

Yoncada (*Medicago sativa* L.) Kuraklık Stresi ve Tolerantlık Mekanizması

İskender TİRYAKI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çanakkale

Geliş (Received): 22.03.2016

Kabul (Accepted): 15.05.2016

ÖZET: Kuraklık dünya genelinde tarımsal üretimi tehdit eden en önemli abiyotik stres faktörlerinin başında gelmektedir. Ilman iklim kuşağının en önemli bitkilerinden birisi olan yoncanın (*Medicago sativa* L.) sürdürülebilir tarıma sağladığı olumlu katkılar ve hayvan beslenmesindeki önemi, bu bitkinin dünya ve ülkemizdeki kıymetini giderek artırmaktadır. Gelişimini tamamlamış 3-4 yıllık yonca bitkisi kurağa kısmen tolerant olmasına karşın özellikle çimlenme ve erken fide evreleri ile biçim sonrası dönemlerde meydana gelebilecek kuraklık stresinden büyük oranda etkilenmektedir. Diğer taraftan yoncada kuraklık stresi uygulayarak doğrudan seleksiyon ya da klasik melezleme yolu ile mevcut genotipler arasında tolerant bitkilerin elde edilmesi, kurağa tolerantlığın düşük bir kalıtım değerine sahip olması ve zaman alıcı uygulamalar olması nedeniyle oldukça güçtür. İntroduksiyon ve yabancı çeşitlerin bu amaçla kullanılması ise beraberinde adaptasyon ve royalty ödemeleri gibi farklı sorunları beraberinde getirmektedir. Biyoteknolojik yaklaşımlar kullanarak kurağa tolerant transgenik çeşitlerin geliştirilmesi kısmen mümkün olmakla birlikte bu bitkilerin kabulüne yönelik dünya genelindeki tartışmalar halen devam etmekte ve ülkemizde bu bitkilerin yetiştirilmesine izin verilmemektedir. Bu nedenle kurağa tolerant yeni bitki genotiplerinin geliştirilmesindeki başarılar, bitkilerin stres ilişkili morfolojik, fizyolojik ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına ve bunların birlikte değerlendirildiği yeni ıslah yaklaşımlarına bağlıdır. Bu çalışmanın amacı güncel literatür varlığında bitkilerde ve özellikle de yoncada kuraklık stresi ve kurağa tolerantlık mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamaktır.

Anahtar Kelimeler: Yonca, kuraklık, su stresi, tolerant

Drought Stress and Tolerance Mechanisms in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

ABSTRACT: Drought is one of the major abiotic stresses threatening agricultural productivity all around the world. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is the most important forage crop in temperate regions whose importance may further increase because of its positive contribution to sustainable agriculture and its productivity on animal feeding. Although 3-4 years old alfalfa is relatively drought tolerant, it is very vulnerable to drought stress at germination and early seedling growth stages as well as at regrowth stage right after grazing. On the other hand, development of drought tolerant alfalfa varieties by selection or classical crossing is very difficult to due to low heritability of drought tolerance traits and longtime requirement. Introduction of foreign drought tolerant varieties comes along with adaptation and royalty payment problems. Although it is possible to develop relatively drought tolerant transgenic varieties by applying biotechnological approaches, the acceptance of such crops are still controversial and planting of those crops is not allowed in our country. Therefore, success for development of drought tolerant new plant genotypes will depend on understanding of stress related morphological, physiological and molecular mechanisms, and collective use of such new breeding approaches. The aim of this study is to help the understanding of drought stress and tolerant mechanisms of plants, specifically alfalfa, under the light of current literature.

Key Words: Alfalfa, drought, water stress, tolerance

GİRİŞ

Kuraklık, toprağın su içeriğinde ve bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönem olarak tanımlanmakta ve bitkilerde büyüme ve gelişme ile verim potansiyellerini doğrudan etkilemektedir (An ve Liang, 2012). Dünyadaki tarım alanlarının yaklaşık % 41'i sürekli kuraklık stresi ile karşı karşıya kalmakta ve bu durum dünya genelinde 2 milyar insanı doğrudan etkilemektedir (Mortimore, 2008). Sürekli artan nüfusa karşılık gıda güvenliğinin sağlanması adına yapılacak olan tarımsal faaliyetlerde ihtiyaç duyulan sulama suyunun, bitkinin ihtiyaç duyduğu gelişme dönemlerinde karşılama ihtimali ise her geçen gün giderek azaltılmaktadır (Tardieu, 2005). Bu nedenle suyun sınırlı olduğu yarı kurak bölgelerde

farklı bitki gelişim dönemlerindeki su stresini daha iyi tolere edebilen ya da su stresine dayanabilen bitki türlerini geliştirmek bitki ıslahçılarının en önemli hedeflerinden birisidir. Bu hedeflere yönelik olarak geçen 80 yıllık zaman zarfında yapılan seleksiyon çalışmaları ile son yıllarda yapılan biyoteknolojik uygulamalar sayesinde bazı bitki türlerinde önemli başarılar elde edilebilmiştir. Bu süreç aynı zamanda bitkilerin su yetersizliğine gösterdikleri tepkilerin genetik, fizyolojik ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına da çok önemli katkılar sağlamıştır. Kuraklık başta olmak üzere çok farklı stres şartlarını daha iyi tolere edebilen ve böylece stres varlığında verim kayıplarını en aza indirecek yeni bitki çeşitlerinin

geliştirilmesi gelecek nesillerin gıda güvenliğinin sağlanması için stratejik öneme sahiptir.

