

## 豆科模式植物——蒺藜苜蓿

陈爱民<sup>1,3</sup> 连瑞丽<sup>1</sup> 孙杰<sup>2</sup> 王彦章<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032; <sup>2</sup>石河子大学农学院新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832000; <sup>3</sup>新疆兵团康地农业高新技术研究中心, 乌鲁木齐 830011

### Leguminous Model Plant—*Medicago truncatula*

CHEN Ai-Min<sup>1,3</sup>, LIAN Rui-Li<sup>1</sup>, SUN Jie<sup>2</sup>, WANG Yan-Zhang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; <sup>2</sup>The Key Oasis Eco-agriculture Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Agricultural College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; <sup>3</sup>Research Center of New and High Technology, Xinjiang Kangdi, Urumqi 830011, China

**提要** 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)是国际上广泛用于研究仅属于豆科植物或者与之有关的某些生物过程的豆科模式植物, 这些生物过程无法采用模式植物拟南芥进行研究。蒺藜苜蓿的基因组较小, 二倍体, 遗传学简单, 遗传转化相对容易, 再生时间较短。2003年, 国际间合作的蒺藜苜蓿基因组测序计划已经启动。文章概述了蒺藜苜蓿基因组测序、生物信息数据库、遗传转化系统以及功能基因组研究工具的研究进展。

**关键词** 蒺藜苜蓿; 基因组; 遗传转化; 遗传突变

豆科植物中的大豆、紫花苜蓿、豌豆和蚕豆等是现代农业系统发展的基础。豆科植物不但是人类食物中蛋白质的主要来源, 而且也是重要的饲料和油料作物。豆科植物与根瘤菌之间的共生固氮系统, 是生物圈中氮循环的一个主要氮源。另外, 豆科植物与广宿主菌根真菌的相互作用, 可促进植物吸收磷和其它矿物质。为了加快对豆科植物学的理解和合理应用, 人们选择蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)作为研究豆科植物的生物和农业性状的模式植物。

蒺藜苜蓿之所以被选为豆科模式植物, 是由于其具有其它豆科植物无法比拟的遗传特性。蒺藜苜蓿与紫花苜蓿的亲缘关系很近, 是二倍体( $2n=16$ 条染色体), 基因组为454~526 Mb, 遗传学简单。而且, 蒺藜苜蓿的植株再生时间较短, 有大量的突变体和多种生态型, 并有较高的生物多样性(Barker等1990)。蒺藜苜蓿和大部分豆科植物(如紫花苜蓿、大豆、豌豆、三叶草等)有遗传上的相似性, 因而从蒺藜苜蓿获得的信息可以用于其它豆科植物。因此, 蒺藜苜蓿已成为继拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻基因组测序完成之后又一个大规模基因组测序的植物。在过去十

多年中, 蒺藜苜蓿基因组测序和研究已经取得很大进展, 并已建立了相关的蒺藜苜蓿基因组数据库, 发展了一系列的功能基因组研究工具。

#### 1 蒺藜苜蓿基因组测序和相关数据库的建立

最初是在塞缪尔罗伯特诺贝尔基金(Samuel Roberts Noble Foundation)资助下, 俄克拉荷马州州立大学最早开展了蒺藜苜蓿基因组测序工作。2003年, 在美国国家科学基金会(National Science Foundation, NSF)和欧洲联盟第六工作框架纲要(Sixth Framework Programme)资助下进行了大规模测序, 从而启动了一个国际间合作的蒺藜苜蓿基因组测序计划。参与这项计划的研究者采用鸟枪法测序策略, 对蒺藜苜蓿生态型Jemalong A17的8条染色体臂的常染色质区200 Mb的序列进行测序, 计划将于2007年完成。参与测序的有美国明尼苏达州州立大学和俄克拉荷马州州立大学(染

收稿 2006-04-08 修定 2006-07-31

资助 国家科技部“973”重大基础项目(2001CB108901)和新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室开放课题(200503)。

