

# ***Axi 1* (Oksinden Bağımsız) Geninin, *Rhizobium leguminosarum* bv. PRE ile Aşıl原因mış Bezelye Bitkisinin Kök Uçlarındaki *in situ* Lokalizasyonu**

Yeşim YALÇIN MENDİ, Katharina PAWLOWSKI, Selim ÇETİNER  
Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Balcalı, Adana - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.06.1999

**Özet :** *Axi 1*, bütün bitkilerinden izole edilmiş ve şimdiye kadar karakterize edilen tek oksinden bağımsız gelişmeden sorumlu olan genidir. Bu çalışmada, *axi 1* geninin, azot fiksasyonunun farklı aşamalarındaki kortikal hücre bölünmesi üzerine etkisi ve polar oksin taşınımındaki olası rolü araştırılmıştır. Bezelye bitki köklerinin *Rhizobium leguminosarum* PRE suşu ile aşıl原因masından 24 saat, 48 saat, 6 gün ve 10 gün sonra alınmış kök ve nodül örneklerinde *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak, *axi 1* geninin ekspresyon yerleri belirlenmiştir. Bakteri ile aşıl原因mış kök ve nodül dokuları incelendiğinde, *axi 1* gen ekspresyonunun vasküler dokunun floem tabakasında olduğu saptanmıştır. Bakteri ile aşıl原因dıktan 10 gün sonraki kök nodülünde ise vasküler dokunun floem tabakasına ek olarak nodül meristematik dokusunda ve azot fiksasyonunun gerçekleştiği nodülün orta kısımlarında da *axi 1* geninin ekspresyon yerleri saptanmıştır. Sonuçlar, *Axi 1* geninin de azot fiksasyonu ve polar oksin taşınımında rol oynadığına işaret etmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *Axi 1*, gen ekspresyonu, bezelye, nodül

## ***In situ* Localisation of *Axi 1* (Auxin Independent) Gene in *Rhizobium leguminosarum* Inoculated Root Tips of Pea Plants**

**Abstract :** *Axi 1* is the only characterized auxin independent gene in tobacco plants. In this study, the effect of *axi 1* gene on cortical cell division during different stages of nitrogen fixation and on the role of polar auxin transport were investigated. Root and nodule samples were taken from pea seedlings 24 hours, 48 hours, 6 days and 10 days after inoculation with *R. leguminosarum* PRE strain. Using *in situ* hybridisation, the location of the *axi 1* gene expression in root and nodule tissues was identified. The results showed that in root tissues inoculated with *Rhizobia*, the *axi 1* gene is expressed on the phloem tissue of the vascular bundle. In the 10-day-old nodule tissues, the gene expression was found in the phloem tissue, around the nodule bundle and nodule meristematic region. The results obtained indicate that also *Axi 1* gene plays a role in nitrogen fixation and auxine transport.

**Key Words:** *Axi 1*, gene expression, pea, nodule

## **Giriş**

Bitki dokularında C, O ve H'den sonra en fazla bulunan N atomu, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında yer almaktadır. Ancak atmosferin % 78'ini oluşturan serbest azot (N<sub>2</sub>), bitkiler tarafından kullanılabilir formda değildir. Bu nedenle bitkiler, gelişmeleri için büyük öneme sahip olan bu elementi, azotlu bileşikler halinde topraktan alırlar. Çoğu bitkiler (baklagillerin dışında) için azot kaynağını, organik maddelerin parçalanması ile açığa çıkan organik azot ve toprağa eklenen inorganik azotlu gübreler oluşturmaktadır (Taiz and Zeiger, 1991).

Bazı bakteriler havadaki azot gazını kendilerinin ve diğer bitkilerin kullanabilecekleri azotlu bileşiklere çevirebilmektedirler. Bu olaya azot fiksasyonu adı verilmektedir. Siyanobakteriler gibi bazı azot bağlayıcı

bakteriler toprakta bağımsız olarak yaşarlar ve azotu bağlarlar. Fakat *Rhizobium* adı verilen bakteriler toprakta bağımsız yaşadıkları zaman azot gazını bağlama yeteneğinde değillerdir. Ancak baklagiller familyasından bezelye, bakla ve üçgül gibi bazı bitkilerin köklerini enfekte ettikleri zaman nodül adı verilen ufak yumrucukların oluşumlarına sebep olarak, bu bitkilerle ortak yaşamaya başlar ve azotu bağlama yeteneği kazanırlar (Taiz and Zeiger, 1991).