Yaklaşık 50 türü barındıran yonca cinsi içerisinde tarımsal açıdan önemli olan 10 kadar tür bulunmaktadır (Avcıoğlu ve ark., 2009). Yaygın ya da adı yonca olarak isimlendirilen *Medicago sativa* dünya genelinde ekonomik öneme sahip olan yonca türüdür (Avcıoğlu ve ark., 2009). Tür içerisinde tarımı yapılan çeşitler, hemen hemen birbirinin aynı olan genomlardan oluşan autotetraploid bitkilerdir (Li ve Brummer, 2012). Diploid türler *M. sativa* ssp. *caerulea* (Less. ex Ledeb.) Schmalh. ($2n=2x=16$), halen kültürü yapılan autotetraploid yoncanın progenitorü olarak bilinir (Mccoy ve Smith, 1983). Salkım formunda çiçeklere sahip olan yonca, helezonik meyve içerisinde gelişen böbrek şeklinde tohumlar meydana getirir (Avcıoğlu ve ark., 2009). Uzun ömürlü bir yem bitkisi olan yonca çok farklı iklim ve toprak şartlarına adapte olabilmektedir (Avcıoğlu ve ark., 2009). Ekim sonrası Batı ve Güney Anadolu koşullarında 7-10 yıl, Orta ve Doğu Anadolu koşullarında 20-30 yıl yaşayabilen bitkiden iklim ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak yılda 4-12 kez biçim alınabilmektedir (Avcıoğlu ve ark., 2009). Kuru otunda ortalama %18 ham protein bulunduran yonca dünyada ve ülkemizde kaliteli kaba yemin en önemli kaynağını teşkil etmektedir (Avcıoğlu ve ark., 2009). Gelişimini tamamlamış bitki, derin kök sistemi ile genel olarak kurağa dayanıklılık göstermekte, bir yıl içerisinde çok sayıda biçilmesi ve her biçimde zengin bir vejetatif aksam oluşturması nedeniyle özellikle de kurak alanlarda diğer kültür bitkileri ile karşılaştırıldığında çok daha fazla su istemektedir (Wissuwa ve ark., 1997). Ancak, ekim yılında henüz gelişmiş olan bir kök sistemine sahip olmayan bitki, özellikle ekim yılını takip eden birkaç yıllık periyotta kurağa toleransı oldukça düşüktür (Avcıoğlu ve ark., 2009). Bitkide kurağa tolerans 3 yaşından itibaren artan kök sistemine bağlı olarak gelişmektedir (Avcıoğlu ve ark., 2009). Bu nedenle yonca gerek ekim yılında gerekse ekim yılını takip eden bir kaç yıllık periyotta kuraklığa karşı hassasiyet göstermektedir. Yonca, çimlenme ve erken fide döneminde meydana gelecek olası kuraklıklardan büyük oranda etkilenmektedir (Kaplan ve ark., 2015). Gelişimini tamamlamış yonca bitkisinde ise iyi bir verim elde edebilmek için bitkilerin birkaç haftadan daha uzun bir süre kuraklığa maruz kalmaması gerekmektedir (Avcıoğlu ve ark., 2009).

KURAKLIK STRES MEKANİZMASI

Kuraklık mekanizmasının kompleks yapısı kuraklığa yönelik ıslah çalışmalarının yavaş ilerlemesinin en önemli nedenlerinden birisidir (Verslues ve ark., 2006). Ancak son yıllarda bitki fizyolojisi ve genomik konularında elde edilen başarılar, kuraklığa tolerans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve bu konuya yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine imkân tanımıştır (Tuberosa ve Salvi, 2006). Ayrıca, çok sayıdaki fizyolojik çalışma, bitkisel karakterlerin geliştirilmesi yoluyla da bitkilerin adaptasyon

kabiliyetlerinin artırılabilceğini göstermiştir. Bu karakterler arasında küçük habitusluluk, azaltılmış yaprak alanı, erken olgunlaşma, yetiştirme sezonundaki evapotranspirasyonun azaltılmasını sağlayacak stoma kapanma süresi ve azaltılmış verim potansiyeli gösterilebilir (Karamanos ve Papatheohari, 1999).

Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalar, kontrollü şartlarda polyethylene glycol (PEG) kimyasalının bitkilerde kuraklık stresinin oluşturulmasında başarılı bir şekilde kullanılabilceğini göstermiştir (Caruso ve ark., 2008; Chen ve ark., 2010; Rouhi ve ark., 2006; Rouhi ve ark., 2004; Zhu ve ark., 2005). PEG, bulunduğu ortamın ozmotik potansiyelini modifiye etmek sureti ile bitkilerde su alımını kontrol etmekte ve böylece bitkilerde kuraklık stresinin oluşmasını sağlamaktadır. Nitekim, kuraklığa tolerant Giza 2 ve hassas olan Trihibrid 321 mısır genotipleri, PEG kullanılarak oluşturulan kuraklık stresi ortamında 21 gün süre ile muamele edildiğinde, bitkilerin kuraklık ile ilgili bazı parametrelerinde çok önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Moussa ve Abdel-Aziz, 2008). Benzer şekilde *Oryza sativa* ve *Prosopis juliflora* bitkilerinde PEG kullanılarak oluşturulan kuraklık stresinin bitki yapraklarındaki enzim ve gen ifadelerinde önemli değişimlere neden olduğu belirlenmiştir (Basu ve ark., 2010; George ve ark., 2008). Yoncada yapılan çalışmada PEG uygulamasının kuraklık stresinin oluşturulması ve stres parametrelerinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilceği, kurağa hassas ve tolerant yonca çeşitlerine ait ayrımların bu şekilde başarıyla yapılabilceği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2009). Yonca ve üçgül tohumları kullanılarak yapılan bir çalışmada türlerin tuz ve kuraklık stresine karşı çimlenme evresinde büyük bir hassasiyet gösterdikleri ve ilgili stres etmenlerini daha iyi tolere edebilen yeni bitki genotiplerinin geliştirilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır (Kaplan ve ark., 2015). Farklı yonca türlerinin kuraklık stresine verdikleri tepkilerin belirlendiği başka bir çalışmada çeşitler arasında çimlenme, kök ve sap uzunluğu ile fide gücü (vigor) bakımından çok önemli farklılıkların var olduğu ve PEG kullanılarak oluşturulacak kuraklık stresinin tolerant genotiplerin ayrıştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılabilceği gösterilmiştir (Çarpıcı ve Erdel, 2015). Nitekim aynı çalışmada Bilensoy-80 ve Alsancak çeşitlerinin çimlenme ve erken fide dönemindeki kuraklık stresini daha iyi tolere edebildikleri belirtilmiştir (Çarpıcı ve Erdel, 2015). Bilensoy-80 çeşidinin sulu şartlar için geliştirilmiş yerli bir çeşit olmasına karşın çimlenme evresinde kuraklık stresini daha iyi tolere edebilmesi, kuraklık gibi abiyotik stres etmenlerine karşı yapılacak ıslah çalışmalarında farklı yaygın amaçlar için geliştirilmiş çeşit ya da genetik kaynakların tanımlamaya mutlak dahil edilmeleri gerektiğini göstermesi bakımından oldukça önemlidir.

Bitkiler kuraklık stresine karşı fizyolojik, biyokimyasal, anatomik ve morfolojik değişiklikler ile birlikte gen ekspresyonlarını da içeren çok farklı yaşamsal stratejiler geliştirerek adapte olmaya

çalışmaktadır. Bu stratejilerden biri kuraklıktan kaçış diğeri ise kurağa toleranlıktır. Kuraklıktan kaçış stratejisi, bitkilerin kuraklık şartlarında yüksek su potansiyelini devam ettirebilme yeteneği olarak tanımlanırken, kuraklığa toleranlık bitkinin düşük su potansiyelinde dahi normal fonksiyonlarını yerine getirebilme kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır (Levitt, 1980a). Kuraklıktan kaçış genellikle bitkide yaprak alanının küçültülmesi, stoma sayı ve iletkenliğinin azaltılması, yoğun kök sistemlerinin oluşturulması ve kök sap oranının artırılması şeklinde bazı morfolojik değişikliklerle sağlanmaktadır (Levitt, 1980b; Quan ve ark., 2016). Diğer taraftan kuraklığa toleranlık, kuraklık stresi altında spesifik gen ekspresyonlarının yapılması ve spesifik bazı proteinlerin birikim olaylarını da içeren hücre ve doku spesifik fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları içermektedir (Amtmann ve ark., 2005; Bohnert ve Jenson, 1996).

