

Medicago truncatula Gaertn. – roślina modelowa z rodziny bobowatych (*Fabaceae*)

Magdalena BEDERSKA, Wojciech BORUCKI

M. BEDERSKA, W. BORUCKI. 2012. *Medicago truncatula* Gaertn. – a legume (*Fabaceae*) model plant. *Wiadomości Botaniczne* 56(1/2): 21–33.

Legumes are important economic crop plants for human nutrition and animal forage. They have ability to establish effective symbiosis with a wide range of bacteria from the family *Rhizobiaceae* and with arbuscular endomycorrhizal fungi. *Medicago truncatula* (barrel medic) is a pasture legume, native from Mediterranean Area. It was chosen as a model plant for studying the molecular genetics of the symbiotic associations and metabolomics. Model species provide insight into processes that were hitherto poorly understood. *Medicago truncatula* is a diploid, autogamous plant and has relatively compact genome consisting of eight chromosomes. The genome sequence is currently available for this species. The collection of ecotypes, mutants and cultivars of this species is very useful for many aspects of plant science. The generation time of *M. truncatula* is only three months. Furthermore, *M. truncatula* is susceptible to *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* and several procedures for transformation and regeneration are described. Wide range of molecular and genetic tools have been developed for this legume including ESTs and cDNA libraries. Various protocols related to cultivation and multiplication conditions have been proposed. All these factors make *Medicago truncatula* an excellent model for basic and applied plant biology and biotechnology.

KEY WORDS: legumes, *Medicago truncatula*, model plant, symbiosis

Magdalena Bederska, Wojciech Borucki, Katedra Botaniki, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-766 Warszawa, e-mail: magdalena_bederska@sggw.pl

WSTĘP

Zsekwencjonowanie genomu rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* stało się bodźcem do poznania genomów gatunków należących do innych rodzin roślin naczyniowych. W 2002 roku poznano genom gatunku lucerny *Medicago truncatula* Gaertn. należącej do rodziny bobowatych (Young et al. 2005). Rośliny należące do tej rodziny (fasola, soja, groch, lucerna) stanowią podstawę żywienia ludzi oraz zwierząt w wielu rejonach świata. Wiele z tych

roślin wchodzi w interakcje z mikrosymbiontami (symbioza z bakteriami brodawkowymi i grzybami mikoryzowymi), co stanowi obecnie przedmiot licznych badań. Obecność symbiozy roślin bobowatych z bakteriami brodawkowymi *Rhizobium* sp., wiążącymi azot atmosferyczny, jest dodatnio skorelowana z wysoką zawartością białka w nasionach (20–50% suchej masy). Pozwala ona na niższe zużycie nawozów azotowych, które zanieczyszczają glebę, wody powierzchniowe i głębinowe, doprowadzając do ich eutrofizacji (Martyniuk 2008).

Rośliny bobowate charakteryzują się dużą wielkością i złożonością genomu. Trudne było znalezienie przedstawiciela, który wykazywałby podobieństwo w biologii i uprawie do innych roślin i równocześnie stanowiłby wygodny model do badań genetycznych. Blisko spokrewniony z lucerną siewną (*Medicago sativa*) gatunek *M. truncatula* jest samopylną, diploidalną rośliną o stosunkowo małym genomie (około 450 Mbp), licznych genotypowych mutantach i naturalnych ekotypach, co czyni ją odpowiednim modelem do badań nad biologią rodziny *Fabaceae*, a w szczególności nad interakcjami roślina-mikroorganizmy oraz składem jakościowym i ilościowym metabolitów wtórnych (takich jak flawonoidy). Badania wykazały, że genom *M. truncatula* wykazuje mikrosyntenię (podobieństwo lokalizacji kluczowych genów) na poziomie około 8–10% z genomem *Arabidopsis* sp., co wskazuje na to, że wyniki badań dotyczące *Arabidopsis* nie znajdują przełożenia dla roślin bobowatych. Takie rośliny natomiast jak groch, lucerna czy soja są obcopolne i mają stosunkowo duży genom, dlatego również wydają się nieużyteczne w badaniach genetycznych. Obecnie genom *M. truncatula* jest w pełni zsekwencjonowany, a badania dotyczące biologii tej rośliny są prowadzone w wielu ośrodkach na całym świecie (Meinke et al. 1998, Adam 2000, Choi et al. 2004, Jasnowska et al. 2008, Sato et al. 2010). Gatunek ten jest również ważną rośliną paszową uprawianą głównie w Australii na około 50 mln ha (Crawford et al. 1989). Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie najważniejszych zagadnień dotyczących pochodzenia, uprawy, biologii oraz zastosowania *M. truncatula* jako rośliny modelowej.

RODZINA BOBOWATE (*FABACEAE*)

Rodzina bobowate (*Fabaceae*, dawniej motylkowate – *Papilionaceae*) to trzecia pod względem liczby gatunków (około 20 tysięcy) rodzina roślin naczyniowych po storczykowatych (*Orchidaceae*) i astrowatych (*Asteraceae*). W obrębie bobowatych wyodrębniono na podstawie badań morfologicznych trzy podrodziny

– mimozowate (*Mimosoideae*), motylkowate (*Papilionoideae*) oraz brezylkowate (*Caesalpinioideae*), z których dwie pierwsze mają pochodzenie monofiletyczne, natomiast ostatnia – parafiletyczne (Doyle et al. 2003). Podrodzina mimozowate obejmuje ponad 3000 gatunków drzew i krzewów rosnących głównie w klimacie tropikalnym i subtropikalnym (Miller et al. 2003), natomiast podrodzina brezylkowate to około 3000 gatunków występujących w Ameryce Południowej, Afryce i południowo-wschodniej Azji (Esterella et al. 2006). Rodzina bobowate obejmuje rośliny różnorodnych siedlisk – od lasów tropikalnych po pustynie oraz o różnorodnym pokroju – od drzew (*Robinia pseudoacacia*), poprzez pnącza (*Wisteria* spp.), po roczne rośliny zielne (*Ornithopus* spp.). Rośliny z podrodziny bobowate właściwe (syn. motylkowate) charakteryzują się grzbiecistymi kwiatami, w których motylkowata korona zbudowana jest z charakterystycznie wykształconych płatków, określanych jako żagielek, skrzydełka (wioselka) oraz łódeczka. Bobowate są najczęściej owadopylne (*Robinia pseudoacacia*), lecz mogą być również zapylane przez ptaki (*Lotus berthelotii*) bądź nietoperze (*Parkia pendula*), natomiast gatunki samopylne są nieliczne (*Pisum sativum*). Owocem jest strąk, który może przybierać różne formy.

