بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

(گرایش بیوتکنولوژی درکشاورزی)

عنوان:

مطالعه الگوی بیان ژن‌های مرتبط با سرما در دو ژنوتیپ برنج با استفاده از روش Real time PCR

از:

زهرا کچلکی

استاد راهنما:

دکتر حبیب الله سمیع زاده لاهیجی

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به:

به وجود پرمهر پدر و مادرم

و خواهران عزیزم

سپاسگزاری

پس از حمد و ستایش خدای متعال، از خانواده‌ی عزیزم به خاطرحمایت‌های صمیمانه شان در تمام مراحل زندگیم تشکر می‌کنم. از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر حبیب الله سمیع زاده‌ی لاهیجی که مسئولیت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند و در تمامی مراحل تحقیق مرا مرهون راهنمایی‌های عالمانه و لطف صبورانه‌ی خود قرار دادند، تشکر می‌کنم و از صمیم قلب برای ایشان آرزوی موفقیت دارم.

از داوران ارجمند، جناب آقای دکتر محمد مهدی سوهانی و جناب آقای دکتر حسن حسنی، که افتخار شاگردی در محضر ایشان را نیز داشته‌ام، به جهت بازخوانی این پایان نامه نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

از نماینده‌ی محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر مازیار محیطی که مسئولیت اداره این جلسه را بر عهده داشتند سپاسگزارم و برای ایشان آرزوی موفقیت دارم.

از جناب آقای مهندس رضادوست، کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی که در تمام مراحل انجام این پژوهش پاسخگوی سؤالاتم بودند و همچنین جناب آقای مهندس محمد محسن زاده به پاس همکاری بی دریغشان، نهایت تقدیر و تشکر را دارم. در پایان از تمامی همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم خانم‌ها سعیده علیدوست، سیده فاطمه موسوی، سمیه بهادر، سارا فتاحیان، فرناز نوروزی، لیلا رمانی و همچنین آقایان فرهاد معصومی، محسن صفایی، پیمان منبری، امین عابدی که تا این لحظه با حضور گرمشان مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌کنم.

اسفند ۹۲

چکیده‌ی فارسی:

مطالعه الگوی بیان ژن‌های مرتبط با سرما در دو ژنوتیپ برنج با استفاده از روش Real time PCR

زهرا کچلکی

اکثر رقم‌های برنج به طور تغییر ناپذیری از طریق قرار گیری طولانی مدت در برابر دماهای سرمازدگی، مخصوصا در مراحل اولیه‌ی رشد گیاهچه‌ای آسیب‌پذیر هستند. الگوهای بیان ژن تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌کند. در این پژوهش الگوی بیان دو ژن واکنش دهنده به تنش سرمایی در دو رقم PR (رقم مقاوم) و ها شمی (رقم حـ ساس) برنج (*Oryza sativa*) با ا ستفاده از تکنیک Real time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. پس از اســتخراج RNA و ســنتز cDNA ، پروفایل بیان دو ژن OsNAC6 و OsCDPK13 در گیاهان شاهد و تیمارهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت سرما (۵ درجه‌ی سانتی گراد) در گیاهچه‌های ۲ هفته‌ای برنج در دو رقم برنج مورد بررســی قرار گرفت. همچنین میزان فعالیت آنزیم POD به عنوان یک شــاخص برای بررســی تنش غیر زی ستی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج Real time PCR ن شان داد که ژن‌های م سئول سرما در این پژوهش در حالت کلی بیان بالاتری در لاین مقاوم PR ن سبت به رقم ها شمی دا شتند. عامل رونوی سی OsNAC6 و پروتئین کیناز OsCDPK13 در همان ساعات ابتدایی تنش (تیمار ۳ ساعت) در لاین مقاوم PR بیان بالایی دا شتند و بی شترین مقدار بیان این دو ژن در هر دو ژنوتیپ در تیمار ۱۲ ساعت م شاهده شد. میزان فعالیت آنزیم POD در لاین PR در تیمار ۶و ۲۴ ساعت ن سبت به حالت شاهد افزایش معنی داری داشت . ولی در ژنوتیپ هاشمی در هیچ کدام از ساعات تیمار سرما، افزایش معنی داری در فعالیت آنزیم مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: الگوی بیان، برنج، تنش سرما، *Real time PCR*