Yakın zamana kadar kuraklık toleransına yönelik olarak yapılan çalışmalar genelde var olan genotipler arasında tolerant ve hassas bitkilerin bazı fizyolojik parametreler kullanılarak tespitine yönelik olmuştur. Ancak bu uygulamalarda, verim artışına yönelik olarak kullanılan fizyolojik parametrelerin kuraklık toleransına yönelik olarak da kullanılabilmesi, bu bitkilerin farklı çevre şartlarında test edilmesini gerektirmektedir (Voltas ve ark., 2005). Bu nedenle bitkilerin yaşadıkları su stresini tahmin etmek amacıyla su stresi altında olan ve olmayan bitkilere ait kanopy (yeşil aksam) sıcaklıklarının infrared termometre ile ölçülmesi ve Bitki Stresi İndeksi (Crop Water Stress Index-CWSI) verilerinin kullanılması önerilmiştir (Idso ve ark., 1981). Buna karşın buğday ve baklada belirli çevre şartları altında ve belirli bir zaman aralığında ölçülecek olan su potansiyel indeksi (Water Su Index-WPI) değerlerinin belirlenmesinin de kurağa tolerant bitkilerin tespitinde kullanılabilmesi tavsiye edilmiştir (Karamanos ve Papatheohari, 1999). Diğer taraftan stres şartlarında bitkilerin yeşil kalma (stay green) özellikleri ile bazı bitkisel özelliklerin belirlenmesi çalışmaları sorgum ve mısır dahil birçok bitki türünde kurağa tolerant genotiplerin belirlenmesinde önemli ve sonuca götüren parametreler olarak kullanılmaktadır (Burke ve ark., 2010; Campos ve ark., 2004; Hoang ve Kobata, 2009; Nawaz ve ark., 2013). Bu nedenle kurağa toleranlık çalışmalarında belirlenecek ideal bir genotipin su stresine karşı az duyarlılık gösteren ve stres şartlarında yüksek verim potansiyelini muhafaza edebilen genotipler olması beklenmektedir. Ancak, bu tür çalışmalar sırasında gözden kaçırılmaması gereken diğer önemli bir nokta ise kurağa tolerant olarak geliştirilen genotiplerin sahip oldukları verim potansiyellerini, ideal toprak ve iklim şartları ile su stresinin olmadığı durumlarda, en az kurağa tolerant olmayan ve/fakat ideal iklim ve toprak şartlarında yüksek verim verebilen diğer genotip ya da çeşitler kadar iyi olma zorunluluğudur. Aksi takdirde stres varlığında diğer çeşit ya da genotiplerden daha yüksek verim potansiyeline sahip bitkilerin, stresin oluşmadığı

ideal şartlarda çok önemli verim kayıplarına uğramaları kaçınılmaz olmaktadır. Bu çalışmalar sırasında gözden kaçırılmaması gereken diğer önemli nokta ise bitkilerin çimlenmeden tohum oluşturma evresine kadar olan yaşam döngülerinde, farklı stres faktörlerine karşı ortak mekanizmalar yanında stres faktörüne ve farklı bitki gelişim evrelerine spesifik özel mekanizmaların var olduğu ve bitkilerin bu mekanizmaları kullanarak stres faktörlerini kontrol etmeye çalıştıkları gerçeğidir. Bu nedenle kuraklık gibi farklı abiyotik stres faktörlerine karşı yapılacak ıslah çalışmalarında erken bitki gelişim evreleri yanında bu bitkilerin daha sonraki gelişim dönemlerinde ve özelliklede çiçek, yumru gibi ekonomik verim hedefini oluşturan bitki gelişim dönemlerinde, ilgili stres etmeni ile olan ilişkilerinin net bir şekilde ortaya konması oldukça önemlidir.

Kuraklık Stresinin Fizyolojik Mekanizması

Kuraklık stresine maruz kalmış bitki yapraklarında kloroplastların fotokimyasında bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler, fotosistem II (PSII)'nin reaksiyon merkezinde aşırı ışık enerjisinin yayılımına bağlı olarak reaktif oksijen türleri (ROS) [süperoksit (O₂·-), hidroksil radikalleri (OH), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve singlet oksijen (1O₂)] gibi serbest radikallerin oluşması ile ortaya çıkmaktadır (Peltzer ve ark., 2002). Bitkilerde, fotosentezin bir yan ürünü olarak ortaya çıkabilen reaktif oksijen türleri aynı zamanda plazma membranı, mitokondri ve ER membranlarında da oluşabilmektedir (McKersie ve Leshem, 1994). Tepkimeye girmeye oldukça hassas olan ROS lipidler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde oksidatif hasara neden olmakta ve normal hücrel metabolizmalarda değişimlerin yaşanmasını tetiklemektedir (Imlay, 2003). Kuraklık stresine maruz kalmış bitki yapraklarına ait hücrelerde, özellikle kloroplastlarda artan ROS, lipid peroksidasyonuna neden olarak membran hasarlarına yol açabilmektedir (Tambussi ve ark., 2000). Kuraklık stresine uğramış bitkilerin yapraklardaki membran hasarına ait diğer bir gösterge de membranlarda gerçekleşen lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarındaki artıştır. Kuraklığın bitki dokularında MDA ile ölçülen lipid peroksidasyonuna yol açtığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Demirbas ve ark., 2013; Ge ve ark., 2006; Ramachandra Reddy ve ark., 2004; Selote ve ark., 2004).

Bitkiler, kuraklığın neden olduğu oksidatif stresin yıkıcı etkilerinden korunabilmek için antioksidant savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Kuraklık stresinin, birçok bitkinin süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalaz (CAT) (Jiang ve Ren, 2004) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi enzimatik antioksidant savunma aktivitelerini (Sharma ve Dubey, 2005) etkilediği bilinmektedir. Koruyucu antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki azalma, MDA birikiminin hem nedeni hem de sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda bir taraftan, enzim aktivitelerindeki azalmaya bağlı olarak hücre içindeki serbest radikal birikimi artarken

diğer taraftan artan serbest radikallere bağlı olarak MDA içeriği artmakta ve sonuçta plazma membranı lipid peroksidasyonunun doğrudan ya da dolaylı olarak etkilenmesi ile hücrel hasarlar oluşmaktadır. MDA birikimi aynı zamanda enzimlerin aktivitesini inhibe ederek enzimlerin koruyucu fonksiyonlarının kaybolmasına ve membran hasarının daha da artmasına neden olmaktadır. Bu durum, bitkilerin kuraklığa karşı tolerans yeteneklerinin koruyucu enzimlerle ve bu enzimlerin savunma fonksiyonları üzerine olan etkileri ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Quan ve ark., 2016; Trinchant ve ark., 2004). Nitekim yaygın yoncada kuraklık ve tuz stresinin antioksidant enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada tolerant yonca genotiplerinde H₂O₂ ve lipid peroksidasyon aktivitelerinin tolerant olan genotiplere göre daha düşük düzeyde gerçekleştiği buna karşın SOD, APX, CAT ve POD enzim aktivitelerinin ise hem kök hemde sapta daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2009). Benzer şekilde kurağa tolerant ve hassas yonca çeşitlerinde uzun süreli kuraklık stresinin dört haftalık olgun yonca bitkilerinde meydana getirdiği fizyolojik, moleküler ve morfolojik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise tolerant bitkilerin daha küçük yaprak ve daha düşük stoma yoğunluğuna sahip oldukları, bu bitkilerde hassas bitkilere göre daha yüksek antioksidant aktivitesinin var olduğu tespit edilmiştir (Quan ve ark., 2016). Aynı çalışmada gen-spesifik primerler kullanılarak yapılan transkripsiyon analizinde spesifik gen ifadelerinde tolerant ve hassas bitkiler arasında çok önemli ifade farklılıkların meydana geldiği rapor edilmiştir (Quan ve ark., 2016).

