Etil *N*-(piridin-3-ilmetil)-*P*-(4-fluoronaft-1-il)fosfonamidat ('E5' olarak isimlendirilir)**



0,3g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %26 verimde sarı kristallerin izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.33 (3H, t, J=6.9Hz, CH₃); 3.75-3.83 (1H, m, NH); 4.01-4.20 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7.10-7.20 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.55 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 7.59-7.66 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.08-8.18 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.41 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.66 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=6.9Hz); 42.4 (NHCH₂); 61.3 (OCH₂, d, J=4.6Hz); 108.6 (C₂H_{arom}, dxd, J=19.6Hz, 16.2Hz); 121.4 (CH_{arom}, d, J=5.8Hz); 123.4 (CH_{arom}); 123.7 (C_q, d, J=4.6Hz); 124.2 (C_q, dxd, J=15.6Hz, 13.3Hz); 126.4 (CH_{arom}); 126.8 (CH_{arom}); 128.5 (CH_{arom}); 134.7 (C₃H_{arom}, t, J=9.2Hz); 135.1 (C_q, d, J=5.8Hz); 135.4 (CH_{arom}); 148.7 (CH_{arom}); 149.0 (CH_{arom}); 161.9 (C_qF, dxd, J=259.6Hz, 3.5Hz). **¹⁹F-NMR (282MHz, CDCl₃):** δ -114.68. **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 21.63. MS (ESI): m/z (%): 345 (M+H⁺, 100). IR (cm⁻¹) v_{max}: 1164 (P-OEt); 1571; 1579; 1600; 1628; 3192 (NH). MP: 133.6-134.3 °C (Et₃N). Kromatografi: EtOAc/Et₃N 95/5 R_f=0.08. Verim: %26.

15

Etil N-(benzil)-P-(4-fluoronaft-1-il)fosfonamidat ('E6' olarak isimlendirilir)

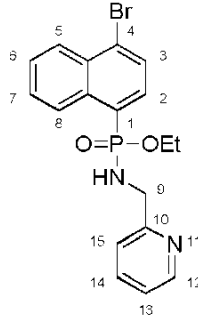


0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %46 verimde sarı kristallerin izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.35 (3H, t, J=6.9Hz, CH₃); 3.14-3.22 (1H, m, NH); 4.02-4.23 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7.14-7.28 (6H, m, 6x CH_{arom}); 8.10-8.20 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.63 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8.70 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=6.9Hz); 44.9 (NHCH₂); 61.0 (OCH₂, d, J=5.8Hz); 108.5 (C₂H_{arom}, dxd, J=19.6Hz, 17.3Hz); 121.3 (CH_{arom}, d, J=3.5Hz); 123.1 (C_qP, d, J=171.9Hz); 124.2 (C_qC_qP, t, J=14.4Hz); 126.7 (2x CH_{arom}); 127.3 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.5 (2x CH_{arom}); 128.4 (CH_{arom}); 128.5 (2x CH_{arom}, d, J=3.5Hz); 134.5 (C₃H_{arom}, d, J=8.1Hz); 134.8 (C_qC_qF, dxd, J=13.3Hz, 4.0Hz); 139.7 (CH₂C_q); 161.8 (C_qF, dxd, J=255.6Hz, 4.0Hz). **¹⁹F-NMR (282MHz, CDCl₃):** δ -115.08. **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 22.05. MS (ESI): m/z (%): 344 (M+H⁺, 100); 687 (2M+H⁺,

30

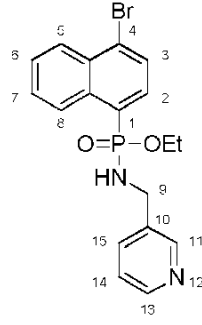
90). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1508; 1571; 1601; 1628; 3187 (NH). **MP:** 120.1-120.8 °C (Et₃N). **Kromatografi:** EtOAc/hekzanlar 60/40 + %5 Et₃N R_f=0.24. **Verim:** %46.

5 **Etil N-(piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidat ('E1' olarak isimlendirilir)**



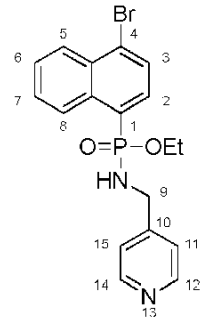
0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %62 verimde sarı
 10 kristallerin izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.35 (3H, t, J=7.2Hz, CH₃); 4.29-4.11 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7.10 (1H, d, J=7.2Hz, CH_{arom}); 7.12 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 7.54 (1H, txd, J=7.7Hz, 1.7Hz, CH_{arom}); 7.63 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.81 (1H, dxd, J=7.7Hz, 2.8Hz, C₃H_{arom}); 7.99 (1H, dxd, J=15.4Hz, 7.7Hz, C₂H_{arom}); 8.32 (1H, dxt, J=7.2Hz, 2.8Hz, CH_{arom}); 8.45 (1H, dxt, J=4.4Hz, 1.7Hz, CH_{arom}); 8.72-8.69 (1H, m, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=5.8Hz); 45.8 (NHCH₂); 61.1 (OCH₂, d, J=5.8Hz); 121.6 (CH_{arom}); 122.2 (CH_{arom}); 127.5 (C_qP, d, J=170.8Hz); 127.3 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.7 (CH_{arom}); 128.0 (CH_{arom}); 128.1 (CH_{arom}); 128.9 (C₃H_{arom}, d, J=15.0Hz); 132.2 (C_qC_qP, d, J=12.7Hz); 133.4 (C₂H_{arom}, d, J=8.1Hz); 134.0 (C_qC_qBr, d, J=12.7Hz); 136.5 (CH_{arom}); 148.9 (C₁₂H_{arom}); 157.6 (CH₂C_q). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 22.08. **MS (ESI): m/z (%):** 405/407 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1159 (P-OEt); 1474; 1501; 1560; 1589; 3188 (NH). **MP:** 87.6-88.4°C (Et₃N). **Kromatografi:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f=0.15. **Verim:** %62.

25 **Etil N-(piridin-3-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidat ('E3' olarak isimlendirilir)**



0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, diklorometan/hekzanlardan ve ana sıvının kolon
 5 izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.32 (3H, t, J=7.2Hz, CH₃); 3.85 (1H, ~q, J=7.7Hz, NH); 4.00-4.09 (2H, m, NHCH₂); 4.13 (2H, ~quin, OCH₂); 7.12 (1H, dxd, J=7.7Hz, 5.0Hz, CH_{arom}); 7.53 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 7.58-7.67 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.82 (1H, dxd, J=7.7Hz, 2.8Hz, C₃H_{arom}); 7.97 (1H, dxd, J=15.4Hz, 7.7Hz, C₂H_{arom}); 8.33 (1H, m, CH_{arom}); 8.41 (2H, br. s, 2x CH_{arom}); 8.67 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=6.9Hz); 42.4 (NHCH₂); 61.4 (OCH₂, d, J=4.6Hz); 123.4 (CH_{arom}); 125.6 (C_q); 126.9 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.9 (2x CH_{arom}); 128.3 (CH_{arom}, d, J=6.9Hz); 129.0 (C₃H_{arom}, d, J=16.2Hz); 129.2 (C_q); 132.3 (C_q, d, J=12.7Hz); 133.8 (C₂H_{arom}, d, J=9.2 Hz); 133.9 (C_q); 135.1 (C_q, d, J=5.8Hz); 135.5 (CH_{arom}); 148.6 (CH_{arom}); 148.8 (CH_{arom}). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 21.44.
 10 **MS (ESI): m/z (%):** 405/407 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1163 (P-OEt); 1478; 1500; 1560; 1579; 3187 (NH). **MP:** 105.6-106.4 °C (Et₃N). **Kromatografi:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f=0.11. **Verim:** %57.

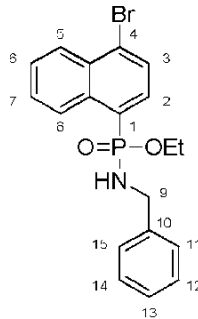
20 **Etil N-(piridin-4-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidat ('E7' olarak isimlendirilir)**



0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %8 verimde beyaz kristallerin izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.34 (3H, t, J=6.9Hz, CH₃); 3.80 (1H, ~q, J=8.3Hz, NH); 4.05-4.15 (2H, m, NHCH₂); 4.16 (2H, ~quin, J=7.3Hz, OCH₂); 7.14 (2H, d, J=5.5Hz, 2x CH_{arom}); 7.60-7.69 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.83 (1H, dxd, J=7.7Hz, 3.3Hz, C₃H_{arom}); 7.98 (1H, dxd, J=15.4Hz, 7.7Hz, C₂H_{arom}); 8.35 (1H, m, CH_{arom}); 8.43 (2H, br. s, 2x CH_{arom}); 8.68 (1H, d, J=6.9Hz, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=6.9Hz); 43.8 (NHCH₂); 61.6 (OCH₂, d, J=5.8Hz); 122.2 (2x CH_{arom}); 126.7 (C_qP, d, J=169.6Hz); 126.9 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.9 (2x CH_{arom}); 128.3 (CH_{arom}, d, J=2.3Hz); 129.0 (C₃H_{arom}, d, J=15.0Hz); 129.3 (C_qBr, d, J=3.5Hz); 132.3 (C_qC_qP, d, J=12.7Hz); 133.8 (C₂H_{arom}, d, J=9.2Hz); 133.9 (C_qC_qBr, d, J=12.7Hz); 148.7 (CH₂C_q); 149.8 (2x CH_{arom}). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 21.84. **MS (ESI): m/z (%):** 405/407 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1162 (P-OEt); 1463; 1501; 1561; 1600; 3161 (NH). **MP:** 131.8-132.5 °C (Et₃N). **Kromatografi:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f=0.10. **Verim:** %8.

15

Etil N-(benzil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidat ('E4' olarak isimlendirilir)



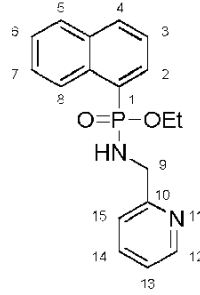
- 0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, diklorometan/hekzanlardan ve ana sıvının kolon kromatografisinden kristalize edildikten sonra %50 verimde beyaz kristallerin izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.34 (3H, t, J=6.9Hz, CH₃); 3.32 (1H, ~q, J=7.7Hz, NH); 4.00-4.10 (2H, m, NHCH₂); 4.17 (2H, quintet, J=7.2Hz, OCH₂); 7.17-7.25 (5H, m, 5x CH_{arom}); 7.60-7.68 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.82 (1H, dxd, J=7.7Hz, 2.8Hz, CH_{arom}); 7.99 (1H, dxd, J=14.9Hz, 7.7Hz, C₂H_{arom}); 8.34 (1H, m, CH_{arom}); 8.70-8.73 (1H, m, CH_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.5 (CH₃, d, J=6.9Hz); 45.0 (NHCH₂); 61.3 (OCH₂, d, J=5.8Hz); 126.8 (C_qP, d, J=128.1Hz); 127.1 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.4 (CH_{arom}); 127.5 (2x CH_{arom}); 127.8 (CH_{arom}); 128.2 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 128.6 (3x CH_{arom}); 129.0 (CH_{arom}, d, J=15.0Hz); 129.0 (C_qBr, d, J=4.6Hz); 132.3 (C_qC_qP, d, J=12.7Hz); 133.8 (CH_{arom}, d, J=8.1Hz); 134.0 (C_qC_qBr, d, J=11.5Hz);

30

139.4 (CH₂C_q, d, J=6.9Hz). ³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃): δ 21.37. MS (ESI): m/z (%): 404/406 (M+H⁺, 100/100). IR (cm⁻¹) v_{max}: 1159 (P-OEt); 1451; 1500; 1560; 3196 (NH). MP: 135.8-136.7 °C (Et₃N). Kromatografi: EtOAc/hekzanlar 60/40 + %5 Et₃N R_f=0.21. Verim: %50.

