وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات

راهنمای شناسائی و ردیابی

بیماری ویروسی چروکیدگی (روگوز) قهوه ای میوه گوجه فرنگی

و اقدامات بهداشتی در گلخانه ها و مزارع گوجه فرنگی و فلفل

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

تهیه و تنظیم :

سازمان حفظ نباتات کشور

با همکاری موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

تابستان 1401

بیماری چروکیدگی (روگوز) قهوه ای میوه گوجه فرنگی

Tomato brown rugose fruit virus

نام عمومی: Tomato brown rugose fruit virus

آکرونیم (acronym) : ToBRFV

مقدمه:

ویروس چروکیدگی قهوه ای میوه گوجه فرنگی (ToBRFV) اولین بار در دره اردن و فلسطین اشغالی بین پاییز 2014 تا بهار 2015 گزارش شد. این ویروس به آسانی از طریق بذر، نشاء الوده و تماس مکانیکی انتقال می یابد و تاکنون 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. تاکنون این ویروس تنها روی محصولات خاص کشاورزی (گوجه فرنگی و فلفل) گزارش شده است. این ویروس از نوامبر 2019 در لیست خطر اتحادیه اروپا (EPPO) قرار گرفته است.

طبقه بندی (تاکسونومی) ویروس:

Domain: Virus

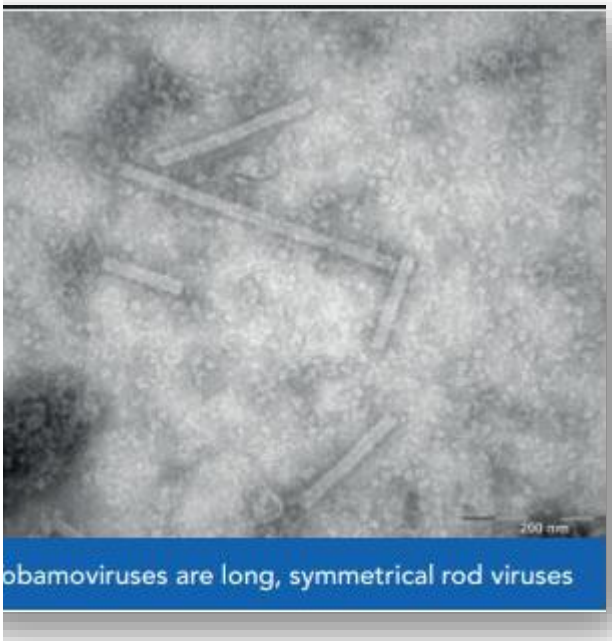
Family: Virgoviridae

Genus: Tobamovirus

Species: Tomato brown rugose fruit virus

خصوصیات فنوتیپیکی ویروس:

ToBRFV از جنس توباموویروس بوده و دارای ویژگی های ساختاری و مولکولی جنس توباموویروس ها است. این ویروس دارای پیکره های سخت و میله ای شکل به طول 300 نانومتر و قطر 17 نانومتر است. ژنوم ویروس آر. ان. ای تک رشته ای با اندازه 6393 نوکلئوتید است. در حال حاضر ده توالی کامل ژنومی شامل دو توالی از اردن، یک توالی از فلسطین اشغالی، دو توالی از فلسطین، دو توالی از آلمان، یک توالی از ایتالیا، یک توالی از انگلستان و یک توالی از مکزیک در پایگاه داده ای GenBank در دسترس است که همگی آنها شباهت 99.5 درصدی در سطح نوکلئوتیدی با یکدیگر دارند که نشانگر شیوع شدید یک ایزوله مشابه در سراسر جهان است.



تاریخچه انتشار ویروس:

ویروس عامل چروکیدگی قهوه ای میوه گوجه فرنگی ToBRFV، گیاهان گوجه فرنگی و فلفل از خانواده Solanacae را آلوده می کند. اولین بار در گلخانه های کشت گوجه فرنگی در اردن (سالم و همکاران، 2016) شناسایی شد. متعاقبا در سال 2017 توسط لوریا و همکاران از فلسطین اشغالی، در سال 2018 از آمریکا (کالیفرنیا و آریزونا)، فلسطین و آلمان. در سال 2019 از مکزیک، چین، ترکیه، ایتالیا، انگلستان، یونان، اسپانیا، هلند، مصر، لهستان، قبرس، چک ، در سال 2020 از فرانسه ، در سال 2021 از بلژیک، مالت، مجارستان، بلغارستان، نروژ، اتریش، استونی، اسلوونی، سوئیس، پرتغال، ازبکستان، عربستان سعودی و ایران گزارش گردید. آلودگی در هر دو محصول گوجه فرنگی و فلفل از بساری از این کشورها گزارش گردیده است.