Bitkilerde, ROS detoksifikasyonu için enzimatik antioksidant savunma sistemlerinin yanı sıra enzimatik olmayan savunma mekanizmaları da önemli görev yapmaktadır. Antioksidant enzimatik olmayan savunma mekanizmaları, hem hücre içinde hem de apoplastlarda yerleşmiş olan (Foyer ve Noctor, 2000; Hancock ve ark., 2006) ve kloroplastlardaki H₂O₂ detoksifikasyonunda görev alan askorbat-glutasyon döngüsünün iki önemli bileşenini (askorbat ve glutasyon) içermektedir (Asada, 2004; Asada, 1999). Su noksanlığı stresinin bitkilerdeki askorbat-glutasyon döngüsü bileşenlerini etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Sofu ve ark., 2005). Yoncada ve diğer bazı baklagil bitkilerinde yapılan kuraklık stresi uygulamalarında, tolerant bitkilerin kuraklık ve tuz stresinin olumsuz etkilerine karşı antioksidant enzim aktivitelerini artırmak sureti ile daha tolerant hale geldikleri rapor edilmiştir (Aranjuelo ve ark., 2011; Quan ve ark., 2016; Wang ve ark., 2009).

Bitkilerin kuraklık stresine karşı en önemli cevaplarından biri de, birbirinin yerine geçebilen farklı tipteki osmolitlerin büyük miktarda biriktirilmesidir (Ashraf ve Iram, 2005). Kuraklığa toleranlık mekanizmalarının önemli bir bileşeni olan osmotik düzenlemenin (Wu ve Xia, 2006; Wu ve ark., 2006) sürdürülmesinde anahtar rol oynayan prolin amino asidi, çözülebilir şekerler, glisin betain ve inorganik iyonlar

gibi birçok bileşikler bir taraftan osmotik konsantrasyonun düşürülmesi ile birlikte turgor basıncını artırarak stomaların açılması, fotosentez ve büyüme gibi fizyolojik fonksiyonlar üzerinde stres etkilerinin sınırlandırılmasını sağlarken (Chimenti ve ark., 2002) diğer taraftan membranlar ve proteinler gibi yapısal hücre bileşenlerinin bütünlüklerinin korunmasına ve serbest radikallerin hücreden uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır (Mahajan ve Tuteja, 2005). Yaygın yoncada kuraklık ile yapılan yeni çalışmalar tolerant genotiplerde hücre membran zararlanmalarının daha az olduğunu ve bu bitkilerde H₂O₂ birikiminin daha az seviyede gerçekleştiğini, buna karşın prolin ve askorbant içeriklerinin daha yüksek oranda var olduğunu göstermiştir (Quan ve ark., 2016).

Kuraklık Stresinin Moleküler ve Genetik Mekanizması

Bitkilerde kurağa toleranlık kantitatif bir kalıtım göstermektedir (Ghandilyan ve ark., 2009). Geçen 10 yıllık zaman zarfında QTL analizleri birçok bitkide kuraklığa tolerant gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu bölgeler suyun yetersiz olduğu şartlarda hemen hemen bütün fizyolojik, morfolojik ve gelişme farklılıklarını kontrol etmektedir. Bu anlamda günümüzde ve yakın gelecekte kuraklık stresine yönelik ıslah çalışmaları (1) osmotik denge konusundaki varyasyonun belirlenmesi (Teulat ve ark., 1997; Teulat ve ark., 1998), (2) yeşil kalma gibi fenolojik özelliklerin genetik tabanının tespit edilmesi (Sanchez ve ark., 2002), (3) derin kök sisteminin oluşturulması (Johnson ve Davis, 1980; Voldseth ve ark., 2007), (4) bitki su kullanımını ile ilgili olarak yaprak alanının daraltılması ve (5) kısa vejetasyon periyodunun elde edilmesi konularını kapsayacaktır (Anyia ve Herzog, 2004).

Ancak, kuraklığa yönelik gen bölgelerinin tespiti ile ilgi yapılan QTL analizlerinde, kuraklığa hassas ve dayanıklı iki farklı genotipin kullanılıyor olması söz konusu çalışmalar ile belirlenmiş olan gen bölgelerinin elit çeşitlere aktarılması sırasında tarımsal açıdan bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu sorunların başında (1) QTL bölgeleri içerisinde istenmeyen bazı gen bölgelerinin elit kültür bitkilerine aktarılabilceği, (2) QTL çalışması ile belirlenen gen bölgeleri ve bu bölgelerin belirlenmesinde kullanılan spesifik DNA markırları arasındaki linkage durumunun, markır yardımcı seleksiyon (MAS) çalışmaları sırasında genetik rekombinasyonlar yolu ile kırılabilceği gerçeğidir (Lanceras ve ark., 2004). Ayrıca, polygenik karakter gösteren kuraklık toleransı konusunda gen sayısının fazlalığı ve bu genler arasında interaksyonun var olması (espistasi) kuraklık stresine yönelik ıslah çalışmalarını içeren QTL çalışmalarının pratiğe aktarılmasını da son derece zora sokmaktadır (Akar ve ark., 2009; Francia ve ark., 2005).