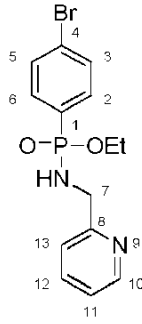
5

Etil N-(piridin-2-ilmetil)-P-(naft-1-il)fosfonamidat ('E9' olarak isimlendirilir)



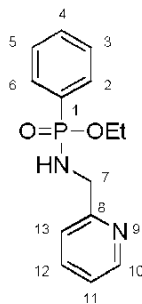
- 10 0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %25 verimde turuncu bir yağın izolasyonuna neden olmuştur. ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.33 (3H, t, J=7.2Hz, OCH₂CH₃); 4.17 (2H, qxd, J¹=J²=7.2Hz, OCH₂CH₃); 4.27 (2H, ~dxd, J¹=8.8Hz, J²=6.1Hz, CH₂NH); 4.39 (1H, br. s, NH); 7.07 (1H, dxd, J¹=7.2Hz, J²=5.0Hz, C₁₃H_{arom}); 7.15 (1H, d, J=7.7Hz, C₁₅H_{arom}); 7.43-7.58 (4H, m, 4xCH_{arom}); 7.84 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 7.96 (1H, d, J=7.7Hz, CH_{arom}); 8.15 (1H, dxdxd, J¹=15.7Hz, J²=7.2Hz, J³=1.1Hz, CH_{arom}); 8.42 (1H, d, J=5.0Hz, C₁₂H_{arom}); 8.69 (1H, d, J=8.8Hz, CH_{arom}). ¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ 16.5 (OCH₂CH₃, d, J=6.9Hz); 45.8 (CH₂NH); 61.0 (OCH₂CH₃, d, J=5.8Hz); 121.7 (C₁₅H_{arom}); 122.2 (C₁₃H_{arom}); 124.6 (CH_{arom}, d, J=16.2Hz); 126.3 (CH_{arom}); 126.7 (CH_{arom}, d, J=4.6Hz); 127.1 (C_qP, d, J=168.5Hz); 127.3 (CH_{arom}); 128.8 (CH_{arom}); 132.9 (C_q, d, J=10.4Hz); 133.1 (CH_{arom}, d, J=3.5Hz); 133.5 (CH_{arom}, d, J=8.1Hz); 133.7 (C_q, d, J=11.5Hz); 136.6 (CH_{arom}); 148.9 (C₁₂H_{arom}); 157.9 (C_qN, d, J=5.8Hz). ³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃): δ 22.95. MS (ESI): m/z (%): 327 (M+H⁺, 100). HRMS (ESI): hesaplanan C₁₈H₂₀N₂O₂P: 327,1257 (M+H⁺), bulunan: 327,1260 (M+H⁺). IR (cm⁻¹) v_{max}: 1199 (P=O); 1435; 1591; 3192 (NH).
- 20 127.3 (CH_{arom}); 128.8 (CH_{arom}); 132.9 (C_q, d, J=10.4Hz); 133.1 (CH_{arom}, d, J=3.5Hz); 133.5 (CH_{arom}, d, J=8.1Hz); 133.7 (C_q, d, J=11.5Hz); 136.6 (CH_{arom}); 148.9 (C₁₂H_{arom}); 157.9 (C_qN, d, J=5.8Hz). ³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃): δ 22.95. MS (ESI): m/z (%): 327 (M+H⁺, 100). HRMS (ESI): hesaplanan C₁₈H₂₀N₂O₂P: 327,1257 (M+H⁺), bulunan: 327,1260 (M+H⁺). IR (cm⁻¹) v_{max}: 1199 (P=O); 1435; 1591; 3192 (NH).
- 25 Kromatografi: EtOAc/hekzanlar90/10 R_f= 0.14. Verim: %25.

Etil N-(piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromofenil)fosfonamidat ('E8' olarak isimlendirilir)



0,3g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %16 verimde turuncu bir yağın izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.23 (3H, t, J=7.2Hz, CH₃); 4.01 (2H, quind, J=7.2Hz, 2.2Hz, OCH₂); 4.11 (2H, dxd, J=9.4Hz, 6.4Hz, NHCH₂); 4.33 (1H, dxt, J=9.9Hz, 6.4Hz, NH); 7.08 (1H, dxd, J=7.6Hz, 4.9Hz, C₁₁H_{arom}); 7.13 (1H, d, J=7.6Hz, C₉H_{arom}); 7.46 (2H, dxd, J=8.3Hz, 3.3Hz, 2x CHC_qBr); 7.53 (1H, txd, J=7.6Hz, 1.7Hz, C₁₂H_{arom}); 7.57 (2H, dxd, J=12.7Hz, 8.3Hz, 2x CHC_qP); 8.41 (1H, d, J=4.9Hz, C₁₀H_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.4 (CH₃, d, J=6.9Hz); 45.7 (NHCH₂); 60.9 (OCH₂, d, J=5.8Hz); 121.6 (CH_{arom}); 122.3 (CH_{arom}); 126.8 (C_qBr, d, J=3.5Hz); 130.1 (C_qP, d, J=175.4Hz); 131.7 (2x CHC_qBr, d, J=15.0Hz); 133.1 (2x CHC_qP, d, J=11.5Hz); 136.7 (C₁₂H_{arom}); 149.0 (C₁₀H_{arom}); 157.7 (CH₂C_q, d, J=6.9Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 22.35. **MS (ESI): m/z (%):** 355/357 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1163 (P-OEt); 1475; 1579; 1592; 3204 (NH). **Kromatografi:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f=0.16. **Verim:** %16

Etil N-(piridin-2-ilmetil)-P-(fenil)fosfonamidat ('D1' olarak isimlendirilir)

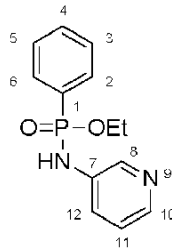


20

0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, %78 verimde turuncu bir yağın izolasyonuna neden olmuştur. Herhangi bir saflaştırma adımı gerekli olmamıştır. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.33 (3H, t, J=7.2Hz, OCH₂CH₃); 3.97 (1H, ~br. s, NH); 4.12 (2H, qxd, J¹=J²=7.2Hz, OCH₂); 4.23 (2H, dxd, J¹=8.5Hz, J²=6.3Hz, CH₂NH); 7.17 (1H, dxd, J¹=

7.5Hz, $J^2=5.0\text{Hz}$, $\text{C}_{11}\text{H}_{\text{arom}}$); 7.22 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, $\text{C}_{13}\text{H}_{\text{arom}}$); 7.39-7.54 (3H, m, $3\times\text{CH}_{\text{arom}}$); 7.62 (1H, txd, $J^1=7.5\text{Hz}$, $J^2=1.7\text{Hz}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{\text{arom}}$); 7.77-7.86 (2H, m, $\text{C}_{2,6}\text{H}_{\text{arom}}$); 8.52 (1H, ~d, $J=5.0\text{Hz}$, $\text{C}_{10}\text{H}_{\text{arom}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3):** δ 16.5 (CH_3 , d, $J=6.9\text{Hz}$); 45.8 (CH_2NH); 60.8 (OCH_2 , d, $J=5.8\text{Hz}$); 121.6 ($\text{C}_{13}\text{H}_{\text{arom}}$); 122.3 ($\text{C}_{11}\text{H}_{\text{arom}}$); 128.4 (2x CH_{arom} , d, $J=13.9\text{Hz}$); 130.9 (C_qP , d, $J=173.0\text{Hz}$); 131.5 (2x CH_{arom} , d, $J=10.4\text{Hz}$); 131.8 (CH_{arom} , d, $J=2.3\text{Hz}$); 136.7 ($\text{C}_{12}\text{H}_{\text{arom}}$); 149 ($\text{C}_{10}\text{H}_{\text{arom}}$); 157.9 (C_qN , d, $J=6.9\text{Hz}$). **$^{31}\text{P-NMR}$ (121MHz, CDCl_3):** δ 23.33. **MS (ESI):** m/z (%): 277 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100). **HRMS (ESI):** hesaplanan $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$: 277,1100 ($\text{M}+\text{H}^+$), bulunan: 277,1104 ($\text{M}+\text{H}^+$). **IR (cm^{-1})** ν_{max} : 1207 ($\text{P}=\text{O}$); 1437; 1591; 3200 (NH). **Kromatografi:** EtOAc $R_f=0.13$. **Verim:** %78.

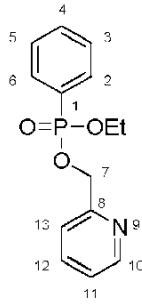
Etil *N*-(piridin-3-il)-*P*-(fenil)fosfonamidat ('D3' olarak isimlendirilir)



15

0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %75 verimde sarı bir yağın izolasyonuna neden olmuştur. **$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3):** δ 1.39 (3H, t, $J=7.2\text{Hz}$, CH_3); 4.13-4.37 (2H, m, OCH_2); 6.46 (1H, ~d, $J=5.5\text{Hz}$, NH); 7.08 (1H, dxd, $J^1=8.3\text{Hz}$, $J^2=4.5\text{Hz}$, $\text{C}_{11}\text{H}_{\text{arom}}$); 7.33-7.38 (1H, m, $\text{C}_{12}\text{H}_{\text{arom}}$); 7.41-7.48 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7.51-7.57 (1H, m, CH_{arom}); 7.81-7.89 (2H, m, $\text{C}_{2,6}\text{H}_{\text{arom}}$); 8.15 (1H, dxd, $J^1=4.5\text{Hz}$, $J^2=1.4\text{Hz}$, $\text{C}_{10}\text{H}_{\text{arom}}$); 8.30 (1H, d, $J=2.8\text{Hz}$, $\text{C}_8\text{H}_{\text{arom}}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3):** δ 16.3 (CH_3 , d, $J=6.9\text{Hz}$); 61.2 (OCH_2 , d, $J=5.8\text{Hz}$); 123.7 ($\text{C}_{11}\text{H}_{\text{arom}}$); 124.4 ($\text{C}_{12}\text{H}_{\text{arom}}$, d, $J=5.8\text{Hz}$); 128.6 (2x CH_{arom} , d, $J=15.0\text{Hz}$); 129.8 (C_qP , d, $J=176.5\text{Hz}$); 131.3 ($\text{C}_{2,6}\text{H}_{\text{arom}}$, d, $J=10.4\text{Hz}$); 132.4 (CH_{arom} , d, $J=2.3\text{Hz}$); 137.9 (C_qNH); 139.7 ($\text{C}_8\text{H}_{\text{arom}}$, d, $J=8.1\text{Hz}$); 142.1 ($\text{C}_{10}\text{H}_{\text{arom}}$). **$^{31}\text{P-NMR}$ (121MHz, CDCl_3):** δ 17.62. **MS (ESI):** m/z (%): 263 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100). **HRMS (ESI):** hesaplanan $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$: 263,0944 ($\text{M}+\text{H}^+$), bulunan: 263,0951 ($\text{M}+\text{H}^+$). **IR (cm^{-1})** ν_{max} : 1212 ($\text{P}=\text{O}$); 1472; 1586; 3396 (NH). **Kromatografi:** EtOAc/hekzanlar 90/10 $R_f=0.14$. **Verim:** %75.