Simbiyotik azot fiksasyonu; konukçu bitki (baklagiller), nodül oluşturacak bakteri (*Rhizobium*) ve yeni organ (nodül) olmak üzere üç biyolojik yapı altında incelenmektedir (Lankhorst et al., 1990). Bakteri - bitki interaksyonu esnasında ilk atak, baklagil bitki kök tüylerinin flavonoid adı verilen sekonder metabolitleri

salgılaması ile gerçekleşmektedir. Flavonoidler bakterideki Nod D geni tarafından algılanarak, diğer nod genlerinin aktif hale geçmesini sağlamaktadırlar. Nod genleri nod faktör olarak adlandırılan spesifik lipooligosakkaritlerin sentezlenmesine neden olmaktadır. Bakteri tarafından salgılanan bu nod faktörler, bitki kökleri üzerinde; kök tüylerinin deforme olmasında (Sprenst, 1990), infeksiyon iplikçığının oluşumunda (Rolfe and Gresshoff, 1988), bakterilerin bitki kök dokuları içerisine girmesinde ve korteks tabakasında yer alan hücre bölünmesinde rol oynamaktadır (Bergersen, 1982). Bunun sonucunda ilk olarak nodül meristematik bölgesi oluşmakta ve devam eden hücre bölünmesi sonucunda olgun nodül oluşumu tamamlanmaktadır (Yang et al., 1994).

Bitkiler ve mikroorganizmalar arasında simbiyotik ve patojenik etkileşimler meydana gelmekte ve bunlar çok geniş araştırmalara konu olmaktadır. Her iki etkileşim tipinde de mikroorganizmalar yaşam döngülerinin belirli kısımlarını bitki doku ve hücreleri içerisinde geçirirler. Endofitik mikroorganizmaların tanımlanması ve etkileşim esnasındaki gen ekspresyon yerlerinin belirlenmesi amacıyla ya markör genlerini içeren transjenik bakteriler kullanılmakta ya da *in situ* hibridizasyon yöntemi uygulanmaktadır. Sitolojik veya histolojik hibridizasyon olarak da adlandırılan *in situ* hibridizasyon; hücre ve dokulardaki gen ekspresyon yerlerinin belirlenmesini ve bir doku parçası içerisinde tek bir hücreye özgü RNA veya DNA dizinlerinin saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. *In situ* tekniği ilk olarak, radyoaktif olarak işaretlenmiş probun kullanılmasıyla DNA dizin yerlerinin belirlenmesi amacıyla, daha ileriki yıllarda ise ökaryotik mRNA'ların ve viral DNA dizinlerinin lokalizasyonunda ve aynı zamanda kromozomal lokasyondaki genlerin haritalanmasında uygulanmıştır.

Bitkisel hormonlar üzerinde yapılmış olan çalışmalar, özellikle oksin ve sitokininlerin nodül oluşumunun başlangıç aşamasındaki korteks tabakasında yer alan hücre bölünmesinde direk etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Daha ileriki çalışmalarda ise oksinden sorumlu mutantlar tanımlanmış ve bunların bitki içerisindeki hormonal etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, *Nicotiana tabacum* SRI protoplastlarını, hygromycin dayanıklılık geni ve CaMV 35S RNA promotörünü içeren T-DNA vektör plazmidini bünyesinde bulduran agrobacterium hücreleri ile transforme etmişlerdir. DNA'nın bitki genomuna girişinden sonra oksin bulunmayan ortam

içerisinde protoplastların gelişimlerine göre seçim yapmışlar ve elde ettikleri hattı *Axi 159* olarak adlandırmışlardır (Hayashi et al., 1992).