\*通讯作者(E-mail: yzwang@sippe.ac.cn, Tel: 021-54924167)。

染色体1、4、6、8)、美国遗传学研究学院(染色体2和7)、英国桑格研究所(染色体3)和法国INRA-CNRS(染色体5)等研究单位。这项测序计划的重点包括构建遗传和物理图谱,并对蒺藜苜蓿与其它豆科植物和模式植物拟南芥之间进行比较基因组学研究;构建基因序列数据库和大规模基因表达分析的基因功能研究;生物信息学研究,包括数据库和资料资源的分析及相关资料的公布(Cook 1999)。这项计划的实施能够加速一些重要农艺性状基因的发现,提高人们对豆科作物中基因和基因组演变的认识。

迄今,蒺藜苜蓿基因组测序最直观的收获就是得到了大批量的表达序列标签(expressed sequence tag, EST),截止到2005年初,已经获得相当密度的物理图谱,公布了来自40个cDNA文库的22万多个EST以及150 000个BAC-end序列。为了与蒺藜苜蓿遗传学研究保持同步,有几家生物信息学团体还相继建立了不同的数据库,把蒺藜苜蓿的EST或者细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)序列组装起来,这样,人们可以在许多网址(The INRA-CNRS-Genoscope, Noble Foundation and NSF Projects)看到构建的cDNA库和EST序列,也可以进入蒺藜苜蓿主页(<http://www.medicago.org/>)链接到其它更多有关测序的共享资源。蒺藜苜蓿数据库的规模每天都在不断地更新和扩大,在不久的将来,很有可能与水稻、拟南芥的数据库相媲美,甚至有超过之势。蒺藜苜蓿基因索引数据库整合了所有公开的蒺藜苜蓿EST。这些EST数据库的资料不仅包含植物的各种主要组织,还综合了植物的不同发育阶段和不同的微生物病原体、细菌和真菌共生体、有害昆虫以及不同环境胁迫处理过的材料。这些不同的信息库之间是相互链接的,可为研究人员提供一整套的技术手段来阐述与豆科植物相关的基本问题。综合分析这些来自多个单位的研究结果,具有更大的可信度。例如,每一个EST都能追踪到它被测序时所在的数据库,通过交叉索引这些同源EST所组装成的假设性一致序列(tentative consensus sequence, TC),蒺藜苜蓿基因索引数据库可为研究人员提供一个对应基因表达

模式的初步信息(Frugoli和Harris 2001)。但完整的蒺藜苜蓿功能遗传学研究计划还应包括基因表达谱、遗传启动标签和启动子诱捕插入突变、高通量代谢谱(high-throughput metabolic profiling)和蛋白质组学研究等。相信随着研究的深入,有关这些方面研究结果的数据库将不断地被建立和完善。

## 2 蒺藜苜蓿的遗传转化

遗传转化是阐明基因表达机制、植物生长和发育过程所不可缺少的技术。建立高效的遗传转化和再生系统是研究蒺藜苜蓿基因功能研究中一个重要方面。农杆菌介导的遗传转化系统是获得转基因植物最常用的方法。目前常用的研究蒺藜苜蓿基因功能的转化系统也是根癌农杆菌介导的遗传转化系统和发根农杆菌介导的转化系统2类,后者可用于研究根部特异表达和与共生有关的基因功能。

**2.1 根癌农杆菌介导的遗传转化系统** 蒺藜苜蓿的组织培养开始于20世纪90年代。1989年,Nolan等(1989)首次通过体胚发生途径获得了蒺藜苜蓿再生植株。Thomas等(1992)运用根癌农杆菌介导法,首次通过体胚发生途径,成功得到了蒺藜苜蓿的转化植株。Rose等(1999)建立了生态型Jemalong 2HA的高频再生系统。Chabaud等(1996, 2003)发展了一种更有效的通过体胚发生途径进行遗传转化的方法,而且他们进一步的研究发现根癌农杆菌AGL1介导系统具有较高的转化效率。但这些方法都需要投入大量的劳动量,且需很长的植株再生时间(4~10个月)。1996年,Trieu和Harrison(1996)通过芽器官发生途径成功获得转化再生植株,在2个多月就能得到转基因再生植株,但是转化效率很低。

用上述方法获得转化植株都要经过组织培养和植株再生的过程,操作较为复杂,还需有良好的组织培养再生技术。2000年,Trieu等(2000)建立了一套类似拟南芥中采用的蘸花(floral dip)转化方法,即蒺藜苜蓿真空渗滤转化法(Clough和Bent 1998; Trieu等2000)。与在拟南芥中采用的真空渗滤法不同的是,蒺藜苜蓿用于转化的花是经过春化处理后的植物材料长成的,而且必须进行春化处理,这是转化取得成功的关键性环节;

