

Baklagillerde Simbiyotik Kök Nodül Gelişimi

Symbiotic Root Nodule Development in Legumes

Elif YÜZBAŞIOĞLU¹ 

¹ *İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul, Türkiye*

Öz

Baklagiller hem insan ve hayvan beslenmesi, hem de toprak verimliliğinin artırılması yönünden önemli bir doğal kaynaktır. Baklagillerin ayırt edici bir özelliği de çeşitli gram negatif kök nodül bakterileri ile azot-fiksasyonu simbiyotik ortaklığı kurma yetenekleridir. Bakteri ve bitki arasında gerçekleşen bu simbiyotik ilişki, bitkinin kök dokusunda özelleşmiş bir yapı olan nodül dokusu içerisinde gerçekleşmektedir. Nodül oluşumu, bitki kökleri tarafından salgılanan flavonoid sentezi ile başlar ve bitki ve bakteri arasında gerçekleşen oldukça karmaşık bir dizi sinyal ilişkisini içermektedir. Bu derleme çalışmasında, bitki köklerinde oluşan nodül dokusunun oluşum mekanizması ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: Azot fiksasyonu, kök, nod faktör, simbiyosom.

Abstract

Legumes are an important natural resource both for human and animal nutrition and for increasing soil fertility. A distinctive characteristic of legumes is their ability to engage in a nitrogen-fixing symbiosis with diverse groups of gram negative root nodule bacteria. This symbiotic relationship between the bacteria and the plant can form within the nodule tissue that specialized structure in the root tissue of the plant. Nodule formation involves a very complex cascade signal between plant and bacteria, starting with the flavonoid synthesis secreted by the plant roots. This review has widely explained the mechanism of the formation of nodule tissue in plant roots.

Keywords: Nitrogen fixation, nod factor, symbiosome, root.

I. GİRİŞ

Bitki kökleri su ve mineral madde taşınması ile hormon sentezi gibi fonksiyonları yerine getirmektedir. Ayrıca kök-toprak yüzeyi ile çevresindeki ortam ile iletişim halinde olmasını sağlamaktadır. Toprak içerisinde azot kaynağı sınırlandırıldığında, Baklagillere ait bitkiler *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* gibi toprak bakterileri ile simbiyotik ilişki içine girmektedirler ve bunun sonucunda azot fikse edebilen nodül dokusunu oluşturmaktadırlar [1]. Bu ilişki bitki ve bakteri arasında sinyal değişimi ile başlamaktadır. Bitki tarafından bakteriyi çekimleyen flavonoidler salgılanmakta ve bitkiye cevap olarak bakteri lipopolisakarit yapıda bir nod faktör sinyali oluşturmaktadır. Böylece kök tüyünde oluşan deformasyon ile bakterinin bitki hücre zarı tarafından oluşturulan enfeksiyon ipliği içerisinde ilerlemesi sağlanmaktadır. Bitki korteks dokusuna ilerleyen bakteri, hücre içerisinde peribakterioid membran ile sarılarak oluşan bakterioid yapısında azot fiksasyonuna başlamaktadır. Bunun bir sonucu olarak değişen korteks dokusu ile kök dışında gözle görülebilen nodül dokusu oluşmakta ve *Rhizobium* bakterileri nitrojenaz enzimi ile serbest halde bulunan azotu amonyağa dönüştürerek azot fiksasyonu olayını gerçekleştirmektedir [2].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Baklagil grubundaki bitkilerde *Rhizobium* bakterisi ile ortak yaşam sonucu oluşan nodül dokusunun oluşum süreci, azot fiksasyonu ve nodül senesensi gibi fizyolojik olaylar önem kazanmaktadır. Nodül dokusu, azot fiksasyonu sürecinde bakteri ve bitki dokularının bir arada oluşturdukları ve fizyolojik olarak karşılıklı sinyal iletişimi kurdıkları özelleşmiş yapılardır. Bu nedenle bu dokuda meydana gelen olayların anatomik, fizyolojik ve moleküler düzeyde anlaşılması oldukça değer kazanmaktadır. *Medicago truncatula* ve *Lojuz japonicus* model bitkilerinin genom dizilenmesi tamamlandıktan sonra, Baklagiller-*Rhizobium* bakterileri arasındaki simbiyotik ilişkinin mekanizması hızla aydınlatılmaya çalışılmaktadır [2].

II. BAKLAGİLLER VE AZOT FİKSASYONU

Dünya florasında yaklaşık 650 cins ve 16000 tür ile temsil edilen Baklagiller (Leguminosae), tarım alanında ekonomik değere sahip Buğdaygillerden sonra gelen oldukça önemli olan bir familyadır. Leguminosae familyasına ait bitkiler Angiospermler içinde üçüncü büyük, yem ve gıda bitkileri içinde ikinci büyük grubu oluşturmaktadır [3]. Ayrıca Baklagiller gerek insan ve hayvan beslenmesi, gerekse toprakların verimliliklerinin artırılması

açısından doğal bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. Tohum ve sürgünleri protein, yağ, karbonhidrat, mineral, vitamin ve diğer yararlı sekonder metabolitler açısından da oldukça zengindir. Protein kaynağı olarak, tahıllar ile karşılaştırıldığında %24 daha fazla protein içermektedir [4] Örneğin Asya'da ve Amerika'da soya fasulyesinin, ülkemizde de birçok baklagil türlerinin besin olarak tüketilerek tarımı yapılmaktadır. Dünya çapında tarım alanlarının % 12-15 inde baklagil ekimi yapıp, elde edilen ürün 247 milyon tonu bulmaktadır. Bunlara ek olarak, soya fasulyesi ve *Pongamia pinnata* (*Milletia pinnata*) gibi bitkiler yüksek yağ içeriğinden dolayı gelecekte sürdürülebilir biyoyakıt olarak da değerlendirilmektedir [5] Baklagiller arasında besin değeri yüksek önemli bitkiler arasında soya fasulyesi, fasulye, bakla, bezelye ve nohut sayılabilir. Son yıllarda özellikle yem bitkisi olarak kullanılan *Medicago* türleri de önem taşımaktadır [6].

Baklagillerin önemli özelliklerinden bir diğeri de, toprakta bulunan *Rhizobium* bakterileri ile kurdukları ortak yaşam sonucu atmosferdeki %78 oranındaki moleküler azotu toprağa bağlamalarıdır [7]. Tarımı yapılan Baklagiller yılda tahmini olarak yaklaşık 40-60 milyon ton atmosferik azotu fikse edebilmekte ve bu da yaklaşık olarak 10 milyar dolar değerinde gübre kullanımına denk gelmektedir [2]. Bunun bir sonucu olarak gelişmekte olan ülkelerin önemli bir sorunu haline gelen yüksek gübre fiyatları ve çiftçilerin kısıtlı gübre kullanımı konusuna olumlu bir yaklaşım getirerek ekonomik avantaj sağlanmaktadır Bu durum azotlu gübre kullanımını azaltmakta ve kendinden sonra ekilecek bitkinin verimini olumlu yönde etkilemektedir. Bu yeteneği de bilindiği gibi *Rhizobium* adı verilen bakteri ile simbiyotik olarak diğer bir deyimle karşılıklı birbirinden fayda sağlayarak gerçekleştirirler [8]. Bu noktada dünya tarımı açısından bu önemli biyolojik fonksiyonun anlaşılmasına çalışılması araştırmacıları *Medicago truncatula* bitkisini model bitki olarak seçmeye yönlendirmiştir [2].