کشور مصر یک سال بعد از اولین گزارش آلودگی در این کشور اعلام کرد که مقاله تحقیقی منتشر شده، قابل استناد نیست و این کشور را عاری از ویروس گزارش کرد. کشور آلمان در سال 2019 موازین ریشه کنی را اجرا و بیماری را ریشه کن نمود. اما بیماری مجددا در سال 2020 در سایر سایت های تولید گوجه فرنگی مشاهده گردید. کشور انگلستان در ژانویه 2022 اعلام ریشه کنی بیماری را نمود، اما در ماه می 2022 مجددا در سایر نواحی کشور گزارش گردید. کشور لهستان در سال 2020 اعلام ریشه کنی و مجددا در سال 2021 بیماری در استانهای دیگر گزارش گردید. کشور استونی اولین گزارش ویروس را در سال 2021 داشت که با موازین ریشه کنی شامل امحاء کلیه گیاهان آلوده و ضدعفونی گلخانه های آلوده اعلام عدم وجود بیماری کرده است. اولین گزارش آلودگی از هلند در سال 2019 روی گوجه فرنگی بود . سپس در سال 2020 از 20 سایت تولید گوجه فرنگی گزارش گزارش گردید. برنامه ریشه کنی در 5 سایت موفقیت آمیز، در 4 سایت تناوب کشت با کدوئیان اجرا شد و در 8 سایت تولید گوجه فرنگی برنامه ریشه کنی ویروس ناموفق بود.

آخرین وضعیت آلودگی به ویروس روگوز میوه گوجه فرنگی در کشورهای مختلف جهان (2022-06-07)

کشور	وضعیت ویروس	کشور	وضعیت ویروس	کشور	وضعیت ویروس	کشور	وضعیت ویروس
مصر	Absent	ایران	Present	بلژیک	Present	هلند	Present
اتیوپی	Absent	ژاپن	Absent	بلغارستان	Absent	نروژ	Present
کانادا	Present	اردن	Present	قبرس	Present	لهستان	Present
شیلی	Absent	لبنان	Present	چک	Present	پرتغال	Present
دومینیکن	Absent	عربستان	Present	فرانسه	Present	اسلوواکی	Absent
گواتمالا	Absent	سوریه	Present	استونی	Absent	اسپانیا	Present
مکزیک	Present	تایوان	Absent	آلمان	Present	سوئیس	Present
پرو	Absent	تایلند	Absent	مجارستان	Present	ترکیه	Present
آمریکا	Present	ازبکستان	Present	ایتالیا	Present	انگلستان	Present
چین	Present	آلبانی	Present	لیتوانی	Absent	استرالیا	Absent
هند	Absent	اتریش	Present	مالت	Present		

کشورهایی که وضعیت ویروس در آنها به صورت عدم وجود (Absent) می باشد گزارشات غیر قابل استناد از وقوع ویروس در آنها وجود دارد که تاکنون به صورت رسمی تایید نشده اند .

اهمیت ویروس:

ویروس ToBRFV یکی از نگرانی های اصلی در تولید محصول گوجه فرنگی و فلفل در گلخانه های تولیدی تحت شرایط کنترلی اروپا، امریکا، کشورهای مدیترانه ای و همچنین آسیا است. مواد تکثیری مانند بذر، نشاء ، پیوندک و قلمه ها و نیز میوه های تازه از عوامل پرخطر ورود و انتشار این ویروس در مناطق جدید و غیر آلوده هستند. زمانیکه ویروس از طریق تجارت بین المللی وارد منطقه ای می شود، اقدامات کنترلی، بسیار محدود بوده و عمدتا محدود به حذف و ریشه کنی گیاهان آلوده و بدنبال آن رعایت اقدامات بهداشتی شدید، نظیر شستشوی منظم دستهای کارگران، تمییز کردن چکمه ها قبل از ورود به گلخانه می باشد. خطرات بالقوه مرتبط با ویروس وارد شده به یک منطقه جدید، عمدتا مربوط به انتقال مکانیکی توسط کارگران، ابزار و تجهیزات در حین کار با گیاهان آلوده می باشد. علاوه بر آن، انتقال از طریق بذور آلوده، سایر مواد تکثیری و محصولات گیاهی نیز از راههای اصلی ورود به یک منطقه جدید می باشد. دلیل دیگر اهمیت این ویروس، غالب شدن آن بر ژنهای مقاومت گیاهان گوجه فرنگی و فلفل حامل ژن های مقاومت $Tm\text{-}2^2$ و $L^{1,3,4}$ می باشد.

در سال 2019 اتحادیه اروپا این ویروس را در لیست هشدار (Alert List) وارد نمود و پس از آن در سال 2020 کمیسیون اتحادیه اروپا (EU Commission) اقدامات سختگیرانه ای برای جلوگیری از ورود و گسترش آن در سایر کشورهای اتحادیه اروپا اعمال نمود.

کشور استرالیا نیز از سال 2019 اقدامات سختگیرانه ای را برای واردات بذر گوجه فرنگی و فلفل اعمال نموده است. وزارت کشاورزی آمریکا (USDA) و سرویس بازرسی سلامت گیاه و دام (APHIS) نیز از سال 2019 دستورالعمل های فدرالی را برای محدود کردن واردات گوجه فرنگی و فلفل و مواد تکثیری گیاهی آلوده به ویروس ToBRFV به اجرا گذاشته است.

دامنه میزبانی ویروس:

تاکنون آلودگی طبیعی به ویروس ToBRFV تنها در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و فلفل (*Capsicum annuum*) گزارش شده است. برخی آلودگیهای بدون علائم در گونه های علفی موجود در محل کشت گوجه فرنگی و فلفل، از جمله *Solanum nigrum* و *Chenopodium murale* گزارش شده است. اما این گزارشات محدود به آزمایشات بررسی دامنه میزبانی با مایه زنی ویروس می باشد.