'DNA tagging' yöntemi kullanılarak *axi 159*'dan *axi 1* (oksinden bağımsız) geni karakterize edilmiş ve bilgisayar analizleri sonucunda, *axi 1* geninin, karakterize edilmiş hiç bir bitki geninin kodlanmış bölgeleri ile benzerlik göstermediği saptanmıştır. Southern blot analizi ile *axi 1* geninin tütün ve Arabidopsis içerisinde küçük bir gen topluluğu tarafından karakterize edildiği ortaya çıkarılmıştır. *Axi 1* geninin yüksek oranda sentezlendiği takdirde tütün protoplastlarına oksinden bağımsız olarak bölünebilme yeteneği kazandırdığı ve ayrıca oksine bağlı olarak artan hücre bölünmesinde ve oksin sinyallerinin iletilmesinde de rol oynadığı saptanmıştır (Walden et al., 1994). Aynı araştırmacıların hipotezlerine göre *axi 1*, sadece kendi ekspresyonunda değil aynı zamanda hücre bölünmesi ile sonuçlanan diğer genlerin de aktivasyonunda direk veya indirek olarak rol oynamaktadır.

Araştırmada, *axi 1* (oksinden bağımsız) geninin bezelye kök ve nodül dokulardaki gen ekspresyon yerlerinin belirlenmesi ve nodülasyon ile ilişkisinin araştırılması amacıyla *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırmada bitki materyali olarak Wageningen Ziraat Üniversitesinden sağlanmış olan Rondo (*P.sativum*) bezelye çeşidi, bakteri materyali olarak ise *Rhizobium leguminosarum* PRE suşu kullanılmıştır.

Genetik materyal olarak ise bezelye ve fiğ bitkisi arasındaki yüksek gen benzerliğinden dolayı fiğ bitkisinden izole edilmiş olan ve pBluescript plasmidi içerisine klonlanmış *axi 1* (oksinden bağımsız) geni (Yalçın-Mendi ve ark., 1998) prob olarak kullanılmıştır. *V. sativa*'dan homolog dizinleri izole edilmiş olan *axi 1* geni, Almanya'nın Köln şehrindeki Max-Planck Enstitüsünden temin edilmiştir.

### Probu hazırlanması

*V. sativa* (fiğ) 'dan izole edilmiş olan *axi 1* gen klonu (Yalçın-Mendi ve ark., 1998) *Sac I* ve *Hind III* restriksiyon enzimleri ile kesilerek düz hale getirilmiştir. Prob hazırlanması sırasında 1 µg/µl lineer plazmid, 2 ml DIG-dNTP (etiketleme karışımı), 4 µl 5x tampon çözeltisi

(T7/T3), 1 µl T7/T3 RNA Polymeraz enzimi ve otoklav edilmiş saf su ile 20 µl 'ye tamamlanarak 37 °C 'de 2 saat süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 µl RNase 'den arındırılmış DNase eklenerek 37 °C'de 15 dakika tekrar inkübe edilmiş ve 2 µl EDTA (0.2 M, pH: 8.0), 2.5 µl LiCl (4 M) ve 75 µl saf alkol ile -20 °C'de bir gece boyunca çöktürülmüştür. Çökelmiş olan düz DNA, % 70 'lik etil alkol ile yıkanarak vakum altında kurutulmuş ve 100 µl otoklav edilmiş saf su içerisinde çözülmüştür. DNA'nın hidrolizi sırasında, hazırlanmış olan 100 µl DNA'nın 50 µl 'si ayrılarak üzerine 30 µl 0.2 M Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>, 20 µl NaHCO<sub>3</sub> eklenmiş ve 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla, 3 µl 3 M NaAc, pH: 6.0, 5 µl 10 % glacial asetik asit, 1µl 10 µg tRNA taşıyıcısı eklenmiş ve hidrolize olmuş DNA etil alkol ile çöktürülmüştür.

### Tohumların Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

Araştırmada, yüzey sterilizasyonunu sağlamak amacıyla tohumlar, ilk olarak % 7' lik Na-hipoklorid, daha sonra % 37'lik hidrojen peroksit çözeltisinde bekletilmiş ve steril saf sudan geçirilmişlerdir. Sterilize edilmiş tohumlar % 1 oranında agar içeren petrilere ekilmişlerdir. Her bir petri içerisinde bir bitkicik olacak şekilde tohumlar ekilmiş ve lateral köklerin gelişimi sağlanmıştır.

### Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Bitkilerin bakteri ile aşılama esnasında YEM (5 g/l mannitol, 0.5 g/l maya özü, 0.2 g/l MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l NaCl, 0.5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 15 g/l Agar (Difco) olarak adlandırılan bakteriyel besi ortamı kullanılmıştır. Sterilizasyondan hemen sonra ortam sıcaklığı yaklaşık 30-40 °C'de iken % 16 yoğunluğunda hazırlanmış 1 ml CaCl<sub>2</sub> çözeltisi filtreden geçirilerek, steril koşullarda ortama eklenmiştir. Petri kaplarına dağıtılan ortam üzerine *Rhizobium* bakterisi steril bir "öze" yardımı ile çizilmiş ve 28-30 °C 'de 2-3 gün süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Daha sonra gelişen bakterilerden tek bir koloni alınarak tekrar aynı oranda CaCl<sub>2</sub> içeren 5 ml sıvı YEM ortamına aşılama yapılmıştır. 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 2 gün süreyle gelişmeye bırakılmış ve " spektrofotometre" yardımı ile bakteri yoğunluğu ölçülerek, O.D<sub>600nm</sub> = 0.2-0.3 değerine geldiğinde ortam inkübatörden çıkarılmıştır.

### Bitkilerin Bakteri ile Aşılması

Gelişen lateral kökler üzerinde kök tüyüçüklerinin görünmeye başladığı kısımların yan tarafları jel üzerinden siyah mürekkeple işaretlenerek bakterinin aşılama

kısım belirlenmiştir. Son olarak 28-30 °C'de 2 gün süreyle geliştirilmiş bakteri kültürü, mikropipetlerin yardımı ile kök tüyüçüklerinin çıkmaya başladığı yani ileride nodül yapısının oluşacağı yerin üzerine damlatılmış ve 22 °C sıcaklıktaki büyütme odalarında inkübe edilmişlerdir.

### In situ hibridizasyon

*Rhizobium* bakterisi ile aşılama 24 saat, 48 saat, 6 gün ve 10 gün sonra alınmış olan kök ve nodül dokuları keskin bir jilet yardımı ile yaklaşık 100 µm kalınlığında olacak şekilde kesilerek % 4 paraformaldehide, % 0.25 glutaraldehide, 0.08 M EGTA, % 10 DMSO ve Na-fosfat içeren fiksatif solusyonunda fikse edilmişlerdir. In situ hibridizasyonunda Tautz ve Pfeifle (1989)'in kullandıkları metod aşağıdaki şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Kök ve nodül dokuları sırasıyla Na- fosfat solusyonu, metil alkol ve etil alkol içerisinde bekletilmiş ve -20 °C 'de 2 gün süreyle etil alkol 'de muhafaza edilmişlerdir. Dokular hibridizasyon öncesinde sırasıyla 1/1 oranında ethanol/ksilen, Na-fosfat (% 0.1 Tween 20) ve Proteinaz K solusyonu içerisinde bekletilmişlerdir. Proteinaz-K uygulamasının amacı RNA'dan proteinlerin uzaklaştırılması ve probun hücre dokuları içerisinde ilgili mRNA'ya ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Dokular son olarak hibridizasyon solusyonu içerisinde yaklaşık 1-2 saat 42 °C'de inkübe edilmişlerdir. Yaklaşık 18 saat süresince prob (Yalçın-Mendi ve ark., 1998) ile inkübe edilmiş olan dokular ilk olarak NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH: 7.5, 1 mM EDTA) solusyonundan, RNaseA uygulamasından (40 µg/ ml RNaseA) ve antikor içeren (1/2000 oranında seyreltilmiş) Na-fosfat solusyonundan geçirilmişlerdir. RNaseA uygulaması ile sadece dokular üzerinde hibridize olmuş mRNA 'lar kalmakta ve diğerleri parçalanmaktadır. Antikor içeren solusyonda + 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiş dokular, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) ve nitroblue tetrazolium (NBT) olarak adlandırılan boya maddeleri ile boyanmışlardır. Sense prob, kontrol olarak kullanılmıştır.