III. NODÜL GELİŞİMİ

Simbiyosis olayının başlayabilmesi için bakteri ve bitki kök hücrelerinin birbirlerini tanıması gerekmektedir. Kök sızıntısı simbiyotik ilişkide kısmen özgünlüğü belirlemektedir. Her bir *Rhizobium* türü spesifik bir flavonoide ve isoflavonoide cevap vermektedir (Şekil 1; 1. basamak). Çoğu *Rhizobium* türü sadece özelleştikleri baklagil türleri ile ilişki içindedir, ancak bazı türlerde geniş bir konakçı aralığı bulunmaktadır [9]. Simbiyotik ilişkinin ilk aşamasında, bakteriler konakçı bitkinin kökleri tarafından üretilen flavonoidler sayesinde rizosfere doğru hareket ederler [1]. Flavonoidler, bakterideki hücrelerarası lipo-kito-oligosakkarit nodulasyon faktörünün (NF) sentezinden sorumlu bakteriyel genlerinin transkripsiyonunu teşvik eder [10,11]. Nod faktör lipo-kito-oligosakkarit sinyal molekülü olup bir kitin β -1-4-bağlı N-asetil-D

glukozamin iskeletine ve indirgenmemiş şekerin C-2 pozisyonundaki bir yağ aside zincirine sahiptir. Konakçı-simbiyont özgünlüğü için esas belirleyici etmen NF yapısındaki oligosakkarit iskelete bağlanan yapılarıdır [12, 13]. Uygun *Rhizobium* türleri ve onlara ait NF bulunması nodül gelişimini teşvik için yeterlidir. Kök tüyünün uç kısmı enfeksiyon sürecinde bakterinin ilk hedefidir, muhtemelen kök tüyünün zayıf ve daha az çapraz bağlı hücre duvarı mikrotübüllerin yeniden organizasyonuna izin vererek, büyüyen kök tüyü ucunda hücre içi veziküler trafik değişecek ve bakterinin hücre içine girişi daha mümkün hale gelecektir. *Rhizobium*'un kök tüyüne yapışması ile 6-8 saat içinde kök tüyü deformasyonu uyarılmakta ve kortikal hücre bölünmesi teşvik edilmektedir [14].

Rhizobium'un bitki köküne girişi kök tüyü aracılığı ile ya da epidermis dokusundaki yarıklardan olmaktadır [14]. Kök tüyü enfeksiyonu simbiyosiste en temel yöntemdir ve enfeksiyon ipliği yapısını oluşturmaktadır. Enfeksiyon ipliği bitki hücre duvarı bileşenlerinden oluşan tubular yapıda olup, bitkinin korteks hücreleri içine bakterinin girişinde rol oynamaktadır [15]. *Rhizobium* zedelenmiş kök tüyü ucundan bitki hücrelerine giriş yapar (Şekil 1, 4. ve 5. basamak), küçük oranlarda bölünen bakteri kapsül içinde yer almaktadır [1]. Eklenen bu mikrokoloniler tahminen NF konsantrasyonunu zenginleştirdiği gibi hücre duvarı yıkım enzimlerini de arttırmaktadır. Bakterinin konakçı plazma membranına değil hücre duvarına nüfuz etmesini yeniden sentez ve yıkım olayları takip etmektedir. Yenilenen bu döngü viskoz hücrelerarası matriks içine gömülü mikrokoloniler ve devam eden bakteri büyümesinin oluşturduğu "ileri" basınç ile beraber bir çift oluşturmaktadır. Bu ileri basınç kök tüyü turgor basıncına karşı bir "itme" gücüne ihtiyaç duyulduğundan meydana gelmektedir. Bu dinamik süreçlerin sonucu olarak, (Şekil 1, basamak 6 ve 7) bitki hücre duvarından türevlenen, hücrelerarası matriks içine gömülü çoğalan bakterinin doldurduğu enfeksiyon ipliği formu oluşmaktadır [15]. Soya fasulyesinde, kök tüyü enfeksiyonu *Rhizobium* ile temastan 12 saat sonra gerçekleşmektedir [16].

Bitki köküne akın eden bakterinin NF üretme yeteneği devam etmektedir. Artan NF seviyesi kök korteks hücrelerinde mitotik aktiviteyi teşvik etmektedir. Bu olay sonucu ile nodül primordiyumu gelişir (Şekil 1, basamak 8). Primordiyumu oluşturan radyal pozisyonundaki hücre bölünmesini etilen hormonu değişik seviyelerde kontrol etmektedir [17]. Bundan dolayı çoğu zaman nodül yapısı ksilem radyal hücreleri yakınında, floem dokusundan uzak bölgelerde gelişmektedir. Enfeksiyon ipliği, kök tüyünden korteks tabakasına ve yeni oluşan bölünmekte olan hücrelere doğru büyümektedir. Bakteriler, enfeksiyon ipliğinin büyüyen ucundan konakçı hücre sitoplazmasında enfeksiyon damlacığına doğru salınmaktadır. Endositoz olayına benzer şekilde bakterileri peribakterioid membran olarak isimlendirilen aynı

zamanda simbiyozom olarak da bilinen bitki hücre membranından kökenlenen bir membranla çevrilmektedir [18].