مراحل رشدی متاثر از ویروس: مرحله گلدهی، مرحله میوه دهی، مرحله نشاء و مرحله رشد رویشی

Hosts	Species	Classification
	Solanum lycopersicum	**Major**
	Capsicum annuum	**None (if *L*-gene containing cultivars)** **Major if no *L*-genes present**
	Chenopodiastrum murale	Artificial, confirmed as natural host in Israel (Dombrovsky, pers. com. 2019)
	Chenopodium bengalense	Artificial
	Chenopodium quinoa	Artificial
	Nicotiana benthamiana	Artificial
	Nicotiana clevelandii	Artificial
	Nicotiana glutinosa	Artificial
	Nicotiana tabacum	Artificial
	Petunia x hybrida	Artificial
	Solanum nigrum	Artificial and as natural host in Israel (Dombrovsky, pers comm 2019
	Solanum melongena	ToBRFV only detected in seed lots not on plant material

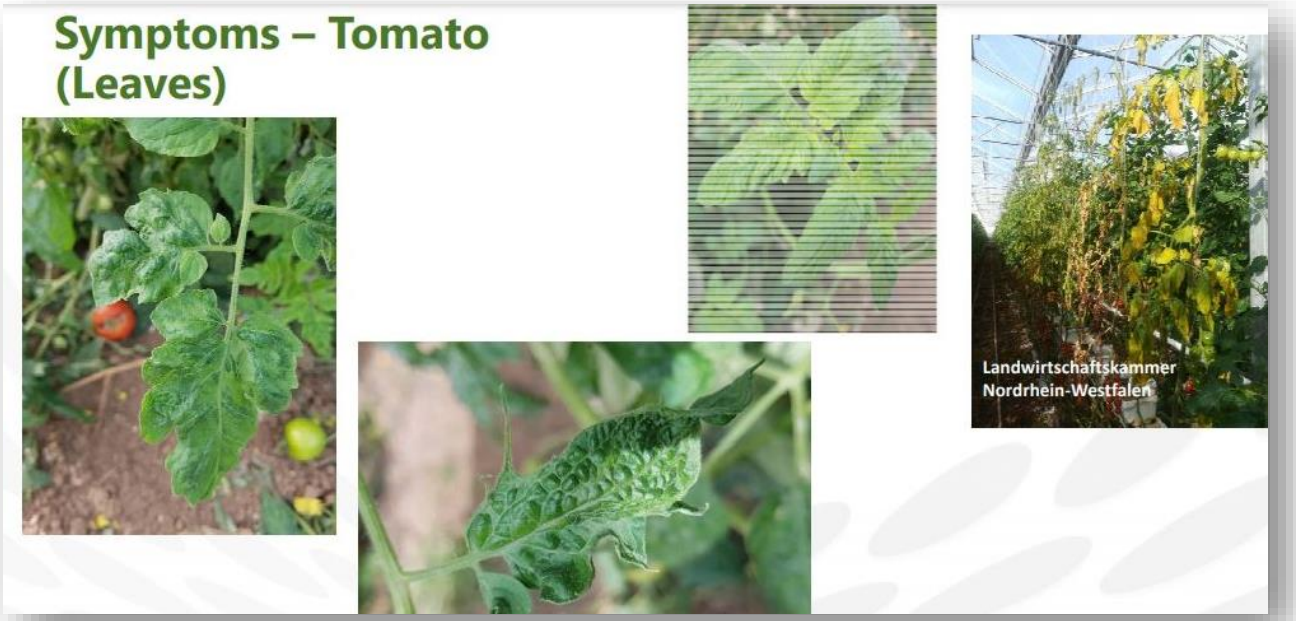
فهرست میزبانهای ویروس ToBRFV

علائم:

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. بر روی برگها 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 برگی را نشان می دهند. اغلب برخی برگها بدشکلیهای شدیدتر با سطوح بین رگبرگی کاهش یافته را نشان می دهند. نکروز موضعی ساقه، همچنین نکروز دم میوه و غلاف گل نیز گزارش شده است. گاهی گلها نیز علائم پژمردگی نشان می دهند. معمولترین علائم بر روی میوه ها 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 واریته میزبان، زمان آلودگی و شرایط محیطی دارد.

آلودگی طبیعی در فلفل با علائم 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.

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 گلها به صورت پژمردگی گل و در برگها به صورت نقوش غیر عادی، تاشدگی یا پیچیدگی برگ و در ساقه به صورت ظهور نکروز یا زخم می باشد.



