الملخص العربي لرسالة الدكتوراه

للدكتور/ عاطف محمد محمد محمد
المدرس بقسم أمراض النبات – كلية الزراعة – جامعة الفيوم

عنوان الرسالة: استهداف النقاط الساخنة سيرنا: استراتيجية جديدة للسيطرة على الأمراض الفيروسية

Targeting siRNA hotspots: a novel strategy for controlling viral diseases

الخلاصة

تم أجراء جميع مراحل هذا البحث في معامل وصوب المعهد الدولي للبساتين (HRI) التابع لمدرسة علوم الحياه- جامعة واريك-المملكة المتحدة. في السنوات الاخيرة تم اكتشاف ان ظاهرة إسكات الحمض النووي الريبوزي (RNA)، في النبات، هو آلية دفاع تكيفية ضد العدوى الفيروسية. من السمات الرائعة لإسكات الحمض النووي الريبي (RNA) هو توليد جزيئات RNA صغيرة متداخلة يتراوح طولها بين ٢١ و ٢٥ نانو متر. في الآونة الأخيرة، كشفت العديد من الأبحاث المنشورة عن وجود نقاط معينة إلى جانب بعض الجينومات الفيروسية ذات ترددات متكررة للغاية من siRNA، وهي النقاط الساخنة، المعرضة للإسكات. نحن نفترض أن استهداف مثل هذه النقاط يمكن أن يتحكم في عدوى الفيروس من خلال تعزيز تدهور الرنا الرسول المستهدف و قمع ترجمة البروتين أوحدوث كلا الأمرين. بشكل عام، يتم إحداث إسكات الحمض النووي الريبي (RNA) عن طريق الحمض النووي الريبي المزدوج (dsRNA)، والذي يمكن أن ينشأ من العديد من المصادر، مثل الجينات المحورة، أو وسائط تكاثر الفيروس، أو الرنا المزدوج الجديلة الذي تم إدخاله تجريبيًا. لذلك، تتضمن أهداف هذا المشروع (١) تحديد سمات siRNAs المرتبطة بالفيروسات التوأمية. وسيشمل ذلك استنساخ وتسلسل siRNAs من النباتات المصابة بالفيروسات التوأمية. سيكشف تحديد ملامح siRNAs عن "النقطة (النقاط) الساخنة" لـ siRNA على طول الجينوم الفيروسي. سيتم استنساخ SiRNA مباشرة من مجموع الحمض النووي الريبوزي (RNA) الصغير المعزول من النباتات المريضة التي تم جمعها من الحقول في مصر، أو من النباتات المصابة بالفيروسات التوأمية المستنسخة. (٢) آلية مضادة للفيروسات محددة مسبقًا بوساطة إسكات الحمض النووي الريبي (RNA) في النباتات ذات "النقطة الساخنة" الفيروسية siRNA. الفكرة وراء ذلك هي أن وجود هذه النقاط الساخنة الفيروسية siRNAs في الأنسجة المضيفة، وخاصة الأوراق، سيؤدي إلى دفاع موجه بواسطة siRNA ضد أي عدوى بالفيروسات التوأمية مستقبلا. (٣) تحريض المقاومة وفحوصات مقاومة العدوى الفيروسية في النباتات.

من أجل اختبار هذه الفرضية، تم توفير خيوط الحمض النووي الريبي (RNA) sense and anti-sense المقابلة لتسلسل المختار من الحمض النووي (نقطة فعالة تبلغ ١٩nt)، وبناءه في نهايته بـ ٥' فوسفات، ٣' هيدروكسيل dTT معلق في نهاية ٣' من كلا التتابعيين مع ادماجه مع T7 ويتم نسخه في النهاية عبر بروتوكول invitrotranscriptin ®. تم إنتاج الجينوم كامل الطول لـ

ToMV بشكل إلزامي ثم تم إدخاله في نبات *Nicotiana benthmiana* وبالاشتراك او بشكل منفصل مع الحمض النووي الريبي (RNA) sense، وشريط anti-sense، وdsRNA على التوالي. بعد أسبوع واحد من العدوي الصناعية، يتم جمع الأوراق المصابة وتصنيفها إلى مجموعة بها اصابة موضعية وأخري جهازية. تم إجراء اختبار northern blot باستخدام مسبار غير مشع (ديجوكسيجينين ١١-dUTP) لدراسة الفرق في تركيز الحمض النووي الريبي الفيروسي بين المعاملات المختلفة. وقد أدى ذلك إلى ملاحظة انخفاض واضح في تركيز الحمض النووي الريبي (RNA) في النباتات ذات الرنا المزدوج الجديلة dsRNS والنباتات المنقولة بواسطة الحمض النووي الريبي anti-sense (RNA) على التوالي، في حين لا يوجد فرق كبير بين النباتات المنقولة بواسطة ToMV والنباتات المنقولة بواسطة الحمض النووي الريبي (Sense-RNA). علاوة على ذلك، من خلال الملاحظة بالعين المجردة، شوهدت اختلافات واضحة بين النباتات المعاملة حيث كانت شدة المرض عالية جدًا في ToMV والنباتات الملقحة بالـ RNA بينما ToMV plus dsRNA وToMV plus antisense - أظهرت إحدى النباتات الملقحة أعراضًا ضعيفة قليلاً والنباتات ظهرت أكثر صحة ونمو.

وفي مزيد من التجارب، تم الكشف عن siRNAs مختلفة الحجم المرتبطة بعدوى African cassava mosaic virus (ACMV) بواسطة كل من northern blot, وجهاز ٤٥٤ العالي التسلسل للعينات من النباتات المصابة. استنادًا إلى البيانات التسلسلية لجهاز٤٥٤ التي تم الحصول عليها، تم إنتاج senese siRNAs وsenese-anti siRNAs المقابلة لمناطق النقاط الساخنة والباردة في siRNA. تم التحقيق في آثار هذه siRNAs الخارجية على عدوى ACMV في نباتات *N. benthamiana*.

كشفت النتائج أن العدوي المشتركة لـ siRNAs في النقاط الساخنة مع ACMV قلل من تكرار الحمض النووي الفيروسي وتطور المرض. ظلت النباتات التي تم تلقيحها بشكل مشترك بـ ACMV/siRNA بدون أعراض طوال فترة التجارب التي استمرت ٣ أشهر. من ناحية أخرى، عندما تم تلقيح ACMV مع siRNA المستهدف للبقع الباردة coldspots، كان تراكم الحمض النووي الفيروسي مشابهًا للعدوى بـ ACMV وحده، وأظهرت النباتات أعراض عدوى ACMV النموذجية. كان تأثير النقطة الساخنة سيرنا في إحداث المقاومة الفيروسية معتمدا على الجرعة. وكشفت النتائج أيضًا أن فعالية النقطة الساخنة siRNA لاستنباط مقاومة دائمة لعدوى ACMV تتطلب مضيفًا وظيفيًا يعتمد على RNA بوليميريز ٦ (RDR6).

في الختام، توضح هذه النتائج أن النقطة الساخنة vsiRNA يمكن أن تقدم استراتيجية جديدة للسيطرة على الأمراض الفيروسية المدمرة في النباتات.

رئيس مجلس القسم **عميد الكلية**

أ.د/محمد أحمدعلى حسن **أ.د/ محمود على عبد الفتاح**