فهرست

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی .....د

چکیده انگلیسی.....ذ

مقدمه.....۲

کلیات و مرور منابع

۱-۱-برنج.....۵

۱-۲-اهمیت اقتصادی برنج.....۶

۱-۳-پراکنش جغرافیایی برنج ۶

۱-۴- گیاهشناسی برنج.....۶

۱-۵- تنش.....۷

۱-۵-۱-تنش دمایی.....۷

۱-۵-۲-شوری.....۸

۱-۵-۳- خشکی ۹

۱-۵-۴- آبسیزیک اسید ۹

۱-۶- انواع تنش سرما و تأثیر آن برسلول ۱۰

۱-۶-۱-سازش سرما و نقش آن در ایجاد مقاومت به یخ زدگی ۱۰

۱-۶-۲- علایم مرفولوژیکی تنش سرما.....۱۰

۱-۷- پاسخ مولکولی گیاهان به تنش ۱۱

۱-۸- انواع ژن‌های پاسخ گو به تنش.....۱۲

۱-۹- پاسخ مولکولی طی تنش دمای پایین.....۱۳

۱-۹-۱- درک پیام.....۱۳

۱-۹-۲- انواع گیرنده‌های کلسیم.....۱۴

۱-۹-۲-۱- کالمودولین (CaM)..... ۱۴
۱-۹-۲-۲- CBL-CIPK..... ۱۴
۱-۹-۲-۳- CDPK..... ۱۵
۱-۹-۳- انتقال پیام و بیان ژن‌های هدف..... ۱۶
۱-۹-۴- محصولات ژن‌های تنش ۱۶
۱-۱۰- عوامل اصلی رونویسی پاسخ به تنش سرمازدگی در برنج..... ۱۷
۱-۱۰-۱- عامل رونویسی DREB/CB..... ۱۷
۱-۱۰-۲- عامل رونویسی NAC ۱۹
۱-۱۱- انواع الگوهای بیانی ژن‌ها تحت تنش سرمایی..... ۲۰
۱-۱۲- بررسی بیان ژن..... ۲۲
۱-۱۲-۱- روش‌های بررسی بیان ژن..... ۲۲
۱-۱۲-۲- روش Real time PCR..... ۲۲
۱-۱۲-۳- مراحل Q Real time PCR..... ۲۳
۱-۱۲-۴- رنگ متصل شونده به DNA..... ۲۴
۱-۱۲-۵- بازدهی Q Real time PCR ۲۴
۱-۱۲-۶- ژن مرجع..... ۲۴
۱-۱۲-۷- نرمال سازی..... ۲۵
۱-۱۲-۸- تحلیل اطلاعات کمیQ Real time PC..... ۲۵

مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد گیاهی ۲۷
۲-۱-۱- جوانه زنی بذور..... ۲۷
۲-۱-۲- آماده سازی محلول غذایی یوشیدا..... ۲۷

۲-۱-۳- انتقال بذور جوانه زده به محلول غذایی یوشیدا.....۲۸
۲-۲- نمونه گیری ۳۰
۲-۳- استخراج RNA.....۳۰
۲-۳-۱- مراحل استخراج RNA.....۳۱
۲-۳-۲- تعیین کمیت RNA استخراج شده ۳۳
۲-۳-۳- بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده ۳۳
۲-۴- ساخت cDNA از روی RNA ۳۴
۲-۴-۱- تیمار DNase.....۳۴
۲-۴-۲- تیمار EDTA ۳۴
۲-۴-۳- ساخت cDNA.....۳۴
۲-۵- الکتروفورز.....۳۶
۲-۵-۱- بارگذاری و الکتروفورز نمونه‌ها.....۳۶
۲-۵-۲- تهیه ژل آگارز.....۳۶
۲-۶- بافرها و محلول‌های مورد نیاز.....۳۷
۲-۵-۴- بافر بارگذاری با نام تجاری دای.....۳۷
۲-۶-۱- محلول اتیدیوم بروماید.....۳۷
۲-۶-۲- بافر TBE.....۳۸
۲-۶-۳- آب DEPC.....۳۸
۲-۷- Real time PCR.....۳۹
۲-۷-۱- Q Real time PCR.....۳۹
۲-۸- مطالعه فیزیولوژیکی ۴۰
۲-۸-۱- بررسی فعالیت آنزیم POD به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو.....۴۰
۲-۸-۲- تهیه بافر استخراج پروتئین.....۴۱

