

Kapitel 1 – Einleitung

Einschleppung und Regulierung von viralen Schadorganismen

In den zurückliegenden Jahrzehnten sind weltweit wiederholt pandemische Viruserkrankungen an diversen Kulturpflanzen aufgetreten, die zum einen durch Ertrags- und Qualitätsverluste wirtschaftliche Schäden in Milliardenhöhe verursachen konnten und darüber hinaus sogar die Versorgung mit Nahrungsmitteln so stark beeinträchtigten, dass Hungersnöte die Folge waren (Jones, 2021). Das jüngste Beispiel eines sich rasant ausbreitenden viralen Krankheitserregers einer Kulturpflanze ist das Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), welches als die größte Bedrohung der wirtschaftlich bedeutenden Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) angesehen wird (Caruso et al., 2022). Ein Hauptgrund solcher Krankheitspandemien ist die rasche Verbreitung von (viralen) Krankheitserregern der Pflanze über Betriebe, Länder und Kontinente hinweg, insbesondere durch die Globalisierung des Waren- und Personenverkehrs. Nach der Einschleppung von invasiven Phytopathogenen in bisher nicht betroffenen Gebieten, können diese sich unter günstigen Bedingungen etablieren und ausbreiten.

Die Einschleppung von phytopathogenen Viren in die Europäische Union (EU), traditionell ein Nettoimporteur von (potentiell infiziertem) Obst und Gemüse, kann dabei durch eine Vielzahl von Wegen unbeabsichtigt erfolgen. Zu den Einschleppungswegen gehören u.a. Importlieferungen von infiziertem Saat- und Pflanzgut (Salem et al., 2022, Vazquez-Iglesias et al., 2020), pflanzlichen Erzeugnissen (Chanda et al., 2021a) und kontaminierten Erden und Substraten. Dabei können diese direkt von einem Schadorganismus betroffen sein oder aber einen infizierten Vektor eines Schadorganismus beherbergen. Auch mit pflanzenschädigenden Viren kontaminierte Oberflächen von beispielsweise Transportkisten, Fahrzeugen, Geräten und Kleidung tragen zur Verbreitung bei (Jennings et al., 1997, Fehres und Linkies, 2018, Darzi et al., 2020, Ehlers et al., 2022a).

Aufgrund der großen Mengen von agrarischen Importlieferungen, der vielfältigen Einschleppungsmöglichkeiten für zahlreiche gefährliche Pflanzenviren und der hohen Anzahl an Fängen von neuen gefährlichen Schadorganismen wie dem ToBRFV innerhalb Europas (Anonymous, 2023b), ergibt sich für die EU ein hohes phytosanitäres Gefährdungspotential. Das Gefährdungspotential eines invasiven Krankheitserregers kann zusätzlich noch verstärkt werden, sofern den potentiell betroffenen Produktionsbetrieben wirksame innerbetriebliche Maßnahmen wie resistente Sorten oder kurativ wirkende Pflanzenschutzmittel fehlen.

Das phytosanitäre Gefährdungspotential eines neuen Schadorganismus für Europa wird durch eine standardisierte Risikoanalyse (Eppo, 2011) nach Pflanzengesundheitsverordnung (EU) 2016/2031 Anhang 1 evaluiert. Auf nationaler Ebene ist für die Durchführung von Risikoanalysen in Deutschland das Julius Kühn-Institut (Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen) verantwortlich. Sofern ein pflanzenschädigender Schadorganismus in einer Region oder einem Land noch nicht vorkommt und die Risikoanalyse dem spezifizierten Schadorganismus ein großes phytosanitäres, wirtschaftliches oder soziokulturelles Risiko zuordnet, wird dieser durch amtliche Überwachungs- und Tilgungsmaßnahmen reguliert. Solche Organismen werden als Quarantäneschadorganismen (QSO) klassifiziert.

Zur Verhinderung der Einschleppung und Etablierung von Quarantäneschadorganismen werden amtlich angeordnete Maßnahmen der Pflanzenquarantäne, die nach ISPM 5 der FAO als *“All activities designed to prevent the introduction or spread of quarantine pests or to ensure their official control”* (IPPC, 2022) definiert sind, mit der Pflanzengesundheitsverordnung (EU) 2016/2031 rechtlich hinterlegt und auf europäischer Ebene harmonisiert. Die Ziele der gesetzlichen Regelungen zur Pflanzengesundheit sind i) die Verhinderung der Einschleppung, ii) Vermeidung der Etablierung und iii) Eindämmung der Ausbreitung.