علائم ویروس ToBRFV بر روی برگهای گوجه فرنگی

Symptoms – Tomato

علائم ویروس ToBRFV بر روی میوه گوجه فرنگی

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

تغییر رنگ میوه گوجه فرنگی ناشی از ویروس ToBRFV

تغییر شکل برگها ناشی از ویروس ToBRFV

تغییر رنگ میوه گوجه فرنگی ناشی از ویروس ToBRFV

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

علائم ویروس ToBRFV بر روی برگ و میوه فلفل

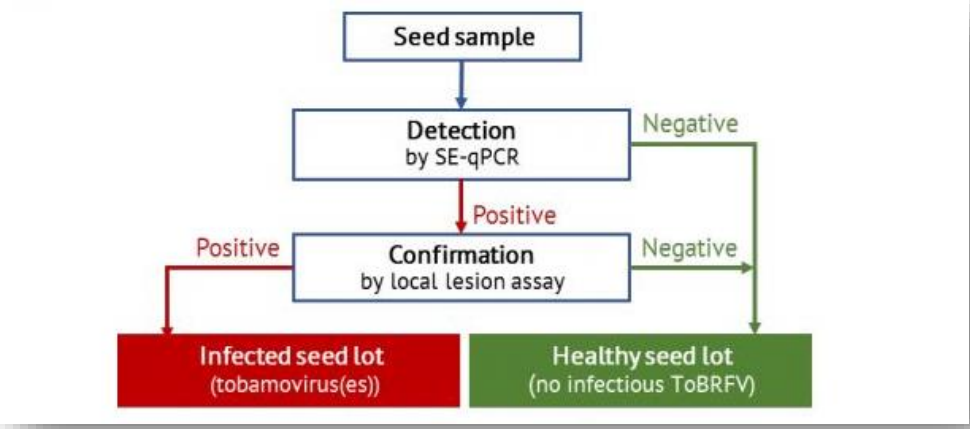
زیست شناسی و انتشار ویروس :

ویروس ToBRFV همانند سایر جنسهای توباموویریده، قدرت ماندگاری بالا و انتقال از طریق بذر، نشا و انتقال مکانیکی آسان از طریق تماس نظیر دست کارگران، لباس کارگران، ابزار آلوده ، تماس مستقیم گیاه با گیاه دارد. ویروس در گلخانه به آسانی از طریق عملیات کشت نظیر پیوند و هرس و غیره گسترش پیدا می کند و این موضوع به خوبی شیوع سریع ویروس ToBRFV را در گلخانه های زیر کشت گوجه فرنگی و فلفل توضیح می دهد. ویروس ToBRFV در سرتاسر گیاه میزبان به صورت سیستمیک منتشر و کل بافتهای میزبان را درگیر می کند و بنابراین گیاه آلوده خود می تواند منبع آلودگی برای سایر گیاهان باشد. همچنین خاک آلوده، آب آبیاری آلوده و محلولهای کودی و غذایی می توانند منبع بالقوه آلودگی به ویروس باشند.

هچنین محققین نشان داده اند که ویروس ToBRFV می تواند از طریق زنبورهای گرده افشان *Bombus terrestris* حمل و موجب انتقال مکانیکی ویروس به گیاهان سالم گوجه فرنگی در دوره گرده افشانی و متعاقبا باعث گسترش ویروس در گلخانه های گوجه فرنگی شوند. این زنبورها به طور معمول برای انجام گرده افشانی در گلخانه های گوجه فرنگی به کار میروند که این خود می تواند یکی از عوامل مهم انتشار این ویروس باشد. از طرف دیگر هنوز ناقل اختصاصی برای انتقال این ویروس گزارش نشده است.

ردیابی و تست های سلامت بذر:

انتشار جهانی ویروس ToBRFV از زمان اولین شناسایی آن در سال 2015، می تواند مرتبط با تجارت بین المللی از طریق بذر باشد. همانند سایر توباموویروسها، انتقال با بذر ویروس ToBRFV تایید شده است. آلودگی بذور با توباموویروسها عمدتا به صورت خارجی (بر روی سطح بذر) می باشد. انتشار بیشتر با تماس (نظیر مرحله نشاء کاری یا برداشت محصول) به انتشار سریع ویروس در داخل گلخانه منجر می شود. گسترش سریع ویروس ToBRFV سبب ایجاد مخاطراتی در صنعت تولید بذر و کشت گوجه فرنگی در جهان می شود. این موضوع سبب شده است که کشورهای اروپایی، استرالیا و آمریکا اقدامات بهداشتی شدیدی در خصوص این ویروس اعمال نمایند. متدهای تست متنوع نظیر RT-PCR و qPCR برای شناسایی ویروس ToBRFV در بذر در دسترس است. کیت های الایزای تجاری مختلفی مانند کیت های Agdia و Loewe، برای شناسایی این ویروس در بذر تولید شده است. اما این ابزارها نتوانستند بین ویروس Tomato mosaic virus و ToBRFV تمایزی قائل شوند بنابراین در صورت مثبت بودن آزمایش، تایید نوع ویروس لازم است. فدراسیون جهانی بهداشت بذر (ISF) یک روش اندازه گیری برای تشخیص ToBRFV در بذور گوجه فرنگی و فلفل تدوین کرده است که ویروس ToBRFV را می توان با استفاده از روش پی سی آر کمی (qPCR) در عصاره بذر تشخیص داد (seq-PCR) . در این روش حداقل اندازه نمونه توصیه شده 3000 بذر با اندازه زیر نمونه ی 250 بذر است.



اهمیت اقتصادی:

اگرچه اطلاعات خاصی از خسارت ایجاد شده توسط ویروس ToBRFV وجود ندارد، اهمیت اقتصادی آن (مستقیم و غیر مستقیم) می تواند زیاد باشد زیرا تنها راه مدیریتی این ویروس اقدامات پیشگیرانه می باشد و هنوز ابزارهای موثری برای کنترل آن در گلخانه ها یا مزارع وجود ندارد. برای مثال ژن مقاومت خاصی در مقابل این ویروس در گیاه میزبان شناسایی نشده است. یک مثال برای مشخص شدن اهمیت اقتصادی این ویروس، برنامه ریشه کنی آن در گلخانه گوجه فرنگی بوده که هزینه ریشه کنی، 100 هزار یورو در هکتار برآورد شده است.