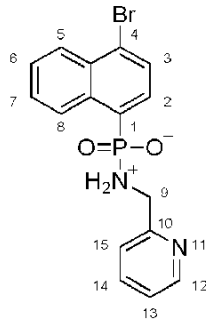
30 **Etil (piridin-2-ilmetil) fenilfosfonat ('D2' olarak isimlendirilir)**



0,5g fosfonik asit dönüştürülmüştür, kolon kromatografisinden sonra %56 verimde kahverengi bir yağın izolasyonuna neden olmuştur. **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 1.34 (3H, t, J=7.2Hz, CH₃); 4.10-4.27 (2H, m, OCH₂); 5.15 (1H, dxd, J¹=13.2Hz, J²=7.7Hz, OCH_aH_bC_q); 5.21 (1H, dxd, J¹=13.2Hz, J²=7.7Hz, OCH_aH_bC_q); 7.21 (1H, ~dxd, J¹=7.2Hz, J²=4.8Hz, C₁₁H_{arom}); 7.44-7.50 (3H, m, 2xCH_{arom}, C₁₃H_{arom}); 7.54-7.61 (1H, m, CH_{arom}); 7.70 (1H, txd, J¹=7.2Hz, J²=1.5Hz, C₁₂H_{arom}); 7.82-7.90 (2H, m, C_{2,6}H_{arom}); 8.55 (1H, ~dxd, J¹=4.8Hz, J²=1.5Hz, C₁₀H_{arom}). **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 16.2 (CH₃, d, J=6.9Hz); 62.4 (OCH₂CH₃, d, J=5.8Hz); 67.7 (OCH₂C_q, d, J=5.8Hz); 121.3 (C₁₃H_{arom}); 122.8 (C₁₁H_{arom}); 127.6 (C_qP, d, J=189.2Hz); 128.5 (2xCH_{arom}, d, J=15.0Hz); 131.7 (C_{2,6}H_{arom}, d, J=9.2Hz); 132.6 (CH_{arom}, d, J=2.3Hz); 136.8 (C₁₂H_{arom}); 149.0 (C₁₀H_{arom}); 156.1 (C_qN, d, J=8.1Hz). **³¹P-NMR (121MHz, CDCl₃):** δ 20.00. **MS (ESI): m/z (%):** 278 (M+H⁺, 100). **HRMS (ESI):** hesaplanan C₁₄H₁₇NO₃P: 278,0941 (M+H⁺), bulunan: 278,0946 (M+H⁺). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1248 (P=O); 1438; 1592; 3453 (NH). **Kromatografi:** EtOAc/hekzanlar 60/40 R_f= 0.23. **Verim:** %56.

Hidrojen N-(piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidatın sentezi ('E10' olarak isimlendirilir)

20



50 ml bir balonda 0.5 g Etil N-(piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidat, 20 ml bir 1/1 MeOH ve 1.5M aköz LiOH karışımında çözünmüştür. Karışım 45 dakika reflükse

ısıtılmıştır ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Kloroform (3x15ml) ile yıkandıktan sonra pH, konsantre edilmiş HCl (12M) kullanılarak 1'e ayarlanmıştır. Kloroform kullanılarak özütleme, %42 verimde ve HPLC'ye göre %70 saflıkta zwitteriyonik **E10** vermiştir. Kristalizasyon veya iyon değişimi kromatografisi ile saflığın arttırılma girişimi başarısız olmuştur.

Bitki materyali

Arabidopsis thaliana Columbia (Col0) fideleri, 1,5 g/L MS bazal tuzları (Duchefa, M0221.0050), 5,0 g/L D-sakaroz, 0,5 g/L MES (Duchefa, M1503.0100) ve 8,0 g/L agar (MC29, Amersham) içeren, pH5,7, 50 mL bazal ortamda kare şeklinde 12x12 cm petri kapları (Gosselin, BP124-04) içinde yetiştirilmiştir. Tohumlara, klorin gazında (cam fanus içinde 100 mL ticari ağartıcı ve 3 mL hipoklorik asit) 4 saat boyunca yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır, petri kaplarına yayılmıştır ve çimlenmeyi uyarmak üzere 5°C'de karanlıkta 4 gün boyunca akabinde 25°C'de ışıktaki (70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 8 saat boyunca katmanlaştırılmıştır. Bundan sonra kaplar, 60 ila 100 mm uzunluğunda hipokotiller ile etiyolman ve skotomorfojenik büyümeyi indüklemek üzere 3 gün boyunca alüminyum folyo ile kaplanır. Solmuş fideler, büyüme odasına (25°C, 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 16 saat ışık/8 saat karanlık) aktarılmıştır ve 10 gün boyunca farklı işlemlere tabi tutulmuştur.

2. Bitki büyümesi regülatörleri ve pirabaktin analogları

Absisik asit ve pirabaktin, Sigma Aldrich (B190923.27 ve B3438) tarafından satın alınmıştır ve 10 mM bir stok hazırlamak üzere DMSO içinde çözünmüştür. Kendiliğinden sentezlenen fosfonamid analogları benzer bir şekilde DMSO içinde çözünmüştür. Çimlenme analizlerine yönelik fideler, büyüme regülatörlerini içeren ortamda inkübe edilmiştir. Kök ve sürgün büyüme analizlerine yönelik küçük bitkiler, K1 ortamında önceden yetiştirilmiştir ve büyüme regülatörlerini içeren ortama aktarılmıştır. Gözenek açıklığı analizleri, gözlem altında hücrelere doğrudan büyüme regülatörleri eklenerek gerçekleştirilmiştir.

3. Kök fenotipik analizi

Kök fenotipleri, bir binoküler mikroskop (Olympus, SZX9) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Genel fotoğraflar, bir Nikon D5000 kamerası ile çekilmiştir ve görüntüler, ImageJ® yazılımı ile analiz edilmiştir. Primer kök uzunluğu, Segmented Line aracı acılığıyla ayrı
5 fidelere yönelik ölçülmüştür, burada kökün tahmin edilen bir profili izlenir ve bu profilin uzunluğu hesaplanır.

4. İstatistiksel analiz

10 Hesaplanan ve ölçülen kök verileri, değerleri ve istatistiksel hata çubuklarını gösteren grafikler ile temsil edilir. Ayrıca farklı işlemler arasındaki önemi belirlemek üzere istatistiksel analiz, S-Plus (version 8, TIBCO Software Inc.) içinde gerçekleştirilir. Verilerin normalliğini ve değişkenlerin dağılımını (homoskedastisite) kontrol etmek
15 üzere sırasıyla bir Kolmogorov-Smirnov ve Modifiye Edilmiş Levene testi uygulanmıştır. Normalliği ve homoskedastisiteyi uygulayan veri setlerinde Anova testlerine, işlemleri karşılaştırmak üzere devam edilmiştir. Bonferroni yöntemi, çoklu ortalamaları karşılaştırmak üzere kullanılmıştır. Daha sık olarak parametrik olmayan bir Wilcoxon Rank testi, ortalamaları ikişer ikişer karşılaştırır. Aynı harf kodunu alan grafik çubukları önemli olmayan ölçüde farklıdır. Farklı harfler, işlemler arasındaki önemli farklı
20 ortalamaları gösterir.

Sonuçlar

Kök gelişimi üzerinde fosfonamid pirabaktin analoglarının aşağıda bahsedilen etkisine
25 ek olarak analogların tohum çimlenmesi ve gözenek kapanması gibi tipik ABA ile ilgili biyolojik proseslerdeki etkisi ayrıca açıklanır.

Pirabaktin ve fosfonamid analoglarının primer kök büyümesi üzerindeki etkisi

30 Önceki deneyler, 10 μ M pirabaktin ve ABA'nın primer kök uzamasında önemli azalmalara neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle başlangıç olarak bu konsantrasyonda pirabaktin analoglarının etkisi tarafımızca değerlendirilmiştir.

Beklendiği gibi 10 μ M ABA ve pirabaktin, primer kök uzamasını sırasıyla 5- ve 2.5-katı
35 azaltmıştır (**Şekil 1**). Pirabaktin analogları E4 ve E7, primer kök büyümesini inhibe

etmiştir ancak E1, E5, E9 ve E10, primer kök uzamasının küçük inhibitörleri olmuştur. Analog E6, pirabaktin ile karşılaştırılabilir olarak kök büyümesini azaltan tek bileşik olmuştur. Diğer pirabaktin analogları E2, E3, D1, D2 ve D3, önemli bir etki göstermemiştir. Önemli bir şekilde bileşik E8, primer kök uzamasında küçük ancak önemli bir artış göstermiştir (**Şekil 1**).

Yan kök gelişiminde bulunan pirabaktin ve fosfonamid analogları

Primer kökün dallanması, kök yapısının önemli bir belirleyicisidir ve yan köklerin başlaması ve meydana gelmesi sırasında düzenleyici bir fonksiyona sahip olan ABA sinyalleme ile kontrol edilir ve çevresel sinyalleri organdan kaynaklanan yanıtlara dönüştürür (De Smet et al, 2003; De Smet et al, 2006; Guo et al, 2009; Guo et al, 2012; Signora et al, 2001). Bu nedenle yan kök primordiumların (LRP) ve yan köklerin (LR) hormon tedavisi üzerine sayısı tarafımızca analiz edilmiştir. **Şekil 2 A**, 13 günlük primer kök üzerinde görünen primordiumların ve meydana gelen köklerin, solmuş *Arabidopsis thaliana* fidelerinin toplam sayısını gösterir. Pirabaktin yan kök başlamasını sadece orta şiddette etkilerken ABA, LR+LRP'nin sayısını önemli derecede azaltmıştır (**Şekil 2 B**). Analoglar E1, E4, E6 ve E7, güçlü inhibitörlerdir ancak E2, E3, E5, E8, E9, E10 ve D1, yan kök oluşumunun orta ile zayıf inhibitörleridir. Analog (D2), önemli bir etkiye sahip olmamıştır ve D3, yan kök indüksiyonunu geliştirmiştir (**Şekil 2 A**). Ayrıca yoğunluk değerleri göz önünde bulundurulduğunda ABA-işlemi, primer kökün her cm'sine yönelik köklerin sayısını azaltmıştır. Pirabaktin diğer bir taraftan LR+LRP yoğunluğunu önemli derecede arttırmıştır (**Şekil 2 B**). Analoglar E1, E4 ve E6 ile tedavi, güçlü bir yoğunluk azalmasına (ABA'dan dahi fazla) neden olmuştur. Analog E7, primer kökün cm'si başına yaklaşık 5 LR+LRP'lik normal yoğunluk değerlerini ortaya çıkaracak şekilde yan kök sayılarını ve primer kök uzunluğunu etkilemiştir. E2, E3, E8, E9, E10 ve D1, ABA ile benzer bir şekilde LR+LRP sayılarını azaltmıştır. Ancak analog D2, LR sayılarını önemli derecede etkilememiştir, D3 işlemi, LR yoğunluğunu arttırmıştır (**Şekil 2 B**).

