



سازمان حفظ نباتات
معاونت قرنطینه و بهداشت گیاهی

دستورالعمل ردیابی و نمونه برداری
بیماری ویروسی چروکیدگی (روگوز) قهوه ای میوه گوجه فرنگی
Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

تهیه و تنظیم
دفتر پایش و تحلیل خطر
پاییز 1400

مقدمه

ویروس چروکیدگی قهوه ای میوه گوجه فرنگی (*Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) از اعضای جنس توباموویروس (*Tobamovirus*) یکی از ویروس های نوظهور در چند سال اخیر و از مهم ترین ویروس های خسارتزای گوجه فرنگی می باشد. این ویروس اولین بار در دره اردن و فلسطین اشغالی بین پاییز 2014 تا بهار 2015 گزارش شد. این ویروس به آسانی از طریق تماس منتشر می شود لذا به دلیل انتشار بسیار آسان و سریع، اکنون به سایر مناطق تولید گوجه فرنگی در جهان گسترش یافته است. این ویروس جدید می تواند به عنوان یک گونه مهاجم در نظر گرفته شود، حتی اگر دامنه میزبانی آن به چند گونه از یک خانواده محدود شود. تا کنون خسارت این ویروس تنها روی محصولات خاص کشاورزی (گوجه فرنگی و فلفل) شناخته شده است.

علائم بیماری

مراحل رشدی متاثر از ویروس، شامل مرحله گلدهی، مرحله میوه دهی، مرحله نشاء و مرحله رشد رویشی می باشد. ویروس ToBRFV طیف وسیعی از علائم را روی گیاه گوجه فرنگی بسته به زمان آلودگی، واریته میزبان، مرحله رشدی میزبان و شرایط محیطی سبب می گردد. **علائم روی برگ گوجه فرنگی:** بر روی برگهای گوجه فرنگی متداولترین علائم، موزائیک همراه با تاولهای سبز تیره در برگهای رشد یافته قدیمی می باشد. برگهای جوان نزدیک به راس گیاه علائم لکه های زرد رنگ و بدشکلی برگ را نشان می دهند (شکل 1).



شکل 1- علائم ویروس ToBRFV بر روی برگچه های گوجه فرنگی

اغلب برخی برگها بدشکلی های شدیدتر با سطوح بین رگبرگی کاهش یافته را نشان می دهند (شکل 2). برخی محققین نکرورز موضعی ساقه را گزارش کرده اند. همچنین نکرورز دم میوه و غلاف گل نیز گزارش شده است. گاهی گلها نیز علائم پژمردگی نشان می دهند.



شکل 2- علائم موزاییک ، تاوولی شدن سطح برگها و تغییر شکل برگها ناشی از ویروس ToBRFV

علائم روی میوه گوجه فرنگی: معمول ترین علائم بر روی میوه های گوجه فرنگی تغییر رنگ زرد یا سبز (Discoloration) می باشد. شدت روگوز یا چروکیدگی قهوه ای همراه با تغییر رنگ به سبز یا زرد و بدشکلی بستگی به وارپته میزبان، زمان آلودگی و شرایط محیطی دارد (شکل 3، 4، 5 و 6).



شکل 3- تغییر رنگ میوه گوجه فرنگی ناشی از ویروس ToBRFV



Tomato brown rugose fruit virus (TOBRFV) - <https://gd.eppo.int>

شکل 4- لکه های قهوه ای ناشی از آلودگی به ویروس ToBRFV بر روی میوه گوجه فرنگی

Symptoms – Tomato



شکل 5- علائم ویروس ToBRFV بر روی میوه گوجه فرنگی



شکل 6- A: نقوش موزائیک سراسری روی برگهای گوجه فرنگی، B: خشکیدگی ساقه ها و دم میوه ها روی گوجه گیلاسی، C: علائم تپیک میوه با لکه های زرد رنگ، D: علائم ToBRFV روی میوه، E: علائم ترکیبی ویروس ToBRFV و Tomato spotted wilt virus(TSWV)

علائم بیماری روی فلفل: آلودگی طبیعی در فلفل با علائم طبقه بندی شده کمتری شناسایی شده است. اما میوه های با سطوح تاولی و موج دار در فلفل گزارش شده است. در یک آزمایش زیر پلاستیک، آلودگی مکانیکی گیاهان فلفل منجر به بدشکلی و موزائیک زرد رنگ همراه با لکه های سبز یا قرمز در میوه ها گردید (شکل 7).

به طور کلی علائم بر روی میوه ها به صورت اشکال غیر طبیعی میوه، بی رنگی یا تغییر رنگ میوه، زخمهای سیاه یا قهوه ای بر روی میوه، بدشکلی پوست میوه و کاهش سایز میوه و در گلهای به صورت پژمردگی گل و در برگها به صورت نقوش غیر عادی، تاشدگی یا پپچیدگی برگ و در ساقه به صورت ظهور نکروز یا زخم می باشد.