Ökonomische Konsequenzen durch das Auftreten von QSO

Die wirtschaftliche Bedeutung, welche sich aus dem Auftreten von QSO in hochspezialisierten Produktionsbetrieben aus dem Agrarsektor ergeben können, wurde in einer interdisziplinären Untersuchung der Fachgebiete Allgemeine Betriebslehre des Landbaus und Fachgebiet Phytomedizin der Humboldt-Universität zu Berlin zur Bewertung von Entschädigungsmöglichkeiten für Betriebe beim Auftreten von Quarantäneschadorganismen berechnet (BMEL, 2023). Kommt es zu einem Ausbruch von einem Quarantäneschadorganismus in einem Betrieb, resultieren sowohl aus den Schadsymptomen des Organismus als auch aus den sich anschließenden amtlich angeordneten Quarantänemaßnahmen hohe wirtschaftliche Schäden, welche existenzbedrohende Ausmaße annehmen können. Die Höhe des Schadensmaßes wird für regulierte Schadorganismen insbesondere durch die Vernichtung von (potenziell) infiziertem Pflanzenmaterial, Verbringungsverboten von Pflanzen und pflanzlichen Erzeugnissen sowie durch Pflanzverbote von Wirtspflanzen in eigens dafür abgegrenzten Gebieten maßgeblich bestimmt. Unter Berücksichtigung zahlreicher Annahmen und verschiedener Szenarien wurden in einem Partial-Budgeting Ansatz dabei einzelbetriebliche Schadenshöhen für Sektoren aus dem Agrarbereich, u.a. den Baumschulen, der Landwirtschaft oder dem Gemüsebau und Quarantäneschadorganismen berechnet, die im Fall von schwerwiegenden angeordneten Tilgungsmaßnahmen ohne betriebliche Anpassungsmöglichkeiten von 13.162 – 350.611 €/ha reichen. Das größte Schadensmaß von 350.611 €/ha wurde dabei für das Tomato brown rugose fruit virus in der Gewächshaustomatenproduktion errechnet (BMEL, 2023). In Deutschland wird die Tomate nahezu ausschließlich auf knapp 400 ha in Gewächshäusern mit einem Produktionsumfang von 101.765 Tonnen kultiviert (Anonymous, 2022). Weltweit betrug die Tomatenproduktion im Jahr 2020 ca. 184,786 Millionen Tonnen mit einem geschätzten Brutto-Produktionswert von 102,622 Milliarden US\$ (FAO, 2023). Die Produktion von Tomaten findet dabei sowohl im Freiland als auch in hochtechnisierten Gewächshäusern statt, welche zu einer Erhöhung der Erntemenge um das 6,4-fache auf gleicher Fläche gegenüber der Freilandproduktion führten und in denen Erträge von über 60 kg m⁻² Tomatenfrüchte realisiert werden können (Maureira et al., 2022). Unter diesen Produktionsbedingungen können die wirtschaftlichen Schäden enorme Ausmaße annehmen. Die ökonomischen Konsequenzen aus dem Auftreten von ToBRFV werden deutlich, indem aufbauend auf der Schadensausmaßkalkulation der historische Schaden durch zurückliegende Ausbrüche von ToBRFV berechnet wird. Der Schaden kann demnach für Deutschland ca. 14,7 Mio. € und für die Niederlande ca. 167 Mio. € erreichen (BMEL, 2023).

Herausforderungen im Kontext viraler Krankheitserreger der Tomate

Die für die menschliche Ernährung und Wertschöpfung bedeutende Tomate ist seit jeher von einer Reihe verschiedener DNA- als auch RNA-Pflanzenviren bedroht (Ong et al., 2020, Hanssen et al., 2010). In der Literatur wurden über 130 Virusarten aus unterschiedlichen Familien bzw. Gattungen beschrieben, welche die Tomatenpflanze schädigen (Hanssen et al., 2010). Die Tomate wird unter anderem durch das erste erforschte Virus weltweit, dem Tobacco mosaic tobamovirus (TMV), bedroht (Holmes, 1946). Andere den Tomatenanbau bedrohende Tobamoviren sind sowohl das Tomato mosaic virus (ToMV) (Brunt, 1986) als auch das vor 10 Jahren erstmals nachgewiesene Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) (Li et al., 2013). Weitere, teils weltweit schädigende, tomateninfizierende Viren sind Tospoviren wie das Tomato spotted wilt virus (TSWV) (Scholthof et al., 2011), Begomoviren wie die Gruppe der Tomato yellow leaf curl induzierenden Geminiviren (Moriones und Navas-Castillo, 2000), Torradoviren wie das Tomato torrado virus (ToTV) (van der Vlugt et al., 2015), das Potexvirus Pepino mosaic virus (PepMV) (Hanssen und Thomma, 2010) und das Amalgavirus Southern tomato virus (Sabanadzovic et al., 2009).

Dieser Ausschnitt von nur einigen bedeutenden viralen Krankheitserregern der Tomate verdeutlicht die Komplexität der sich die Wissenschaft, Züchter, Anbauer, Politik und Behörden ausgesetzt sehen,

Tomaten nachhaltig vor Viruserkrankungen zu schützen. Im Jahr 2014 ist zu den genannten Viren mit dem Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) ein neues Tobamovirus mit globalen Auswirkungen für die Tomatenproduktion dazugekommen (Luria et al., 2017).