未经春化处理的幼苗开放的花用真空渗滤法进行遗传转化很难成功(Trieu等2000)。同时, Trieu等(2000)用渗滤法建立了另外一个转化体系: 将在4℃下春化处理的幼苗用培养菌液侵染, 然后将幼苗移栽并筛选抗性植株。相对花而言, 用幼苗作外植体能同时处理大批材料, 容易操作。渗滤法的应用可极大地缩短植株再生时间, 但不足之处是其转化效率极不稳定(分别在4.7%~76%和2.9%~27.6%之间)。这种较大的差异性显然很不理想(Trieu等2000), 但到目前为止, 还未见该实验室或其它实验室有更深入的研究报道。这种高效转化的再生方法促进了蒺藜苜蓿进行T-DNA插入突变的基因功能遗传学研究(Scholte等2002)。

**2.2 发根农杆菌介导的遗传转化系统** 许多双子叶植物根部接种发根农杆菌后, 在接种部位能够产生毛状的遗传转化根系, 可以用来进行含有目的基因的双元载体的共转化。转化的根与非转化的根在形态上没有明显差别。对于豆科植物而言, 前者能为根瘤菌侵染结瘤, 也可以受菌根真菌侵染, 可以用于植物与微生物相互作用方面的研究。发根农杆菌介导的转化系统是一种快速产生遗传转化根系的方法, 已成为研究根生物学基因功能的快速、有效工具。

发根农杆菌介导的遗传转化方法已在多种豆科植物中得到应用。发根农杆菌介导蒺藜苜蓿遗传转化系统的研究始于2001年, 迄今已建立了一套卡那霉素抗性筛选的快速、有效转化系统(Boisson-Dernier等2001)。2004年, Limpens等(2004)建立了一套以红色荧光DsRED1作为筛选标记的发根农杆菌介导的转化系统, 此套系统的优点之一是红色荧光标记可以有效地辨别是嵌合根或是完全转化根。目前, 这2套发根农杆菌介导的转化系统主要用于研究蒺藜苜蓿与苜蓿根瘤菌和菌根真菌的共生作用以及病原真菌或寄生生物(如线虫)的相互作用。

### 3 蒺藜苜蓿功能基因组学的研究方法

建立有效的遗传突变的方法和鉴定突变基因的方法对研究基因功能来说十分重要。已有许多方法在蒺藜苜蓿中得到应用。如曾在拟南芥基因

组突变中得到成功应用的甲基磺酸乙酯(EMS)法和电离射线(快速中子、 $\gamma$ -射线和X-射线)法等。这2种经典方法的优点就是不需要转基因, 并且突变频率也不依赖于基因组大小。唯一的要求就是在突变率和繁殖力之间寻找一种平衡: 太高的突变剂量会降低繁殖力和生育能力; 突变剂量过低则会造成低突变率。但是应用这种方法的最大困难是从突变表型植株中寻找突变基因。近年来, 反向遗传学的研究方法也已应用于蒺藜苜蓿基因功能的研究。

#### 3.1 EMS诱变和定向诱导基因组局部突变技术(targeting induced local lesions in genomes, TILLING)

EMS会引起特定基因位点的等位基因DNA的点突变(Koornneef等1982)。以EMS和快中子诱变获得的突变体, 其突变的等位基因涉及基因图位克隆。一旦根据表型筛选到突变体, 突变基因的定位克隆需要突变的图谱定位以及鉴定与突变位点紧密连锁的分子标记, 以便进行染色体步行(chromosome walking)和测序, 这样, 通过比较野生型和突变体的序列, 即可鉴定突变基因。应用EMS突变技术已经分离到几个与共生、植物形态和生理有关的突变体(Ané等2004; Mitra等2004; Amor等2003; Ellis等2003; McConn和Nakata 2002; Catoira等2000; Penmetsa和Cook 1997, 2000)。

TILLING是近年来发展起来的以PCR为基础的反向遗传学方法。采用高通量的检测手段, 能快速、有效地从EMS诱变的突变群体中鉴定出点突变(Henikoff和Comai等2003; Henikoff等2004; Till等2003; Colbert等2001; McCallum等2000)。