Symptoms – Pepper (non tobamovirus-resistant varieties only)



شکل 7- علائم ویروس ToBRFV بر روی برگ و میوه فلفل

جمع آوری نمونه های گیاهی گوجه فرنگی و فلفل به منظور انجام بررسی های آزمایشگاهی

به منظور بررسی وضعیت گلخانه یا مزارع تحت کشت گوجه فرنگی و فلفل در رابطه با آلودگی به ویروس ToBRFV لازم است در طی داشت و قبل از برداشت محصول، مزرعه یا گلخانه مورد نظر، تحت بازدید و پایش علائم بیماری که در بالا به آن اشاره شد قرار گیرند. با توجه به شباهت علائم این ویروس به برخی ویروس های دیگر از جمله ویروسهای از جمله ویروسهای *Tobacco mosaic virus* ، *Tomato mottle mosaic virus* و *Tomato mosaic virus* ، ضروری است از گیاهان دارای علائم مشکوک منطبق با علائم ذکر شده در بالا نمونه برداری شده و نمونه ها به آزمایشگاه منتقل شود و تحت تست آزمایشگاهی قرار گیرد. توصیه می شود در هنگام نمونه برداری علاوه بر نمونه های با علائم مشکوک، نمونه های معمولی و احیاناً بدون علائم نیز جمع آوری شوند.

غلظت ویروس در بخش های مختلف گیاه متفاوت بوده و بیشترین غلظت ویروس در برگ های جوان و میوه ها و کمترین غلظت در برگهای مسن است. البته نمونه های برگ باید از رشد کافی برخوردار باشند، به طوری که برگ از لحاظ اندازه به حد طبیعی رسیده باشد.

نمونه برگ:

تعداد نمونه های برگی حدود 12 الی 20 عدد برگ یا برگچه باشد که توصیه می شود در بوته های بدون علائم از قسمتهای مختلف بوته و در بوته های دارای علائم، عمدتاً از قسمتهای دارای علائم و مخصوصاً برگهای بالایی و جوان بوته برداشته شوند.

نمونه میوه:

تعداد نمونه های میوه حداقل 3 نمونه از هر بوته ی آلوده نمونه گیری شده و هر سه، یک نمونه مرکب قلمداد گردد.

توجه شود که در گلخانه های دارای علائم از حداقل پنج بخش مستقل گلخانه و یا از حداقل 10 درصد بوته ها، نمونه برداری شود.

در نمونه برداری اولیه یعنی زمانی که از وضعیت بیماری در گلخانه هیچ اطلاعاتی موجود نیست می توان از 10 درصد بوته ها و از هر بوته يك برگ نمونه برداری کرد و تمامی برگها را با هم مخلوط و به عنوان يك نمونه تلقی کرد.

نمونه نشاء:

در نمونه برداری از مرحله نشاء برای انجام تست های مولکولی، بهترین زمان نمونه برداری، قبل از انتقال نشاء به گلخانه یا مزرعه می باشد.

انتقال نمونه به آزمایشگاه:

نمونه های برگي و میوه را جداگانه در داخل پاکتهای نایلونی قرار داده و پس از خارج کردن هوای داخل آن، درب آن بسته شود. اطلاعات مربوطه روی پاکت درج شود یا به همراه آن ارسال شود.

توصیه می شود نمونه ها به هیچ وجه در معرض نور آفتاب قرار نگیرند و در شرایط خنک و 4 درجه سانتی گراد مثلاً روی یخ داخل یخدان، نگهداری و از یخ زدن نمونه ها نیز جلوگیری شود. نمونه ها در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شوند.

در خصوص نحوه ی ثبت اطلاعات مربوط به نمونه ها توجه به موارد زیر ضروری است:

- نام و مشخصات جمع آوری کننده
- تاریخ جمع آوری
- شماره ي نمونه
- گونه و رقم گیاه نمونه برداری شده
- تعداد یا درصد بوته های آلوده
- آدرس کامل محل جمع آوری
- مختصات جغرافیایی محل نمونه
- وسعت گلخانه یا مزرعه

- نام و مشخصات بهره بردار

شناسایی مولکولی ویروس در آزمایشگاه

یکی از روشهای متداول شناسایی آزمایشگاهی ویروس ToBRFV انجام تست مولکولی RT-PCR می باشد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه لازم است سریعاً تست فوق به ترتیب زیر انجام شود:

الف- استخراج RNA:

برای استخراج RNA از نمونه ها، می توان از کیت استخراج RNA (مانند RNeasy Plant Mini kit (Qiagen)) که به صورت تجاری در بازار به فروش می رسد و براساس دستورالعمل موجود در کیت مربوطه استفاده کرد. یا از روش های سنتی و متداول آزمایشگاهی برای استخراج RNA استفاده نمود.

ب- انجام تست RT-PCR:

جفت پرایمر قابل توصیه برای انجام این تست به صورت توالی زیر می باشد:

Forward primer: ToBRFV-FMX: 5'-AAC CAG AGT CTT CCT ATA CTC GGA A- 3'

Reverse primer: ToBRFV-RMX: 5'-CTC WCC ATC TCT TAA TAA TCT CCT-3'

با استفاده از پرایمر Reverse و انجام واکنش RT (براساس آنزیم Reverse transcriptase و پروتوکل مربوط به آن) درون تیوب آزمایشگاهی و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ابتدا cDNA تهیه می شود. سپس با استفاده از جفت پرایمر توصیه شده فوق و با کمک آنزیم Taq polymerase و انجام واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اقدام به تکثیر قطعه مورد نظر می شود.

ج- بردن نمونه ها روی ژل آگارز و بررسی وضعیت تکثیر ژنوم:

پس از انجام RT-PCR لازم است نمونه ها روی ژل آگارز برده شده و پس از ران کردن ژل، تحت نور UV مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به جفت پرایمر توصیه شده در بالا برای انجام تست RT-PCR قطعه مورد نظر 475 کیلوباز خواهد بود که در صورت مشاهده روی ژل پی به آلودگی نمونه خواهید برد.