### Sonuç ve Tartışma

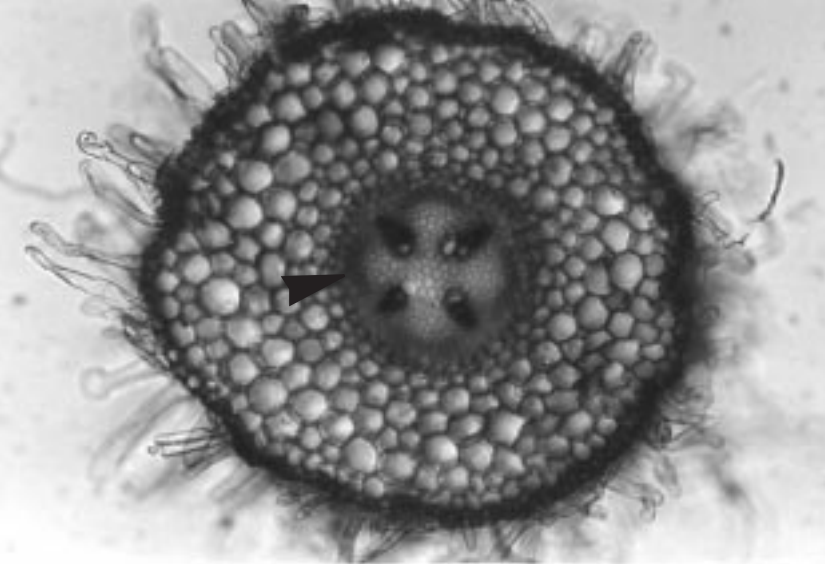
**Bakteri ile Aşıldıktan 24 saat Sonra Bezelye Kök Dokularındaki *Axi 1* (Oksinden Bağımsız) Geninin Ekspresyon Durumu**

Metod bölümünde belirtildiği şekilde bakteri ile aşıldıktan 24 saat sonra alınmış doku parçaları, radyoaktif olmayan digdNTP ile etiketlenmiş olan *axi 1* geni ile hibridize edilmiştir. 'Antisense' (T7) RNA ile

hibridizasyon sonucunda; floemi çevreleyen bölünebilen hücrelerde *Axi 1* geninin ekspresyonunu gösteren koyu renkte boyanmış dokular saptanmıştır (Şekil 1).

Kontrol olarak kullanılan "sense" RNA probunda hiç bir sinyalin görülmemesi ancak "antisense" RNA ile hibridizasyon sonucunda floemi çevreleyen bölünebilen hücrelerde genin ekspresyon yerlerine rastlanması, bu genin ilk olarak vasküler dokunun farklılaşmasında yani floem ve ksilem iletim demetlerinin oluşumundan önce meydana gelebilecek hücre bölünmesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Bakteri ile aşılandıktan 24 saat sonra alınmış olan kök dokularında bu genin eksprese ediliyor olması *axi 1* 'in sadece kendi ekspresyonunda değil aynı zamanda nodül primordiasının oluşumuna neden olacak sitokinin/oksin dengesinin ayarlanmasında ve kortikal hücre bölünmesi esnasında sentezlenecek nodülün genlerinin aktive edilmesinde direkt veya indirek olarak rol oynayabileceğini göstermektedir.

Nap ve Bisseling (1990)'de ENOD 2, ENOD 5, ENOD 12 ve ENOD 40 genlerinin nodül oluşumunun ilk aşamasında rol oynadığını belirtmişlerdir. Roussis ve ark., (1995) ise ENOD 40 erken nodulin genini bakla bitkisinden izole etmişler ve *in situ* hibridizasyon çalışmaları sonucunda bu genin nodül primordiyumunun merkez bölgesindeki hücrelerde ve özellikle de nodül vasküler dokusunun perisaykıl bölgesinde sentezlendiğini saptamışlardır. Bu çalışmalar *axi 1* geninin ve diğer oksin ve sitokinin sentezinden sorumlu olan genlerin, erken nodulin genlerinin sentezinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 1. Bakteri ile aşılanmış 24 saatlik kök dokusu. " Antisense " (T7) RNA ile hibridize olmuş dokularda (floemi çevreleyen bölünebilen hücrelerde) *axi 1* geninin sentezlenmesi.