**3.2 快中子和 $\gamma$ -射线诱变** 离子射线是另外一种有效的突变剂, 它与EMS不同, 可引起基因组中DNA序列缺失和染色体重排, DNA缺失范围从几个碱基至3万个碱基(Li等2001; Bruggemann等1996)。快中子和 $\gamma$ -射线很容易产生基因敲除突变体, 特别适用于串联重复基因家族。另外, 快速中子和 $\gamma$ -射线产生的突变体可以用作反向遗传和正向遗传的筛选, 鉴定引起突变的缺失。几年前, 有人用 $\gamma$ -射线突变技术分离到第1个蒺藜苜蓿共生突变体(Sagan等1995)。最近, 又有人用

转录本为基础的克隆策略, 分离到一个 $\gamma$ -射线突变体DMI3 (Mitra等2004)。目前, 应用快中子突变蒺藜苜蓿突变体的研究正在美国的Roberts Noble Foundation和John Innes Centre进行, 用这种正向遗传学方法, 已经成功筛选到几个发育受阻和结瘤缺失的突变体。

**3.3 T-DNA标签** T-DNA标签是插入突变的一种, 离体转化和再生T-DNA标签已经在水稻、百麦根等许多作物中成功地得到应用(Sallaud等2004; Jeong等2002; Webb等2000)。2002年, Scholte等(2002)设计了3个T-DNA标签, 对蒺藜苜蓿进行插入突变, 从T-DNA边界分析检测到转基因系中含有T-DNA插入, 表明T-DNA标签能有效地用于蒺藜苜蓿的研究。但若要用T-DNA对蒺藜苜蓿的整个基因组进行插入突变, 实际上技术尚不成熟。

虽然T-DNA标签群体在许多作物中都得到成功的应用, 但这些都是通过转化产生的, 所以需要高效的组织培养步骤, 而且要花费大量的劳动才能分离到标签突变。Krysan等(1999)曾做过这样的估算: 由于T-DNA的插入是随机的, 若要拟南芥的任何基因有99%概率的突变, 则需要280 000个T-DNA插入。所以, 要在500 Mb大小的蒺藜苜蓿基因组中进行T-DNA突变, 并且要达到突变饱和, 还需要做更多的工作。此外, 拟南芥基因组之所以能成功进行T-DNA突变, 很重要的原因是由于它有一个简单而有效的转化体系。虽然蒺藜苜蓿也有不用组织培养的真菌渗透法进行转化的报道, 但并不很成功(Trieu等2000; Somers等2003)。事实上, 采用T-DNA插入突变技术进行蒺藜苜蓿整个基因组的突变并不可行, 操作起来有许多困难。此外, T-DNA插入有时会导致靶位点的缺失或重排, 这会给反向遗传筛选带来麻烦。

**3.4 转座子插入突变** 转座标签法是一种诱人的产生大量插入突变体的方法。玉米的DNA转座子*Ac/Ds*、*En/Spm*和*Mu*都已经在玉米和拟南芥中得到广泛应用, 在水稻和烟草也有一定程度的应用(Enoki等1999; Meissner等2000)。而且, 采用*Ac*标签系也克隆到百脉根的根瘤形成和花发育基

因(Schauser等1999; Zhang等2003)。转座元件一旦引入基因组, 就可通过一种剪接-粘贴(cut-and-paste)的机制转座到新的位点, 从而形成不稳定的突变。因此, 如果在比较大的基因组中应用这种转座元件制造突变, 则需要大量覆盖整个基因组的插入位点。尽管只有相对少的起始插入位点, 通过大面积覆盖的基因组, 顺式转座就能被反向选择, 但在蒺藜苜蓿中尚未见报道。也有报道认为, 玉米*En/Spm*元件的转座活性在蒺藜苜蓿中很低, 并且在再生植株里会很快失活(d'Erfurth等2003b)。