Wiele gatunków bobowatych jest ważnych z gospodarczego punktu widzenia. Części nadziemne roślin stanowią pożywienie dla ludzi oraz paszę dla zwierząt. Części podziemne wzbogacają glebę w azot (50–300 kg N/ha rocznie) oraz związki mineralne pobierane z głębszych warstw.

W naszej florze występuje ponad 100 gatunków w stanie naturalnym oraz w uprawie. Wiele z nich zawiera związki biologicznie czynne wykorzystywane w lecznictwie (np. kumaryny w nostrzyku, flawonoidy w lucernie; Jasiński et al. 2009, Kapusta 2009).

Jako rośliny uprawne wykorzystuje się głównie fasolę (*Phaseolus* sp.), bób (*Vicia faba* subsp. *maior*), groch zwyczajny (*Pisum sativum*), soczewicę jadalną (*Lens esculenta*), soję uprawną (*Glycine max*) oraz orzecha ziemnego

(*Arachis hypogaea*). Powierzchnia upraw roślin bobowatych to około 0,2 mln ha, natomiast zbóż, najważniejszej z gospodarczego punktu widzenia grupy roślin – 3,7 mln ha (dane z roku 2010 wg FAOSTAT, www.faostat.org).

Rośliny z rodziny bobowatych są obiektem wielu badań, nie tylko ze względu na ich znaczenie jako roślin uprawnych, lecz również ze względu na ich zdolność do wchodzenia w interakcje symbiotyczne (Oldroyd, Geurts 2001).

MEDICAGO TRUNCATULA GAERTN.

Nazwa rodzajowa *Medicago* (*Medica* z żeńską końcówką *-ago*) oznacza roślinę pochodzącą z Medii (obecnie Iran) i wywodzi się z języka perskiego. Drugi człon nazwy – *truncatula* – znaczy po łacinie tyle co „ucięta” i odnosi się do wierzchołka listka. Angielska nazwa „barrel medic” nawiązuje do beczułkowatego kształtu strąków (Rejewski 1996, Gledhill 2008).

Za główny ośrodek pochodzenia rodzaju *Medicago* uważa się basen Morza Śródziemnego, Półwysep Arabski, Irak oraz tereny wschodnich Bałkanów (Maureira-Butler et al. 2008, Steele et al. 2010). Rodzaj *Medicago* w naszej florze jest reprezentowany przez lucernę nerkowatą (*Medicago lupulina*), lucernę sierpowatą (*Medicago falcata*), lucernę siewną (*Medicago sativa*) oraz lucernę kolczastostrąkową (*Medicago minima*). Gatunki te są uprawiane w monokulturach, a dziedzicze rosną na łąkach i przydrożach (Pojnar et al. 1993, Doyle 1994, Jasnowska et al. 2008).

CHARAKTERYSTYKA ROŚLINY

M. truncatula jest jednoroczną, wolnorosnącą rośliną o pokroju płożącym lub wzniesionym, wysokości 10–60 cm; pokrój rośliny (Ryc. 1) zależy od genotypu i warunków wzrostu (gęstości nasadzenia oraz intensywności naświetlenia). Cykl życiowy (od nasiona do nasiona) trwa, z pewnymi różnicami pomiędzy odmianami, około trzech miesięcy. Kiełkowanie jest epigeiczne, liścienie są jednolistkowe. W momencie rozwoju wierzchołka wzrostu produkowane są



Ryc. 1. Roślina *M. truncatula* w trzecim miesiącu wegetacji (fot. M. Bederska).

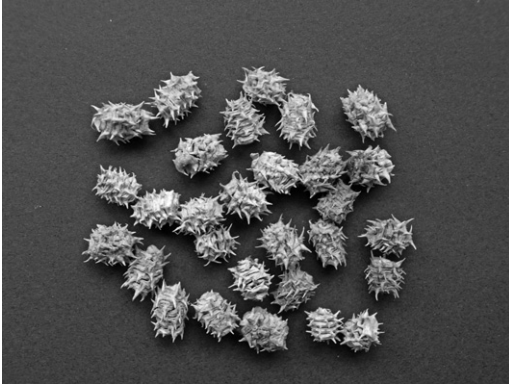
Fig. 1. Three-month-old-plant of *M. truncatula* (phot. M. Bederska).

serie odcinków wzrostu (metamery) składające się z międzywęźli, liści oraz kątów liściowych. Pęd główny tworzy początkowo cztery metamery oddzielone krótkimi międzywęźlami, które sukcesywnie się wydłużają. Liście są ułożone



Ryc. 2. Kwiat *M. truncatula* wykazuje budowę typową dla kwiatów roślin bobowatych właściwych (fot. M. Bederska).

Fig. 2. A flower of *M. truncatula* is typical for legumes (phot. M. Bederska).



Ryc. 3. Kłujące, poskręcane strąki *M. truncatula* (fot. M. Bederska).

Fig. 3. A spiky, curved pods of *M. truncatula* (phot. M. Bederska).

na łodydze spiralnie, trójlistkowe, listki jajowate z antocyjanowymi plamkami pośrodku, brzegiem ząbkowane, środkowa szypułka dłuższa niż boczne. Kwiaty są żółte, pojedyncze lub zebrane w niewielkie kwiatostany (2–5 kwiatów), samopylne (Ryc. 2). Roślina jednocześnie produkuje pędy wegetatywne i generatywne, dlatego zarówno liście jak i kwiaty oraz owoce mogą występować na jednej roślinie. Kolczaste strąki o długości 1,5 do 2,5 mm zawierają 4–14 kremowych nasion o nerkowatym kształcie (Ryc. 3). Nasiona przechodzą spoczynek przez około 3–4 miesiące po odpadnięciu strąka od rośliny matecznej.