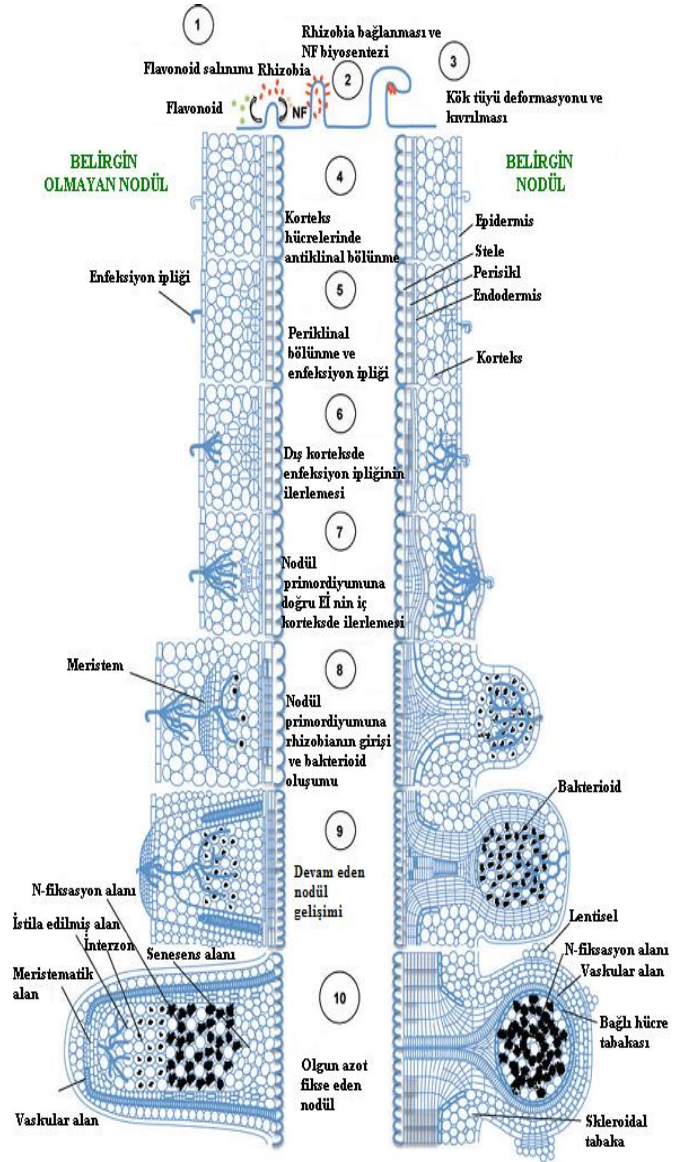
Konakçı hücre içinde membran ile kaplı bakteri bölünmeye devam ederken yani bakterioide farklılaşmadan önce azot fiksasyonuna başlamaktadır [19]. Bakterioide tarafından atmosferik azot amonyağa çevrilir ve daha sonra bitki tarafından assimile edilerek glutamin sentaz enzimi tarafından glutamine dönüştürülmektedir. Amonyakın hızlı dönüşümü farklı bir gradient oluşturur, bu gradienti sağlayan öncelikli durum bakterioiddan dışarıya verilen amonyak miktarıdır [18]. Vaskular dokunun yanısıra korteks tabakasını içeren merkezi dokuda enfekte olmuş (Şekil 1, basamak 9, 10) ve olmamış hücreler bulunmaktadır [20, 21]. Nodül içerisinde, komşu bitki hücrelerinde ve bakterioide arasında gerekli besin maddelerinin değişimi olmaktadır. Peribakterioide membrana karşı oluşan membran potansiyeli pasif taşınma ile sürdürülmektedir. Bu durum da simbiyozom içine besin taşınmasını kolaylaştırmaktadır [18]. Bu mekanizma, nodül içinde bakterioidlere malat gibi fotosentez ürünü bileşiklerin özümsemesine ve glutamin gibi fikse edilmiş azotu da içeren çeşitli bileşenlerin köklere geçişine izin vermektedir [1].

3.1. Belirgin ve Belirgin Olmayan Nodül Yapısı

Baklagillerde morfolojik olarak belirgin ve belirgin olmayan iki esas nodül tipi bulunmaktadır. Nodül tipi konakçı bitki tarafından belirlenmektedir. Bu iki nodül tipi arasındaki fark içindeki ilk hücre bölünmesinin gerçekleştiği alandır [22]. Belirgin olmayan nodülde ilk hücre bölünmesi olayı iç korteks tabakasında antiklinal şekilde gerçekleşerek, endodermis ve perisikldaki periklinal bölünmeler takip etmektedir (Şekil 1, basamak 4-5). Toplu olarak bu bölünmeler nodül primordiyumunun oluşumuna neden olmaktadır. Belirgin olmayan nodüller silindirik yapıdaki nodüllerin oluşumuna sebep olan daha dayanıklı bir meristeme sahiptir. Bu nodül tipine *Medicago truncatula*, *Pisum sativum*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa* gibi bitki türleri örnek verebilir [23]. Apikal meristem devamlı olarak yeni hücre üretmektedir ve bu hücrelerde bakteri ile enfekte olmaktadır. Belirgin olmayan nodüller olgunlaşmış formunda, hücre bölünme aktivitesinden dolayı azot fikse eden bakterioidler heterojen bir populasyona sahiptir ve nodül uzamaya devam ederken gelişimsel evrede bir gradient oluşur. Bu nodüller belirgin nodüllerden farklı daha az dallanmış vaskular sisteme sahiptir [1]. Diğer bir deyişle belirgin nodüller (Şekil 1), genellikle küresel, dayanıklı meristem dokusundan yoksun ve gelişimsel bir gradient gözlenmeyen yapıdadır [24].

Belirgin nodülde ilk hücre bölünmesi genellikle subepidermal olarak dış korteks tabakasında meydana gelmektedir. Bazı istisnalarda, *Lotus japonicus* nodül dokusunda olduğu gibi ilk bölünme subepidermal dokuda gerçekleşmez [25]. Belirgin nodüller olgun

formunda, azot fikse eden bakterioide populasyonunu homojen bir şekilde içermektedir. Enfekte olan hücrelerin farklılaşması eş zamanlı olarak meydana gelir ve bu olayı nodül senesensi takip etmektedir. Yaşlı nodüller senesense uğradığında yeni nodüller kökün en son gelişen kısımlarında oluşmaktadır [22]. Belirgin nodüller aynı zamanda gaz alışverişinde rol oynayan lentisel formunu da oluşturmaktadır. Belirgin nodül yapısı oluşturan Baklagiller arasında soya fasulyesi (*Glycine max*), pongamia (*Pongamia pinnata*) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) gibi baskın tropikal ve subtropikal türlerde bulunmaktadır [23].



Şekil 1. Belirgin ve belirgin olmayan nodül yapısının gelişim evreleri [1].

3.2. Bakteri ve Konakçı Hücre Arasındaki Sinyal Değişimi

3.2.1. Kök Tüyüne Bakterinin Tutunması

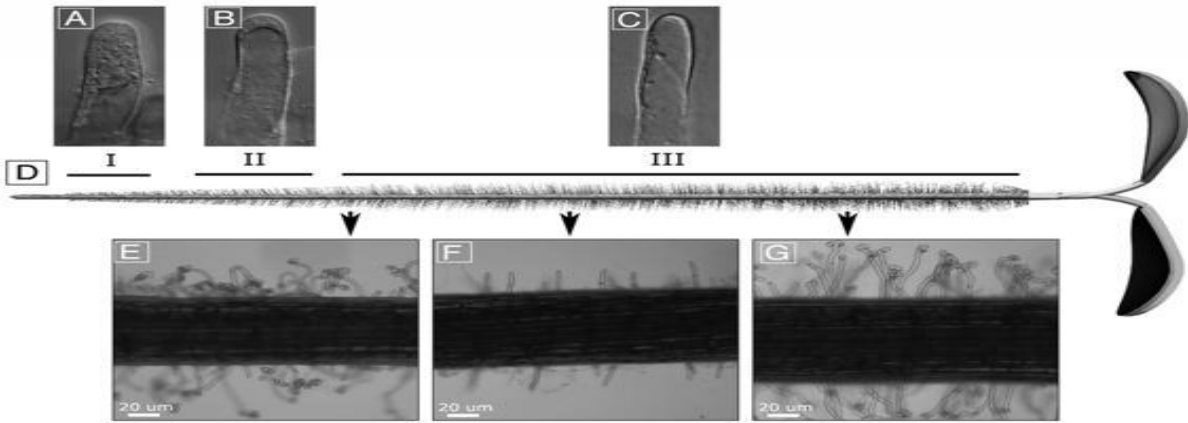
Bakteri ve konakçı bitki arasındaki ilişkide, ilk basamak rhizobial bakterinin kök epidermisine