Kurağa toleranlık kantitatif bir karakter olmasına karşın çiçeklenme zamanı, bitki yüksekliği ve osmotik denge gibi karakterleri kontrol eden genler bitkilerin kuraklığa adaptasyonunda çok önemli rol oynamaktadır

(Bhatnagar-Mathur ve ark., 2008; Forster ve ark., 2004). Örneğin, buğdayda ozmotik dengeyi kontrol eden spesifik bir gene yönelik ıslah çalışması suyun yetersiz olduğu şartlarda verim artışının olabileceğini göstermiştir (Morgan, 2000). Bugüne kadar farklı bitkilere ait stres ilişkili birçok gen izole edilmiş olmasına karşın (Cattivelli ve ark., 2002), bitkilerde kurağa karşı verilen tepkinin çok karmaşık olması nedeniyle tüm moleküler tepkilerin kapsamlı olarak anlaşılması ancak yakın zamanda yapılan transkriptome çalışmaları ile mümkün olabilmektedir (Hazen ve ark., 2005; Verslues ve ark., 2006; Verslues ve Juenger, 2011). Kuraklığa tolerans mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılması için kuraklık ilişkili genlere ait ifade düzeylerinin tespiti büyük önem taşımaktadır. LEA (late-embryogenesis abundant) ve DREB (dehydration response element binding) gibi kuraklıkla birlikte indüklenen transkripsiyon faktörleri ve gen ürünleri, su noksanlığı cevabında önemli rol oynayarak; sinyal iletim yollarını aktive etmekte, hücre yapısını korumakta ve kuraklık toleransının oluşmasını sağlamaktadırlar (Romo ve ark., 2001; Zhu, 2002). Örneğin, LEA proteinlerini fazla ekspres eden transgenik bitkiler su yetersizliğini daha iyi tolere edebilmektedirler (Bray, 2002). Benzer şekilde Delta pyroline -5-carboxylate synthase (P5CS, proline biyosentezinde görevli) gibi bazı stres ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transgenik bitkilerdeki ekspresyonları artırıldığında kuraklığa toleransın artmış olduğu belirlenmiştir (Kishore ve ark., 1995). Ozmotik stres şartlarında serbest prolin birikimi P5CS enzimi sayesinde gerçekleşirken bu genin antisensinin aktarıldığı bitkilerde ozmotik strese karşı aşırı duyarlılık meydana gelmiştir (Nanjo ve ark., 1999). Bu bitkilerdeki prolin azlığının spesifik olarak yapısal proteinleri etkilemesi, prolinin stres altındaki bitkilerde ozmotik dengeleyici olarak görev yaptığına işaret etmektedir (Sakamoto ve Murata, 2002).

Stres ile ilgili olarak ökaryot hücrelerde bulunan ve yüksek oranda korunumlu bir yapıya sahip diğer bir protein grubu ise 14-3-3 proteinleridir (Denison ve ark., 2011; Ferl, 1996; Wu ve ark., 1997). Regülatör görevi olan bu proteinler homo-ve-hetero-dimers (aynı-ve-farklı protein alt birimleri) olarak bulunmakta ve herbir alt unite çok farklı proteinler ile interaksiyona girerek söz konusu proteinlerin aktivitelerini ya da lokalizasyonlarında farklılıklar oluşturabilmektedir (Fuller ve ark., 2006; Mayfield ve ark., 2012). Bu gruba ait bazı proteinler ile yapılan çalışmalar, ilgili genlerin kuraklık stresinin düzenlenmesinde görev aldıklarını göstermiştir. Nitekim yapılan bir çalışmada pamuk bitkisine transfer edilen *GF14λ* geninin kuraklık stresi karşısında bitkinin yeşil kalma 'stay green' süresine ve su yetersizliğine karşı bitki toleransının artırılmasında etkili olduğunu göstermiştir (Yan ve ark., 2004). Bitkilerin ve özellikle yem bitkilerinin stres şartlarında yeşil kalma özelliği strese toleran bitkilerin belirlenmesinde kullanılan önemli bir kriter olarak daha yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Harris ve ark., 2007;

Tian ve ark., 2013; Yan ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2013). Son zamanlarda yapılan gen transferi çalışmaları sayesinde kurağa toleranlık seviyesi artırılmış çok sayıda transgenik yonca bitkisinin elde edilmesi mümkün olmuştur (Ferradini ve ark., 2015; Li ve ark., 2014; Tang ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2015). Ayrıca, son zamanlarda geliştirilen transkriptome, RNAi, siRNA ve miRNA dizileme çalışmalarının model fiçi yoncası (*Medicago truncatula*) ve kültür yoncası (*Medicago sativa*) türlerinde kullanılmaya başlanmış olması, kuraklık ve diğer stres etmenlerine tepki veren genlerin belirlenmesi çalışmalarına çok önemli katkılar sağlayacaktır (Li ve ark., 2012; Li ve ark., 2016; Liu ve ark., 2013; Postnikova ve ark., 2013; Puleo ve ark., 2006; Wang ve ark., 2016; Wang ve ark., 2011; Wang ve ark., 2015; Wang ve Zhang, 2013; Wang ve ark., 2009). Diğer taraftan son yıllarda kuraklık stresinden etkilenen ve sekansı bilinen genlerin ifade düzeylerinde, strese bağlı olarak gerçekleşen değişimlerin tespitinde oldukça hassas, güvenilir ve kullanımı kolay olan yarı nicel ters transkriptaz PCR analizi (RT-PCR) tekniğinin etkin bir şekilde kullanılabileceği yapılan birçok çalışmada ile gösterilmiştir (Quan ve ark., 2016; Torres ve ark., 2006).

İlman iklim kuşağının en önemli bitkilerinden birisi olan yoncanın sürdürülebilir tarıma sağladığı katkılar nedeni ile önemi giderek artmaktadır (Huyghe, 2003). Bu bitki türünde yeşil ot verimine yönelik genetik kazanım diğer bitki türleri ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Nitekim genetik kazanım yoncada %0.2-0.3 arasında değişirken bu oran mısır bitkisinde %2, ak üçgül türünde ise %1 civarındadır (Woodfield ve Brummer, 2001). Farklı stres faktörüne karşı toleranslı yonca çeşitlerinin geliştirilmesinde başarılı sonuçlar elde edilmiş olmasına karşın verim potansiyelinin kalıtımı, yeşil ot kalitesinin artırılması, (Lamb ve ark., 2006), yetiştirildikleri bölgelerde yaz kuraklık stresini tolere edebilen ve genetik orijinin dışındaki bölgelerde adaptasyon kabiliyeti yüksek yonca çeşitlerinin geliştirilmesi çalışmalarındaki başarılar oldukça sınırlı kalmıştır (Annicchiarico ve ark., 2012; Annicchiarico ve ark., 2010). Ayrıca, ileriki vejetasyon dönemlerinde gelişmiş bir kök sistemi oluşturması şartı ile derin kök sistemi sayesinde yarı kurak bölgelerde su kaybını tolere edebilen yonca bitkisinin kurağa dayanıklılığının genetik varyasyonuna yönelik çalışmalar da oldukça yetersizdir (Sheaffer ve ark., 1988). Bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışmada yoncada kuraklığa karşı toleranslığın daha ziyade kuraklıktan kaçış şeklinde geliştiği, sınırlı kök gelişmesine bağlı olarak suyun muhafazası ve böylelikle daha sonra olabilecek aşırı kuraklık stresinde ihtiyaç duyulan suyun karşılanabileceği şeklinde geliştiği bildirilmiştir (Annicchiarico, 2007).