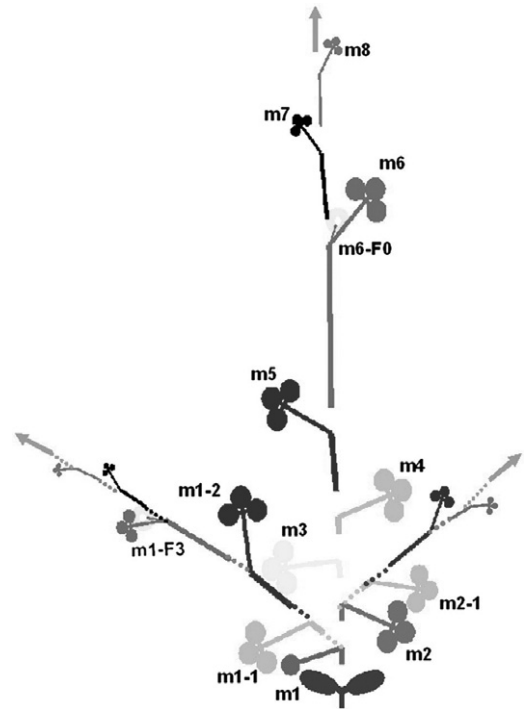
Dla najbardziej popularnego kultuwaru Jemalong A17 utworzono system opisu fenotypowego reprezentujący najważniejsze fazy rozwojowe rośliny (Ryc. 4). Został on sprawdzony podczas opisu fenotypu roślin poddanych stresowi niedoboru fosforu i azotu. System ten może być stosowany jako standaryzowana metoda do analizy fenotypowych zmian (poprzez dokładne wskazanie miejsca występowania zmian) u roślin poddanych różnym stresom. Wyróżnione zostały trzy fazy wzrostu: wzrost wegetatywny pędu głównego, wzrost wegetatywny pędów bocznych oraz różnicowanie i rozwój organów generatywnych (Bucciarelli et al. 2006). *M. truncatula* jest również rośliną modelową w badaniach ontogenezy kwiatu – przy użyciu

homeotypycznych mutantów zostały opisane poszczególne fazy rozwoju kwiatu (Benlloch et al. 2003).

Istnieje kilkaset ekotypów, z czego w uprawie stosuje się Jemalong, Cyprus i Ghor (o krótkim okresie wegetacji).

GENOM

Dwa gatunki należące do rodziny *Fabaceae* zostały wybrane jako rośliny modelowe – *Lotus japonicus* oraz *Medicago truncatula*. Obydwa są od dawna wykorzystywane do badań genetycznych i fizjologicznych (ze szczególnym uwzględnieniem relacji symbiotycznych roślina-mikrosymbiont (Handberg, Stougaard



Ryc. 4. Schemat opisu genotypowego kultuwaru Jemalong A17 *M. truncatula*, F – miejsce pojawiania się kwiatu, m – metamer, ten sam kolor oznacza jednoczesne pojawianie się danej części rośliny (wg Bucciarelli et al. 2006).

Fig. 4. Schematic diagram of *M. truncatula* phenotypic development, F – flower emergence, m – metamer, the same colour indicates organs which appear simultaneously (according to Bucciarelli et al. 2006).

1992, Frugoli, Harris 2001, Town 2006, Sato et al. 2010). Zrealizowano również porównanie sekwencji obydwu genomów, co pozwoliło na połączenie wiedzy o modelowych gatunkach oraz zwiększyło ich przydatność w odniesieniu do strączkowych (Young et al. 2005). Blisko spokrewniona z lucerną siewną *M. truncatula* została uznana za odpowiedni gatunek modelowy dla roślin z rodziny bobowatych kilka lat temu. Przemawiają za tym takie cechy tej rośliny jak: mały, diploidalny genom (~454 do 526 Mbp – połowa wielkości genomu lucerny siewnej, czterokrotnie większy od genomu *Arabidopsis thaliana*), samopylność oraz łatwość transformowania. Porównanie genomu *M. truncatula* (między innymi częstotliwości insercji, delecji poszczególnych genów oraz grup genów, makro i mikrosyntenii) do *Lotus japonicus* i *Glycine max* wykazało wysokie podobieństwo genomów *M. truncatula* i *L. japonicus* oraz umiarkowane między *M. truncatula* a *G. max*. Analiza porównawcza wskazuje na użyteczność *M. truncatula* jako rośliny modelowej, a uzyskane wyniki badań mogą znacznie poszerzyć obecny stan wiedzy na temat uprawnych roślin strączkowych (Choi et al. 2004).

Poznanie sekwencji genomu roślin modelowych stanowi bazę do wykorzystania zdobytej wiedzy w uprawie roślin bobowatych. Przy pomocy najnowszych technik rozwiniętych dla rośliny modelowej możliwe jest uzyskanie informacji na temat ich genetyki, a co za tym idzie, przyspieszenie postępu hodowlanego. *M. truncatula* należąca do plemienia *Trifoliae* jest blisko spokrewniona z lucerną siewną (*Medicago sativa*), która jest rośliną tetraploidalną i obcopolną, dlatego nie jest odpowiednia do badań genetycznych (Barker et al. 1990, Young, Shoemaker 2006, Julier, Meusnier 2010).

Narzędzia do badań obejmujących sekwencjonowanie genomów oraz modyfikacje genetyczne rozwijają się w szybkim tempie i powodują znaczne powiększenie zakresu oraz różnorodności badań dotyczących *M. truncatula*.

Bruce Roe z Uniwersytetu w Oklahomie (USA) przy wsparciu Samuela Roberta z Noble Foundation zainicjował w 2001 roku projekt

sekwencjonowania całego genomu *Medicago truncatula* cv. Jemalong A17. Projekt wspierany był przez U.S. National Science Foundation oraz 6 Europejski Program Ramowy. Do tej pory zgromadzono liczne sąsiadujące sekwencje, których większość reprezentuje sekwencje powtarzające się w genomie (Young et al. 2005).

Na podstawie kariogramu DAPI w pachytenie (długości chromosomów, pozycji centromerów, struktury heterochromatyny oraz pozycji trzech sekwencji powtarzających się – 5S rDNA, 45S rDNA oraz MtR1) została utworzona molekularna mapa cytogenetyczna za pomocą metody FISH (Fluorescence In Situ Hybridization, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*) (Kulikova et al. 2001).

W ciągu ostatnich kilku lat utworzono ponad 190 000 sekwencji tagujących (TAGs) – oligonukleotydy DNA stosowane w sekwencjonowaniu oraz 155 000 zsekwencjonowanych końców BAC (Bacterial Artificial Chromosome, sztuczny chromosom bakteryjny). Projekt sekwencjonowania genomu *M. truncatula* miał charakter międzynarodowy i obejmował współpracę wielu ośrodków naukowych zarówno w Europie jak i w Stanach Zjednoczonych. Informacje na temat wyników badań są dostępne na wielu stronach internetowych (www.medicago.org/genome, www.tigr.org/tbd/e2k1/mta1, mips.gsf.de/proj/plant/jsf/medi/index.jsp) (Young et al. 2005).