Virusinfektion von Pflanzen sind im Vergleich zu durch Bakterien oder Pilze verursachte Pflanzenkrankheiten durch organismenspezifische Besonderheiten gekennzeichnet, die einen bedeutenden Einfluss auf mögliche Kontrollmaßnahmen nehmen. So haben Viren keinen eigenen Stoffwechsel und benötigen daher einen Wirt zur Vermehrung. Gleichzeitig können Viren nicht aktiv in Pflanzen eindringen. Sind phytopathogene Viren durch eine Verletzung der Pflanze oder durch einen Vektor passiv in die Wirtspflanze gelangt, kann die Pflanze nicht mehr kurativ durch den Einsatz eines Pflanzenschutzmittels geheilt werden. Aus diesem Grund ist die Unterbrechung der Übertragungswege von Pflanzenviren von höchster phytosanitärer und wirtschaftlicher Bedeutung. Für vektorübertragbare Tospoviren (Riley et al., 2011) ist die Thripskontrolle durch integrierte Pflanzenschutzmaßnahmen eine wirksame Bekämpfungsstrategie. Für mechanisch leicht übertragbare Tobamoviren sind hingegen auf einander abgestimmte Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen von übergeordneter Bedeutung. Sie sind sowohl in der Vermeidung der Einschleppung (Davino et al., 2020, Samarah et al., 2021), der Vermeidung der Etablierung (Ellouze et al., 2020, Dombrovsky et al., 2022) als auch zur Verhinderung der Ausbreitung von Tobamoviren entscheidend (Ehlers et al., 2022a, Ehlers et al., 2022b). Im Kontext der Gefahren von leicht mechanisch übertragbaren Tobamoviren sind Untersuchungen zur innerbetrieblichen Verbreitung von stabilen Pflanzenviren notwendig, um darauf aufbauend wirksame Hygienisierungskonzepte zu entwickeln und den heimischen Tomatenanbau zu erhalten. Die Notwendigkeit solcher Untersuchungen wird durch die hohen wirtschaftlichen Verluste und die Häufigkeit von ToBRFV-Ausbrüchen in Deutschland und Europa verdeutlicht.

Ein wesentlicher Baustein eines ganzheitlichen Hygienekonzeptes ist die Untersuchung der Rolle des Menschen in der Verbreitung von Tobamoviren. Dazu muss geklärt werden, wie Menschen zur Verbreitung von Pflanzenviren beitragen und wo sie Pflanzenviren unbeabsichtigt hin verschleppen. Welche Hygienemaßnahmen werden vor Betreten des Produktionsbereiches und nach dem Verlassen des Gewächshauses ergriffen? Die Verschleppung von Viren durch den Menschen kann dabei innerbetrieblich als auch über den Betrieb hinaus erfolgen und somit zur Verbreitung in regionalen Produktionsclustern und/oder International beitragen. Außerdem müssen die entsprechenden Reinigungs- und Desinfektionsmittelprüfungen unter praxisnahen Bedingungen an diversen Gegenständen, Kleidungsstücken, Schuhen oder Handschuhen durchgeführt und evaluiert werden, die im Betrieb maßgeblich zur Verbreitung von stabilen Pflanzenviren beitragen.

Tomato brown rugose fruit virus

Das neuartige Tobamovirus wurde in Jordanien 2015 erstmalig nachgewiesen (Salem et al., 2016), trat aber bereits 2014 in Israel auf (Luria et al., 2017). Seitdem konnte es bereits in mehr als 30 Ländern weltweit nachgewiesen werden (Eppo, 2023), darunter in den wichtigsten Ländern für die Tomatenproduktion wie China (Yan et al., 2019), Türkei (Fidan et al., 2019), USA (Ling et al., 2019) oder Italien (Panno et al., 2019a). In Deutschland trat ToBRFV bereits wiederholt auf, nachdem der erste Ausbruch 2018 bereits mehr als 25 ha Tomatenanbaufläche in Gewächshäusern betroffen hatte (Anonymous, 2023c, Menzel et al., 2019). Eine Klassifizierung und Regulierung von ToBRFV als neuer Schadorganismus erfolgte nach Artikel 29, 30 der (EU) 2016/2031 zunächst durch die Notmaßnahmen der Durchführungsverordnung (EU) 2020/1191 bzw. die (EU) 2021/1809 und inzwischen durch (EU) 2023/1032. Für die rasche weltweite Verbreitung als auch die pandemische Ausbreitung im Tomatenbestand sind mehrere Faktoren entscheidend, die nachfolgend umrissen werden: Eine hohe Stabilität, Saatgutübertragbarkeit, leichte mechanische Übertragbarkeit und Resistenzdurchbrechung.