ABA ve pirabaktinin yan kök yoğunluğu üzerindeki karşı etkileri ayrıca pirabaktin analoglarının değişken etkileri, inhibitör ve uyarıcı ABA sinyalleme dahil olmak üzere yan kök oluşumunun regülasyonunun bir kompleks yolu takip ettiğine dair hipoteze yönelik destek verir.

Fosfonamid analoglarının dağınık kök organojenezi üzerindeki etkisi

Kök sistemi aynı zamanda solmuş *Arabidopsis* tohumlarının hipokotili üzerinde görünen sürgün ile yayılan veya dağınık köklerden (AR) oluşabilir. AR'lerin suyun durumundan etkilenmesi, AR oluşumu sırasında ABA'nın veya ilgili moleküllerin olası bir rolünü gösterir. ABA'nın ve ilgili bileşiklerin etkisini belirlemek üzere işlem görmüş fidelerin üzerinde AR oluşumu tarafımızca değerlendirilmiştir. Fidelerin hipokotil uzunluğunun analoglar tarafından etkilenmemesi nedeniyle herhangi bir yoğunluk düzeltimi gerekli olmamıştır.

Dağınık kök ortajenezi, ABA tarafından etkilenmemiştir ancak pirabaktin, bu köklerin oluşumunu azaltmıştır (**Şekil 3**). Değerlendirilen farklı analoglar, dağınık kök oluşumunun uyarılmasını ve inhibisyonunu içeren çeşitli etkileri göstermiştir. Üç analog, E4, E6 ve E7, dağınık kök oluşumunun sırasıyla daha güçlü veya pirabaktin ile benzer bir azalımını vermiştir. Bu üç molekül ayrıca bunların AR oluşumu üzerindeki etkilerini daha iyi açıklamak üzere daha geniş bir konsantrasyon aralığında test edilmiştir. 10 μM 'de eklenen daha zayıf analoglar E8 ve E2, sırasıyla AR oluşumu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmamıştır veya bunu uyarmıştır (**Şekil 3**). Analog E4, bunun kullanılan konsantrasyonda hücrel toksisiteyi gösterdiğini öneren bitki gelişimi üzerinde güçlü bir inhibitör etkisine sahip olmuştur.

Fosfonamid analoglarının tohum çimlenmesi üzerindeki etkisi

Arabidopsis thaliana tohum çimlenmesi analizi

Arabidopsis thaliana tohumlarında çimlenme analizi, büyüme odasında tabakalaşması (5°C 'de 4 gün) ve sonraki büyümesi sırasında hormon içeren ortam üzerinde inkübe edilen olgun tohumlarda yer alır. Tohum çimlenmesi, büyüme odasında (25°C , $70 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık) 10 günden sonra değerlendirilir. Çimlenme, çimlenen tohumların sayısının başlangıçta plaka üzerine yayılan toplam tohuma oranını temsil eden bir yüzde olarak değerlendirilmiştir. ABA ve pirabaktin, farklı konsantrasyonlarda görüntülenmiştir. Her ikisi de tohum çimlenmesini inhibe etmiştir ve inhibisyon, aşamalı ve doza bağlı olmuştur. $50 \mu\text{M}$ 'de ABA, pirabaktinden daha güçlü bir şekilde tohum çimlenmesini inhibe etmiştir. Bu, daha önceden yayınlanan sonuçlar (Puli & Raghavendra, 2012) ile uyumludur. Ancak her iki moleküle yanıt, tohum

çimlenmesi sırasında pirabaktinin ABA benzeri etkisini doğrulayan bir şekilde çok benzerdir (**Şekil 4**).

10 μM 'de mevcut buluşun fosfonamid pirabaktin analoglarının etkisi tarafımızca analiz edilmiştir ve ABA ve pirabaktinin etkisiyle karşılaştırılmıştır. Fosfonamid pirabaktin analogları, sadece 1 bileşiğin, E5, tohumların çimlenmesinin yüzdesini önemli derecede azaltması nedeniyle tohumlanmanın zayıf inhibitörleri olmuştur (**Şekil 5**).

Fosfonamid analoglarının fide gelişimi üzerindeki etkisi

10

***Arabidopsis thaliana* fidesi gelişimi**

Ayrıca mevcut buluşun ABA, pirabaktin ve fosfonamid analoglarının varlığında sürgün gelişimi de tarafımızca analiz edilmiştir. ABA'nın varlığında yeni yaprakların ortaya çıkması ve bunların boyutu, kontrol, işlem görmemiş fideler ile karşılaştırıldığında azalmıştır (**Şekil 6 A, B**). Diğer bir taraftan pirabaktin, ABA kadar güçlü bir şekilde sürgün gelişimini etkilememiştir ancak 10 μM konsantrasyonda pirabaktin uygulandığında yaprak boyutu önemli derecede azalmıştır (**Şekil 6 C**).

20 Farklı pirabaktin analoglarının sürgün büyümesi üzerindeki etkisi ayrıca kaydedilmiştir. Özellikler bileşikler E4 ve E7, fidenin sürgün gelişiminin güçlü bir inhibisyonuna neden olmuştur. E4 ile tedavi edilen fidelerde, klorofilde bir azalma önerecek şekilde yapraklar sarıya dönmüştür ve albinolar oluşmuştur. Ayrıca gelişimde genel bir azalma meydana gelmiştir. E6, pirabaktin ile karşılaştırılabilir olarak yaprak boyutunun bir inhibisyonuna 25 neden olmuştur. Bileşik E2, kontrol ile karşılaştırıldığında yaprakların gelişimini uyarmıştır. Bileşikler E4 ve E6, tohumlanmayı inhibe etmemiştir ancak bunlar, yüksek dozlarda uygulandığında yaprakların beyaza dönmesi ve ayrıca gelişimin gecikmesi nedeniyle *Arabidopsis* fidelerine yönelik fitotoksik olabilir. Diğer bileşikler, fidelerin sürgün gelişimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmamıştır (**Şekil 6 D**).

30

Fosfonamid analoglarının gözenek kapanması üzerindeki etkisi

Yaprak dehidrasyon analizi

ABA ile önceden tedavi, gözenek kapanmasına neden olur ve böylece yaprakları kuraklık sırasında stomatal gözenekler aracılığıyla suyun aşırı buharlaşmasından korur. ABA'nın bu terleme önleyici özelliği, dünya çapında yaklaşık %50 verim kaybına neden olacak şekilde kuraklık ve su kısıtlamasının ürün verimliliğini sınırlandıran en önemli faktörler olması nedeniyle önemlidir (Jones & Corlett, 1992; Skirycz & Inzé, 2010). İşlem görmemiş yapraklarda su potansiyeli, yapraklar kuraklığa maruz kaldığında hızlı bir şekilde düşer. Bu yaprakların ABA ile önceden işleminden geçirilmesi, gözenekleri kapatarak su eksikliğini ve membran sızıntısını önler (Clifford et al, 1998; Islam et al, 2003). Su kaybı, yaprak ağırlığının ölçülmesiyle takip edilebilir. ABA ile önceden işlem gören numuneler, su buharlaşmasının azalması nedeniyle önemli derecede daha az ağırlık kaybı göstermiştir. Nispi su içeriği, taze ağırlığa, şişmiş ağırlığa (=rehidrasyondan sonraki kütle) ve kuru ağırlığa göre belirlenebilir (Clifford et al, 1998). Dehidrasyon analizi, bu prensibi takip edecek şekilde tasarlanmıştır. *Nicotiana benthamiana* yaprakları, 8 haftalık *ex vivo* bitkilerden uzaklaştırılmıştır. Koparılan yapraklar, 1 saat boyunca yaprak sapları suyun içine batırılarak şişkin halde saklanmıştır. Odun dokusuna bu şekilde uygun besleme meydana gelmiştir. Akabinde yapraklar, solüsyondan uzaklaştırılmıştır ve yaprak saplarının uçları silikon ile kapatılmıştır ve damar sistemi aracılığıyla su kaybını önlemek üzere parafilm ile kaplanmıştır. Tam olarak şişen yapraklar akabinde laminar akış kabini içinde bir hava akışına tabi tutulmuştur. Su kaybı, yaş yaprak ağırlığının periyodik ölçümü ile 6 saat boyunca görüntülenmiştir.

Bu analiz kullanılarak 10 ve 100 μ M ile ABA ön işlemleri ile su kaybına karşı koruma tarafımızca analiz edilmiştir. ABA tedavisi, bunun su kaybını azaltma kapasitesini gösterecek şekilde önemli derecede daha az ağırlık kaybına neden olmuştur (**Tablo 1**). Pirabaktin analogları ile ön işleme, 10 μ M konsantrasyonda olmuştur ve beş ila on katı yaprak, ilgili bileşikler içeren akuatik solüsyonlarda inkübe edilmiştir. Bunların ortalama ağırlık kaybı, **Tablo 7**'de temsil edilir. ABA ile benzer bir şekilde bileşikler E1, E9 ve E10, terlemede bir azalmaya neden olmuştur. Değerlendirilen diğer bileşikler, kontrol yapraklarından önemli derecede farklı olmamıştır (**Tablo 7**).

Tablo 1: ABA ile önceden tedavi edilen yaprakların ağırlık kaybı %'si. Verilen değerler, 5-10 yaprağın ortalamalarını göstermiştir ve standart hata, farklı işlemler arasındaki önemi gösterir.