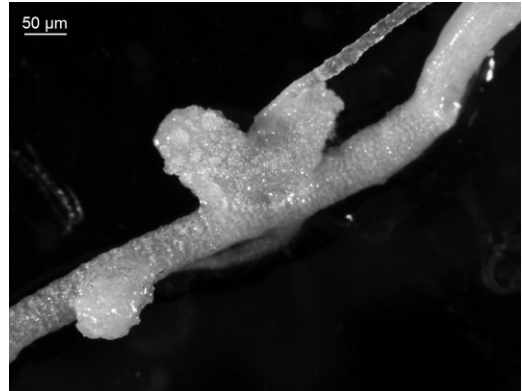
Efektom współpracy Samuel Roberts Noble Foundation z National Center for Genome Resources mającej na celu zsekwencjonowanie genomu *M. truncatula* stało się utworzenie bazy danych MGI (Medicago Genome Initiative) sekwencji EST (Expressed Sequence Tags) dostępnej na stronie www.ncgr.org/research/mgi (Bell et al. 2001).

Inną bazą służącą do pozyskiwania danych dotyczących transkryptomu jest MtDB (Medicago truncatula Database) dostępna na stronie www.medicago.org/MtDB (Lamblin et al. 2003). Na stronie www.cebitec.uni-bielefeld.de/truncatulix/ znajduje się obszerna baza zbierająca dane z pięciu innych baz (Town 2006, Henckel et al. 2009).

Genom *M. truncatula* zawiera osiem chromosomów ($2n = 2x = 16$) o podobnym kształcie i wielkości. Euchromatyna zlokalizowana jest na ramionach chromosomów, natomiast heterochromatyna znajduje się w regionach centromerycznych, pericentromerycznych oraz telomerycznych, z wyjątkiem chromosomu 6, gdzie występuje również na ramionach. 80% genomu występuje w formie heterochromatyny w miejscach pericentromerycznych (Sanders 2008, Kulikova et al. 2001).

SYMBIOZA Z RYZOBIAMI

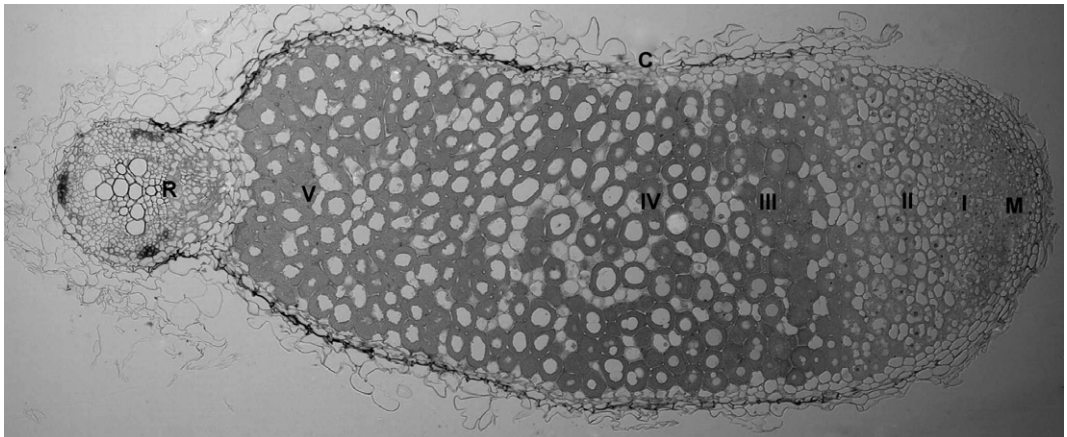
Pierwszym etapem prowadzącym do nawiązania symbiozy jest dialog molekularny pomiędzy rośliną, która jest gospodarzem a bakterią będącą symbiontem. Korzenie *Medicago truncatula* wydzielają do gleby wtórne metabolity o charakterze związków aromatycznych – flawonoidów (głównie medikarpinę), które oddziałują na bakterie z rodzaju *Sinorhizobium* (*S. meliloti* i *S. medicae*) znajdujące się w podłożu (Brewin 2004, Gage 2004, Wasson et al. 2006, Lozano-Baena et al. 2007). Odpowiedzią bakterii jest ekspresja genów NOD (nodulacji)



Ryc. 5. Brodawki korzeniowe *M. truncatula* indukowane efektywnym szczepem *Sinorhizobium medicae* 419 (fot. M. Bederska).

Fig. 5. *M. truncatula* root nodules induced by effective strain *Sinorhizobium medicae* 419 (phot. M. Bederska).

i synteza czynnika Nod, który jest związkiem z grupy lipochitooligosacharydów. Czynniki Nod ma za zadanie przygotować roślinę na kontakt z bakterią, a razem z bakteryjnymi egzopolisacharydami indukuje tworzenie nici infekcyjnej we włośniku (Jones et al. 2007). Czynniki Nod wywołuje u rośliny odpowiedź w postaci wzrostu zawartości wapnia w cytozolu włośników oraz



Ryc. 6. Przekrój podłużny przez brodawkę korzeniową *M. truncatula* (pow. 100×): M – merystem, I – strefa penetracji nici infekcyjnej, II – strefa młodej symbiozy, III – strefa przejściowa, IV – strefa wiązania azotu, V – strefa starzenia, C – kora brodawki, R – korzeń (fot. M. Bederska).

Fig. 6. Longitudinal section of *M. truncatula* root nodule (mag. 100×): M – meristem, I – infection thread penetration zone, II – prefixed zone, III – interzone, IV – nitrogen fixing zone, V – senescent zone, C – cortex, R – root (phot. M. Bederska).

zmiany w ich cytoszkielecie (Timmers et al. 1999). Włośniki ulegają skręceniu zamykając bakterie w wytworzonej przez siebie niszy. Rosnąca nić infekcyjna (tubularna struktura zawierająca bakterie) penetruje primordium brodawki (grupę komórek kory korzenia dzielących się w wyniku działania bakteryjnego czynnika Nod), a uwolnione z nici bakterie zasiedlają komórki (Oke et al. 1999, Monahan-Giovanelli et al. 2005, Sujkowska 2009). Brodawki *M. truncatula* należą do typu niezdeterminowanego, co oznacza, że merystem funkcjonuje przez cały okres życia brodawki, której budowa anatomiczna charakteryzuje się dzięki temu strefowością (merystem, strefa infekcji, młoda tkanka bakteroidalna, strefa przejściowa, strefa wiązania azotu, strefa starzenia; Ryc. 5, 6).

Dojrzała brodawka jest połączona z systemem waskularnym rośliny poprzez własne wiązki przewodzące przebiegające w korze wewnętrznej brodawki. Jak podaje Guinel (2009), wiązki przewodzące rozgałęziają się na coraz mniejsze w miarę zbliżania się do merystemu i mogą występować w różnej odległości od siebie. Obserwacje własne autorów dowodzą jednak, że rozmieszczenie to nie jest przypadkowe. Dostrzegalna jest regularność odstępów pomiędzy wiązkami, co może zapewniać równomierne zaopatrzenie w asymilaty i odbiór produktów wiązania azotu strefy infekcyjnej brodawki (Ryc. 7).