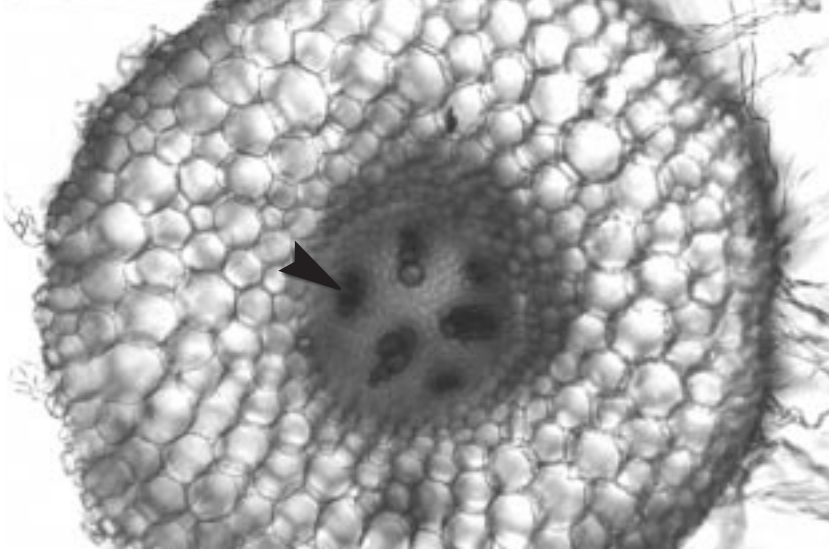
### Bakteri ile Aşılandıktan 48 saat sonra Bezelye Kök Dokularındaki *Axi 1* (Oksinden Bağımsız) Geninin Ekspresyon Durumu

"Antiense" (T7) RNA ile hibridize edilmiş olan dokularda, bakteri infeksiyonunun gerçekleştiği vasküler dokunun floem tabakasında gen ekspresyonunun olduğu, koyu renkte boyanmış kısımlara bakılarak tespit edilmiştir (Şekil 2).

Bakteri ile aşılandıktan 48 saat sonra alınan kök dokularında, vasküler dokunun artık farklılaştığı, floem ve ksilem iletim demetlerinin oluşumlarını tamamladığı ve *axi 1* geninin floemi çevreleyen dokular yerine floem 'de sentezlendiği görülmüştür.

Baklagil bitkileri ve *Rhizobium*'un etkileşimi sonucunda bakteri tarafından salgılanan nod faktörler ve bitkide yer alan flavonoidler, oksin transport inhibitörü olarak görev yaparak oksinin kambiyum dokusundan kortikal hücrelere doğru olan akışını engellemektedir (Roussis et al., 1995). *Axi 1* geninin de kambiyum dokusunun floem tabakasında sentezleniyor olması, bu genin de "polar oksin taşınımı" mekanizmasında direkt veya indirek olarak etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Jacobs and Rubery, (1988)'de raporlarında flavonoidlerin doğal olarak oluşan oksin transport inhibitörü olduğunu ve oksin transportunu engelleyen alıcılara bağlanarak içsel hormon dengesini değiştirdiğini ve oksinin sitokininlere olan oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir.



Şekil 2. Bakteri ile aşılansmış 48 saatlik kök dokusu. " Antisense " (T7) RNA ile hibridize olmuş dokularda (floemi çevreleyen bölünebilen hücrelerde) *axi 1* geninin sentezlenmesi.

#### Bakteri ile Aşlandıktan 6 Gün Sonra Bezelye Kök Dokularındaki *Axi 1* (Oksinden Bağımsız) Geninin Ekspresyon Durumu

Bakteri ile aşlandıktan 6 gün sonra alınan kök dokuları, *axi 1* geni ile hibridize edilmiştir. "Sense" (T3) RNA ile hibridize edilmiş dokuların floem tabakasında çok az *axi 1* geni ekspresyonuna rastlanmıştır. "Antisense" (T7) RNA ile yapılan hibridizasyon sonucunda ise vasküler dokunun floem tabakasında koyu renkte boyanmış kısımların *axi 1* geninin ekspresyon bölgesi olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Kontrol olarak kullanılan "sense" (T3) RNA ile hibridize edilmiş dokuların floem