سایر جنبه های مرتبط با اهمیت اقتصادی ویروس ToBRFV:

- گیاه گوجه فرنگی محصولی با ارزش اقتصادی بالا بویژه در گلخانه های تجاری و گلخانه های هیدروپونیک که سرمایه گذاری های اقتصادی آنها زیاد است، می باشد.
- ویروس ToBRFV ، سبب خسارت به محصول و کاهش تولید و مستقیما سبب خسارت بر روی میوه ها می شود.
- هزینه های بالا برای تست های ویروسی و اقدامات بهداشتی عمومی
- شناسایی ویروس در مناطق جدید منجر به برنامه های ریشه کنی و حذف محصول می شود.
- بهترین استراتژی پیشنهادی در مناطق شناسایی شده، عدم کاشت مجدد گوجه فرنگی پس از برنامه ریشه کنی و کاشت گیاهان تناوبی مانند کدوئیان که ارزش اقتصادی بالایی به اندازه گوجه فرنگی ندارند می باشد.
- جایگزینی زنبورهای گرده افشان در گلخانه ها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد.

- هزینه های مستقیم روشهای ریشه کنی
- هزینه های بالای تولید بذر گوجه فرنگی
- تحت تاثیر قرار گرفتن تجارت بین المللی محصول گوجه فرنگی

روشهای تشخیص:

روشهای شناسایی مختلفی برای تشخیص ویروس ToBRFV در بذر و بافت گیاهی وجود دارد. سه کیت تجاری الایزا شامل AGDIA-TMV ، Prime Diognistic- ToMV و LOEWE- ToBRFV برای شناسایی ویروس ToBRFV در دسترس هستند اما اختصاصی این ویروس نمی باشند. بنابراین در صورت مثبت بودن آزمایش تست های تاییدی از جمله تست مولکولی RT-PCR مورد نیاز است.

تمایز بین ویروس ToBRFV و سایر توباموویروسها که برگها و میوه های گیاه گوجه فرنگی را آلوده می کنند، امکان پذیر نیست. در حال حاضر از تست های سرولوژیکی، مولکولی و بیولوژیکی (گیاهان محک) برای تشخیص این ویروس استفاده می شود. در تست بیولوژیکی از گیاه محک *Nicotiana tabacum* برای شناسایی ویروس ToBRFV در عصاره بذر استفاده می شود اما این روش بین این ویروس و سایر ویروسهای جنس توباموویروس نظیر TMV و ToMV تمایزی قائل نمیشود. در روش الایزا نیز آنتی بادی های در دسترس نمیتوانند بین این ویروس و سایر توباموویروس ها تفاوتی قائل شود. پرایمرها و پروبهای متنوع نیز برای شناسایی این ویروس با استفاده از روش های مولکولی RT-PCR و Real time PCR سنتز شده اند .

Protocol for detecting infectious ToBRFV in tomato and pepper seed

SEED EXTRACT qPCR

Material

Seed extraction buffer	RNA purification kit and equipment
TaqMan RT-qPCR mix, primers and equipment	1.5 ml RNase Free tube
Spike solution	RNAse free water
Controls	Centrifuge

Seed extraction buffer

Table 1. Phosphate Buffered Saline (PBS) - pH 7.2 – 7.4 per liter

Sodium chloride (NaCl)	8.0 g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.15 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.2 g
Add de-ionized water up to 1 liter, adjust pH and autoclave buffer at 121 °C, 15 psi for 15 minutes.	

Note: If a different seed extraction buffer is used, it must be verified in a comparison using uniform positive control material that it does not lead to a reduction in the number of lesions obtained.

Primers

Table 2. Primers, their sequences and source

Name	Sequence	Source
CaTa28 Fw	5' - GGT GGT GTC AGT GTC TGT TT - 3'	Enza Zaden B.V. Netherlands
CaTa28 Pr	5' - 6FAM - AGA GAA TGG AGA GAG CGG ACG AGG - BHQ1 - 3'	
CaTa28 Rv	5' - GCG TCC TTG GTA GTG ATG TT - 3'	
CSP1325[1] Fw	5' - CAT TTG AAA GTG CAT CCG GTT T - 3'	CSP Labs USA
CSP1325 Pr	5' - VIC - ATG GTC CTC TGC ACC TGC ATC TTG AGA - BHQ1 - 3'	
CSP1325 Rv	5' - GTA CCA CGT GTG TTT GCA GAC A - 3'	
BaCV-F	5' - CGA TGG GAA TTC ACT TTC GT - 3'	Naktuinbouw Netherlands
BaCV-R	5' - AAT CCA CAT CGC ACA CAA GA - 3'	
BaCV-P	5' - TxR - CAA TCC TCA CAT GAT GAG ATG CCG - BHQ2 - 3'	

[1] The name CSPtbrfv101 is also used for the primer sequence

نمونه ای از پروتوکل تشخیص آلودگی به ویروس ToBRFV در بذور گوجه فرنگی و فلفل

متدهای تشخیصی ارائه شده توسط آیین نامه اجرایی کمیسیون اتحادیه اروپا 2020/1191 (EU)، برای شناسایی ویروس ToBRFV روی بذور گوجه فرنگی و فلفل :

انجام یکی از روشهای تشخیصی ذیل برای شناسایی ویروس ToBRFV روی بذور گوجه فرنگی و فلفل توصیه شده است :