İşlem	Ağırlık kaybı %'si (ortalama)	Standart hata
Kontrol	%29,51	2,28
10 μ M ABA	%18,54	3,94
100 μ M ABA	%16,99	1,87

Gözenek kapanması analizi

Pirabaktin analoglarının ABA benzeri etkisine yönelik diğer destek, gözenek açıklığı ölçümleri sonucunu çıkarmıştır. Gözeneklerde ABA'nın birikmesi, yaprak gözeneklerinin kapanmasına neden olur. Bitkiler akabinde mevcut su kaynaklarını daha etkili bir şekilde idare edebilir. Kuraklık yanıtına ve ABA benzeri aktiviteye yönelik bir ölçüm olarak gözenek kapanması, tütün (*Nicotiana tabacum*) ve *Arabidopsis thaliana* üzerinde incelenmiştir (Jones & Mansfield, 1970; Roelfsema & Prins, 1995; Thomas, 1970). Bu analize yönelik, bir kaplama kılıfının altında mikroskop lamı üzerine sabitlenen tütün epidermal şeritleri (yaprakların abaksiyal kenarından alınan) kullanılmıştır. Epidermal şeritler, bir tampon (10mM MES, 50mM KCl, 10 μ M CaCl₂ ve pH 6,5) ile temas ettirilmiştir ve lamlar, gözeneklerin ideal açılmasının sağlamak üzere 2 saat boyunca ışık altına koyulmuştur. Gözenek açıklığı, otomatik tablo (Olympus, CellIM™-Software) ile bir mikroskop kullanılarak ölçülmüştür. Gözenekler, 1 saat boyunca 5 dakikada bir sabitlenmiş pozisyonlarda görüntülenmiştir. Deneyin başlangıcında epidermal şeritler, perfüzyon prosesini görüntülemek üzere bileşikler ve bir damla bromo-fenol mavi içeren bir solüsyon ile muamele edilmiştir (solüsyon değişimi, filtre kağıdı ile bir uçta solüsyonun absorbe edilmesiyle tetiklenmiştir).

Bileşiklerin yokluğunda, 30 dakikaya kadar herhangi bir değişiklik olmadan 15 dakika sonra gözenek açıklığında yaklaşık %10'luk bir azalma gözlemlenmiştir (**Şekil 8**). Bu nedenle %10 gözenek kapanmasının önemli olduğunu düşünülmemiştir.

ABA, 5 dakika içinde %40'lık nispi bir açıklığa ulaşan gözenek açıklığının azalmasında oldukça etkili olmuştur (**Şekil 9 B**). Bezelyelerde (Puli & Raghavendra, 2012) olan ile benzer bir şekilde pirabaktin, hızlı bir şekilde ancak ABA'da çok daha düşük bir derecede gözenek kapanmasını indüklemiştir (**Şekil 9 B**).

Sonraki deneylerde mevcut buluşun pirabaktin analoglarının etkisi değerlendirilmiştir. Aktif ve aktif olmayan bileşikler tarafımızca bulunmuştur (**Şekil 10**). Bileşik E1, gözeneklerin kapanmasına neden olmamıştır ve işlem görmemiş gözeneklerde %10'luk bir içsel kapanma yer aldığı anda açılmayı indüklemiştir (**yukarıya bakınız, Şekil 10 A**).

- 5 Diğer bir taraftan E2, başlangıç açılmasının %50'sine gözenek kapanmasını indüklemiştir ancak gözeneklerin kapanma hızı, ABA'ninkinden daha düşüktür: E2'ye yönelik bu sadece 30 dakika sonra elde edilirken 10µM ABA varlığında gözenekler, 10 dakika (kapanmanın %50'si) içinde kapanmıştır (**Şekil 10 B**). Ayrıca analog E6, gözenek kapanmasını güçlü bir şekilde indüklemiştir (**Şekil 10 F**). Diğer bileşikler de
10 ayrıca orta seviyede gözenek kapanmasına neden olmuştur: E3, E4, E5, E8, E10 ve D3 (**Şekil 10 C, D, E ve H**). E7, E9, D1 ve D2 aksine gözenek açıklığının boyutunu etkilememiştir (**Şekil 10 G**).

- ABA ve ABA-agonistlerinin aksine bileşik E1, bu molekülün gözeneklerde tipik ABA
15 sinyalleme prosesini indüklediğini öneren bir şekilde gözenek açılmasını indüklemiştir. Bunun rapor edilen diğer ABA agonistleri ile gözlenmemesi nedeniyle bu etki etkileyicidir. E1'in etki modunun, diğer pirabaktin analoglarınınkinden farklı olduğu ve bunun ABA algısını etkisiz hale getirerek ABA sinyallesini etkileyebileceği veya
20 PYR/PYL reseptörleri ile alternatif bir etkileşim ile karşı aşağı yönlü bir regülasyon oluşturabileceği tarafımızca önerilir. Genel olarak pirabaktin analogları, bunların olası bir şekilde ABA agonistleri olarak hareket ettiğini doğrulayan bir şekilde ABA benzeri yanıtlar verir. Sonuçlar ayrıca gözenek açıklığının, su buharlaşmasını geliştirmek veya
25 bunun azaltmak üzere sentetik moleküllere maruz kalması aracılığıyla regüle edilebileceğini gösterir. Bu nedenle bu moleküller, gözenek regülasyonunda yer alan sinyalleme komplekslerini ve yollarını belirlemek üzere moleküler çalışmalarda oldukça faydalıdır. Ayrıca bileşiklerin belirli bir özgüllük seviyesi göstermesi nedeniyle bunlar, tarımsal uygulamaların geliştirilmesinde yardımcıdır.

Mevcut buluşun pirabaktin analoglarının tarımsal uygulaması

30

- Uygun olmayan koşullar altında bunların performansını muhafaza etmek üzere sesil organizmalar olarak bitkiler, koruyucu yollar üzerinde başlamak üzere endojen sinyallere bağlıdır (Raghavendra et al, 2010). Bu yolların manipülasyonu bu nedenle
35 bitki üretimi sağlamak üzere bir stratejidir ve ABA, kullanmak üzere hedef moleküldür.

ABA'nın topikal olarak püskürtülmesi, gözeneklerin kapanmasına ve kuraklık stresine karşı korumaya neden olur ancak bu ayrıca primer kök büyümesini ve yaprak gelişimini etkiler. Mevcut buluşun pirabaktin analogları, bu sınırları çözer.

- 5 **Tablo 2: Farklı pirabaktin analoglarının biyolojik yanıtlarının yorumu. Moleküllerin tamamı, 10 µM konsantrasyonda uygulanır ve kontrol işlem görmemiş tohumlar, fideler veya epidermal şeritler ile karşılaştırılır. Ayrı veriler yukarıda temsil edilir. 0 = kontrol ile önemli derecede farklı değil, +++ = çok güçlü etki (tohumlara, köklere ve sürgünlere yönelik inhibisyon veya gözenek kapanmasının indüksiyonu), ++ = güçlü etki, + = orta derecede etki ve - = karşı etki (örneğin tohumların, köklerin ve sürgünlerin stimulanları veya gözeneklerin açılması).**
- 10

Analog	Tohum çimlenmesi	PR	LR	AR	Sürgün	Gözenekler
ABA	+++	+++	+++	0	+++	+++
Pirabaktin	++	++	++	+++	++	+
E1	0	+	++	-	0	-
E2	0	0	+	-	-	+++
E3	0	0	+	-	0	++
E4	+	+++	+++	+++	+++	++
E5	+++	+	+	0	0	+
E6	0	++	+++	+++	++	+++
E7	0	+++	+++	+++	+++	0
E8	0	0	+-	0	0	++
E9	0	0	+	-	0	0
E10	0	+	+	-	0	+
D1	+	0	+-	0	0	+
D2	0	0	0	0	0	0
D3	0	0	0	0	0	0

Nemli bir yaz sonu iklimlerinde tohumların hasat öncesi filizlenmesi, önemli kayıplara neden olur (Gubler et al, 2005). Bu soruna yönelik dayanıksız olan mahsüller üzerinde tohum çimlenmesinin bir inhibitörü olarak ABA'nın püskürtülmesi, filizlenmesi sorunlarını çözebilir. Ancak ABA ayrıca bitkiler üzerinde diğer etkileri de indükler.

5 Bunun istenmemesi nedeniyle daha spesifik moleküllerin uygulanması, ikinci soruna yönelik bir çözümdür. Taranan analoglar arasında bir molekül E5 spesifik olarak tohum çimlenmesini inhibe eder ancak görüntülenen diğer biyolojik yanıtlar üzerinde sınırlı bir etkiye sahiptir (**Tablo 2**). Diğer bir ilginç analog ise, gözeneklerin kapanmasını etkileyen ve sürgün gelişimi ve dağınık kök oluşumu üzerinde pozitif etkilere sahip olan

10 E2'dir. Aynı zamanda E8, kök gelişimini etkilemeksizin bitkilerin kuraklığa toleransını geliştirmek üzere mahsüller üzerine püskürtülmek üzere uygun bir bileşiktir. ABA'nın aksine bu, kök büyümesinin daha derin su kaynaklarına erişimi sağlayacak şekilde muhafaza edilecek olması nedeniyle uzun stres koşullarında bir bitkinin gelişimine yönelik olumludur. Bu nedenle bu bileşiklerin tarımda saha uygulamalarına yönelik yeni

15 imkanlar sunması sonucu çıkarılır.

Referanslar

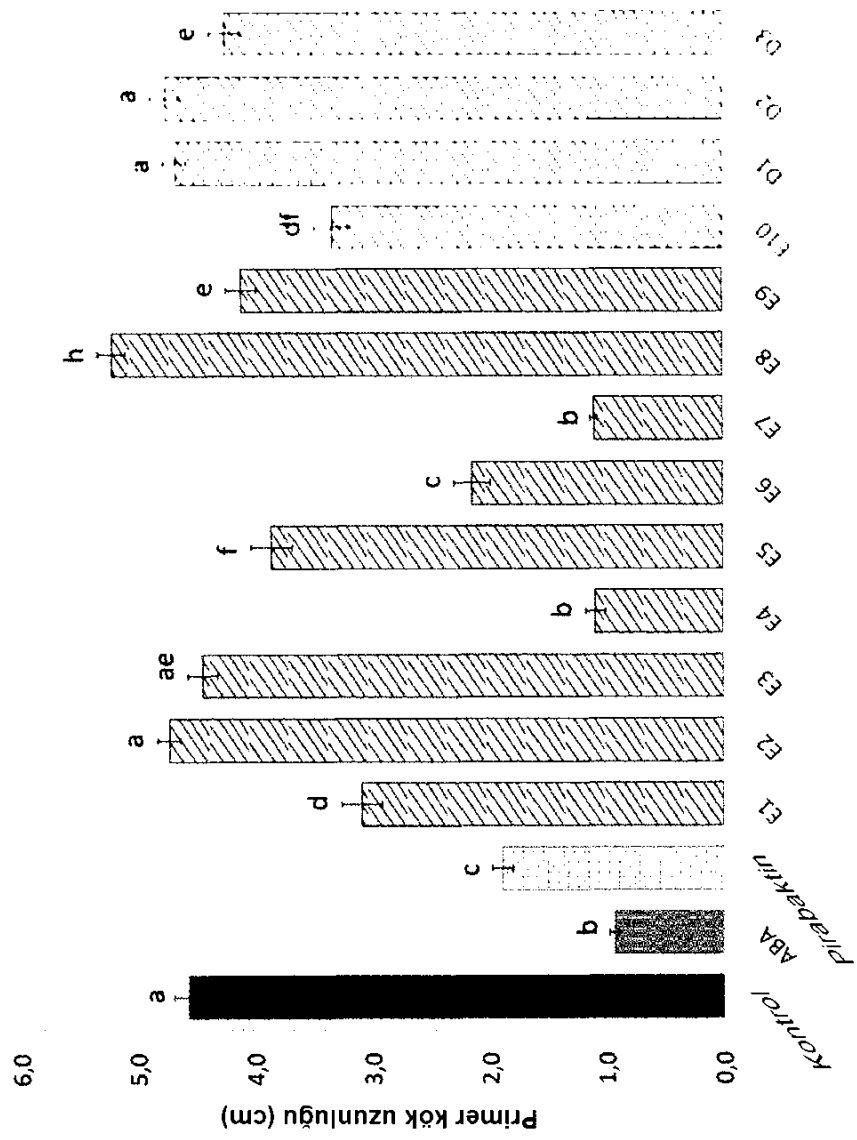
- 20 Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez PL (2011) News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 547-553
- Ashokan KV (2010) Docking studies on abscisic acid receptor pyrabactin receptor 1 (pyr1) and pyrabactin like receptor1 (pyl1). *International Journal of Environmental*
- 25 *Sciences* **1**: 314-322
- Audus L.J. and Quasterl J.H. (1948). The Growth-inhibitory Activity of the Sulphonamides and Plant Growth-substances, and the Effects thereon of p-Aminobenzoic acid. *Ann Bot* **12**: 27-34
- 30 Clifford SC, Arndt SK, Corlett JE, Joshi S, Sankhla N, Popp M, Jones HG (1998) The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J Exp Bot* **49**: 967-977