tabakasında çok az *axi 1* geninin sinyallerine rastlanması dokuların, *in situ* hibridizasyonun son aşamasında kullanılan NBT ve BCIP olarak adlandırılan boyama solusyonlarında fazla bekletilmelerinden kaynaklanmıştır. "Antisense" (T7) RNA ile yapılan hibridizasyon sonucunda *axi 1* geninin vasküler dokunun floem tabakasında görülmesi, bu genin kortikal hücre bölünmesinden önce kökün perisaykıl bölgesinde sentezlenen ve sitokinin/oksin dengesinin ayarlanmasında etkili olan erken nodulin geni ENOD40 ile aynı oksin metabolizmasında direk veya indirek olarak etkili olabileceğini göstermektedir. *Axi 1* ve sentetik nod faktörler üzerinde yapılmış olan çalışmalar da, oksin ve



Şekil 3. Bakteri ile aşılansmış 6 günlük kök dokusu " Antisense " (T7) RNA ile hibridize olmuş dokularda (floem hücrelerinde) *axi 1* geninin sentezlenmesi.

sitokininin taşıyım mekanizmasında ENOD 40 ve *axi 1* genlerinin rol oynadıklarını ve hücre bölünmesinin arttırılarak nodül oluşumuna neden olduklarını göstermiştir (Cooper and Long, 1994).

#### Bakteri ile Aşılandıktan 10 Gün Sonra Bezelye Kök Dokularındaki *Axi 1* (Oksinden Bağımsız) Geninin Ekspresyon Durumu

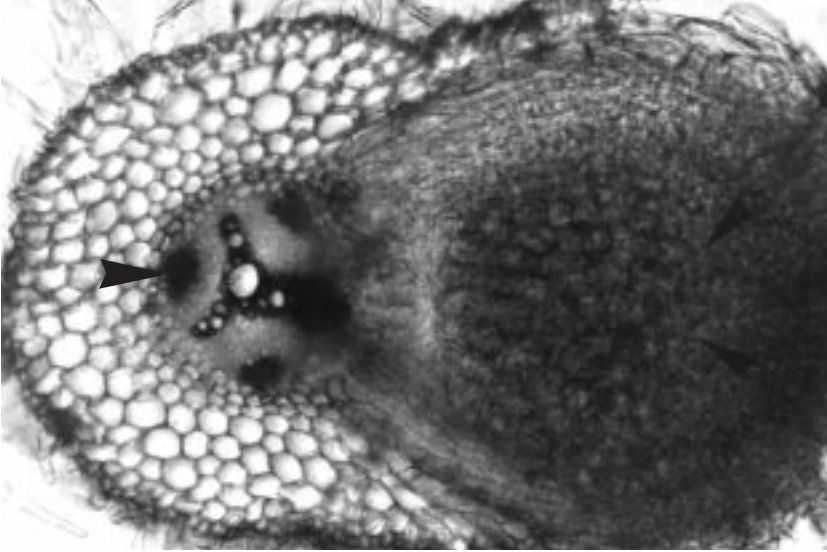
10 günlük kök ve nodül dokuları *axi 1* geni ile hibridize edilmiş, "sense" (T3) RNA ile hibridizasyon sonucunda kök ve nodül dokusunda önemli bir sinyale rastlanmamıştır. "Antisense" (T7) RNA ile yapılan hibridizasyon sonucunda ise kökün vasküler dokusunda, nodül meristematik dokusunda ve azot fiksasyonunun gerçekleştiği nodülün orta kısımlarında koyu renkte boyanmış kısımların *axi 1* geninin ekspresyon bölgesi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).

*Axi 1* geninin bu şekilde nodülün meristematik dokusunda ve orta kısımlarında sentezleniyor olması, nodülün oluşumu esnasında kökün vasküler dokusu ile nodülün vasküler dokusu arasında kurulmuş olan

bağlantıda rol oynuyor olabileceğine işaret etmektedir. Daha önce yapılan araştırmalar kinetin, indol-3-asetik asit (IAA) ve gibberellik asit (GA) gibi bitkisel hormonların floemde organik bileşiklerin taşınmalarını bir ölçüde kontrol altında bulundurduklarını göstermiştir (Thimann, 1936, Mothes and Engelbrecht, 1996).