۲-۸-۳-استخراج پروتئین کل.....۴۱

۲-۸-۴- تعیین فعالیت آنزیم POD.....۴۱

نتایج و بحث

۳-۱- اثر تیمار سرمابر فنوتیپ گیاهچه‌های حساس و مقاوم ۴۴

۳-۲- نتایج آنالیز بیوشیمیایی در تنش سرمایی ۵ درجه سانتی گراد.....۴۵

۳-۲-۱- اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش سرمایی در ژنوتیپ هاشمی و لاین PR.....۴۵

۳-۳- نتایج آنالیز مولکولی در ژنوتیپ هاشمی و لاین PR تحت دمای ۵ درجه سانتی گراد.....۴۶

۳-۳-۱- نتایج مربوط به استخراج RNA.....۴۶

۳-۳-۲-بررسی صحت ساختcDNA.....۴۷

۳-۳-۳- نتایج بررسی بیان ژن با استفاده از روش Real time PCR.....۴۹

۳-۳-۳-۱- میزان بیان نسبی ژن OsNAC6.....۵۰

۳-۳-۳-۲- میزان بیان نسبی ژن OsCDPK13.....۵۳

۳-۴- نتیجه گیری کلی.....۵۵

۳-۵- پیشنهادها.....۵۶

منابع.....۵۸

فهرست جدول‌ها **صفحه**

جدول ۲-۱- ترکیبات لازم برای تهیه محلول غذایی یوشیدا.....۲۹

جدول ۲-۲- مقادیر مورد نیاز از هر استوک برای تهیه ۴ لیتر محلول یوشیدا و غلظت نهایی ۳۰

هر عنصر در هر محلول

جدول ۲-۳-نتایج حاصل از کمیت سنجی RNA های استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر.....۳۳

جدول ۲-۴- مواد مورد نیاز برای ساخت cDNA.....۳۵

جدول ۲-۵- ترکیبات مورد نیاز در واکنش PCR جهت صحت ساخت cDNA.....۳۵

جدول ۲-۶- چرخه‌های واکنش PCR.....۳۶

جدول ۲-۷- اجزای تشکیل دهنده‌ی بافر رنگ آمیزی6X.....۳۷

جدول ۲-۸- مقادیر مواد تشکیل دهنده‌ی ۱ لیتر بافرTBE..... ۳۸

جدول ۲-۹- پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر اختصاصی در Real time PCR.....۳۹

فهرست شکل‌ها **صفحه**

شکل ۱-۱- نمودار مقایسه‌ای روند تکاملی برنج‌های زراعی آفریقا و آسیا.....۵

شکل ۱-۲- مسیر پیام رسانی تنش.....۱۲

شکل۱-۳- الگوهای بیان ژن‌ها تحت تنش سرمایی.....۲۱

شکل ۲-۱- جوانه زنی بذور در اتاقک رشد آزمایشگاه بیوتکنولوژی.....۲۷

شکل ۲-۲- گلدان‌های دارای یونولیت جهت کشت گیاهچه‌های برنج.....۲۸

شکل ۲-۳- انتقال گیاهچه‌های ۷ روزه به محلول یوشیدا.....۲۸

شکل ۲-۴- گیاهجه‌های دو ژنوتیپ هاشمی و PR در تنش ۵ درجه سانتی گراد در انکوباتورGROUC.....۳۱

شکل۲-۵- انکوباتور گروک جهت اعمال تنش سرمایی.....۳۱

شکل ۲-۶-دستگاه tissue rupture جهت پودر نمودن نمونه‌های گیاهی.....۳۲

شکل ۳-۱- گیاهچه‌های هاشمی قبل و بعد از تنش.....۴۴

شکل ۳-۲- گیاهچه‌های PR قبل و بعد از اعمال تنش.....۴۴

شکل۳-۳- میزان فعالیت آنزیم POD در زمان‌های مختلف پس از تیمار در دو ژنوتیپ مورد بررسی.....۴۵