تکنیک real-time RT-PCR (استفاده از پرایمرها و پروب های توصیه شده در پروتکل ISF (2020))

تکنیک real-time RT-PCR (استفاده از پرایمرها و پروب های Manzel and Winter (Acta Horticulture, in press))

متدهای تشخیصی ارائه شده توسط آیین نامه اجرایی کمیسیون اتحادیه اروپا 2020/1191 (EU) ، برای شناسایی ویروس ToBRFV روی نشاء گوجه فرنگی و فلفل :

انجام یکی از روشهای تشخیصی ذیل برای شناسایی ویروس ToBRFV روی نشاء گوجه فرنگی و فلفل توصیه شده است :

تکنیک RT-PCR (استفاده از پرایمرهای Alkovin et al (2019))

تکنیک RT-PCR (استفاده از پرایمرهای Rodriguez-Mendoza et al (2019))

تکنیک real-time RT-PCR (استفاده از پرایمرها و پروب های توصیه شده در پروتکل ISF (2020))

تکنیک real-time RT-PCR (استفاده از پرایمرها و پروب های Manzel and Winter (Acta Horticulture, in press))

پیشگیری و کنترل:

همانند سایر ویروسهای گیاهی ترکیب شیمیایی و یا ضد ویروسی ویژه و مستقیمی که بتواند برای تیمار گیاهان آلوده استفاده شود وجود ندارد و به دلیل فقدان ناقل بیولوژیکی واقعی برای این ویروس، تنها اقدامی که می توان علیه این ویروس انجام داد روش پیشگیرانه و جلوگیری از آلودگی اولیه و یا گسترش ثانویه می باشد.

آلودگی اولیه عمدتا از طریق بذر، نشا آلوده و یا خاک آلوده صورت می گیرد. بنابراین اقدامات ذیل می تواند به شکستن چرخه آلودگی کمک کند.:

- استفاده از بذور گواهی شده و اجباری شدن انجام تست های سلامت بذور در مناطق آلوده به این ویروس
- استفاده از دستورالعمل های خاص برای تولید نشاء در گلخانه های دارای مجوز
- محدود کردن رفت وآمد در گلخانه ها و مزارع به جز کارگران که مقررات بهداشتی را به طور کامل رعایت می کنند.
- پرهیز از جداسازی و بسته بندی میوه های گوجه فرنگی در نزدیکی مکانهای تولید گوجه فرنگی
- بازرسی دقیق برای مشاهده علائم آلودگی از زمان شروع چرخه کاشت تا برداشت

اهمیت بیماری و راه های انتقال آن:

این بیماری به دلایل زیر بسیار خطرناک است :

- بیمـاری به سـرعت و حتی با تماس های مکانیکی با دسـتان آلوده ، ابزار الات کشاورزی، سـینی های نشا، بستر آلوده، پکیج های بسته بندی، بذر و احتمالا گرده (از طریق گرده افشانی با زنبور)گسترش پیدا می کند.
- علائم ممکن است از نظر تنوع متفاوت باشد و در بعضـی موارد ، اندام های آلوده بدون علامت باشند. به طور معمول ، گیاهان آلوده میوه ای با علائم شدید نکروز یا کلروز دارند علائم در برگ ها شامل بد شکل شدن برگها است. میوه مبتلا ممکن است سقط شود یا کوچک مانده و لکه های قهوه ای روی میوه دیده شوند.
- ویروس رفتار مشابه توبامو ویروس های دیگر ماننـدTMV یاToMV دارد ، اما علائم(به ویژه در میوه) ممکن است بسیار شدیدتر باشد .میوه هایی که علائم بیماری را نشان دهند، ارزش اقتصادی ندارند.
- ویروس به راحتی توسط کارگران یا حتی از تماس ریشه به ریشه می تواند از گیاهی به گیاه دیگر منتقل شود. کارگران می توانند این بیماری را از مزرعه ای به مزرعه دیگر یا از گلخانه ای به گلخانه دیگر منتقل کنند.

از آنجـا که بیماری مورد بحث یک بیماری نسـبتا جدیـد است، بنابراین ژرم پلاسم جهانی فلفل یا گوجه فرنگی با هـدف ارزیابی مقاومت به آن هنوز بطور کامل ارزیابی و بررسی نشده است و شاید تعداد لاین های مقاوم (و نیمه مقاوم) از تعداد انگشتان یک دست فرا تر نرود. برای پیشـگیری و کنترل بیماری، اقـدامات بهداشتی قوی لازم است از جمله اسـتفاده از لبـاس تمیز و حتی الامکان یکبار مصـرف در هر بار مراجعه به هر گلخانه یا مزرعه، ضد عفونی ابزار و وسایل، بویژه در هنگام اسـتفاده مشترک از آنها، ضـد عفونی لوازم، لباسهای کار و دست ها و غیره. گیاهان علامت دار را می توان از بین برد اما باید مطمئن شد که هیچ گیاه با سـطح یا گیاه یا ادوات دیگری تماس نداشته باشند. برای این منظور می توان روی گیاه آلوده یک کیسه پلاستیکی قرار داد و پس از کندن آن، بوته را به همان صورت و در داخل نایلون به حاشـیه مزرعه و یک مکان امن منتقل نمود. نباید گیاهان را با دست لمس کرد. حرکت افراد در بین گلخـانه ها بایـد طوری باشـد که هیچگاه از گلخانه ای آلوده وارد گلخانه های تمیز نشوند. همواره بایـد هر گلخانه ای را آلوده به ویروس در نظر گرفت و بـا رعـایت آیین نـامه ها کارها را داخل گلخانه انجام داد. اگر گیاهانی با علائم بیماری های ویروسـی دیـده شـد، حتما باید احتمال آلودگی به ToBRFV را بررسـی نمود. به طور کلی، ضـروری است که کارگران هنگام جابجایی بین گلخانه ها، از لباس و دستکش تمیز (یا یکبار مصرف) استفاده کنند.