SONUÇ

Bugüne kadar bitkilerde kuraklığa toleranlık ile ilgili yapılan çalışmalar ya toleran bitkiler ile hassas bitkiler arasındaki fizyolojik, biyokimyasal ve

moleküler farklılıkların belirlenmesi ya da elde var olan genotipler arasında kuraklığı daha iyi tolere edebilen genotiplerin belirlenmesine yönelik olmuştur. Tolerant bitkilerin belirlenmesine yönelik çalışmalarda başarı, çalışmada kullanılan genetik materyale, genetik materyale ait varyasyona ve tarama (screening) yönteminin başarısına bağlı olarak çok farklılıklar göstermektedir. Tarama çalışmalarında, farklı yaygın amaçlar için geliştirilmiş çeşit ya da genetik kaynakların tanımlamaya dahil edilmeleri onların olası potansiyellerinin farklı amaçlar için kullanılabilmesine imkan tanıyacaktır. Ancak, var olan genotiplere kuraklık stresi uygulayarak doğrudan seleksiyon yolu ile tolerant bitkilerin belirlenmesinde karşılaşılan en önemli sorunların başında, kurağa toleranslığın düşük kalıtım değerine sahip olması, çok gen tarafından kontrol edilmesi, epistatik etkiye maruz kalması ve çevresel faktörlerden büyük oranda etkilenmesi gelmektedir. Bu nedenle klasik melezleme yöntemi ile dar bir genetik taban kullanılarak, var olan genotipler arasından kurağa tolerant yeni yonca genotiplerinin geliştirilmesi oldukça zor görünmektedir. Özellikle son zamanlarda geliştirilen moleküler tekniklerin model bitkilerden sonra yonca gibi çok önemli kültür bitkilerinde de uygulanmaya başlanması yukarıda belirtilen zorlukların aşılmasına ve kuraklık gibi diğer abiyotik stres faktörlerine yönelik mekanizmaların anlaşılmasına çok önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akar, T., Francia, E., Tondelli, A., Rizza, F., Stanca, A.M., Pecchioni, N. 2009. Marker-assisted characterization of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Bre.*, 128(4): 381-386.
- Amtmann, A., Bohnert, H.J., Bressan, R.A. 2005. Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models. *Plant Physiology*, 138(1): 127-130.
- An, Y.Y., Liang, Z.S. 2012. Staged strategy of plants in response to drought stress. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 23(10): 2907-15.
- Annicchiarico, P. 2007. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops Research*, 102(1), 51-59.
- Annicchiarico, P., Pecetti, L., Torricelli, R. 2012. Impact of landrace germplasm, non-conventional habit and regional cultivar selection on forage and seed yield of organically grown lucerne in Italy. *Journal of Agricultural Science*, 150: 345-355.
- Annicchiarico, P., Scotti, C., Carelli, M., Pecetti, L. 2010. Questions and Avenues for Lucerne Improvement. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(1): 1-13.
- Anyia, A.O., Herzog, H. 2004. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*, 20(4): 327-339.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avice, J.C., Nogues, S. 2011. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.*, 62(1): 111-23.
- Asada, K. 2004. Functions of the water-water cycle in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 45: S11-11.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639.
- Ashraf, M., Iram, A. 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora*, 200: 535-546.
- Avcioglu, R., Geren, H., Tamkoç, A. 2009. Yonca (*Medicago* sp L.). (Yembitkileri. Baklagil Yembitkileri, Tarım ve Köyişleri Bak. İzmir: Ed. Avcioglu, R., Hatipoglu, R., Karadag, Y.) Cilt II.
- Basu, S., Roychoudhury, A., Saha, P.P., Sengupta, D.N. 2010. Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. *Plant Growth Regulation*, 60(1): 51-59.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., Sharma, K.K. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27(3): 411-424.
- Bohnert, H.J., Jenson, R.G. 1996. Plant stress adaptations making metabolism move. *Trends Biotech.*, 14: 267-74.
- Bray, E.A. 2002. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using Microarray and differential expression data. *Ann. Bot.*, 89: 803-811.
- Burke, J.J., Franks, C.D., Burow, G., Xin, Z. 2010. Selection System for the Stay-Green Drought Tolerance Trait in Sorghum Germplasm. *Agronomy Journal*, 102(4): 1118-1122.
- Campos, H., Cooper, A., Habben, J.E., Edmeades, G.O., Schussler, J.R. 2004. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research*, 90(1): 19-34.
- Caruso, A., Chedford, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F.M., Kahlem, G., Morabito, D. 2008. Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(9): 932-41.
- Cattivelli, L., Baldi, P., Crosatti, C., Di Fonzo, N., Faccioli, P., Grossi, M., Mastrangelo, A.M., Pecchioni, N., Stanca, A.M. 2002. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. *Plant Molecular Biology*, 48(5): 649-665.
- Chen, J., Wu, W., Zheng, Y., Hou, K., Xu, Y., Zai, J. 2010. Drought resistance of *Angelica dahurica* during seedling stage under polyethylene glycol (PEG-6000)-simulated drought stress. *China journal of Chinese Materia Medica*, 35(2): 149-53.
- Chimenti, C.A., Pearson, J., Hall, A.J. 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Research*, 75(2-3): 235-246.