Tobamoviren sind seit der extensiven Untersuchungen am TMV für ihre ausgeprägte Stabilität bekannt (Castello et al., 1999, Balique et al., 2012), welche sich aus der dichten Partikelstruktur ergibt (Creager et al., 1999). Das Tomato brown rugose fruit virus besitzt ein 6,4 kb großes Genom. Es besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Polarität (+ssRNA), welche in einer stäbchenförmigen Partikelmorphologie eingekapselt vorliegt (Salem et al., 2016). Das Genom kodiert dabei vier Proteine, zwei replikationsrelevante Proteinkomplexe von 126 kDa (ORF1a) und 183 kDa (ORF1b) sowie das Bewegungsprotein (movementprotein, MP) von ~30 kDa (ORF2) und das Hüllprotein (coat protein, CP) von ~17,5 kDa (ORF3) (Salem et al., 2016, Caruso et al., 2022).

Die Viruspartikel können bis zu 3000 Tage infektiös in infiziertem Pflanzensaft und aufgereinigt sogar über 50 Jahre überdauern (Creager et al., 1999). Eine sichere thermische Inaktivierung tritt erst bei hohen Temperaturen von > 90 °C auf (Price, 1933, Samarah et al., 2021). Neben der hohen Stabilität ist insbesondere die rasante Ausbreitung von Tobamoviren wie ToBRFV in der Pflanze (Bernabé-Orts et al., 2021, Skelton et al., 2023) in Kombination mit der leichten mechanischen Übertragbarkeit des Virus (Ehlers et al., 2022a, Ehlers et al., 2022b) von enormer phytosanitärer und wirtschaftlicher Bedeutung. Die Langstreckenverbreitung von ToBRFV ist auf den internationalen Handel von mit ToBRFV-kontaminiertem Saatgut und ToBRFV-infizierten Tomatenjungpflanzen zurückzuführen (Davino et al., 2020, Salem et al., 2022, Samarah et al., 2021). Die Viruspartikel haften an der äußeren Samenschale und können bei einer niedrigen Samenübertragungsrates beim Keimprozess zu einer Infektion des Keimlings führen (Salem et al., 2022). Wenige oder eine einzelne infizierte Pflanze reichen in der Folge aus, dass ganze Tomatenbestände durch die mechanische Übertragung während Kultur- oder Erntemaßnahmen mit ToBRFV infiziert werden (González-Concha et al., 2021, Panno et al., 2020). Der Mensch -als „Superspreader“ (Ranawaka et al., 2020)- ist für die Verbreitung von ToBRFV maßgeblich verantwortlich. Neben der mechanischen Verbreitung durch den Menschen können Tobamoviren mechanisch über Bestäuber (Levitzky et al., 2019), Erden und Substraten (Dombrovsky et al., 2022, Li et al., 2016) oder Gießwasser übertragen werden (Li et al., 2016).

Die genannten Eigenschaften und Übertragungswege von ToBRFV ähneln denen von länger bekannten Tobamoviren. Die Bedrohung der weltweiten Tomatenproduktion (Zhang et al., 2022) durch ToBRFV resultiert im Gegensatz zu TMV oder ToMV durch die Resistenzdurchbrechung des bis dato vor Tobamoviren schützenden Allel *Tm-2²* des Resistenzgens *Tm-2* in der Tomate (Luria et al., 2017, Chanda et al., 2021a). *Tm-2²* wird seit Jahrzehnten vorrangig in Kultursorten verwendet, nachdem die Resistenzgene *Tm-1* und *Tm-2* durch natürlich auftretende ToMV-Stämme durchbrochen wurden (Hall, 1980). Durch den Resistenzbruch stehen den Betrieben derzeit keine ToBRFV-resistente Tomatensorte mit Praxisrelevanz zur Verfügung. Gleichzeitig werden bereits zahlreiche ToBRFV-resistente Tomatensorte erworben, denen eine hohe (HR) oder intermediäre (IR) Resistenz gegenüber ToBRFV unterstellt wird. Eine wissenschaftliche Bewertung der Resistenzeigenschaften dieser Sorten kann derzeit nicht vorgenommen werden.

Die Kombination aus Resistenzdurchbrechung, Saatgutübertragbarkeit, leichter mechanischer Übertragbarkeit, hoher Partikelstabilität und enormen Ertragsverlusten (González-Concha et al., 2023) machen wissenschaftlich fundierte Hygienierungsmaßnahmen im Kontext der Kontrolle von ToBRFV im Praxisalltag unumgänglich.

Maßnahmen zur Kontrolle von ToBRFV

Tomatenfrüchte, die mit ToBRFV infiziert sind, haben eine 100 % Kontaminationsrate der sich in der Frucht befindlichen Samen (Salem et al., 2022). Aus diesem Grund sind zur Verhinderung der Einschleppung von viruskontaminiertem Tomatensaatgut obligatorische Saatguttestung zur Bestätigung der jeweils spezifischen Virusfreiheit mittels des sensitivsten Nachweisverfahrens, der Echtzeit-RT-PCR, zwingend erforderlich (Torre et al., 2020, Nourinejhad Zarghani et al., 2023, Bernabé-

Orts et al., 2021) und seit der Durchführungsverordnung (EU) 2020/1191 Artikel 10) rechtlich hinterlegt. Trotz der Testung von Tomatensaatgut auf ToBRFV kam es wiederholt in der EU zu ToBRFV-Ausbrüchen. Aufgrund des Fehlens von marktdurchdringenden resistenten Tomatensorten sind aus diesem Grund zurzeit nur wirksame präventive Hygienisierungsmaßnahmen zur Kontrolle von ToBRFV zielführend.