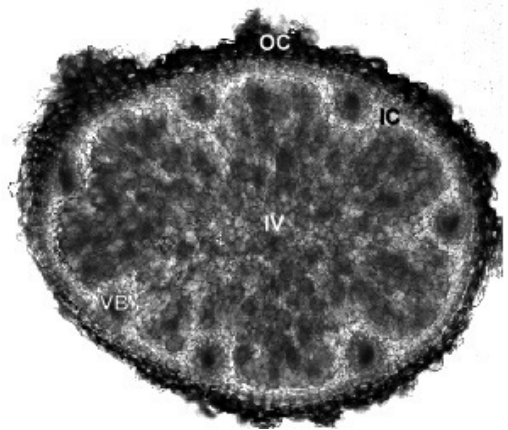
Jak już wspomniano, ryzobia indukujące powstawanie brodawek u *M. truncatula* należą do rodzaju *Sinorhizobium*. Poszczególne ich gatunki mogą wykazywać różnice w efektywności wiązania azotu. Wciąż bardzo mało wiadomo o przyczynach warunkujących efektywność w wiązaniu N₂ brodawek powstałych z udziałem poszczególnych szczepów. Stwierdzono, iż dla *M. truncatula* szczepem w pełni efektywnym jest *Sinorhizobium medicae* WSM 419, natomiast częściowo efektywnym *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Terpolili et al. 2008).

Genom *Sinorhizobium meliloti* – bakterii będącej mikrosymbiontem *M. sativa* i *M. truncatula* – składający się z jednego chromosomu i dwóch plazmidów został niedawno w pełni

zsekwencjonowany, co znacznie ułatwia badanie genetycznych aspektów symbiozy (Rome et al. 1996, Colebath et al. 2002, Howieson et al. 2005, Zribi et al. 2005, Terpolili et al. 2008).

MIKORYZA ARBUSKULARNA

U *M. truncatula* występuje także inny typ symbiozy – mikoryza wewnętrzna zwana również mikoryzą arbuskularną (ang. *arbuscular mycorrhiza* – AM) lub pęcherzykowato-arbuskularną (ang. *vesicular-arbuscular mycorrhiza* – VAM, VA). Jest to symbioza pomiędzy grzybami z gromady *Glomeromycota* (u *Medicago* są to najczęściej *Glomus mosseae* i *G. intraradices*) a dużą częścią roślin wyższych. Tak samo jak w przypadku dialogu molekularnego z ryzobiami również tutaj flawonoidy odgrywają znaczącą rolę: stymulują kiełkowanie spor a następnie wzrost strzępek oraz obniżenie reakcji obronnej gospodarza (Van Rhijn et al. 1997). Strzępki grzyba rozrastają się pomiędzy komórkami korzenia, następnie wrastają przez ścianę komórek kory, gdzie na styku z błoną komórkową tworzą



Ryc. 7. Przekrój poprzeczny przez brodawkę korzeniową *M. truncatula*, widocznych jest siedem wiązek przewodzących w parenchymie: IV – strefa wiązania azotu, IC – kora wewnętrzna, OC – kora zewnętrzna, VB – wiązka przewodząca (fot. M. Bederska).

Fig. 7. Cross section of *M. truncatula* root nodule, seven vascular bundles in the inner cortex are visible: IV – nitrogen fixing zone, IC – inner cortex, OC – outer cortex, VB – vascular bundles (phot. M. Bederska).

specjalne rozgałęzione struktury – arbuskule. Komórki grzyba gromadzą fosforany pobrane przez grzybnię w wakuoli lub w cytoplazmie (Rausch, Bucher 2002). Arbuskule, które są miejscem wymiany fosforanów oraz związków organicznych pomiędzy symbiontami tworzą się w komórkach kory leżących najbliżej wiązek przewodzących (Wulf et al. 2003, Brundrett 2004, Genre et al. 2005, Harrison 2005, Gianinazzi-Pearson et al. 2006).

TRANSFORMACJA I REGENERACJA

Jednym z powodów wyboru *M. truncatula* na roślinę modelową jest stosunkowa łatwość, z jaką roślina ta ulega transformacji różnymi szczepami *Agrobacterium tumefaciens* oraz rzadziej *Agrobacterium rhizogenes* (w drugim przypadku istnieje bardzo słaba regeneracja roślin *in vitro* dlatego nie jest wskazana transformacja eksplantatów). Transformacja polega na wbudowaniu do genomu rośliny genów umieszczonych na plazmidzie bakteryjnym (Hnatuszko-Konka et al. 2009). Możliwa jest regeneracja przez somatyczną embriogenezę (z eksplantatów liściowych oraz mezofilowych protoplastów), kulturę zarodków lub bezpośrednią organogenezę (Nolan et al. 1989, Thomas et al. 1992, Rose, Nolan 1995).

Wysoką zdolnością do regeneracji charakteryzuje się linia Jemalong 2HA i jest ona często używana do transformacji (Wang et al. 1996). Podobne właściwości posiada wyselekcjonowana *in vitro* linia R108-1, pochodna ekotypu 108-1, która tworzy efektywne brodawki z wieloma szczepami ryzobiów (Hoffmann et al. 1997).

Dla *M. truncatula* opracowano dwie metody transformacji *in planta*. Pierwsza z nich powstała w oparciu o metodę opracowaną dla *Arabidopsis thaliana* i polega na infiltracji kwitnących roślin zawiesiną *Agrobacterium*. Siewki poddawane są wernalizacji w celu uzyskania wcześniejszego kwitnienia. Po około 3–4 tygodniach, na początku okresu kwitnienia, nadziemne części roślin zanurza się w zawieszynie *Agrobacterium* i inkubuje dwukrotnie w próżni. Efektywność transformacji wynosi do 66%.

Druga metoda opiera się na infiltracji w próżni dwutygodniowych siewek zawiesiną *Agrobacterium* (efektywność do 9%). Obie metody są szybkie, proste technicznie i nie wymagają stadium kultur tkankowych. Selekcji potomstwa dokonuje się za pomocą herbicydu. Do transformacji stosowane są często szczepy bakteryjne EHA105, ASE1 oraz GV3101, natomiast w transformacji *Medicago* sp. powszechnie stosowany jest szczep LBA4404 (Trieu et al. 2000). Wykazano, że genotyp 2HA oraz hiperwirulentny szczep *Agrobacterium* AGL1 pozwalają uzyskać bardzo wysoką wydajność transformacji (Chabaud et al. 2003).