- Crowdy S.H. and Jones D. R. (1956). Partition of Sulphonamides in Plant Roots: A Factor in their Translocation. *Nature* **178**, 1165 - 1167
- Cutler SR, Park SY, Defries A. (2010) Control of plant stress tolerance, water use efficiency and gene expression using novel ABA receptor proteins and synthetic agonists Regents of the University of California, USA.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I. (2013). Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front Plant Sci.* 4:138
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**: S15-S45
- Garciaarrubio A, Legaria JP, Covarrubias AA (1997) Absciscic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* **203**: 182-187
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 183-187
- Hao Q, Yin P, Yan C, Yuan X, Li W, Zhang Z, Liu L, Wang J, Yan N. (2010). Functional mechanism of the absciscic acid agonist pyrabactin. *J Biol Chem.* **285**:28946-52.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early absciscic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* **24**: 1695-1708
- Islam MA, Blake TJ, Kocacinar F, Lada R (2003) Ambiol, spermine, and aminoethoxyvinylglycine prevent water stress and protect membranes in *Pinus strobus* L under drought. *Journa of Experimental Botany* **17**: 278-284
- Jones HG, Corlett JE (1992) Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science* **119**: 291-296
- Jones RJ, Mansfiel.T (1970) Suppression of stomatal opening in leaves treated with absciscic acid. *J Exp Bot* **21**: 714-&

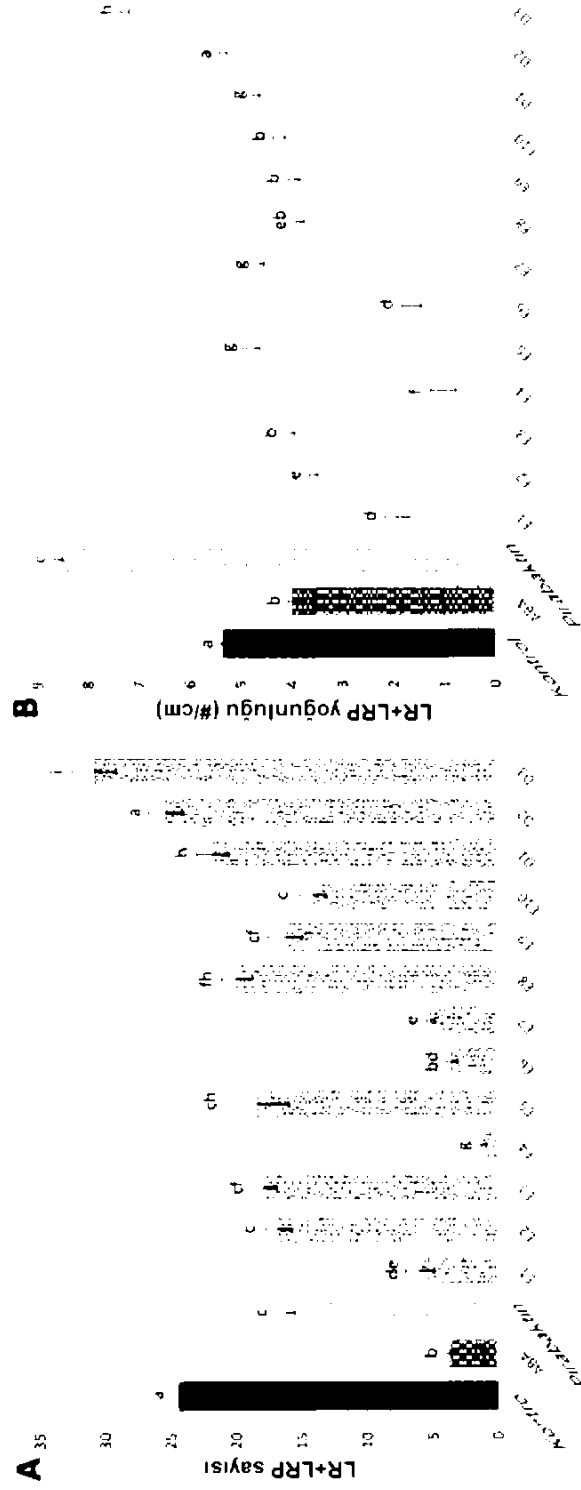
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J. (2011) Absciscic acid signal off the STARting block. *Mol Plant*. 2011 Jul;4(4):562-80
- Kitahata N, Asami T. (2011) Chemical biology of abscisic acid. *J Plant Res*. **124**:549-57
- 5 Linkies A, Leubner-Metzger G (2012) Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* **31**: 253-270
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang YH, Li JY, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**: 602-U672
- 10 Melcher K, Zhou XE, Xu HE. (2010a) Thirsty plants and beyond: structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling. *Curr Opin Struct Biol*. **20**:722-9.
- 15 Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Chinnusamy V, Suino-Powell KM, Kovach A, Tham FS, Cutler SR, Li J, Yong EL, Zhu JK, Xu HE. (2010). Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol*. **17**:1102-8.
- 20 Mosquna A, Peterson FC, Park SY, Lozano-Juste J, Volkman BF, Cutler SR. (2011). Potent and selective activation of abscisic acid receptors in vivo by mutational stabilization of their agonist-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**:20838-43.
- 25 Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y (2010) Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci Res* **20**: 55-67
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **22**: 1068-1071
- 30

- Peterson FC, Burgie ES, Park SY, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang CA, Cutler SR, Phillips GNJ, Volkman BF (2010) Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1109-1113
- 5 Puli MR, Raghavendra AS (2012) Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **63**: 1349-1356
- Roelfsema MRG, Prins HBA (1995) Effect of abscisic acid on stomatal opening in
10 isolated epidermal strips of abi mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **95**: 373-378
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A. (2012), 'Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation
15 under long-term drought stress?'. *Gene*, **506**:265 - 273.
- Skirycz A, Inzé D (2010) More or less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 197-203
- 20 Thomas DA (1970) The regulation of stomatal aperture in Tobacco leaf epidermal strips. *Australian Journal of Biological Sciences* **23**: 961-980
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL.(2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**:20260-4.
25
- Mucha A, Kunert A, Grembecka J, Pawelczak M, Kafarski P (2006) A phosphoramidate containing aromatic N-terminal amino group as inhibitor of leucine aminopeptidase - design, synthesis and stability. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**: 768-772.
- 30 Xie L, Ding Y, Wang Y, Ding Y (2009) Synthetic strategy of o-hydroxyphenyl(ethynyl)phosphinates. *Chinese Journal of Chemistry* **27**: 1387-1390.

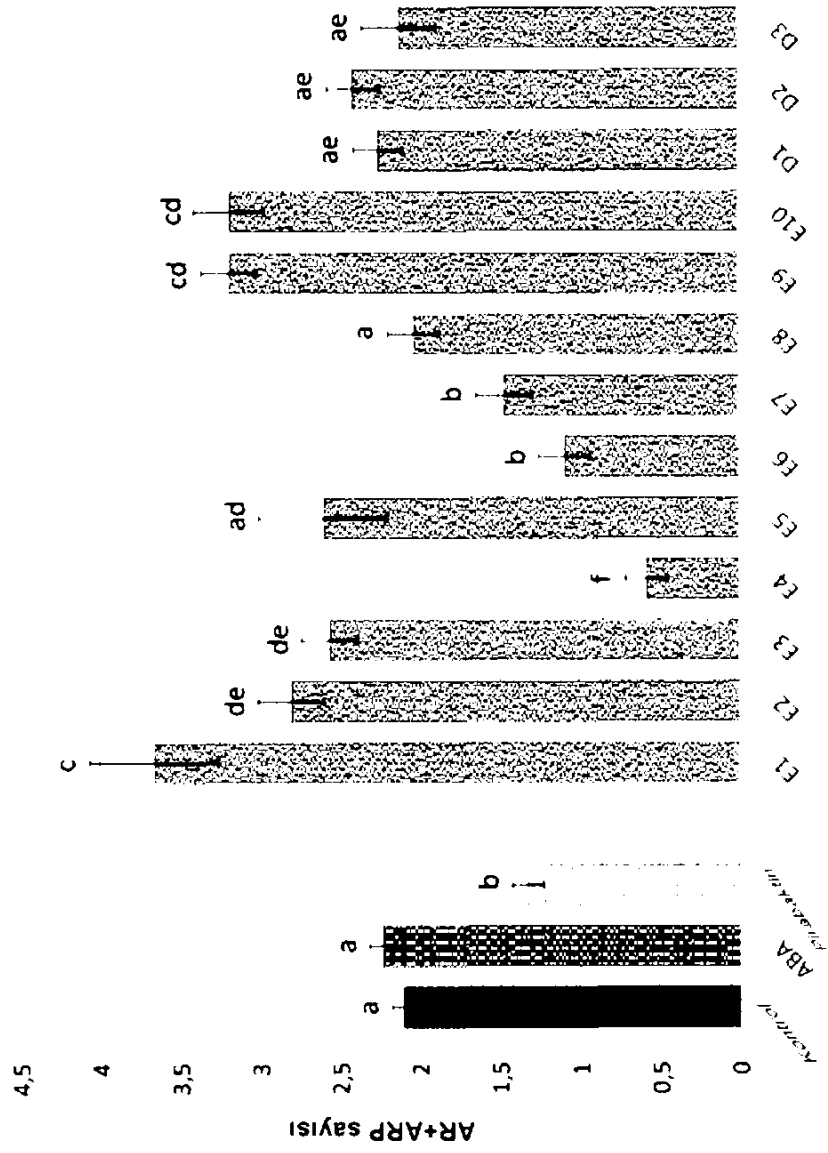
Zhang, W. and Gusta, L.V. (2010). Germination response of black and yellow seed coated canola (*Brassica napus*) lines to chemical treatments under cold temperature conditions. *Plant Growth Regulation* **60**:105-114.