Im Rahmen präventiver Maßnahmen ist die Applikation von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen an unterschiedlichsten Oberflächen von entscheidender Bedeutung. Ziel ist dabei die Unterbrechung der Übertragungs- und Verbreitungswege durch eine physikalische Entfernung (Reinigung) mit anschließender Inaktivierung (Desinfektion). Die Reinigung (von Oberflächen) ist definitorisch die mechanische Entfernung von Verunreinigungen inklusive anhaftender Mikroorganismen, ohne dass eine Inaktivierung dieser beabsichtigt ist (beim Robert, 2022). Um eine erfolgreiche Desinfektion in Form einer hohen Inaktivierungsrate zu erzielen, ist zumeist eine vorhergehende Reinigung erforderlich, da ansonsten anorganische oder organische Stoffe die Inaktivierungsprozesse behindern können (Rutala und Weber, 2008). Bei der Desinfektion handelt es sich um einen Prozess, bei dem die Anzahl vermehrungsfähiger Mikroorganismen [...] durch eine Inaktivierung auf ein Niveau reduziert werden kann, von dem keine Infektionsgefahr mehr ausgeht (beim Robert, 2022).

Untersuchungen zur Reinigung von Oberflächen im Kontext der Bekämpfung von phytopathogenen Viren im Produktionsumfeld sind kaum zu finden. In einer Untersuchung von Ellouze und Kollegen konnte die Bedeutung einer Reinigungsmaßnahme mit anschließender Desinfektion in einer Dekontamination eines Tobamovirus-befallenen Gewächshauses herausgestellt werden (Ellouze et al., 2020). Untersuchungen zur Inaktivierung von Tobamoviren durch Desinfektionsmittel wurden in infiziertem Pflanzensaft (Chanda et al., 2021b, Li et al., 2015, Ling et al., 2022, Darzi et al., 2020), an Messern und Tablets (Darzi et al., 2020), im Boden (Dombrovsky et al., 2022), in Nährlösungen (Rodriguez et al., 2022) und an verschiedenen Oberflächen vorgenommen (Skelton und Fox, 2021). Diese Studien wurden mit unseren Probenahmen-, Reinigungs- und Desinfektionsuntersuchungen um den Menschen (Kapitel 2, 3 und 4) ergänzt. Außerdem wurde die Oberflächendesinfektion von Gewächshausmaterialien in den Fokus genommen (Kapitel 5 und 6). Die Notwendigkeit der Ausweitung von Hygienisierungsuntersuchungen von stabilen phytopathogenen Krankheitserregern wird durch Studien aus den Niederlanden zu Sequenzdaten von ToBRFV-Ausbrüchen unterstützt. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in einigen ToBRFV-betroffenen Betrieben ein genetisch identisches ToBRFV-Isolat in der darauffolgenden Kultur wieder auftrat (van de Vossenbergh et al., 2021). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Tilgung über den Kulturwechsel in den Betrieben nicht erfolgreich war.

Aufgrund der schwierigen Tilgung eines stabilen Pflanzenvirus in einem Produktionsumfeld mit etlichen verschiedenen Oberflächen und Gegenständen muss zunächst geklärt werden, wo phytopathogene Viren wie ToBRFV anhaften und durch den Wiedereintrag in den Kulturpflanzenbestand ein hohes phytosanitäres Risiko darstellen. Dies wurde mit einer Probenahmen in einem ToBRFV-betroffenem Betrieb unternommen (Ehlers et al., 2023). Sind die verschiedenen (mechanischen) Übertragungswege in Form von unterschiedlichen kontaminierten Gegenständen und Oberflächen identifiziert, müssen zielflächenspezifische Reinigungs- und Desinfektionsuntersuchungen angestellt werden. Kontaminierte Kleidung und Schuhsohlen tragen maßgeblich zur Verbreitung von ToBRFV innerhalb und außerhalb des Gewächshauses bei. An Metall- und Kunststoffoberflächen wurde ToBRFV im Gewächshaus wiederholt gefunden. Daher wurden für jene Gegenstände praxisnahe Dekontaminationsuntersuchungen angestellt (Ehlers et al., 2022a, Ehlers et al., 2022b, Nourinejad Zarghani et al., 2023).