Najczęściej transformacji dokonuje się używając liści 4–6 tygodniowych lub starszych roślin. Liście są sterylizowane powierzchniowo etanolem i podchlorynem wapnia, płukane w wodzie destylowanej, a następnie wykładane na zestaloną pożywkę B5 (Gamborg) z NAA (kwasem naftylooctowym). Po 3-tygodniowej inkubacji z *Agrobacterium* fragmenty kalusa są dalej inkubowane, ale na świetle i przy zmienionym składzie pożywki (Nolan et al. 1989). Inkubacja fragmentów liści (3–4 mm) przez 1–2 godziny zawiesiną *Agrobacterium* skutkuje wysokim procentem transformacji. Po odsączeniu nadmiaru bakterii eksplantaty wykładane są na szalki Petriego z medium bez antybiotyków. Spodnia strona liścia powinna przylegać do medium. Po minimum dwóch dobach w ciemności, w 24°C, eksplantaty przenoszone są na podłoże z antybiotykami (augmentinem lub kanamycyną) (Trinth et al. 2001).

Do istotnych aspektów, które trzeba uwzględnić dokonując transformacji oraz regeneracji roślin należą: prowadzenie kultury matecznej, gęstość optyczna zawiesiny bakterii, czas inokulacji oraz dobór właściwej pożywki w zależności od transformowanego genotypu (Iantcheva et al. 2005).

UPRAWA

Zebrane, nieuszkodzone strąki należy przechowywać w temperaturze pokojowej w papierowych torebkach lub plastikowych

pojemnikach z dostępem powietrza. Tak przechowywane nasiona zachowują żywotność przez co najmniej 2 lata. Nasiona ze strąków pozyskuje się ręcznie rozkręcając strąk pęsetą lub przy użyciu specjalnych młynków. Nasiona od fragmentów strąków można oddzielić przez sedymentację lub za pomocą strumienia powietrza, np. z suszarki do włosów. Łupina nasienna jest twarda, dlatego nasiona należy skaryfikować mechanicznie (papierem ściernym lub skalpelem w przypadku małej liczby nasion) lub za pomocą stężonego kwasu siarkowego (5–12 minut). Nasiona sterylizuje się podchlorynem wapnia lub sodu a następnie wyklada na szalki Petriego z agarem (optymalne stężenie to 0,8%) lub na bibule w sterylnych warunkach (do 50 nasion na szalkę o średnicy 9 cm). Nasiona przechodzą około sześciomiesięczny okres spoczynku, który może zostać przerwany za pomocą skaryfikacji stężonym kwasem siarkowym przez 6–8 minut, skaryfikację mechaniczną polegającą na przetrwaniu ciągłości łupiny nasiennej, wernalizację sterylnych nasion przez 7 dni w 4–6°C w ciemności lub poprzez traktowanie benzyloaminopuryną. Przedłużanie wernalizacji skutkuje wcześniejszym kwitnieniem, ale słabszym



Ryc. 8. Dwudniowe siewki *M. truncatula* na szalkach Petriego z pożywką agarową (fot. M. Bederska).

Fig. 8. Two days old *M. truncatula* seedlings on the Petri agar plates (phot. M. Bederska).



Ryc. 9. Brodawkująca roślina *M. truncatula* w probówce na skosie agarowym (fot. M. Bederska).

Fig. 9. A nodulating *M. truncatula* plant in test-tube with agar (phot. M. Bederska).

wzrostem wegetatywnym. Możliwe jest również kiełkowanie niedojrzałych zarodków, które nie ulegają spoczynkowi (od 25 dnia po zapyleniu; Barker et al. 1990). Nasiona kiełkują w ciągu 24–48 godzin w 14–20°C (Ryc. 8).

M. truncatula rośnie dobrze na wielu substratach (agar, ziemia, podłoża inertne – perlit, piasek, wermikulit). Może rosnąć na różnych typach gleb od piaszczystych do gliniastych, jednak powinny to być gleby o umiarkowanej wilgotności i o pH 6–8. Nie toleruje niskiego pH gleby, zwłaszcza w obecności jonów glinu i manganu, oraz niskiego zwierciadła wody gruntowej, dopóki rośliny nie są głęboko zakorzenione. Preferuje klimat typu śródziemnomorskiego z opadami rocznymi 500–1200 mm.

Pomimo, iż *M. truncatula* jest często wysiewana w mieszance z móżgą (*Phalaris aquatica*) lub rajgrasem (*Lolium rigidum*), najlepiej rośnie i plonuje w monokulturze. W uprawie *M. truncatula* znalazło zastosowanie wiele systemów,

m.in. uprawa szklarniowa, w fitotronie, aeroponiczna czy *in vitro* (Ryc. 9). Bardzo złe wyniki daje uprawa hydroponiczna (korzenie są wrażliwe na niedobór tlenu), za to dość dobre aeroponiczna. Siewki z rozwiniętymi liścieniami (około 1-tygodniowe) można rozsadzać do doniczek (do 7 roślin w doniczce o objętości 5 l).

Rośliny są wytrzymałe na suszę, ze względu na możliwość wytwarzania rozbudowanego systemu korzeniowego sięgającego do 10m w głąb gleby. Są natomiast wrażliwe na zalewanie, dlatego zalecane jest podlewanie raz w tygodniu nawozem oraz wodą dejonizowaną w miarę wysychania podłoża. Rośliny zakwitają po około trzech miesiącach (linia R108 i ekotyp Ghor wcześniej). Stosuje się również rozmnażanie poprzez ukorzenianie sadzonek pędowych lub poprzez szczepienie, natomiast krzyżowanie jest utrudnione ze względu na małe, samopylne, klejstogamiczne kwiaty (Journet et al. 2001).

Uprawy lucerny są atakowane przez mszycę grochową (*Aphis pisum*), mszycę fasolową (*Aphis craccivora*) i lucernową (*Therioaphis trifolii* f. *maculata*) oraz wciornastki (*Thrips* sp.). W warunkach szklarniowych lub laboratoryjnych, w niskiej wilgotności powietrza oraz przy dobrych warunkach świetlnych (lampy sodowe), rośliny są często atakowane przez przędziorkowate (*Tetranychidae*). Choroby są mniej groźne – może pojawić się *Phoma medicaginis*, choroba grzybowa powodująca nekrotyczne plamy na liściach. Wzrost i rozwój roślin może również zostać zahamowany również poprzez wirusa mozaiki lucerny (*Alfalfa Mosaic Virus*; Barker et al. 2006).