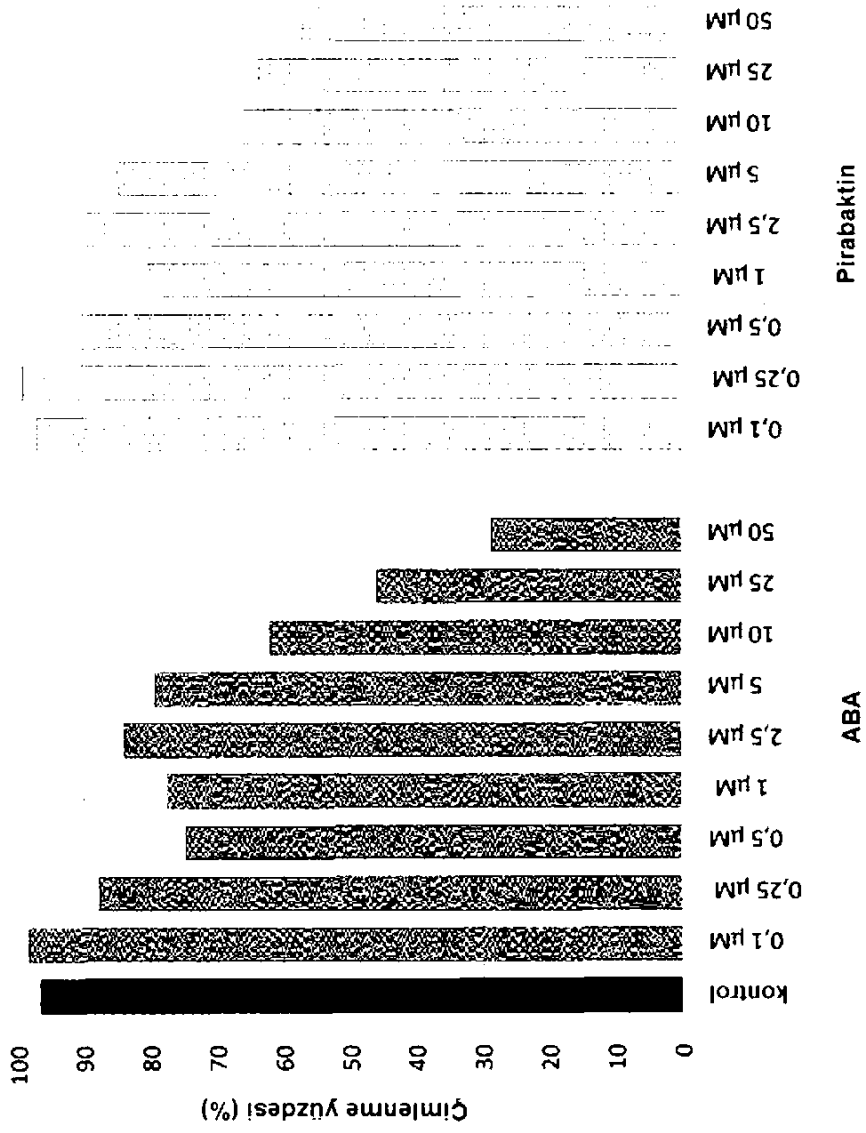
Şekil 1



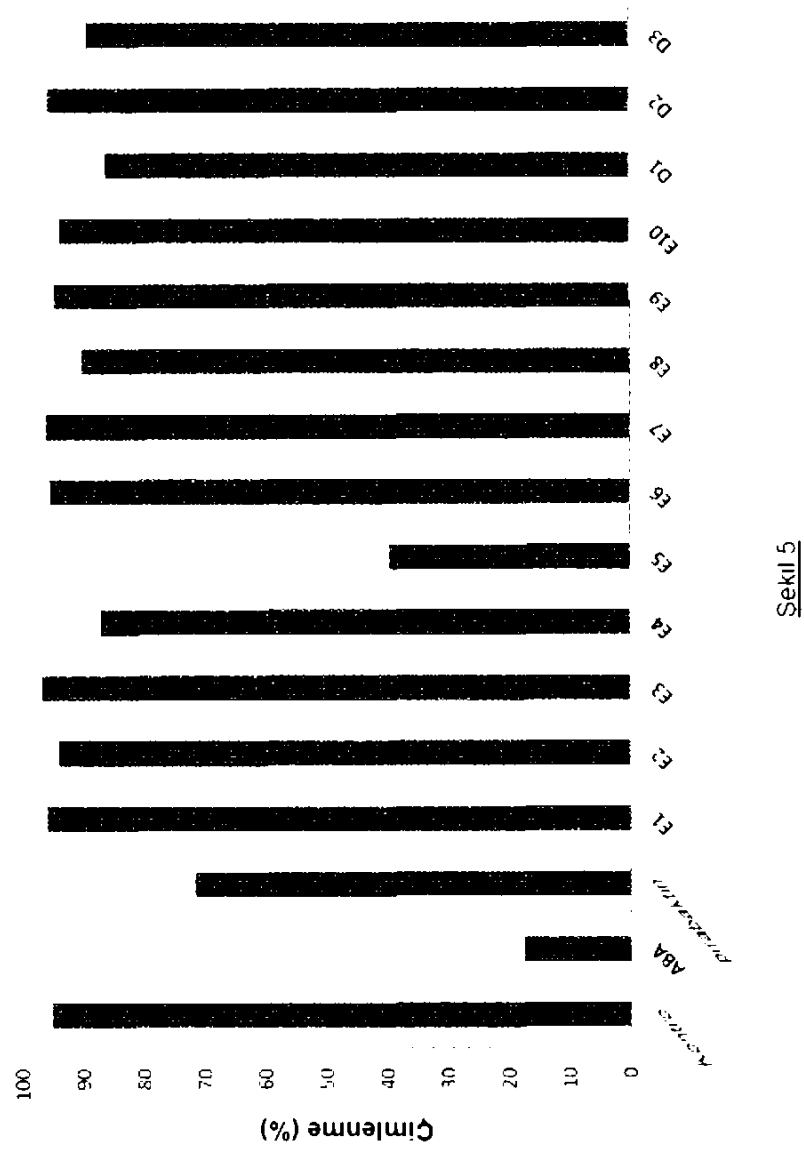
Sekil 2

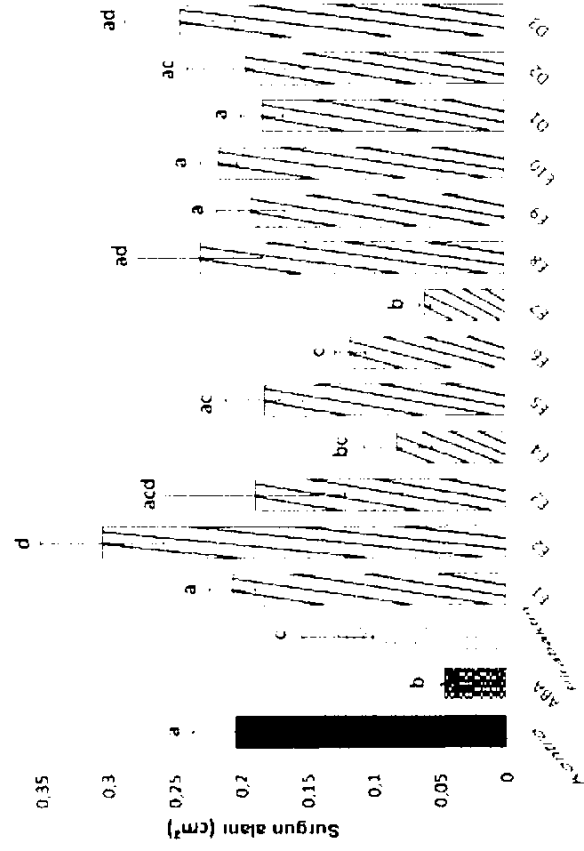
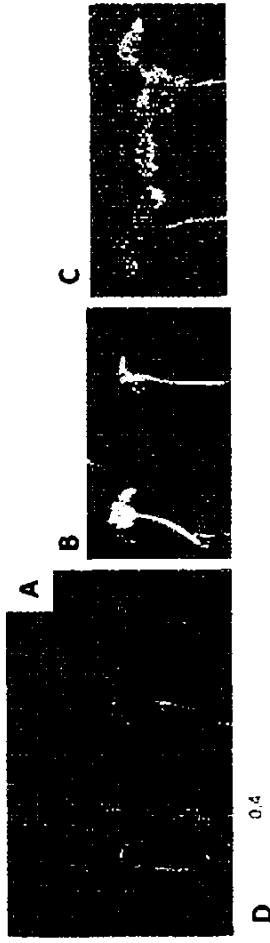