tutunmasıdır. *Rhizobium*'un bu özel yeteneği diğer bakterilere göre iki önemli avantaj kazandırmaktadır: Bu durum rizosferdeki *Rhizobium* sayısını ve etkisiz olan özel türlerin arttırılmasını sağlayabilmektedir [14,26,27]. *Rhizobium leguminosarum* bakterisinin bitki kök tüyüne bağlanması iki aşamalı bir süreçtir. İlk aşama, bakteri yüzeyi üzerinde rhicadesin denilen bir protein aracılığı ile bitki reseptörüne zayıf bir şekilde bağlanır. Rhicadesin, Rhizobiaceae familyasında yaygın olarak görülen Ca^{+2} -bağımlı bir proteindir [28]. Bu protein *Rhizobium leguminosarum* bakterisinden izole edilmiştir [29]. İkinci aşama selüloz fibriller aracılığıyla olur ve daha kuvvetli bir adhezyon ile gerçekleşir [28,29]. Ayrıca lipo-oligosakkaritleri bağlayan bir diğer reseptör moleküllerinin büyüyen kök tüylerinin üzerinde büyüme ucu yakınlarında yerleştikleri tahmin edilmektedir. Kimyasal yapısı tam olarak bilinmemekle birlikte bir lektin olabileceği ileri sürülmektedir. Bitki lektinleri özel polisakkaritlerine bağlanarak rhizobial tutunmayı arttırmaktadır [30, 31].

3.2.2. Kök Tüyünün Bozulması ve Kıvrılması

M. truncatula'da kök tüyü gelişim süreci, epidermal hücre nükleusu iç çeper merkezinden karşısındaki kök tüyü primordiyumunun gelişmeye başladığı yer olan dış çeper pozisyonuna doğru göç etmesi ile başlamaktadır [32]. Bu çıkıntı (şişkinlik) başlangıçta sitoplazma ile dolu olup kök yüzeyinden dışarı doğru büyümektedir [15]. Büyüyen kök tüyünün uç kısmında sitoplazma kitlesi, alt kısmında geniş bir vakuol ve kök tüyünün plazma membranı ile vakuol membranı arasında da ince bir sitoplazmik kısım bulunmaktadır [15]. Büyüme devam ederken, epidermis hücre nükleusu iç periklinal çeper üzerindeki pozisyonunu değiştirip kök tüyüne giriş yapar ve uç kısımdan yaklaşık 30 μ m uzaklıktaki sitoplazmanın yoğun olduğu bir bölgede yeni pozisyonunu alır. Bu pozisyon kök tüyünde alan I olarak bilinmektedir (Şekil 2). Alan I, kök yüzeyinden uzaklaştıkça ya da büyümeye devam ettikçe nükleus uç kısımda bu mesafede kalmaya devam eder. Kök tüyü olgun uzunluğuna yaklaştıkça, vakuol uç kısmın arkasındaki sitoplazmanın yoğun

olduğu alana girmektedir (Şekil 2) ve nükleus uç kısmı takip etmeye son verir. Bu yapı da kök tüyünde alan II olarak tarif edilmektedir [32]. Büyümesini tamamlamış hücrelerde vakuol kök tüyünün uç kısmının yakınlarındadır (Şekil 2) ve nükleus hücrenin herhangi bir yerinde bulunabilmektedir. Bu belirtilen alanda kök tüyünde alan III olarak ifade edilmektedir [32]. Konak bitkinin kök tüylerinde uyumlu rhizobial türlerden saflaştırılmış nod faktörlerin etkisi ile deformasyon olduğu bilinmektedir. Bu olay *Alfalfa, M. truncatula* ve bezelyeyi de kapsayan pek çok bitki türünde detaylı bir şekilde çalışılmıştır [15]. Nod faktöre en duyarlı kök tüyleri, büyümenin sonlanmaya yakın yerleri olan alan II de bulunur, kök tüyü alan III bölgesinde ise büyüme tamamen durmuştur. Kuvvetli şekilde polimerize olmuş içsel organizasyona sahip kök tüylerinin aktif bir şekilde büyümeye devam ettiği bölge kök tüyü alan I bölgesidir ve bu bölge nod faktörün deforme edici etkisine duyarlıdır. Alan II kök tüylerinde nod faktör ile tetiklenmiş deformasyonu kök tüyü uçlarının izodiametrik şekilde şişkinleşmesi ile başlar ve bu olayı oldukça polar yapıda, alan I kök tüyülerinin aktif olarak büyüyen uçlarına benzer yapıda yeni bir büyüyen ucun tesisi takip etmektedir [15]. Böylece NF alan II hücrelerinde yeni uç büyümesini teşvik etmektedir. NF uygulamasını ardışık vezikül depozisyonunun geçici olarak izodiametrik şekle dönüşmesi halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. İzodiametrik depozisyon hücre iskeletinin bozulmasından kaynaklanabilir. Dış ortama NF ilave edildiğinde, NF kök tüyünde deformasyona ve dallanmaya neden olmaktadır ancak sıkıca kıvrılmış kök tüyü (shepherd's crooks) yapısının oluşması için yeterli olmamaktadır ve bu yapı genellikle bakterinin bitkiye girdiği alanı oluşturmaktadır [15]. Kök tüyü kıvrılması ve enfeksiyon sürecinde mikrotübül organizasyonunda değişiklik meydana gelmektedir. Kıvrılma sırasında, mikrotübüller kıvrılma alanının merkezine yerleşmektedir ve bunun sonucunda kök tüyünün uç kısmı ile bağlantısı kesilerek, nükleus ve enfeksiyon ipliğinin uç kısmı arasında konumlanmaktadır [33].



Şekil 2. Enfekte olmuş ve olmamış kök dokusunun morfolojik yapısı (A-C). Enfekte olmamış yonca bitkisinin tipik I, II, III kök alanları (D). *S. meliloti* ile enfekte olan yonca bitkisinin kök tüyü görüntüsü (E-G) [15].