شکل ۳-۴- بررسی کیفیت RNA های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱درصد.....۴۷

شکل۳-۵- تصویر ژل آگارز ۱ درصد بررسی ساخت cDNA با استفاده از ژن مرجع 18srRNA.....۴۷

شکل ۳-۶-تصویر فراورده‌ی PCR ژن OsCDPK13.....۴۸

شکل ۳-۷-فراورده‌ی تکثیر اختصاصی ژن OsNAC6.....۴۸

شکل ۳-۸- نمودار تکثیر برای ژن‌های 18s rRNA و OsNAC6.....۴۹

شکل ۳-۹- نمودار منحنی ذوب (Melt curve).....۴۹

شکل ۳-۱۰- نمودار پیک ذوب (Melt peak).....۵۰

شکل ۳-۱۱- میزان بیان نسبی ژن OsNAC6.....۵۲

شکل ۳-۱۲-میزان بیان نسبی ژن OsCDPK13.....۵۳

مقدمه

سرما، خشکی و شوری از جمله تنش‌هایی هستند که بر رشد و نمو گیاهان و تولید محصولات زراعی اثر مضر دارند [رهایی و همکاران، ۲۰۱۰]. شناخت مکانیزم‌هایی که گیاهان پیام تنش‌ها را به سیستم سلولی جهت فعال‌سازی واکنش‌های منطبق با تنش ارسال می‌کنند از جمله اساسی ترین نیازها برای تهیه‌ی بیشتر مقاومت گیاهان زراعی به تنش، در راستای افزایش بهره وری در تولید غذا برای جمیعت رو به رشد جهان به شمار می‌رود [Huang et al., 2012]. بنابراین بهبود مقاومت به تنش غیرزیستی ممکن است عملکردهای واقعی را به میزان زیادی در بیشتر گیاهان زراعی افزایش دهد. چون گیاهان در طبیعت ثابت هستند، مکانیسم‌های سازگاری را در برابر شرایط تنش غیرزیستی را تکامل داده‌اند. تحت تنش غیرزیستی بیان بسیاری از ژن‌ها القا شده است و محصولاتشان نقش مهمی در واکنش‌های تنش و تحمل(مقاومت) دارد. [Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki., 2005,2006].

قرار گیری در معرض سرما از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی برای گیاهان در مناطق معتدله می‌باشد [Janska et al., 2010]. سرما عامل محدود کننده‌ی رشد گیاهان بوده و به دو دسته‌ی دمای سرمازدگی (۱۵-۰ درجه سانتی‌گراد) و دمای یخزدگی (زیر صفر درجه سانتی‌گراد) تقسیم می شود.

برنج (*Oryza sativa*) از مهم ترین گیاهان زراعی جهان از نظر اقتصادی می‌باشد. برنج یک گیاه حساس به سرمازدگی است و محصول آن به میزان زیادی تحت تأثیر تنش سرما قرار می‌گیرد. دمای مناسب برای رشد و نمو آن بین ۲۵ تا ۳۵ درجه‌ی سانتی گراد می‌باشد. همچنین این گیاه به دلیل توالی ژنومی کاملا شناخته شده، یک سیستم مدل برای گیاهان حساس به سرما است [Lv et al, 2010]. مراحل ویژه جوانه زنی و اوایل رشد گیاهچه‌ای برنج حساسیت ویژه‌ای به کاهش دمای محیط به زیر حد مطلوب دارند[Adair., 1968].

گونه‌های مختلف گیاهی با درجات مختلفی در برابر تنش سرما مقاومت می‌کنند که میزان این مقاومت به برنامه ریزی مجدد بیان ژن برای تغییر فیزیولوژی، متابولیسم و رشدشان بستگی دارد[Chinnosamy et al., 2010].