Bulgular, bakteri ile aşılmiş tüm doku örneklerinde gen ekspresyon bölgesinin vasküler dokusunun floem tabakası olduğunu göstermiştir. Özellikle 10 günlük nodül dokusunda floem tabakasına ek olarak nodülün meristematik bölgesinde ve azot fiksasyonunun gerçekleştiği orta kısımda yer alan hücrelerde de *axi 1* mRNA 'sının sentezlendiği saptanmıştır.

İletim demetlerinin temel olarak bölünebilen hücrelerden oluşması, bu bölgede ifade edilen *axi 1* geninin hücre bölünmesinde ve genişlemesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Özellikle floem iletim demetinin henüz oluşma aşamasındaki 24 saat, 48 saat ve 6 günlük kök dokularında da gen ekspresyonunun görülmesi, iletim demetlerinin ilk oluşumunda da bu genin etkili olabileceğini ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4. Bakteri ile aşılmiş 10 günlük kök dokusu "Antisense" (T7)RNA ile hibridize olmuş genç dokularda *axi 1* geninin ekspresyonu.

#### Kaynaklar

- Bergersen, F.J. 1982. Root nodules of legumes: Structure and functions. Chichester: Wiley. P. 164.
- Cooper, J.B. and S.R Long. 1994. Morphogenetic complementation of *Rhizobium meliloti* by trans-zeatin secretion. The Plant Cell 54, 1025-1030.

- Hayashi, H., I. Czaja, H. Lubenow, J. Schell and R. Walden. 1992. Activation of a plant gene by T-DNA tagging: Auxin-independent growth *in vitro*. Science. 258, 1350-1353.
- Jacobs, M and P.H. Rubery. 1988. Naturally Occurring Auxin Transport Regulators. Science. 241, 346-349.

- Lankhorst, R.M., P. Katinakis, A. Van Kammen, and R.C. van den Bos. 1988. Identification and characterisation of a bacteroid-specific dehydrogenase complex in *Rhizobium leguminosarum* PRE. Applied and Environmental Microbiology. 3008-3013.
- Mothes, K. and L. Engelbrecht. 1996. Kinetin and role in nitrogen metabolism. In: International Botanical Congress 9th Montreal, University of Toronto Press, Toronto, Canada. 2.
- Nap, J.P. and T. Bisseling. 1990. Developmental biology of plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science 250, 948-954.
- Rolfe, B.G. and P.M. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. Annu. Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 297-319.
- Roussis, A., K. van de Sande, K. Papadopoulou, J. Drenth, T. Bisseling, H. Franssen and P. Katinakis. 1995. Characterization of the soybean gene Gm ENOD40-2. Journal of Experimental Botany, 46, 719-724.
- Sprent, J.I. 1990. Plant Cell Env., 3:35.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1991 Plant Physiology. USA. p. 314.
- Tautz, D. and C.A. Pfeifle. 1989. Non-radioactive *in-situ* hybridisation method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. Chromosoma , 98, 81-85.
- Thimann, K.V. 1936. On the physiology of the formation of nodules on legume roots. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 22, 511-514.
- Walden, R., H. Hayashi, H. Lubenow, I. Czaja and J. Schell. 1994. Auxin inducibility and development expression of *axi 1*: a gene directing auxin independent growth in tobacco protoplasts. The EMBO Journal. No: 20.13,4729-4736.
- Yang, W.C., C. de Blank, I. Meskiene, H. Hirt, J. Bakker, A. van Kammen, H. Franssen and T. Bisseling. 1994. Rhizobium Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation, The plant cell 6, 1415-1426.
- Yalçın-Mendi,Y., Y. Kaçar, T. Bisseling and S. Çetiner. 1998. Isolation and characterisation of sequences homologous to the tobacco clone *axi 1* from *Vicia sativa* nodule cDNA library, XXV International Horticultural Congress (IHC). 2-7 August, Brussels.