آیین نامه پیشگیری و کنترل بیماری :

1- تهیه بذر گواهی شده از نمایندگی های معتبر
2- پرهیز از آلودگی بذر یا پرهیز از استفاده از بذر آلوده: استفاده از بذور گواهی شده و اجباری شدن انجام تست های سلامت بذور در مناطق آلوده به این ویروس
3- استفاده از دستورالعمل های خاص برای تولید نشاء در نهالستان های دارای مجوز
4- محدود کردن رفت وآمد در گلخانه ها و مزارع به جز کارگران که مقررات بهداشتی را به طور کامل رعایت می کنند.
5- پرهیز از جداسازی و بسته بندی میوه های گوجه فرنگی در نزدیکی مکانهای تولید گوجه فرنگی
6- بازرسی دقیق برای مشاهده علائم آلودگی از زمان شروع چرخه کاشت تا برداشت
7- شستشوی مرتب دستها و ضدعفونی وسایل کارگران گلخانه و مزارع
8- استفاده از دستکش های یکبار مصرف در گلخانه ها و تعویض آنها در فاصله بین دو گلخانه یا مزرعه
9- استفاده از البسه یکبار مصرف در هر بار مراجعه به گلخانه یا مزرعه و امحاء البسه پس از خروج از گلخانه یا مزرعه
10- حذف بوته های مشـکوک به بیماری (ابتدا تمام بوته را وارد یک کیسه پلاستیکی نموده و پس از کندن بوته، آنرا در کیسه پلاستیکی قرار داده و از گلخانه یا مزرعه خارج نمایید) و بلافاصله اقدام به امحاء و سوزاندن آنها کنترل جابجایی تجهیزات و کارگران بین مزارع و گلخانه ها.

اقدامات قرنطینه ای:

برای جلوگیری از انتقال بیماری لازم است از نقل و انتقال بذور آلوده و نشاء آلوده گیاهی جلوگیری به عمل آید. واردات بذر و اندامهای تکثیری گیاهی از کشورهای غیر آلوده و یا مناطق عاری از بیماری تایید شده توسط کشور مبداء الزامی است. استفاده از بذور سالم و گواهی شده و اندامهای تکثیری سالم و گواهی شده از مهمترین اقدامات قرنطینه ای پیشگیری کننده از ورود بیماری به منطقه است. بررسی بذر و اندامهای تکثیری گیاه میزبان جهت احتمال آلودگی به این بیماری، در کشور مبدا باید به دقت صورت گیرد.

بدیهی است بدون رعایت این موارد، بیماری ویروسی چروکیدگی قهوه ای میوه گوجه فرنگی در یک منطقه ی آلوده به سرعت گسترش خواهد یافت. کاهش منابع آلودگی اولیه با حذف بوته ها و یا نشاءهای آلوده، تنها زمانی میسر است که با ردیابی، تشخیص و شناسایی دقیق عامل بیماری در مناطق و گلخانه های زیر کشت گوجه فرنگی و فلفل (بادنجانیان)، ابتدا کانونهای اولیه ی آلودگی مورد شناسایی قرارگیرند. این امر نخستین اقدام مهم و اساسی در هر بسته ی مدیریتی است.

ریشه کنی:

هنگام شناسایی زود هنگام بیماری در یک منطقه، روش ریشه کنی باید مد نظر قرار گیرد. تلاش های موفقیت آمیز ریشه کنی بیماری در بسیاری از کشورهای اروپایی و امریکا اجرا گردیده است. ریشه کنی برای محصولات گلخانه ای امکان پذیر است و شامل حذف بقایای محصول، بستر های آلی، طناب های حائل و مالچ ها با روش سوزاندن می باشد. سپس یک ضدعفونی کامل تمام سطوح، با فشار بالای آب و استفاده از یک ماده غیر فعال کننده ویروس مانند Virkon S 2 درصد، Clorox 10 درصد، سفیدکننده معمولی 20 در صد، شیرخشک های بدون چربی و یا تری سدیم فسفات 10 درصد و با کارایی پایین تر و یا پتاسیم پروکسی منو سولفات، توصیه شده است. ضدعفونی سیستم هیدروپونیک با استفاده از روشهای فیزیکی و شیمیایی، تناوب با یک گیاه غیر میزبان از جمله کدوئیان، برای از بین بردن چرخه آلودگی ناشی از باقی مانده ها (Residue) ، نیز امکان پذیر است.