反转录转座子是另一种很有吸引力的转座元件, 这种转座元件能通过复制-粘贴(copy-and-paste)的机制在基因组中转座。长末端重复(long-terminal repeat, LTR)反转录转座子有点像逆转录病毒, 它能自我编码复制和转座。反转录转座子通过一个RNA中介的反转录元件, 先转录成mRNA, 然后再反转录成DNA, 最后新的反转录元件又退回到核中插入到新的位点上。由于复制转座时没有删除系统, 所以通过反转录转座插入形成的突变是稳定的。不过, 这与其它插入突变工具一样, 此种系统的缺点也是需要稳定高效的转化再生系统。水稻*Tos17*、烟草的*Tnt1*和*Tto1*是3个具有最好特征活性的转座植物LTR反转录转座子(Kumar和Hirochika 2001; Courtial等2001; Okamoto和Hirochika 2000)。*Tos17*曾在水稻中成功地被用来产生了47 000多个突变系, 证明是一种有用的植物功能遗传研究工具(Kumar和Hirochika 2001)。

最近, 烟草的*Tnt1*已引入蒺藜苜蓿和拟南芥中, 而且可以形成有效转座(d'Erfurth等2003a)。尽管这类分析的样本数目还不够大(蒺藜苜蓿225个株系, 拟南芥35个株系), 但*Tnt1*在烟草、拟南芥和蒺藜苜蓿中的行为却比其它2种转座子显得更具应用潜力(d'Erfurth等2003a; Courtial等2001)。反转录转座子在形成插入突变时, 很重要的是插入位点的特异性。有些反转录转座子仅仅插入基因组的特定区域, 而*Tnt1*则没有表现出插入位点的特异性或插入热点。但*Tnt1*插入明显偏爱基因富集区, 并且多插入基因内部(Courtial

等2001)。此外,与T-DNA插入不同的是,*Tnt1*插入位点的删除和重排很少或不发生,因而*Tnt1*插入可成为一种理想的突变方法,能容易地通过反向遗传学筛选获得植物旁邻序列。

*Tnt1*在蒺藜苜蓿中的转座效率很高,每一代每个品系都有15个拷贝插入非连锁遗传位点(unlinked loci)。根据Krysan等(2002)的拟南芥基因组转座插入突变公式,*Tnt1*在蒺藜苜蓿基因组中平均为3.5 kb的基因长度内随机插入,要使整个蒺藜苜蓿基因组(约500 Mb)里随机插入达到99%的标记,就需要有657 881个插入。如果分别达到95%和85%的饱和度,则分别需要427 961和271 017个插入,即要使蒺藜苜蓿整个基因组达到插入位点饱和时,需要T-DNA插入转基因株系是500 000个,而用*Tnt1*插入只需要350 000个株系(每个系有15个插入)就可达到要求(Alonso等2003)。事实上,由于*Tnt1*插入集中在基因内部,而T-DNA偏好于基因间的区域,所以,实际用到的*Tnt1*插入数会更小一些(Krysan等2002)。而运用*Tnt1*插入最大的优点是,突变体再生很方便,转化事件不必要分成独立的突变系。从单一的*Tnt1*转化系得到的种子能用于再生,而许多其它转座系则需要离体再生。

在欧洲(European Grain Legume Program; <http://www.eugrainlegumes.org/>)和美国(The Samuel Roberts Noble Foundation)有关部门的合作下,已产生了约20 000个*Tnt1*标记的蒺藜苜蓿株系。2005年,Tadege等(2005)首次将烟草的*Tnt1*基因转入蒺藜苜蓿生态型R108-1,并构建了*Tnt1*标签的R108-1的突变体库。

**3.5 RNA干扰** RNA诱导的基因沉默(RNA-induced gene silencing)在动物中通常称为RNA干扰(RNA interference),而在植物中则称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing,PTGS),这是一种基于小双链RNA(dsRNA)的有效反向遗传学工具,它能有效地降解序列特异性mRNA。这项技术的实施要求构建携带目标基因的载体,并且需要经过遗传转化的植物,因此,在拟南芥以外的其它作物中的应用需要建立快速、高效的高通量转化体系,这样就限制了该技术有效的应用。

此外,RNA诱导的基因沉默经常会导致各种各样的表型,这就需要分析大批量的有效转基因植株来寻找每一个沉默的基因。

人们已经围绕豆科作物蒺藜苜蓿做了许多工作,这包括EST序列、有效的遗传转化系统及基因组测序等,其中许多基因序列已证明在根或共生过程中能不同程度地表达。目前,蒺藜苜蓿中已有人做过单个基因沉默的研究(Limpens等2004)。2005年,在美国国家卫生基金会的植物基因组计划资助下,Ivashuta等(2005)采用RNA干扰技术已开始对于蒺藜苜蓿的根发育基因功能大规模进行研究。