عکس العمل گیاه به تنش سرمایی با تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی همراه است [Wang et al., 2003]. از جمله تغییرات مورفولوژیکی می‌توان به علائم مختلف فنوتیپی مانند کاهش گسترش برگ، پژمردگی و کلروزه شدن اشاره کرد [Feng et al., 2009]. تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی نیز همراه با تغییر در سطوح یون کلسیم، اینوزیتول فسفات، گونه‌های فعال

اکسیژن و تغییر در سطوح بیان ژن‌های چاپرون‌ها، پروتئین‌های کانال آبی و آنزیم‌های اکسیداتیو همراه است [Xiong et al., 2002; Prasad et al., 1994]. در پا سخ به تنش های محیطی، یک شبکه‌ی پیام ر سانی ایجاد می شود که از طریق تعامل میان Ca، پروتئین‌های تنظیمی با Ca، MAP کینازها، تعداد زیادی از عوامل رونویسی، به گیاهان امکان می‌دهد پاسخ‌هایی را صادر کنند که آن‌ها را برا ی سازگاری به شرایط محیطی گوناگون مانند دماهای یخ زدگی قادر می‌سازد [Kim., 2007].

عوامل رونویسی در فرآیندهای مقاومت به سرما درگیر بوده و به عنوان عامل مهم کنترل‌کننده‌ی ژن‌های موثر در واکنش به سرما مطرح شده‌اند. در واقع عوامل رونویسی، پروتئین‌هایی (Trans acting) هستند که بیان ژن‌ها را از طریق اتصال به توالی‌های خاصی از DNA (Cis acting)، واقع در ناحیه پروموترهای ژن‌های هدف، تقویت یا متوقف می‌کنند. ژن‌های عوامل رونویسی، بخش قابل توجهی از ژنوم‌های همه یوکاریوت‌ها و از جمله گیاهان آلی را تشکیل می‌دهند [Riechmann et al., 2000].

در این پژوهش به منظور بررسی تغییرات بیان ژن‌های درگیر در تنش سرمایی در واریته‌های ها شمی (حساس) و PR (مقاوم) برنج، بیان نسبی یک ژن عامل رونویسی مرتبط با سرما و یک ژن کدکننده‌ی پروتئین کیناز مؤثر در انتقال پیام در ۲ شرایط تنش و غیر تنش با استفاده از روش Real time PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

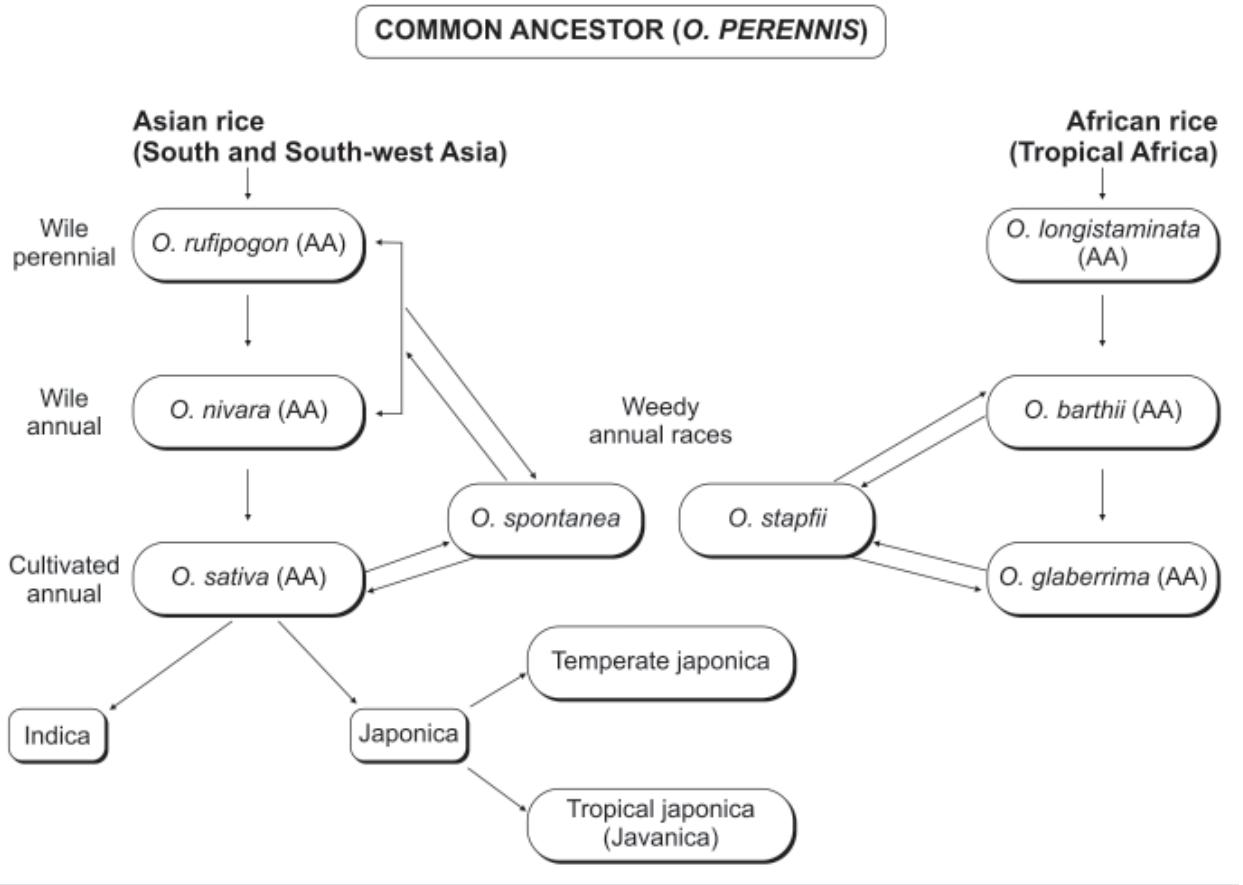
فصل اول:

کلیات و مرور منابع

۱-۱- برنج

برنج متعلق به جنس Oryza و زیر خانواده‌ی Oryzeae از خانواده‌ی گندمیان[1] می‌باشد. جنس Oryza شامل ۲۵ گونه‌ی طبقه بندی شده است که ۲۳ عدد آن‌ها گونه‌های وحشی و دو گونه O.sativa و O.glaberrima آن کشت می‌شود [Morishima, 1984; Vaughan,1994;Brar and khush, 2003]

O.sativa و O.glaberrima به صورت مستقل از دو نیای مختلف به وجود آمدند و باور براین است که به ترتیب در جنوب یا جنوب شرقی آسیا و مناطق گرمسیری غرب آفریقا اهلی شده‌اند.



شکل۱-۱. نمودار مقایسه‌ای روند تکاملی برنج های زراعی آفریقا و آسیا

باور بر این است که اهلی شدن برنج آسیایی، O.sativa در ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد اتفاق افتاده است [OECD, 1999]. این گونه به صورت ۲ گروه اکولوژیکی به نام ایندیکا و ژاپونیکا انتشار یافته است. مطالعات صورت گرفته، ثابت می‌کند که این ۲ گروه به طور مستقل از اهلی شدن ۲ برنج وحشی به ترتیب در چین و هند مشتق شده‌اند[second, 1982; 1986]. تعداد کروموزوم پایه

جنس Oryza، ۱۲ عدد است. O.sativa و O.glaberrima و ۱۴ گونه‌ی وحشی دیپلوئید هستند و۲۴ کروموزوم دارند و ۸ گونه وحشی تتراپلوئید با ۴۸ کروموزوم هستند.

۱-۲- اهمیت اقتصادی برنج

برنج یکی از سه گیاه غذایی عمده‌ی جهان است و غذای حدود نیمی از مردم جهان را تأمین می‌کند. بیش از ۴۰۰۰۰ واریته برنج در سطح جهان گزارش شده است. قاره‌ی آسیا در تولید برنج پیشرو است و بر اساس آمار حدود ۹۰ درصد تولید جهانی را داراست. برنج اولین گیاه زراعی خوراکی است که توالی کامل ژنوم آن در دسترس است. این گیاه به عنوان ژنوم مرجع برای گندمیان از جمله دیگر غلات مطرح است. توالی کامل برای ژنوم ژاپونیکا [Goff et al., 2002] و ژنوم ایندیکا [yu et al., 2002] در دسترس است.