PODSUMOWANIE

Zastosowanie *M. truncatula* jako rośliny modelowej otwiera drogę do wielokierunkowych, szczegółowych badań genetycznych i hodowlanych dotyczących roślin strączkowych. Właściwości biologiczne oraz łatwość uprawy w różnych systemach umożliwiają prowadzenie badań na całym świecie. Opracowane metody dotyczące transformacji i regeneracji roślin oraz zastosowanie innych powszechnie dostępnych

narzędzi biologii molekularnej pozwalają na badania dotyczące symbiozy z ryzobiami, grzybami mikoryzowymi oraz metabolomiki. Poznanie funkcjonowania brodawek korzeniowych jest istotne dla uzyskania zwiększenia ich wydajności w wiązaniu azotu szczególnie w warunkach stresowych. Można przewidywać, że zdobyta wiedza znajdzie aplikacyjne zastosowanie w zwiększeniu efektywności uprawy roślin bobowatych.

LITERATURA

- ADAM D. 2000. Now for the hard ones. *Nature* **408**: 792–793.
- BARKER D. G., BIANCHI S., BLONDON F., DATTEE Y., DUC G., ESSAD S., FLAMENT P., GALLUSCI P., GERNIER G., GUY P., MUEL X., TOURNEUR J., DENARIE J., HUGUET T. 1990. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-Legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* **8**(1): 40–49.
- BARKER D. G., PFAFF T., MOREAU D., GROVES E., RUFFEL S., LEPETIT M., WHITEHAND S., MAILLET F., NAIR R. M., JOURNET E. P. 2006. Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. *Medicago truncatula handbook*. <www.medicago.org> [dostęp 3.04.2012]
- BELL C. J., DIXON R. A., FARMER A. D., FLORES R., INMAN J., GONZALES R. A., HARRISON M. J., PAIVA N. L., SCOTT D., WELLER J. W., MAY G. D. 2001. The *Medicago* genome initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Research* **29**: 114–177.
- BENLLOCH R., NAVARRO C., BELTRAN J. P., CANAS L. 2003. Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sexual Plant Reproduction* **15**: 231–241.
- BREWEN N. J. 2004. Plant cell wall remodeling in the Rhizobium-Legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**: 293–316.
- BRUNDRETT M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews* **79**: 473–495.
- BUCCIARELLI B., HANAN J., PALMQUIST D., VANCE C. P. 2006. A standardized method for analysis of *Medicago truncatula* phenotypic development. *Plant Physiology* **142**: 207–219.
- CHABAUD M., CARVALHO-NIEBEL F., BARKER D. G. 2003. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports* **22**: 46–51.
- CHOI H., MUN J., KIM D., ZHU H., BAEK J., MUDGE J., ROE B., ELLIS N., DOYLE J., KISS G. B., YOUNG N. D.,

- COOK D. R. 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(43): 15289–15294.
- COLEBATH G., TREVASKIS B., UDVARDI M. 2002. Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. *New Phytologist* **153**: 37–42.
- CRAWFORD E. J., LAKE A. W. H., BOYCE K. G. 1989. Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. *Advances in Agronomy* **42**: 399–437.
- DOYLE J. J. 1994. Phylogeny of the legume family: An approach to understanding the origins of nodulation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **25**: 325–349.
- DOYLE J. J., LUCKOW M. A. 2003. The rest of the Iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**: 900–910.
- ESTERELLA M., CABEZAS F. J., AEDO C., VELAYOS M. 2006. Checklist of the *Caesalpinioideae* (Leguminosae) of Equatorial Guinea (Annobon, Bioko and Rio Muni). *Botanical Journal of the Linnean Society* **151**: 541–562.
- FRUGOLI J., HARRIS J. 2001. *Medicago truncatula* on the Move! *The Plant Cell* **13**: 458–463.
- GAGE D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **6**: 280–300.
- GENRE A., CHABAUD M., TIMMERS T., BONFANTE P., BARKER D. G. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi Elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* **17**: 3489–3499.
- GIANNAZZI-PEARSON V., MALDONADO-MENDOZA I., LOPEZ-MEYER M., WEIDMANN S., HARRISON M. J. 2006. Arbuscular Mycorrhiza. *Medicago truncatula handbook*. <www.medicago.org> [dostęp 3.04.2012]
- GLEDHILL D. 2008. The names of plants. Cambridge University Press, New York, s. 253, 389.
- GUINEL F. C. 2009. Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types. *Botany* **87**: 1117–1138.
- HANDBERG K., STOUGAARD J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal* **2**(4): 487–496.
- HARRISON M. J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**: 19–42.
- HENCKEL K., RUNTE K. J., BEKEL T., DONDRUP M., JAKOBI T., KUESTER H., GOESMANN A. 2009. TRUNCA-TULIX – a data warehouse for the legume community. *Plant Biology* **11**: 9–19.
- HNATUSZKO-KONKA K., ŁUCHNIAK P., WIKTOREK-SMAGUR A., GERSZBERG A., KOWALCZYK T., KONONOWICZ A. K. 2009. Transformacja roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes*. *Postępy Biologii Komórki* **36**: 189–200.
- HOFFMANN B., TRINH T. H., LEUNG J., KONDOROSI A., KONDOROSI E. 1997. A new *Medicago truncatula* line with superior invitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**: 307–315.
- HOWIESON J. G., YATES R. J., O'HARA G. W., RYDER M., REAL D. 2005. The interactions of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii in nodulation of annual and perennial *Trifolium* spp. from diverse centers of origin. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **45**: 199–207.
- IANTCHEVA A., VLAHOVA M., ATANASSOV A. 2005. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using system for direct somatic embryogenesis promoted by TDZ. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **19**: 50–56.
- JASIŃSKI M., MAZURKIEWICZ E., RODZIEWICZ P., FIGLE-ROWICZ M. 2009. Flawonoidy – budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych. *Biotechnologia* **2**(85): 81–94.
- JASNOWSKA J., JASNOWSKI M., RADOMSKI J., FRIEDRICH S., KOWALSKI W. 2008. Botanika Wydawnictwo Brasika, Szczecin.
- JONES K. M., KOBAYASHI H., DAVIES B. W., TAGA M. E., WALKER G. C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology* **5**(8): 619–633.
- JOURNET E., BARKER D., HARRISON M., KONDOROSI E. P. 2001. *M. truncatula* as biological material (Module 1), *EMBO Practical Course on the New Plant Model System Medicago truncatula*. <<http://www.isv.cnrs-gif.fr/embo01/manuals/index.html>> [dostęp 3.04.2012]
- JULIER B., MEUSNIER I. 2010. Alfalfa breeding benefits from genomics of *Medicago truncatula*. *Field and Vegetable Crop Research* **47**: 395–402.
- KAPUSTA I. 2009. *Medicago truncatula* – roślina modelowa w badaniach metabolomu roślin bobowatych (Fabaceae). *Biotechnologia* **1**(84): 119–131.
- KULIKOVA O., GUALTIERI G., GEURTS R., KIM D. J., COOK D., HUGUET T., JONG J. H., FRANZ P. F., BISELING T. 2001. Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **27**(1): 49–58.
- LAMBLIN A. J., CROW J. A., JONHSON J. E., SILVERSTEIN K. A. T., KUNAU T. M., KILIAN A., BENZ D., STROMVIK M., ENDRE G., VANDENBOSCH K. A., COOK D. R., YOUNG N. D., RETZEL E. F. 2003. MtDB: a database for personalized data mining of the model legume