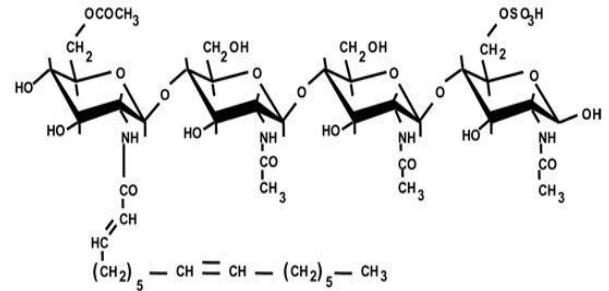
3.2.3. Nod Faktör Yaklaşımı

Konakçı bitki kökleri tarafından salınan flavonoidler rhizobial hücrelerde *nod* genlerinin teşvik edilmesinde rol oynamaktadır [34]. Flavonoidler bakteriyel NodD transkripsiyon düzenleyicilerini aktive ederek nod faktör sentezini içeren genlerin transkripsiyonunu teşvik etmektedir [35]. Nod faktörün temel yapısı farklı rhizobial türlerde benzer yapıda olmaktadır. Genellikle, NF β -1,4-bağlı N-asetil-D-glukozaminin 4-5 biriminden oluşan iskelet yapısına sahiptir ve redüklenmemiş terminal uç C2 pozisyonunda açıl zincir içermektedir [31]. Rhizobial türlerde NF deki özgünlük açıl zincirin yapısındaki çeşitliliğe bağlı olmaktadır. Şekil 3'de *Medicago* türleri ile nodül oluşturabilen *Sinorhizobium meliloti* bakterisine ait nod faktörün yapısı verilmiştir. Rhizobial türler arasında nod faktörün yapısındaki farklılık türe özgü nodülasyon genlerinde ya da allellik varyasyonlarından dolayı farklı aktivitede enzimlerin kodlanması sonucu olabilmektedir [31].

NF mekanizmasının çözümünün altında çoğunlukla genetik yaklaşım yatmaktadır. Ancak NF ile ilgili güncel model olarak, nod faktör bağlanmasında görev alan epidermis hücresinde yerleşmiş iki reseptör benzeri kinaz (RLK) önerilmektedir [1]. Bu kinazlarda, *L. japonicus*'da LjNFR1 ve LjNFR5, *P. sativum*'da PsSYM2A ve PsSYM10, *M. truncatula*'da MtLYK3/MtLYK4 ve MtNFP, *Glycine max* L.'de GmNFR1 α/β ve GmNFR5 α/β dir [36, 37,38, 39, 40]. NF reseptörleri; intrasellüler kinaz bölge, transmembran bölge ve LysM domainine sahip ekstrasellüler bölge içermektedir. LysM domaini N-asetilglukozamin bakiyelerini içeren NF'e benzer şekilde peptidoglikanlara bağlandığı düşünülen bakteriye özgü hücre çeperi-yıkıcı enzimde yaygın olarak mevcut kısımdır [41]. Bu yapı ökaryotlarda mevcut olmasına karşın bir genelleme yapılamamaktadır. Kinaz ve transmembran alan ile birlikte LysM bölgesinin varlığı bitkilere özgüdür [42]. İlginç bir şekilde, tüm ökaryotik protein kinazlarda genellikle fosforilasyon bölgesinin yerleştiği LjNFR5/PsSYM10/MtNFP/GmNFR5 α/β aktivasyon ilmeği eksik iken LjNFR1/PsSYM2A/MtLYK3/MtLYK4/GmNFR1 α/β tipik bir serin\treonin kinaz alanı içerir [36, 37, 38, 40, 43]. Bir kinaz domaininde aktif ilmeğin yokluğunda iki LysM RLKs ın ileri yönde sinyal iletiminde fonksiyonel aktif kinaz domainine sahip bir heterodimerik reseptörde toplandığı ileri sürülmektedir [36, 37, 38, 40].

NF sinyalinde görev alan diğer bir RLK ise lösince zengin (LRR) tekrarlanan bölgelere, serin\treonin bölgelerine sahiptir ve *M. sativa* NORK, *Pisum sativum* PsSYM19, *Lotus japonicus* LjSYM19, *Medicago truncatula* MtDMI2 tarafından kodlanmaktadır [44, 45, 46]. Bu yapı plazma membranı ve enfeksiyon ipliği membranı üzerinde yerleşmiştir ve en erken saptanabilir kök tüyü cevabı için gerekli olan hem NF

algılanması hem de ileri yönde sinyal iletiminde fonksiyonel olduğu tahmin edilmektedir [36,44]. LysM RLKs ın aktive olması için ilk önce LRR RLK nin aktive olması gerekmektedir [1]. Gerçekten de, bu iki reseptör mikrobiyal sinyal molekülün algısında rol oynamaktadır, ancak LRR RLK reseptörünün fungal ve bakteriyel sinyal yolu ile nasıl bütünleştiği tam olarak açıklanamamıştır [1]. Bunun doğrudan heterokompleks oluşumlar aracılığı ile mi yoksa dolaylı ikinci sinyaller aracılığı ile mi olup olmadığı aydınlatılamamıştır. İleri yönde sinyal iletimine dayanarak, LRR RLK lar bakteri kökenli enfeksiyon olaylarının başlamasında daha fonksiyonel iken LysM RLKs lar NF sinyalindeki olaylar dizisinde spesifik bir role sahip olabilir [1].



Şekil 3. *S. meliloti* bakterisine ait nod faktörün kimyasal yapısı [31].

3.2.4. Nod Faktör Sinyali Basamakları

İleri yönde sinyal iletim basamakları nod faktörün algılanması ile başlar. Bu yapı nuklear membranda konumlanmış *M. truncatula*'ya ait MtDMI1 ve *L. japonicus*'a ait LjCASTOR and LjPOLLUX tarafından kodlanan potasyum iyon-kanal proteinleri [47,48, 49]. LjNup133 ve LjNup85 [50,51] tarafından kodlanan iki nukleoporin ve MtDMI3/PsSYM9 tarafından kodlanan kalsiyum ve kalmadulin bağlantılı protein kinaz (CCaMK) içermektedir [46, 52].

NF uygulamasından sonra 1 dk gibi kısa bir sürede, Ca⁺² iyonlarının hızlı bir şekilde hücre içine alınması Ca⁺² akışını meydana getirir ve bunu kök tüylerinde Cl⁻ ve K⁺ iyonlarının dışarı akışı takip etmektedir [53]. Kalsiyumun depolanması olarak bilinen sitosolik kalsiyum konsantrasyonundaki salınım, Ca⁺² akışının artışından sonra (NF uygulamasından yaklaşık 10 dk sonra) aynı hücrede aynı anda ardışık olarak teşvik edilmektedir [54]. İyon-kanal proteinleri ve nukleoporinler kalsiyumun depolanması olayları için gereklidir ve yapılan çalışmalarda CCaMK Ca⁺² depolanma sinyalinde rol oynadığı belirlenmiştir [55]. Benzer şekilde yükselip alçalma ve depolama olayları NF bağlandıktan sonraki sinyal iletiminde daha önce gözlenmiştir ve işaret edilen benzer etkiler NF algısından sonra meydana gelmektedir [56,57]. NF algısı, kök tüyü deformasyonuna, kök tüyü kıvrılması ve bakteri istilası için gerekli olan kök tüyü aktin iskeletinde değişikliğe neden olmaktadır [14].

LRR RLK kodlayan genlerdeki mutasyon, varsayılan (putativ) iyon kanalları ya da nukleoporinler Ca⁺²

depolanması ve devam eden nodül gelişim olaylarını engellemektedirler, buna karşın kalsiyum akışı ve kök tüyü deformasyonu olayları devam etmektedir [47, 48]. CcCaMK da mutasyonu Ca^{+2} akışını ve birikimini etkilememiştir fakat yinede devam eden nodül gelişimi engellenmiştir [52]. NF LRR RLK, iyon kanalları ve nukleoporinlerin NF algısının akış yönünde ilerlemesini, Ca^{+2} depolanmasını ise aksi yönde etkilemektedir. Oysa ki CcCaMK Ca^{+2} birikimini akış yönünde etkilemektedir [1].