病毒诱导的基因沉默(VIGS)是采用病毒载体,绕过遗传转化,直接将构建的病毒载体擦洗植物叶片或通过农杆菌渗入叶片(Waterhouse和Helliwell 2003; Liu等2002)。而且,VIGS的一个优点就是能将整个cDNA文库克隆到病毒载体中,而不仅仅是单个基因。但由于VIGS介导的表型是短暂的,因此,寻找一种能对目标植物感染导致基因沉默的合适病毒载体是必需的。但病毒载体成功感染蒺藜苜蓿的报道尚未见到。

#### 4 结语

随着蒺藜苜蓿基因组大规模测序的进行,将为从事相关问题研究的人员提供更多的免费资源。这些EST序列、TC序列以及其它各种生物信息的分析,也为蒺藜苜蓿的研究带来了方便。

另一个重要资源是蒺藜苜蓿基因组学研究工具的建立。已建立的芯片技术促进了蒺藜苜蓿转录谱的研究。蒺藜苜蓿中有超过98%的序列在紫花苜蓿中都已找到直向同源基因,因此,蒺藜苜蓿的芯片也能用于紫花苜蓿的表达谱。根据蒺藜苜蓿的合作研究计划,更为详细的有关转录、蛋白和次生代谢谱的研究也正在进行中,目的是探索豆科植物基因组结构的保守性以及蒺藜苜蓿与研究相对深入的模式植物拟南芥基因组之间的关系。这些研究结果不仅可供克隆蒺藜苜蓿和其它豆科植物中的基因研究参考,而且还丰富了人们对植物基因组进化的认识。有关蒺藜苜蓿的研究已在很多方面迅速地展开,特别是植物和微生物相互作用方面的研究已取得新的进展,从而加深了人们

对植物与微生物相互作用机理的认识(Hogg等2006)。

此外, 在这项研究过程中发展起来的分子和遗传信息等资源, 还可用于豆科植物生物学的其它方面的研究, 并推动其它诸如人类营养, 植物的病原反应, 根系发育, 共生互作, 植物中碳、氮和磷的新陈代谢以及植物发育的激素控制和信号转导等研究的开展。

### 参考文献

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R et al (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301: 653~657
- Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GED, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Dénarié J, Gough C (2003). The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J*, 34: 495~506
- Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GED, Ayax C, Lévy J, Debellef, Baek JM, Kalo P et al (2004). *Medicago truncatula DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*, 303: 1364~1367
- Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy P et al (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep*, 8: 40~49
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG (2001). Hairy roots of *Medicago truncatula* as tools for studying nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbioses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 14: 693~700
- Bruggemann E, Handwerker K, Essex C, Storz G (1996). Analysis of fast neutron-generated mutants at the *Arabidopsis thaliana HY4* locus. *Plant J*, 10: 755~760
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Dénarie J (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, 12: 1647~1665
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep*, 22: 46~51
- Chabaud M, Larssonneau C, Marmouget C, Hugué T (1996). Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the *MtENOD12* nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene. *Plant Cell Rep*, 15: 305~310
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16: 735~743
- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol*, 126: 480~484
- Cook DG (1999). *Medicago truncatula*—a model in the making! *Curr Opin Plant Biol*, 2: 310~304
- Courtial B, Feuerbach F, Eberhard S, Rohmer L, Chiapello H, Camilleri C, Lucas H (2001). *Tnt1* transposition events are induced by *in vitro* transformation of *Arabidopsis thaliana*, and transposed copies integrate into genes. *Mol Genet Genomics*, 265: 32~42
- d'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P (2003a). Efficient transposition of the *Tnt1* tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 34: 95~106
- d'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Ripa S, Messinese E, Durand P, Trinh H, Kondorosi A, Ratet P (2003b). Rapid inactivation of the maize transposable element *En/Spm* in *Medicago truncatula*. *Mol Genet Genomics*, 269: 732~745
- Ellis DR, Lopez-Millan AF, Grusak MA (2003). Metal physiology and accumulation in a *Medicago truncatula* mutant exhibiting an elevated requirement for zinc. *New Phytol*, 158: 207~218
- Enoki H, Izawa T, Kawahara M, Komatsu M, Koh S, Kyojuka J, Shimamoto K (1999). Ac as a tool for functional genomics of rice. *Plant J*, 19: 605~613
- Frugoli J, Harris J (2001). *Medicago truncatula* on the move! *Plant Cell*, 13 (3): 458~465
- Henikoff S, Comai L (2003). Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 75~401
- Henikoff S, Till BJ, Comai L (2004). TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol*, 135: 630~636
- Hogg BV, Cullimore JV, Ranjeva R, Bono JJ (2006). The *DMI1* and *DMI2* early symbiotic genes of *Medicago truncatula* are required for a high-affinity nodulation factor-binding site associated to a particulate fraction of roots. *Plant Physiol*, 140 (1): 365~373
- Ivashuta SI, Harrison MJ, Vance CP, Van den Bosch KA, Samac DA, Retzel EF, Gantt SJ (2005). Use of RNA interference to study gene function in *Medicago truncatula* roots. *Plant & Animal Genomes XIII Conference*
- Jeong DH, An S, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An G (2002). T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol*, 130: 1636~1644
- Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH (1982). EMS- and

- radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh Mutat Res*, 93: 109~123
- Krysan PJ, Young JC, Jester PJ, Monson S, Copenhaver G, Preuss D, Sussman MR (2002). Characterization of T-DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis. *OMICS*, 6: 163~174
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11: 2283~2290
- Kumar A, Hirochika H (2001). Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends Plant Sci*, 6: 127~134
- Li X, Song Y, Century K, Straight S, Ronald P, Dong X, Lassner M, Zhang Y (2001). A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J*, 27: 235~242
- Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaan B, Franssen H, Bisselgong T, Geurts R (2004). RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot*, 55 (399): 983~992
- Liu YL, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 31: 777~786
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol*, 123: 439~442
- McConn MM, Nakata PA (2002). Calcium oxalate crystal morphology mutants from *Medicago truncatula*. *Planta*, 215: 380~386
- Meissner R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y, Levy AA (2000). A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant J*, 22: 265~274
- Mitra RM, Shaw SL, Long SR (2004). Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 10217~10222
- Nolan KE, Rose RJ, Gorst JR (1989). Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Rep*, 8: 278~281
- Okamoto H, Hirochika H (2000). Efficient insertion mutagenesis of *Arabidopsis* by tissue culture-induced activation of the tobacco retrotransposon *Tto1*. *Plant J*, 23: 291~304
- Penmetza RV, Cook DR (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*, 275: 527~530
- Penmetza RV, Cook DR (2000). Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 123: 1387~1397
- Rose RJ, Nolan KE, Bicego L (1999). The development of the highly regenerable seed line Jemalong 2HA for transformation of *Medicago truncatula*—implications for regenerability via somatic embryogenesis. *J Plant Physiol*, 155: 788~791
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, Duc G (1995). Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn) after  $\gamma$ -ray mutagenesis. *Plant Sci*, 111: 63~71
- Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bès M, Piffanelli P, Piégu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D et al (2004). High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant J*, 39: 450~464
- Schauser L, Roussis A, Stiller J, Stougaard J (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 402: 191~195
- Scholte M, d'Erfurth I, Rippa S, Mondy S, Cosson V, Durand P, Breda C, Trinh H, Rodriguez-Llorente I, Kondorosi E et al (2002). T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Mol Breed*, 10: 203~215
- Somers DA, Samac DA, Olhoft PM (2003). Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol*, 131: 892~899
- Tadege M, Ratet P, Mysore KS (2005). Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. *Trends Plant Sci*, 10: 229~235
- Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE (1992). Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Rep*, 11: 113~117
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Comodo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE et al (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res*, 13: 524~530
- Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza IE, Versaw WK, Blaylock LA, Shin H, Chiou T-J, Katagi H, Dewbre GR et al (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J*, 22: 531~541
- Trieu AT, Harrison MJ (1996). Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep*, 16: 6~11
- Waterhouse PM, Helliwell CA (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet*, 4: 29~38
- Webb KJ, Skot L, Nicholson MN, Jorgensen B, Mizen S (2000). *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 13: 606~616
- Zhang SL, Sandal N, Polowick PL, Stiller J, Stougaard J, Fobert PR (2003). *Proliferating floral organs (Pfo)*, a *Lotus japonicus* gene required for specifying floral meristem determinacy and organ identity, encodes an F-box protein. *Plant J*, 33: 607~619