مقاومت میزبان:

کشف ToBRFV در گوجه فرنگی رقم Candela حامل ژن مقاومت *Tm-2²* نشان می دهد که حضور این ژن مقاومت در گیاه در برابر ویروس فوق موثر نمی باشد. یک مطالعه جامع تر اثبات کرد که همه منابع مختلف مقاومت موجود در گوجه فرنگی در برابر این ویروس بی اثر هستند. در مورد گیاه فلفل به نظر می رسد که ژنهای L^3 و L^4 یک منبع مقاومت عملی در برابر ToBRFV در نتیجه تلقیح مکانیکی در محیط های کنترل شده هستند. اما تلقیح ریشه ای فلفل مقاوم با

ToBRFV نیز منجر به واکنش بیش از حد نکروتیکی شده که به رشد گیاه در دمای بالای 30 درجه سانتیگراد آسیب می رساند.

جمع آوری نمونه های گیاهی آلوده به بیماری به منظور انجام بررسیهای آزمایشگاهی:

جمع آوری نمونه های گیاهی، به منظور انجام بررسیهای آزمایشگاهی و تشخیص یا حصول اطمینان بیشتر از آلوده بودن یا نبودن بوته های مورد بررسی است. نمونه هـای جمـع آوری شـده می تواننـد بـرگ و یا میـوه باشـند. توصیـه می شـود درهنـگام نمونه بـرداری علاوه بـر نمونه های بـا علائم مشـکوک، نمونه های معمولـی و احیانـا بـدون علائم نیـز جمـع آوری شـوند.

در زیـر موارد مهمی که باید در هنـگام نمونه برداری مد نظـرقـرار گیرد آمده اسـت :

الـف–بـرگ: نمونه هـای برگـی باید از رشـد کافـی برخـوردار باشـند، به طوری که بـرگ از لحاظ انـدازه به حـد طبیعـی یـک بـرگ بالغ رسـیده باشـد. تعـداد نمونه هـای برگـی در گلخانه های بدون علائم، حـدود 200 عـدد باشـد کـه توصیـه می شـود از از تمام قسمتهای بوته نمونه گیری گردد و در گلخانه های دارای علائم، از بوته های دارای علائم، به تعداد سه برگ عمدتـا از برگهای بالایی بوته برداشـته شـوند.

نمونه های برگی را در داخل پاکتهای نایلونی که درب آنها بسته می شود، قرارداده و پس از خارج‌کردن هوای داخل آن درب آن بسته شود. اطلاعات مربوطه روی پاکت درج شود یا به همراه آن ارسال شود.

ب–میوه: توصیه شده است میوه از بوته های آلوده برداشته شود و حتی الامکان دارای علائم همراه جمع آوری شود. نمونه بـرداری از میـوه مشـکوک به تنهایـی صـورت نگیـرد، بلکـه بایـد بـه همـراه یـک نمونـهٔ جداگانـه از برگهـای آلـوده مربـوط بـه همـان بوته کـه میـوه از آن برداشـت شـده است باشـد.

توصیـه می شـود نمونه هـا به هیچ وجـه درمعـرض نـور آفتـاب قـرار نگرفتـه و در شـرایط خنـک و 4 درجه مثلا روی یـخ داخـل یخـدان، نگـهداری و از یـخ زدن نمونه هـا جلوگیـری شـود. نمونه هـا در اسـرع وقت بـه آزمایشـگاه و یـا شـرکت حمل و نقـل منتقـل شـوند تـا شـبانه بـه آدرس آزمایشـگاه مورد نظـر فرسـتاده شـوند. درخصـوص نحـوه ی ثبـت اطالعـات مربـوط بـه نمونه هـا توجـه به مـوارد زیـر ضـروری اسـت:

- نام ومشخصات جمع آوری‌کننده
- تاریخ جمع آوری
- شماره ی نمونه
- اندام نمونه برداری شده

- گونه و رقم گیاه نمونه برداری شده
- تعداد یا درصد بوته های آلوده
- مختصات جغرافیایی محل نمونه
- وسعت گلخانه
- آدرس کامل محل جمع آوری
- نام و مشخصات گلخانه دار
- شرایط عمومی و یا هرگونه اطلاعات مربوطه دیگر در نمونه بـرداری از گلخانه ها

منابع:

https://www.cabi.org/isc/datasheet/88757522

EPPO Global Database. 2019. https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV

https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/09/Tomato-ToBRFV_2019.09.pdf

https://www.fdacs.gov/content/download/83755/file/pest-alert-tomato-brown-rugose-fruit-virus.pdf

https://www.betterseed.org/wp-content/uploads/ToBRFV-QA.pdf

https://planthealthportal.defra.gov.uk/assets/factsheets/ToBRFV-factsheet-v4.pdf

Camacho-Beltrán, E., Perez-Villarreal, A., Leyva-Lopez, N.A., Rodriguez- Negrete, E.A., Ceniceros- Ojeda, E.A., and MendezLozano, J.M. 2019. Occurrence of Tomato brown rugose fruit virus Infecting Tomato Crops in Mexico. Disease Notes. Published Online: https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1974-PDN

Levitzky, N., Smith, E., Lachman, O., Luria, N., Mizrahi, Y., Bakelman, H., Sela, N., Laskar, O., Milrot, E., and Dombrovsky, A. 2019. The bumblebee Bombus terrestris carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. Plos One 14.

Ling, K.S., Tian, T., Gurung, S., Salati, R., and Gilliard, A. 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the United States. Disease Notes. Published Online: https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN

Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., and Dombrovsky, A. 2017. A New Israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm2(2) resistance genes. Plos One 12.

Panno, S., Caruso, G., and Davino, S. 2019. First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. Disease Notes. Published Online: https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN

Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B., and Turina, M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordon. Archives of Virology 161:503-506.