Werden Desinfektionsversuche zu Phytopathogenen angestellt, greifen im Bereich der Desinfektion von Oberflächen in der Pflanzenproduktion der EPPO-Standard 1/261 (1) (OEPP/EPPO, 2008) als auch der EN 14885:2022 Standard vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ u.a. für den Lebensmittelbereich (EN, 2022). Auch wenn beide Standards unterschiedliche Anwendungsbereiche abdecken, wird in beiden Standards herausgestellt, dass reine Suspensionsuntersuchungen unter Laborbedingungen nicht geeignet sind, um praxisrelevante Produktauslobungen auszusprechen. Aus diesem Grund wurden im Gegensatz zu bisherigen Studien zur Desinfektionsmittelwirkung in Suspensionen (Chanda et al., 2021b, Li et al., 2015, Ling et al., 2022) immer auf kontaminierten Oberflächen vorgenommen, um eine möglichst praxisrelevante Wirksamkeitsprüfungen durchzuführen.

Gleichzeitig werden in internationalen Studien Produkte getestet, die nach europäischem Recht nicht als viruzides Produkt zur Bekämpfung von Phytopathogenen in der Pflanzenproduktion eingesetzt werden dürfen. Solche Produkte und Substanzen, häufig als Biozide zugelassen, werden allerdings zum Teil weiträumig auch in Europa und Deutschland in der Praxis mit dem Ziel der Virusinaktivierung eingesetzt, obwohl diese weder zugelassen noch hinsichtlich ihrer Wirkung, Rückstände und Auswirkung auf Menschen und Umwelt überprüft wurden. In Deutschland steht dem beruflichen Anwender mit MENNO Florades (Zulassungsnummer 044407-00) nur ein einziges zugelassenes Pflanzenschutzmittel mit desinfizierender Wirkung zur Verfügung, um phytopathogene Schadorganismen wie ToBRFV an Oberflächen in der Gemüseproduktion zu inaktivieren (044407-00/00-011). MENNO Florades wurde aus diesem Grund vorrangig in den Hygienisierungsuntersuchungen zum ToBRFV eingesetzt.

Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen zur Detektion, Quantifizierung, Reinigung und Desinfektion verschiedener Oberflächen am Beispiel des regulierten Schadorganismus Tomato brown rugose fruit virus stellvertretend für stabile Pflanzenviren angestellt. Der Fokus lag dabei auf möglichst praxisnahen Versuchsbedingungen, um einen direkten Transfer der Ergebnisse in die Praxis sicherzustellen. Die Studien thematisieren insbesondere das Risiko der Verschleppung von ToBRFV durch den Menschen und den sich daraus ergebenden Anforderungen an Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen. Dafür wurde die räumliche Verschleppung von ToBRFV in einem infizierten Tomatenbaubetrieb in Deutschland untersucht, um zu verstehen, wo ToBRFV-Kontaminationen in der Praxis auftreten und welche Rolle der Mensch in der Verbreitung des Virus spielt (Kapitel 2). Aufbauend auf Kenntnissen zur innerbetrieblichen Verbreitung von ToBRFV können entsprechende Hygienisierungsmaßnahmen zielgerichtet in den Praxisalltag implementiert werden und wirtschaftliche Konsequenzen aus dem Auftreten von ToBRFV zukünftig verhindert oder abgemildert werden. Am Beispiel der Reinigung von ToBRFV-kontaminierter Kleidung (Kapitel 3) und der Dekontamination von Schuhsohlen, die mit ToBRFV beladen waren (Kapitel 4), wurden Hygienisierungskonzepte unter praxisnahen Bedingungen evaluiert. Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Ergebnisse direkt in die Praxis einfließen zu lassen.

In weiteren Untersuchungen wurde die Quantifizierung von infektiösen Pflanzenviren am Beispiel ToBRFV *in-vitro* als auch an Oberflächen vorgenommen (Kapitel 5) und darauf aufbauend erstmalig die viruzide Wirkung von dem zugelassenen Pflanzenschutzmittel MENNO Florades quantitativ bewertet (Kapitel 6). Mit dieser Methode ist es nun möglich internationale Studien vergleichbarer zu machen, indem die Ausgangskonzentration von Viren in einem zu testenden Inokulum bestimmt werden kann, um die Abreicherung der Viruskonzentration nicht mehr nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu bestimmen. Außerdem kann in zukünftigen Untersuchungen nun die Viruskonzentration an Gewächshausoberflächen bestimmt werden, um darauf aufbauend die Intensität und Wiederholung von Reinigungs- und Desinfektionsapplikationen anzupassen.