- Medicago truncatula* transcriptome. *Nucleic Acids Research* **31**: 196–201.
- LOZANO-BAENA M. D., PRATS E., MORENO T. T., RUBIALES D., PEREZ-DE-LUQUE A. 2007. *Medicago truncatula* as a model for nonhost resistance in Legume-parasitic plant interactions. *Plant Physiology* **145**: 437–449.
- MARTYNIUK S. 2008. Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. *Journal of Research and Applications In Agricultural Engineering* **53**(4): 9–14.
- MAUREIRA-BULER I. J., PFEIL B. E., MUANGPROM A., OSBORN T. C., DOYLE J. 2008. The reticulate History of *Medicago* (Fabaceae). *Systematic Biology* **57**: 466–482.
- MEINKE D. W., CHERRY M., DEAN C., ROUNSLEY S. D., KOORNNEEF M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662–681.
- MILLER J. T., GRIMES J. W., MURPHY D. J., BAYER R. J., LADIGES P. Y. 2003. A phylogenetic analysis of the *Acaciae* and *Ingeae* (Mimosoideae: Fabaceae) based on *trnK*, *matK*, *psbA-trnH*, and *trnL/trnF* sequence data. *Systematic Botany* **28**: 558–566.
- MONAHAN-GIOVANELLI H., PINEDO C. A., GAGE D. G. 2005. Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic Bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **140**: 661–670.
- NOLAN K. E., ROSE R. J., GORST J. R. 1989. Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell reports* **8**: 279–281.
- OKE V., LONG S. R. 1999. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* **2**: 641–646.
- OLDROYD G. E. D., GEURTS R. 2001. *Medicago truncatula*, going where no plant has gone before. *Trends in Plant Science* **6**: 552–554.
- POJNAR E., JAROS W., KOBYŁKO T., KORALKOWSKA K., MIKULSKA-MACHETA A., ZAJĄC Z. 1993. Botanika. Teoria i ćwiczenia. Część I. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Krakowie, Kraków.
- RAUSCH C., BUCHER M. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216**: 23–37.
- REJEWSKI M. 1996. Pochodzenie łacińskich nazw roślin polskich. Książka i Wiedza, Warszawa.
- ROME S., FERNANDEZ M. P., BRUNEL B., NORMAND P., CLEYET-MARELM J. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* **10**: 972–980.
- ROSE R. J., NOLAN K. E. 1995. Regeneration of *Medicago truncatula* from protoplasts isolated from kanamycin-sensitive and kanamycin-resistant plants. *Plant Cell Reports* **14**: 349–353.
- SANDERS I. F. 2008. Sequencing of *Medicago truncatula* genome and study of metabolic gene organization and expression profile. *University of Oklahoma Graduate College, Oklahoma*.
- SATO S., ISOBE S., TABATA S. 2010. Structural analyses of the genome in legumes. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 146–152.
- STEELE K. P., ICKERT-BOND S. M., ZARRE S., WOJCIECHOWSKI M. F. 2010. Phylogeny and character evolution in *Medicago* (Leguminosae): evidence from analyses of plastid *trnK/matK* and nuclear *GA3ox1* sequences. *American Journal of Botany* **97**: 1142–1155.
- SUJKOWSKA M. 2009. Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate-*Rhizobium*. *Wiadom. Bot.* **53**: 35–53.
- TERPOLILI J. J., O'HARA G. W., TIWARI R. P., DILWORTH M. J., HOWIESON J. G. 2008. The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *1021. New Phytologist* **179**: 62–66.
- THOMAS M. R., ROSE R. J., NOLAN K. E. 1992. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant cell reports* **11**: 113–117.
- TIMMERS A. C. J., AURIAC M., TRUCHET G. 1999. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**: 3617–3628.
- TOWN C. D. 2006. Annotating the genome of *Medicago truncatula*. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 122–127.
- TRIEU A. T., BURLEIGH S. H., KARDAILSKY I. V., MALDONADO-MENDOZA I. E., VERSAW W. K., BLAYLOCK L. A., SHIN H., CHIOU T., KATAGI H., DEWBRE G. R., WEIGEL D., HARRISON M. J. 2000. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *The Plant Journal* **22**(6): 531–541.
- TRINTH H., BARKER D., RATED P. 2001. *EMBO Practical Course on the New Plant Model System. Medicago truncatula. Course Manual. Module 2. Regeneration and transformation methods.* s. 11–12. <<http://www.isv.cnrs.gif.fr/embo01/manuels/index.html>> [dostęp 03.04.2012]
- WANG J. H., ROSE R. J., DONALDSON B. I. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation and expression of foreign genes in *Medicago truncatula*. *Australian Journal of Plant Physiology* **23**: 265–270.
- WASSON A. P., PELLERONE F. I., MATHESIUS U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin

- transport regulation by Rhizobia. *The Plant Cell* **18**: 1617–1629.
- WULF A., MANTHEY K., DOLL J., PERLICK A., LINKE B., BEKEI T., MEYER F., FRANKEN P., KUSTER H., KRAJINSKI F. 2003. Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 306–314.
- VAN RHIJN P., FANG Y., GALILI S., SHAUL O., ATZMON N., WININGER S., ESHED Y., LUM M., LI Y., TO V., FUJISHIGE N., KAPULNIK Y., HIRSCH A. M. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5467–5472.
- YOUNG N. D., SHOEMAKER R. C. 2006. Genome studies and molecular genetics. Part 1. Model legumes. Exploring the structure, function and evolution of legume genomes. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 95–98.
- YOUNG N. D., CANNON S. B., SATO S., KIM D., COOK D. R., TOWN C. D., ROE B. A., TABATA S. 2005. Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **137**: 1174–1181.
- ZRIBI K., MHAMDI R., HUGUET T., AOUANI M. E. 2005. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* nodulating *Medicago truncatula* according to host and soil origins. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**: 1009–1015.