Birçok transkripsiyon faktörü nodülasyon sinyal yolu 1 (NSY1) ve NSY2, nodülasyon için gerekli olan Ets2 repressör faktör (ERF) (ERN) ve nodül başlangıcını (NIN) içeren CcCaMK sinyalinin ileri yönde akışını aktive etmektedir [58]. *nsy1* ve *nsy2* mutantları epidermiste erken nodülasyon genlerinin (ENOD) transkripsiyonunu başlatma yeteneğinde değilken, NF ile muamele edildiği zaman normal Ca^{+2} cevabı sergilemektedir [59]. Epidermis hücrelerinde NSY1 ve NSY2 nin nukleusta CcCaMK ile beraber yerleştiği düşünülmektedir [14]. *NSY1* ve *NSY2* Ca^{+2} birikiminden sonra benzer şekilde aktive olmaktadır, muhtemelen CcCaMK sinyali ile doğrudan etkilenmektedir. Bunlara ek olarak ERN1 ve NSY1 nin ENOD11 in promotörüne bağlandığı gösterilmiştir. NSP1 in ENOD promotörüne bağlanması NSP2 ye gereksinim duyarken epidermis hücrelerinde ENOD ekspresyonu oldukça iyi karakterize edilmiştir [60, 61]. Hirsch ve diğ. (2009) yaptıkları çalışmada ENOD11 promotörüne bağlanabilmesi için, NSP1 in ERN1 promotörüne bağlanması ve NIN in de bunların ekspresyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Epidermis hücrelerinde NSY1, NSY2, ERN1 ve NIN bütün kombinasyonları ENODs ekspresyonlarını düzenlenmektedir [61]. Genetik ve protein düzeyinde yapılan çalışmalarda protein bileşenlerinin CcCaMK ile etkileşim halinde olduğunu göstermiştir. Bu ilişki NF sinyali ve nodül gelişiminde gereklidir ve bu proteinler *M. truncatula*'da DMI3 (MtIPD3) ve *L.japonicus* da LjCYCLOPS olarak isimlendirilir [62,63]. Bu proteinlerin C terminal bölgesi ile etkileşim halinde oldukları, kalsiyum birikimi sinyalinde etkili oldukları ve NSY1 ekspresyonunu düzenledikleri düşünülmektedir [58].

3.2.5. Nod Faktör Tarafından Korteks Hücrelerinin Teşvik Edilmesi

Rhizobium-baklagil arasındaki simbiyotik ilişkide, rhizobial hücreler konakçı dokuda kolonize olarak kök korteksinde hücre döngüsünü yeniden aktif hale getirmektedir. NF'nin kök tüyü ve epidermis hücre çeperine doğrudan etkisine ek olarak, korteks ve perisikl dokularında da hücre döngüsünü aktive ettiği gözlenmektedir. Korteks ve perisikl hücrelerinin aktivasyonu farklı baklagil türlerinde varyasyon göstermektedir [31]. Bu olay da kök korteksindeki morfojenetik yapıya bağlıdır [64]. *Medicago sativa*'da *Rhizobium* ile inokülasyonundan 18-24 saat sonra, iç korteks hücrelerinde erken morfolojik aktivasyon

gözlenmektedir [65,66]. Bu vakuollü hücreler ilk önce antiklinal bölünme geçirmektedirler. Daha sonra, periklinal bölünmeler meydana gelerek, primordiyum oluşmaktadır. Tüm baklagillerde karakteristik olarak belirgin olmayan apikal meristem ile beraber silindirik nodüller gelişmektedir [31]. Bunlara zıt olarak, *Phaseolus vulgaris* ve *Glycine max* 'te ilk bölünen hücre hipodermiste bulunmaktadır [21, 67].

3.3. Enfeksiyon İpliği (Eİ) Gelişimi

Tüm rhizobial-konakçı arasındaki simbiyosis olaylarında, azot fiksasyonunun başlamasından önce bakteri bitki hücresinin kök korteks tabakasına yerleşmelidir. Bakteri bitki dokularının derinliklerine enfeksiyon ipliği üreterek nüfuz etmektedir. Bu yapıyı oluşturmak için, bakterinin kıvrılmış kök ucunda lokalize olması gerekmektedir [68]. Kök ucunda lokalize olan bakteri simbiyotik olarak aktif ekso polisakarit ve nod faktörü üreterek, kök tüyü hücre membranından içeriye doğru ilerleyen büyümeyi teşvik etmektedir [35]. Bunun sonucunda da içindeki bitki dokularına bakteri akımı gerçekleşmektedir [15]. Uç bölgesinden gelişen enfeksiyon ipliği yeni bir membran sentez alanı oluşturmaktadır ve bu yapının uç büyümesinin değişikliği sonucu meydana geldiği düşünülmekle beraber hücre polaritenin yeniden organizasyonu sonucu ve kök tüyü tarafından normal olarak ortaya konulan bir durum olmaktadır [15]. Enfeksiyon ipliğinin kök tüyünün içine doğru büyümesi sürecinde, nukleus ve uzayan enfeksiyon ipliğinin uç kısmı yoğun ve aktif olarak akan sitoplazma aracılığı ile bağlantı halindedir [15]. Aynı zamanda, konakçı hücrenin hücre iskeleti Eİ nin büyüme düzenini belirleyen önemli bir faktör olmaktadır [65]. Floresans ile işaretlenmiş bakteri enfeksiyon ipliği içinde mikroskopik olarak analiz edildiğinde, içe doğru bölünen enfeksiyon ipliğinin uç bölgesinde bakterinin aktif olarak bölündüğü gözlenmiştir [69]. Uç bölgesinde bakteriyel çoğalma sonucunda enfeksiyon ipliğinin membran sentezi teşvik edilmektedir [68].

Enfeksiyon ipliği oluşumunun başlaması için nod faktör sinyalinin salınımı gereklidir [1]. Ayrıca, kök tüyüne yapışan ve mikrokoloni oluşturan *Rhizobium* hücreleri yüksek konsantrasyonda NF üretmektedir. Muhtemelen üretilen NF belli bir konsantrasyona ulaştığında enfeksiyon ipliği oluşumu başlamaktadır [31]. Yapısal olarak yetersiz NF üreten *Rhizobium* türlerinde kök tüyü deformasyonu teşvik edilebilmektedir, ancak enfeksiyon ipliği oluşturamayan çok sayıda geniş enfeksiyon cepleri meydana gelmektedir [69]. Bakteriyel ekstrasellular polisakaritlerde (suksinoglikan) Eİ oluşumunun başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol üstlenmektedir [70,71]. *exoY* mutantlarında (suksinoglikan üretemeyen) Eİ oluşumu başlayamamaktadır ve bunun sonucunda enfekte olmamış boş nodül dokusu gelişmektedir [31].