Şekil 3

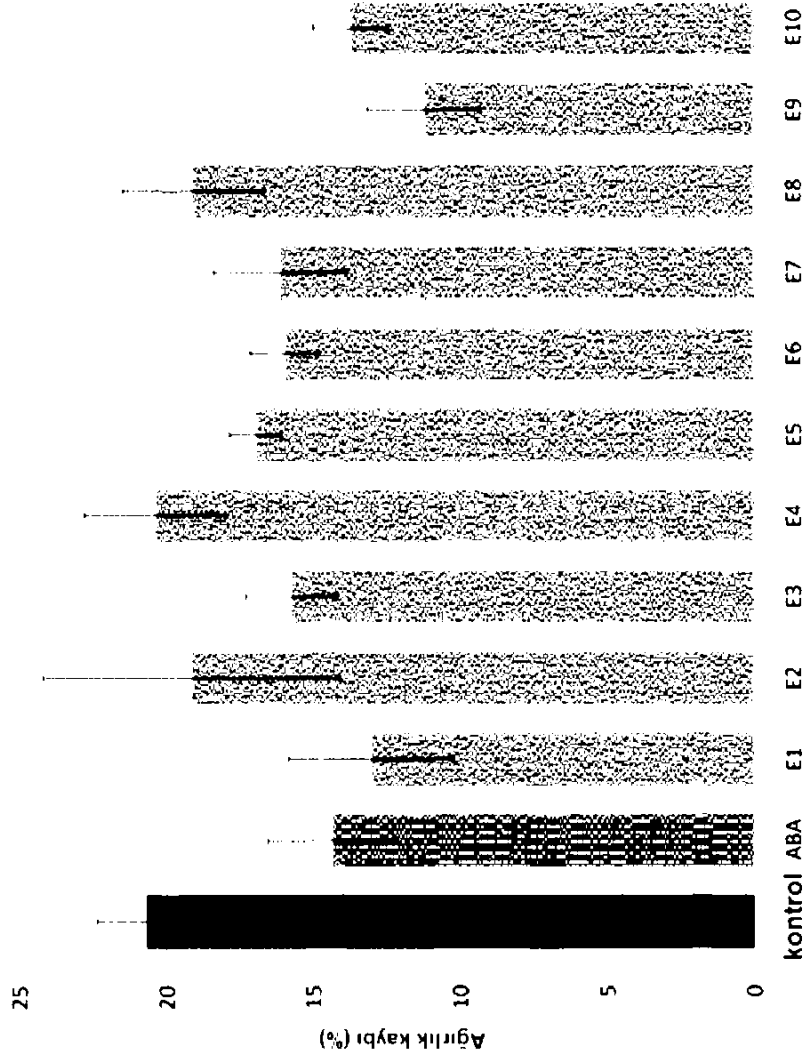


Şekil 4

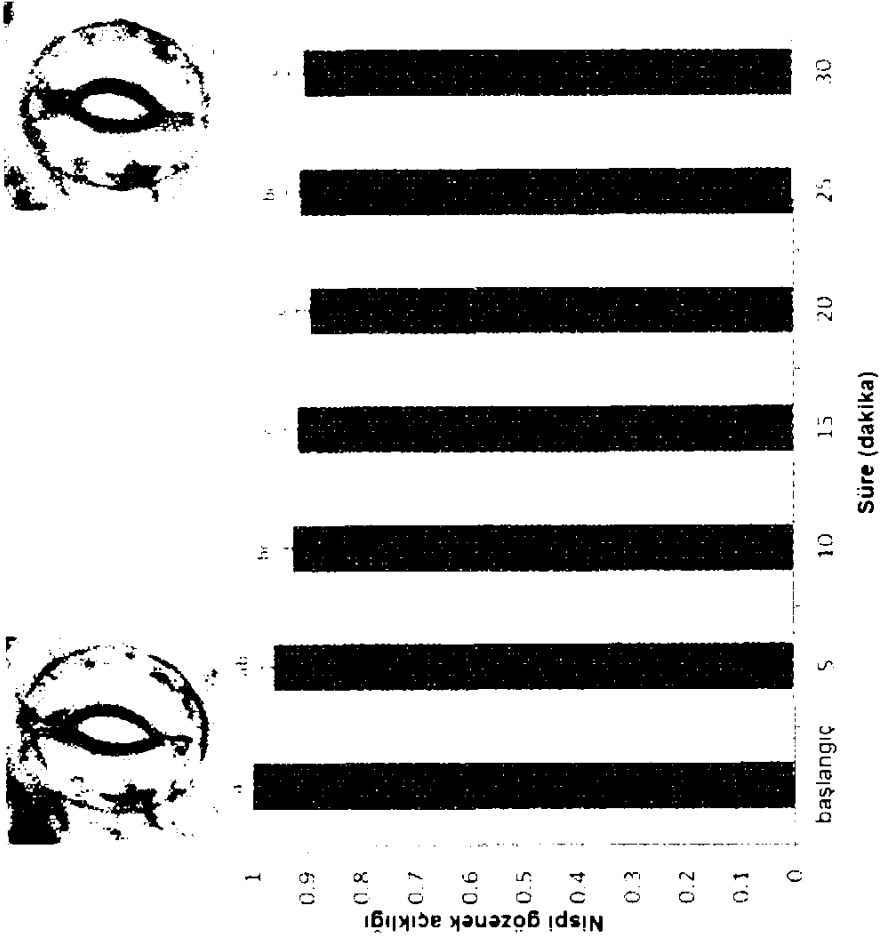




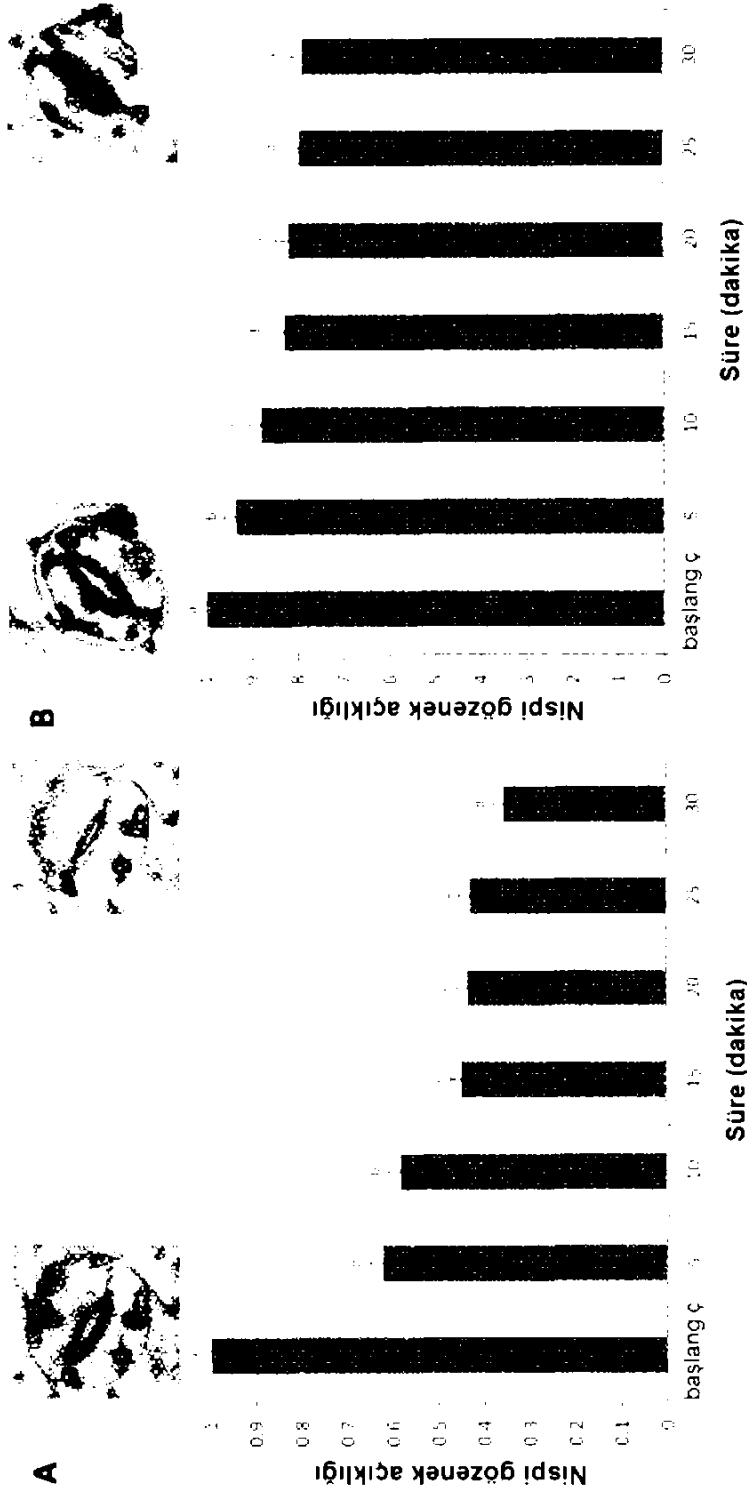
Sekil 6



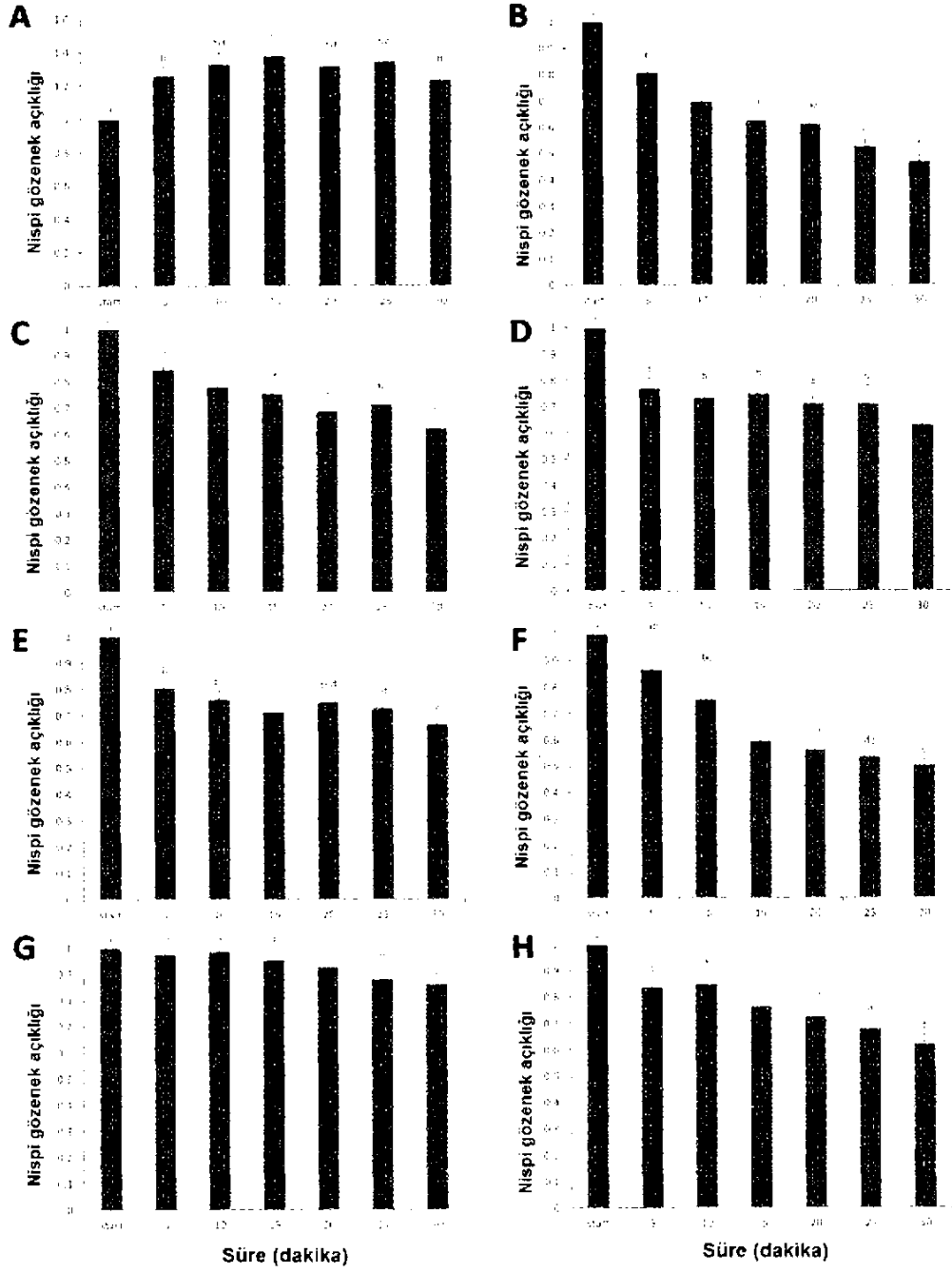
Şekil 7



Şekil 8



Sekil 9



Şekil 10