۱-۳- پراکنش جغرافیایی برنج

O.sativa شامل اکوتایپ‌ها یا ارقام زیادی است که به شرایط زیست محیطی گوناگون سازگار شده‌اند. برنج در حال حاضر در دورترین نقطه شمالی مانند سواحل رودخانه‌ی آمور (۵۳ درجه‌ی شمالی) روی خط مرزی بین روسیه و چین، و در دورترین نقطه‌ی جنوبی مثل آرژانتین مرکزی (۴۰ درجه‌ی جنوبی)کشت می‌شود[IRRI, 1985]. این گیاه در اقلیم‌های خنک در کوهستان‌های نپال و هند، و در صورت آبیاری در بیابان‌های گرم پاکستان، ایران و مصر رشد می‌کند. گیاه برنج متعلق به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است و برای رشد به دماهای بالایی در حدود ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد نیاز دارد. به نظر می‌رسد که دمای ۳۰ درجه در طول روز و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در طول شب برای رشد و نمو گیاه برنج مناسب‌تر باشد. برنج هم چنین می‌تواند در خاک‌های شور، قلیایی یا اسید سولفات رشد کند. واضح است این گیاه برای رشد در شرایط مختلف سازگار شده است.

۱-۴- گیاهشناسی برنج

ریشه برنج سطحی و افشان بوده و حداکثر تا عمق ۲۰ تا ۲۵ سانتی متری خاک نفوذ می‌نماید . در زمان باز شدن گل‌ها و به خوشه رفتن برنج، رشد ریشه حداکثر میزان خود را دارد. ساقه برنج بند بند و توخالی بوده و در فواصل مختلف ساقه جداره‌های سختی قرار دارد که در آن قسمت‌ها ساقه توپر می‌باشد و گره نام دارد. برگ‌های گیاه کشیده و دارای رگبرگ‌های موازی بوده و

بدون دمبرگ است و قاعده برگ پهن‌تر از سایر نقاط آن می‌باشد. مراحل رشدی برنج شامل: جوانه زنی تا سبز شدن[۱] ، گیاهچه‌ای[۲] ، پنجه زنی[۳] ، طویل شدن ساقه،[۴] شروع و خروج پانیکل،[۵] خوشه دهی، [۶] گل دهی،[۷] شیری شدن دانه،[۸] خمیری شدن دانه[۹] و بلوغ دانه[۱۰] است. [Chang and Bardenas., 1965].

۱- ۵- تنش

به طور کلی تعریف تنش در اصطلاح بیولوژیکی مشکل است. یک شرایط بیولوژیکی خاص که برای یک گیاه تنش است، ممکن است برای گیاه دیگر مناسب باشد. تنش بیولوژیکی، یک نیرو یا شرایط مضر که عملکرد طبیعی یک سیستم بیولوژیکی مانند گیاه را مختل می‌کند [Gones, 1989]. در طبیعت گیاهان بارها با شرایط زیستی و غیرزیستی مضر مانند دماهای سرمازدگی، خشکی، شوری و بیماری‌ها رقابت می کنند.

۱-۵-۱- تنش دمایی

دما عامل عمده‌ای است که مناسب بودن شرایط ژئوگرافی را برای رشد گونه‌های گیاهی به طور ویژه‌ای محدود می‌کند. در کشاورزی، دمای بالا یا پایین به عنوان یک عامل محدود کننده‌ی تولید محصول زراعی محسوب می‌شود. به عنوان مثال گیاهان رشد یافته در اقلیم‌های معتدل و نیمه گرمسیری ممکن است اغلب در معرض تنش سرما قرار بگیرند. قرار گرفتن گیاهان برنج در محدوده‌ی دمایی ۰ تا ۱۰ درجه سانتی گراد باعث تنش سرمازدگی می‌شود در حالی که قرار گرفتن دردماهای زیر صفر درجه

1-germination

2 -seedling

3 -tillering

4-stem elongation

5-panicle initiation

6-Heading

7-flowering

8-milk grain stage

9-drough grain stage

10-mature grain stage