- Çarpıcı, E.B., Erdel, B. 2015. Bazı yonca çeşitlerinde (*Medicago sativa* L.) kuraklık stresinin çimlenme özellikleri üzerine etkisi. *Derim*, 32(2):201-210.
- Demirbas, S., Vlachonasios, K.E., Acar, O., Kaldis, A. 2013. The effect of salt stress on *Arabidopsis thaliana* and *Phelipanche ramosa* interaction. *Weed Research*, 53(6): 452-460.
- Denison, F.C., Paul, A.L., Zupanska, A.K., Ferl, R.J. 2011. 14-3-3 proteins in plant physiology. *Semin Cell. Dev. Biol.*, 22(7): 720-7.
- Ferl, R.J. 1996. 14-3-3 Proteins and Signal Transduction. *Ann. Rev. Plant Phy. Plant Mol. Biol.*, 47: 49-73.
- Ferradini, N., Iannacone, R., Capomaccio, S., Metelli, A., Armentano, N., Semeraro, L., Cellini, F., Veronesi, F., Rosellini, D. 2015. Assessment of heat shock protein 70 induction by heat in alfalfa varieties and constitutive overexpression in transgenic plants. *PLoS One*, 10(5): e0126051.
- Forster, B.P., Ellis, R.P., Moir, J., Talame, V., Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., This, D., Teulat-Merah, B., Ahmed, I., Mariy, S.A.E.E., Bahri, H., El Ouahabi, M., Zoumarou-Wallis, N., El-Fellah, M., Ben Salem, M. 2004. Genotype and phenotype associations with drought tolerance in barley tested in North Africa. *Ann. of App. Bio.*, 144(2): 157-168.
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146(3): 359-388.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., Vale, G. 2005. Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 82(3): 317-342.
- Fuller, B., Stevens, S.M., Jr., Sehnke, P.C., Ferl, R.J. 2006. Proteomic analysis of the 14-3-3 family in *Arabidopsis*. *Proteomics*, 6(10): 3050-9.
- Ge, T., Sui, F., Bai, L., Lu, Y., Zhou, G. 2006. Effects of water stress on the protective enzyme activities and lipid peroxidation in roots and leaves of summer maize. *Agr. Sci. China.*, 5(4): 291-298.
- George, S., Usha, B., Parida, A. 2008. Isolation and Characterization of an Atypical LEA Protein Coding cDNA and its Promoter from Drought-Tolerant Plant *Prosopis juliflora*. *Appl. Biochem Biotechnol.*, 157(2):244-53.
- Ghandilyan, A., Barboza, L., Tisne, S., Granier, C., Reymond, M., Koornneef, M., Schat, H., Aarts, M.G.M. 2009. Genetic analysis identifies quantitative trait loci controlling rosette mineral concentrations in *Arabidopsis thaliana* under drought. *New Phytologist*, 184(1): 180-192.
- Hancock, J.T., Smirnov, N., Foyer, C.H. 2006. Oxygen metabolism coming up ROSES: a holistic view of the redox metabolism of plant cells - Preface. *Journal of Experimental Botany*, 57(8): Iv-V. doi: 10.1093/jxb/erl024.
- Harris, K., Subudhi, P.K., Borrell, A., Jordan, D., Rosenow, D., Nguyen, H., Klein, P., Klein, R., Mullet, J. 2007. Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. *J. Exp. Bot.*, 58(2): 327-38.
- Hazen, S.P., Pathan, M.S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang, H.S., Zhu, T., Kreps, J.A., Nguyen, H.T. 2005. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Funct. Integr. Gen.*, 5: 104-116.
- Hoang, T.B., Kobata, T. 2009. Stay-Green in Rice (*Oryza sativa* L.) of Drought-Prone Areas in Desiccated Soils. *Plant Prod. Sci.*, 12(4): 397-408.
- Huyghe, C. 2003. Les fourrages et la production de protéines. *Fourrages*, 174: 145-162.
- Idso, S.B., Reginato, R.J., Reicosky, D.C., Hatfield, J.L. 1981. Determining Soil-Induced Plant Water Potential Depressions in Alfalfa by Means of Infrared Thermometry. *Agronomy J*, 73(5): 826-830.
- Imlay, J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 395-418.
- Jiang, H.F., Ren, X.P. 2004. The effect on SOD activity and protein content in groundnut leaves by drought stress. *AAS*, 30: 169- 174.
- Johnson, W.C., Davis, R.G. 1980. Yield-Water Relationships of Summer-Fallowed Winter-Wheat - a Precision Study in the Texas Panhandle. *Science and Education Administration Pub.*, Arr(Ns-5), 1-43.
- Kaplan, Ş., Güçlü, Ş., Baytekin, G., Tiryaki, İ. 2015. Yonca (*Medicago sativa* L.) ve Çayır Üçgülü (*Trifolium pratense* L.) Tohumlarının Tuz Ve Kuraklık Stresine Verdikleri Tepkilerin Belirlenmesi. *Türkiye 11. Tarla Bitkileri Kongresi*, 7-10 Eylül, Çanakkale.
- Karamanos, A.J., Papatheohari, A.Y. 1999. Assessment of drought resistance of crop genotypes by means of the water potential index. *Crop Science*, 39(6): 1792-1797.
- Kishore, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.-U., Hu, C.-A., Verma, D.P.S. 1995. Overexpression of D-pyrroline-5-carboxylase synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 108: 1387-1394.
- Lamb, J.F.S., Sheaffer, C.C., Rhodes, L.H., Sulc, R.M., Undersander, D.J., Brummer, E.C. 2006. Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence, and nutritive value. *Crop Science*, 46(2): 902-909.
- Lanceras, J.C., Pantuwan, G., Jongdee, B., Toojinda, T. 2004. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiology*, 135(1): 384-399.
- Levitt, J. 1980a. Responses of plants to environmental stress. Academic Press, New York.
- Levitt, J. 1980b. Responses of plants to environmental stress. Academic Press., New York.
- Li, H., Wang, Z., Ke, Q., Ji, C.Y., Jeong, J.C., Lee, H.S., Lim, Y.P., Xu, B., Deng, X.P., Kwak, S.S. 2014. Overexpression of codA gene confers enhanced tolerance to abiotic stresses in alfalfa. *Plant Physiol. Biochem.*, 85: 31-40.
- Li, J., Dai, X., Liu, T., Zhao, P.X. 2012. LegumeIP: an integrative database for comparative genomics and

- transcriptomics of model legumes. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue), D1221-9.
- Li, J., Dai, X., Zhuang, Z., Zhao, P.X. 2016. LegumeIP 2.0-a platform for the study of gene function and genome evolution in legumes. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1), D1189-94.
- Li, X.M., Brummer, E.C. 2012. Applied Genetics and Genomics in Alfalfa Breeding. *Agronomy*, 2: 40-61.
- Liu, Z., Chen, T., Ma, L., Zhao, Z., Zhao, P.X., Nan, Z., Wang, Y. 2013. Global transcriptome sequencing using the Illumina platform and the development of EST-SSR markers in autotetraploid alfalfa. *PLoS One*, 8(12): e83549.
- Mahajan, S., Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2): 139-158.
- Mayfield, J.D., Paul, A.L., Ferl, R.J. 2012. The 14-3-3 proteins of Arabidopsis regulate root growth and chloroplast development as components of the photosensory system. *Journal of Experimental Botany*, 63(8): 3061-70.
- Mccoy, T.J., Smith, L.Y. 1983. Genetics, Cytology, and Crossing Behavior of an Alfalfa (*Medicago Sativa*) Mutant Resulting in Failure of the Postmeiotic Cytokinesis. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(4): 390-397.
- McKersie, B.D., Leshem, Y. 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Morgan, J.M. 2000. Increases in grain yield of wheat by breeding for an osmoregulation gene: relationship to water supply and evaporative demand. *Australian Journal of Agricultural Research*, 51(8): 971-978.
- Mortimore, M. 2008. Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends. (Current State ve Trends Assessment-Chapter 22, Millennium Ecosystem Assessment: Ed. Anderson, S., Cotula, L., Facer, K., Hesse, C., Mwangi, A., Nyangena, W., Skinner, J.
- Moussa, H.R., Abdel-Aziz, S.M. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1(1): 31-36.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 18(2): 185-193.
- Nawaz, A., Farooq, M., Cheema, S.A., Yasmeen, A., Wahid, A. 2013. Stay Green Character at Grain Filling Ensures Resistance against Terminal Drought in Wheat. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(6): 1272-1276.
- Peltzer, D., Dreyer, E., Polle, A. 2002. Temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. *Plant Phy. Bio.*, 40: 141-150.
- Postnikova, O.A., Shao, J., Nemchinov, L.G. 2013. Analysis of the alfalfa root transcriptome in response to salinity stress. *Plant Cell Physiol*, 54(7): 1041-55.
- Puleo, C.M., Liu, K., Wang, T.H. 2006. Pushing miRNA quantification to the limits: high-throughput miRNA gene expression analysis using single-molecule detection. *Nanomedicine (Lond)*, 1(1): 123-7.
- Quan, W., Liu, X., Wang, H., Chan, Z. 2016. Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1256.
- Ramachandra R., Chaitanya, KV, Jutur, PP, Sumithra, K. 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 52: 33-42.
- Romo, S., Labrador, E., Dopico, B. 2001. Water stress-regulated gene expression in Cicer arietinum seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(11): 1017-1026.
- Rouhi, V., Samson, R., Lemeur, R., Van Damme, P. 2006. Stomatal resistance under drought stress conditions induced by PEG 6000 on wild almond. *Commun Agric. Appl. Biol. Sci.*, 71(1): 269-73.
- Rouhi, V., Samson, R., Van Damme, P., Lemeur, R. 2004. Effects of drought stress induced by PEG 6000 on leaf water status of one domestic (*Amygdalus dulcis*) and two wild almond (*A. lycioides* and *A. scoparia*) species. *Commun Agric. Appl. Biol. Sci.*, 69(2): 239-41.
- Sakamoto, A., Murata, N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, 25(2): 163-171.
- Sanchez, A.C., Subudhi, P.K., Rosenow, D.T., Nguyen, H.T. 2002. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Molecular Biology*, 48(5): 713-726.
- Selote, D.S., Bharti, S., Khanna-Chopra, R. 2004. Drought acclimation reduces O₂ accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 314: 724-729.
- Sharma, P., Dubey, R.S. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.*, 162(8): 854-64.
- Sheaffer, C.C., Tanner, C.B., Kirkham, M.B. 1988. Alfalfa water relations and irrigation. (Alfalfa and Alfalfa Improvement., ASA, CSSA, SSSA Publishers. Madison: Ed. Hanson, A.A., Barnes, D.K., Hill, R.R.) 373-409.
- Sofo, A., Tuzio, A.C., Dichio, B., Xiloyannis, C. 2005. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific prunus hybrids. *Plant Sci.*, 169: 403-412.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guamet, J.J., Araus, J.L. 2000. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plan.*, 108: 398-404.
- Tang, L., Cai, H., Ji, W., Luo, X., Wang, Z., Wu, J., Wang, X., Cui, L., Wang, Y., Zhu, Y., Bai, X. 2013. Overexpression of GsZFP1 enhances salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, 71: 22-30.