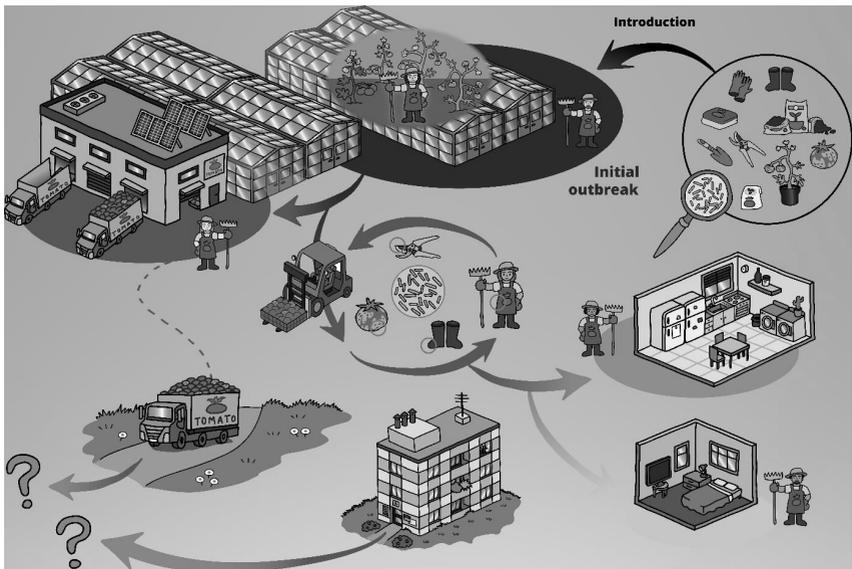
Die Methodiken und Ergebnisse der in dieser Arbeit enthaltenden Studien soll zukünftig dazu beitragen, dass (innerbetriebliche) Risikomanagement zur Verhinderung der Ein- und Verschleppung von Pflanzenviren um wesentliche Hygienisierungsstrategien zu ergänzen, damit der heimische Gemüseanbau durch fachlich fundierte Handlungsempfehlungen im Hygienemanagement unterstützt und erhalten wird. Außerdem sollen die Untersuchungen zur Quantifizierung der Viruskonzentration eine Basis für zukünftige Forschungsansätze zur Desinfektion von Pflanzenpathogenen bieten, indem methodische Herangehensweisen zwischen wissenschaftlichen Instituten harmonisiert werden, um (internationale) Untersuchungsergebnisse vergleichbarer zu machen.

Kapitel 2

Analyse der räumlichen Verteilung des Tomato brown rugose fruit virus auf Oberflächen in einem kommerziellen Tomatenproduktionsbetrieb

Veröffentlicht unter:

Ehlers, J.; Nourinejad Zarghani, S.; Liedtke, S.; Kroschewski, B.; Büttner, C.; Bandte, M. Analysis of the Spatial Dispersion of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Surfaces in a Commercial Tomato Production Site. *Horticulturae* 2023, 9, 611. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050611>



Graphical Abstract



Article

Analysis of the Spatial Dispersion of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Surfaces in a Commercial Tomato Production Site

Jens Ehlers ¹, Shaheen Nourinejhad Zarghani ¹, Stefanie Liedtke ¹, Bärbel Kroschewski ², Carmen Büttner ¹ and Martina Bandte ^{1,*}

¹ Division Phytomedicine, Albrecht Daniel Thaer-Institute for Crop and Animal Sciences, Humboldt-Universität zu Berlin, 14195 Berlin, Germany

² Working Group Biometry and Experimental Methods, Division Crop Science, Albrecht Daniel Thaer-Institute for Crop and Animal Sciences, Humboldt-Universität zu Berlin, 14195 Berlin, Germany

* Correspondence: martina.bandte@agr.ar.hu-berlin.de (M.B.)

Abstract: The tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) causes severe damage to tomato cultivars and has international economic importance. The harmful tobamovirus is easily mechanically transmissible and highly stable. An ongoing cultivation of infected tomato plants may lead to the spread of ToBRFV in and around the production area of the infested tomato farm. We conducted a study in which we collected a representative number of swab samples from various inanimate surfaces in greenhouses, packaging halls, and shared and private accommodations. In addition, numerous fabrics, such as outer clothing, bed linen, and items used by greenhouse workers, were tested. The infectivity of ToBRFV-contaminated surfaces was tested in bioassays using *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN and confirmed using DAS-ELISA. The proportion of ToBRFV-contaminated surfaces varied among locations, from 48.7% in greenhouses to 0% in offices with limited access to staff. Samples from shared accommodation and private accommodation were 18.4% and 3.6% ToBRFV positive, respectively. Clothing and protective items were found to be highly contaminated with ToBRFV, and even around the sleeping area, infective ToBRFV was detected in a few apartments. This study provides evidence for the first time on how and where infectious ToBRFV can be spread by humans beyond the production area. To avoid further dissemination, strict hygiene protocols are required to interrupt transmission routes.

Keywords: bioassay; accommodation; packing hall; greenhouse; vehicle; fabric; protective items; contamination



Citation: Ehlers, J.; Nourinejhad Zarghani, S.; Liedtke, S.; Kroschewski, B.; Büttner, C.; Bandte, M. Analysis of the Spatial Dispersion of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Surfaces in a Commercial Tomato Production Site. *Horticulturae* **2023**, *9*, 611. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050611>

Academic Editor: Boqiang Li

Received: 4 April 2023

Revised: 11 May 2023

Accepted: 19 May 2023

Published: 22 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Currently, the tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is considered the greatest threat to tomato production worldwide [1]. During the first outbreak in Germany in 2018 [2], several tomato greenhouses on different farms were affected. Since then, the virus has been repeatedly detected in German greenhouses, outdoors under polytunnels, in private gardens, and on seeds [3], resulting in well over 50% loss of marketable tomatoes (personal communication).