Belirgin olmayan nodül dokusunun oluşması sırasında, kök dokusunun iç korteks hücreleri yeniden hücre döngüsüne girip antiklinal bölünerek NF e yanıt vermektedir [15]. Böylece nodül primordiyumu oluşmaktadır. Hücre döngüsü aktivasyon sürecinin bir parçası olarak, nükleus çeper bölgesinden merkezi pozisyona göç etmektedir. Bu olay dış korteks hücrelerinde de aynı şekilde meydana gelmektedir ancak hücre döngüsünün G2 fazında kalmaktadır [72]. Bu bölgedeki hücreler radyal olarak dizilmiş hücrelerarası sitoplazmik köprüler ile beraber bir kolon oluşturmaktadır ve bu yapıya enfeksiyon öncesi ipliği adı verilmektedir.

3.4. Simbiyosom

Bakterinin hedef dokusu olan bitkinin iç korteks hücrelerine ulaşmasıyla, hücre içerisinde yeni bir yapılanma oluşmaktadır. Herbir bakteri hedef hücre tarafından tek tek endositoz yolu ile enfeksiyon ipliğinden kökenlenen membrana sarılarak hücre içine alınmaktadır [31]. Bitki kökenli bu membrana peribakterioid membran adı verilmektedir. Herbir bakteriyi içeren endositik membran ile çevrili bu yapı simbiyosom olarak bilinmektedir [68]. Belirgin olmayan nodülde, bakteri hücreleri ve onu çevreleyen peribakterioid membran eş zamanlı olarak azot fikse eden bakterioide dönüşmeden önce bölünmektedir [73]. Simbiyosom azot fiksasyonunda bir birlik oluşturmaktadır çünkü membran yapısı besin taşınımı ve amonyumun salgılanması gibi olaylarda konakçı hücre ile ilişki halinde bulunmaktadır. *Rhizobium* simbiyosom içerisinde değişmekte ve yeni enzim sistemleri için teşvik olmaktadır [74]. Belirgin olmayan nodül yapısında, ön enfeksiyon alanı, enfeksiyon alanı, fiksasyon alanı ve senesens alanı olmak üzere dört bölüm bulunmaktadır. Diğer nodül tipi olan belirgin yapıda ise sadece merkezi enfeksiyon alanı bulunmaktadır [74]. Her iki nodül tipinde de düşük oksijen seviyesi mevcuttur. Dış korteks hücreleri oksijen sızmasına karşı fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır. Ayrıca nodül dokusunda özel olarak oluşturulan leghemoglobin var olan oksijene bağlanmaktadır. Nodül yapısında düşük oksijen miktarı gereklidir çünkü oksijen varlığında nitrogenaz enzimi hızla denature olmaktadır [74].

Medicago bitkisinde *S. meliloti* ile erken enfeksiyon sürecinde Eİ ağında yüksek oranda polarize bir durum bulunmaktadır. Kök tüyünde başlayan iplik yapısı gelişen nodül primordiyumuna doğru dallanarak büyümektedir. Enfeksiyon ipliğinin geçtiği hücrelerde sitoplazma polar yapı kazanmaktadır. Nodül primordiyumunda enfekte olmamış ve aktif hücreler nodülün iç korteks hücrelerinde organize olmaktadır. Nodül büyümesinde, meristem arkasında Eİ ağı gelişime devam etmektedir ve nodül dokusunda oldukça dallanmış yapıda enfeksiyon alanı oluşmaktadır [31]. *Medicago* gibi belirgin olmayan nodül yapısında, meristem dokusu devamlı olarak kök dışına doğru büyümektedir. Meristem dışı doğru

hareket ederken, Eİ meristem dokusunun arkasına doğru büyümek zorundadır. Böylece yeni bölünen ve genişleyen hücreler enfekte olmaktadır [31]. Eİ nin nodül içerisinde nasıl yayıldığı tam olarak bilinmemektedir. Enfeksiyon alanındaki Eİ ağı polar yapıda olup dışı doğru ilerleyen meristem boyunca genişlemektedir.

IV. SONUÇ

Baklagil familyasına ait türlerin, bitkisel protein kaynağı olma özelliği tarımsal ürünler için de önemini ilk sıralara taşımaktadır. Baklagiller, rizobiyal bakteriler ile simbiyotik ilişki kurması sonucu oluşan nodül dokusu, atmosferik azotu kullanılabilir organik forma bağlama yetenekleri nedeniyle tarımsal sürdürülebilirlik ve küresel azot döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, birçok baklagil türü nodüler azot fiksasyon mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılması için model bitki olarak çalışılmaktadır. Aynı zamanda, nodül mekanizması hakkında bilginin çoğaltılması, biyoteknolojik yaklaşımlar kullanılarak daha verimli bitkisel üretimin sağlanmasında kaynak oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] He, J., Lindström, H., Hagfeldt, A., & Lindquist, S.E., (1999). Dye-Sensitized Nanostructured p-Type Nickel Oxide Film as a Photocathode for a Solar Cell. *Journal of Physics and Chemistry B*, 103(42), 8940-8943.
- [2] Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M-H, Lin, Y-H, Reid D.E., & Gresshoff, P.M. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation, *J. Integr. Plant Biol.*, 52 (1), 61–76.
- [3] Yavaş İ., & Ünay A. (2018). Baklagillerde Kök, Nodül Oluşumu ve Azot Fiksasyonu Üzerine Bazı Küresel İklim Değişikliği Parametrelerinin Etkisi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD)*, 4(2): 270 – 278.
- [4] Sarioğlu, G., & Velioglu Y.S. (2018). Baklagillerin Bileşimi. *Akademik Gıda*, 16(4), 483-496.
- [5] European Association for Grain Legume Research , 2007, www.grainlegumes.com. Accessed January 2009.
- [6] Gül, M., & Işık, H. (2002). Dünyada ve Türkiye’de Baklagil Üretim ve Dış Ticaretindeki Gelişmeler. *MKU Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7(1-2): 59-72.
- [7] Kızıloğlu, F.T. (1997). Toprak Organizmalarının Azot Formları Arasındaki Dönüşümlere ve Çevreye Etkileri. *Çevre Koruma*, 30:27-30.
- [8] Müftüoğlu N.M., & Demirel T. (1998). Toprakta Azot Bilançosu. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 29 (1), 175-185.