- Tardieu, F. 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *C.R. Geoscience*, 337: 57-67.
- Teulat, B., Monneveux, P., Wery, J., Borries, C., Souyris, I., Charrier, A., This, D. 1997. Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytologist*, 137(1): 99-107.
- Teulat, B., This, D., Khairallah, M., Borries, C., Ragot, C., Sourdille, P., Leroy, P., Monneveux, P., Charrier, A. 1998. Several QTLs involved in osmotic adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 96(5): 688-698.
- Tian, F., Gong, J., Zhang, J., Zhang, M., Wang, G., Li, A., Wang, W. 2013. Enhanced stability of thylakoid membrane proteins and antioxidant competence contribute to drought stress resistance in the *tasg1* wheat stay-green mutant. *Journal of Experimental Botany*, 64(6): 1509-20.
- Torres, G.A.M., Pflieger, S., Corre-Menguy, F., Mazubert, C., Hartmann, C., Lelandais-Briere, C. 2006. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. *Plant Science*, 171(3): 300-307.
- Trinchant, J.C., Boscari, A., Spennato, G., Van de Sype, G., Le Rudulier, D. 2004. Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiol*, 135(3): 1583-94.
- Tuberosa, R., Salvi, S. 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science*, 11(8): 405-412.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 46(6): 1092-1092.
- Verslues, P.E., Juenger, T.E. 2011. Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3): 240-245.
- Voldseth, R.A., Johnson, W.C., Gilmanov, T., Guntenspergen, G.R., Millett, B.V. 2007. Model estimation of land-use effects on water levels of northern prairie wetlands. *Ecological Applications*, 17(2): 527-540.
- Volta, J., Lopez-Carcoles, H., Borrás, G. 2005. Use of biplot analysis and factorial regression for the investigation of superior genotypes in multi-environment trials. *Euro. J. Agr.*, 22(3): 309-324.
- Wang, J., Zhao, Y., Ray, I., Song, M. 2016. Transcriptome responses in alfalfa associated with tolerance to intensive animal grazing. *Sci Rep.*, 6: 19438.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., Zhang, W.H. 2011. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 12: 367.
- Wang, T.Z., Liu, M., Zhao, M.G., Chen, R., Zhang, W.H. 2015. Identification and characterization of long non-coding RNAs involved in osmotic and salt stress in *Medicago truncatula* using genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Pla. Bio*, 15: 131
- Wang, T.Z., Zhang, W.H. 2013. Genome-wide identification of microRNAs in *Medicago truncatula* by high-throughput sequencing. *Methods Mol. Biol.*, 1069: 67-80.
- Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P., Kwak, S.S. 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Pla Phy. Bioc*, 47(7): 570-7.
- Wissuwa, W., Smith, S.E., Ottman, M.J. 1997. Crown moisture and prediction of plant mortality in drought-stressed alfalfa. *Irrig. Sci.*, 17: 87-91.
- Woodfield, D.R., Brummer, E.C. 2001. Integrating molecular techniques to maximize the genetic potential of forage legumes. (*Molecular Breeding of Forage Crops.*, Kluwer: Ed. Dordrecht S. G.) 51-65.
- Wu, K., Rooney, M.F., Ferl, R.J. 1997. The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. *Plant Phy*, 114(4):1421-31.
- Wu, Q.S., Xia, R.X. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4): 417-425.
- Wu, Q.S., Zou, Y.N., Xia, R.X. 2006. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *European Journal of Soil Biology*, 42(3): 166-172.
- Yan, J., He, C., Wang, J., Mao, Z., Holaday, S.A., Allen, R.D., Zhang, H. 2004. Overexpression of the Arabidopsis 14-3-3 protein GF14 lambda in cotton leads to a "stay-green" phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant and Cell Physiology*, 45(8): 1007-14.
- Zhang, Y.M., Zhang, H.M., Liu, Z.H., Li, H.C., Guo, X.L., Li, G.L. 2015. The wheat NHX antiporter gene *TaNHX2* confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium. *Plant Mol. Biol.*, 87(3): 317-27.
- Zhou, Y.F., Wang, D.Q., Lu, Z.B., Wang, N., Wang, Y.T., Li, F.X., Xu, W.J., Huang, R.D. 2013. Impacts of drought stress on leaf osmotic adjustment and chloroplast ultrastructure of stay-green sorghum. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 24(9): 2545-50.
- Zhu, J., Li, Z., Kang, H., Fan, Y. 2005. Effects of polyethylene glycol (PEG)-simulated drought stress on *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seed germination on sandy land. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 16(5): 801-4.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev. Plant. Biol.*, 53: 247-73.