In the last three decades, viral diseases such as pepino mosaic virus (PepMV) [4], tomato torrado virus (ToTV) [5], and tomato mottle mosaic [6] have emerged worldwide, posing a threat to tomato production [7]. Yield losses have been measured and estimated for individual viruses [8–10] and are particularly large when plants are infected early in development. In 2016, a new tobamovirus, tomato brown rugose fruit virus, was first identified [11]. Since the first outbreaks in Israel [12] and Jordan [11], ToBRFV has become a significant pathogen of tomato plants, causing devastating disease outbreaks and resulting in serious yield losses in many countries [7,13]. It was detected in 22 European countries, including the four largest producers, Spain, Italy, Poland, and Portugal [14–16]; Egypt in Africa [17]; China, Iran, Israel, Jordan, Lebanon, Saudi Arabia, Syria, and Turkey, Uzbekistan

in Asia [11,12,16,18–22]; and Canada, Mexico, and the US in North America [23–25]. Although the pathogen has been detected on four continents to date, genetic diversity among isolates is low [26].

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a major food crop and an important economic contributor to the primary sector, accounting for a global harvest of approximately 184.786 million metric tons and an estimated gross production value of USD 102.622 billion in 2020 [27]. During cultivation or post-harvest storage, tomatoes are susceptible to more than 200 yield-reducing diseases [28]. These diseases are caused by a variety of pathogenic fungi, bacteria, viruses, and nematodes, and they directly or indirectly result in losses in tomato production. In addition to the high water requirements of tomatoes, viral diseases, which cannot be curatively controlled with either pesticides or biological control agents, are an important factor limiting production worldwide.

ToBRFV infection in tomato plants can result in a range of symptoms, from mild to very severe. Fruits often display undesirable yellow and orange marbling or namesake dark “brown rugose” spots. These discolorations make fruits unmarketable [2]. In addition, González-Concha and colleagues recorded a 25 to 40% reduction in average fruit weight in greenhouse tomatoes [13]. Infection trials show ToBRFV-related yield reductions of 19 to 55%, depending on climate and cultivation methods [29]. Interestingly, these reductions were independent of the presence of the *Tm-2* resistance gene. The resistance gene *Tm-2*, which was introduced into cultivated tomatoes, confers strong or near complete resistance against TMV, tomato mosaic virus (ToMV), and tomato mottle mosaic virus (ToMMV) [12,30]. This gene has two resistant alleles: *Tm-2* and *Tm-2²* [31], with the latter becoming the most widely used ToMV resistance in breeding programs, and thus most, if not all, commercial tomato hybrids have this resistance today. Although the resistance gene *Tm-2²* was effective for over 40 years, ToBRFV appears to have overcome this genetic resistance to tobamoviruses [12,29,30].

The pandemic spread of ToBRFV in tomato crops was caused by the breaking of the resistance gene *Tm-2²* and the global trade of plants and seeds, which was enhanced by the easy mechanical transmissibility paired with the high stability of the virions. Tobamovirus virions are rod-shaped and viable in the environment outside the host plant for a long period of time [32,33]. Tobamoviruses such as ToBRFV are transmitted primarily mechanically through infected plants, plant debris, contaminated soil [34], tools [1,7], and items, for example, by farm workers handling both infected and non-infected plants [35,36]. The circulation of nutrient solutions contaminated with viruses is another dissemination path [37]. Klap and colleagues showed that damaged fruits can be an effective inoculum for virus transmission [38]. Tomato pollinators such as bumble bees (*Bombus terrestris*) may also transmit ToBRFV mechanically during flower pollination [39]. However, as with other tobamoviruses, virus vectors are unknown. In addition, low seed-to-seedling transmission rates, ranging from 0.08% to 2.8%, have been demonstrated in previous studies [40,41]. The global movement of the virus via contaminated seed appears to be the only credible explanation for the observed intercontinental movement of ToBRFV. Thus, in many countries, the testing of seed or parent plants is required as part of emergency measures to prevent ToBRFV entry through the importation and movement of ToBRFV host seed, tomato, and pepper. In the event of an outbreak of ToBRFV, emergency measures such as the destruction of infected plants are mandatory to stop the establishment and spread of the virus. These official eradication measures based on (EU) 2020/1191 were revised in the EU in 2021. Producers of tomato fruits can therefore continue cultivating until the end of the growing season despite the detection of a ToBRFV infestation.

This will likely lead to a significant spread of the virus throughout the farm and possibly beyond. Contamination with ToBRFV will not only affect the direct production area but might also spread to parts of the farm not related to tomato production. In parallel, the new Implementing Regulation (EU) 2021/1809 also requires specific hygiene measures for personnel, production site structures, tools and machinery, materials, and means of transport. In light of this changing regulatory framework, sanitation and disinfection measures also need to be adapted if ToBRFV spreads outside the production area. The