- [9] Pueppke, S.G., & Broughton, W.J. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12, 293–318.
- [10] Caetano-Anoll'es, G., & Gresshoff, P.M. (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 345–382.
- [11] Geurts R., & Bisseling T. (2002). Rhizobium Nod Factor Perception and Signalling. *Plant Cell*, 14, 239-249.
- [12] Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prom'E, J.C., & D'enari'e, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344, 781–784.
- [13] D'enari'e, J., Debelle, F., & Prom'e J.C. (1996). Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem*, 65, 503–535.
- [14] Oldroyd, G.E.D., & Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519–546.
- [15] Gage, D.J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 68(2), 280–300.
- [16] Turgeon, B.G., & Bauer, W.D. (1985). Ultrastructure of infection thread development during infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*, 163, 328–349.
- [17] Lohar, D., Stiller, J., Kam, J., Stacey, G., & Gresshoff, P.M. (2009) Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.*, 104, 277–285.
- [18] Udvardi, M., & Day, D. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 48, 493–523.
- [19] Roth, L.E., & Stacey, G. (1989). Cytoplasmic membrane systems involved in bacterium release into soybean nodule cells as studied with two *Bradyrhizobium japonicum* mutant strains. *Eur. J. Cell Biol.*, 49, 24–32.
- [20] Newcomb, W., Sippel, D., & Peterson, R.L. (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 57, 2603–2616.
- [21] Calvert, H.E., Pence, M.K., Pierce, M., Malik, N.S.A., & Bauer, W.D. (1984). Anatomical analysis of the development and distribution of Rhizobium infection in soybean roots. *Can. J. Bot.* 62, 2375–2384.
- [22] Rolfe, B.G., & Gresshoff, P.M. (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 297–319.
- [23] Guinel, F. C. (2009). Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types. *Botany* 87, 1117–1138.
- [24] Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122, 211-237.
- [25] Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., De Bruijn, F.J., Stougaard, J., & Szczyglowski, K. (2000). Shoot root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J*, 23, 97–114.
- [26] Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff Pl, & Hirsch, A.M. (2006). Investigations of Rhizobium biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56,195–206.
- [27] Sanchez-Contreras, M., Bauer, W.D., Gao, M., Robinson, J.B., & Downie, J.A. (2007). Quorum sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 362:1149–63.
- [28] Smit, G., Kijne, J.W., & Lugtenberg, B.J.J. (1987). Involvement of both cellulose fibrils and a Ca⁺²-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.*, 169, 4294–4301.
- [29] Smit, G., Kijne, J.W., & Lugtenberg, B.J.J. (1986). Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.*, 168, 821–827.
- [30] Diaz, C.L., Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., & Kijne, J.W. (1995). Genomic requirements of Rhizobium for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8,348–56.
- [31] Brewin, N.J. (2004). Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4), 293–316.
- [32] Sieberer, B., & Emons, A. M. C. (2000). Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* 214,118–127.
- [33] Timmers, A. C., Auriac, M.C., de Billy, F., & Truchet, G. (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development*, 125, 339–349.
- [34] Shimada, N., Aoki, T., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., & Ayabe, S. (2003). A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5- deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 131, 941–951.
- [35] Geurts R., Fedorova, E., & Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:346–352.
- [36] Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor-induced infection. *Science* 302, 630–633.

- [37] Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425, 637–640.
- [38] Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585–592.
- [39] Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., De Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gh'Erardi, M., Huguet, T., Geurts, R., D'Enari'E, J., Roug'E, P., & Gough, C. (2006). The *Medicago truncatula* Lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.* 142, 265.
- [40] Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li, D., Nguyen, C.D.T., Men, A., Carroll, B.J., & Gresshof, P.M. (2009). Inactivation of duplicated Nod-Factor Receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Cell Physiol.*, 51(2), 201-214.
- [41] Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K.J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A.L., Venema, G., Kuipers, O.P., & Kok, J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J. Biol. Chem.* 278, 23874–23881.
- [42] Gough, C. (2003). *Rhizobium* symbiosis: Insight into nod factor receptors. *Curr. Biol.* 13, 973-975.
- [43] Huse, M., & Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 109, 275–282.
- [44] Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., & Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417, 962–966.
- [45] Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., & Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both fungal and bacterial symbiosis. *Nature* 417, 959–962.
- [46] Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., & Long, S.R. (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4701–4705.
- [47] An'e, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetza, R.V., Oldroyd, G.E., Ajax, C., L'Evy, J., Debell'e, F., Baek, J.M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., D'Enari'E, J., & Cook, D.R. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303, 1364–1367.
- [48] Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Kawaguchi, M., Parniske, M., Hayashi, M., & Kawasaki, S. (2005). Host genes involved in activation and perception of calcium spiking. *Plant Cell Physiol.* 46, S5-S5.
- [49] Riely, B.K., Lougnon, G., Ane, J.M., & Cook, D.R. (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.* 49, 208–216.
- [50] Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 359–364.
- [51] Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M., & Kawaguchi, M. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*, 19, 610–624.
- [52] L'evy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., An'e, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., D'Enari'E, J., Rosenberg, C., & Debell'e, F. (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303, 1361–1364.
- [53] Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., & Schultze, M. (1999). Elevation of the cytosolic free [Ca²⁺] is indispensable for the transduction of the nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol.* 121, 273–279.
- [54] Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetza, R.V., Cook, D., Gough, C., Denari'E, J., & Long, S.R. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13407–13412.
- [55] Oldroyd, G.E.D., & Downie, J.A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 566–576.
- [56] Li, W.H., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., & Tsien, R.Y. (1998). Cell permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392, 936–941.
- [57] Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., & Schroeder, J.I. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053–1057.

- [58] Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debell'E, F., Gough, C., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308, 1789–1791.
- [59] Oldroyd, G.E.D., & Long, S.R. (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling. *Plant Physiol.*, 131, 1027–1032.
- [60] Andrianakaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., & De Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF transcription factors mediate nod factor-dependent MtENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* 19, 2866–2885.
- [61] Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., & Oldroyd, G.E.D. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 21, 545–557.
- [62] Messinese, E., Mun, J.H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Roug'E, P., Barre, A., Loughon, G., Schornack, S., Bono, J.J., Cook, D.R., & An'e, J.M. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 912–921.
- [63] Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi- Anraku, H., Hayashi, M., & Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 20540–20545.
- [64] Van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., Van Brussel, A.A.N., Kijne, J., & .W. (1994). Cell-wall degradation during infection thread formation by the root- nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a 2-step process. *Eur. J. Cell Biol.*, 64, 88–94.
- [65] Timmers, A.C.J., Auriac, M.C., & Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 126, 3617–3628.
- [66] Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan, E., Memon, A., Öz, G. & Yüksel, B., (2017). Functional specialization of Arf paralogs in nodules of model legume, *Medicago truncatula*. *Plant Growth Regul.* 81, 501–510.
- [67] Tate, R., Patriarca, E.J., Riccio, A., Defez, R., & Iaccarino, M., (1994). Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 582–589.
- [68] Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, W.E., & Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Microbiology*, 5, 619-633.
- [69] Walker, S. A. & Downie, J. A. (2000). Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae into root hairs requires minimal nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires nodO or nodE. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 754–762.
- [69] Gage, D.J. (2002). Analysis of infection thread development using GFP- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 184, 7042–7046.
- [70] Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180: 5183–5191.
- [71] Wang, L. X., Wang, Y., Pellock, B., & Walker, G. C. (1999). Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriology* 181: 6788–6796.
- [72] Yang, W.C., De Blank, C., Franssen, H. & Bisseling, T. (1994). *Rhizobium* nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cell cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* , 6,1415–1426.
- [73] Robertson, J.G. & Lyttleton, P. (1984). Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *J. Cell Sci.* 69, 147–157.
- [74] Stacey, G. (2007). The *Rhizobium*-Legume Nitrogen-Fixing Symbiosis, *Biology of the Nitrogen Cycle*, Chapter 10, Elsevier B.V.