



(21) Numer zgłoszenia: **423231**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6895 (2018.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **23.10.2017**

(54) **Zestaw starterów do powielania *Fusarium oxysporum*, sposób wykrywania *Fusarium oxysporum*, sposób diagnostyki fuzariozy oraz zestaw do diagnostyki fuzariozy**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
06.05.2019 BUP 10/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
17.05.2021 WUP 10/21

(73) Uprawniony z patentu:

**TERRABIO SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

IZABELA PIELKA, Łaziec, PL
BARTOSZ PENCAKOWSKI, Lubin, PL
MIRON TOKARSKI, Brzeg, PL
**MAŁGORZATA MAŁODOBRA-MAZUR,
Wrocław, PL**
**HENRYK WALDEMAR ROGUSZCZAK,
Wrocław, PL**
**ARKADIUSZ PIOTR DĄBROWSKI,
Kozmin Wielkopolski, PL**
TADEUSZ MARIAN DOBOSZ, Psary, PL
KONRAD KRAJEWSKI, Oława, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Andrzej Witek

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zestaw starterów do powielania *Fusarium oxysporum*, sposób wykrywania *Fusarium oxysporum*, sposób diagnostyki fuzariozy oraz zestaw do diagnostyki fuzariozy. Wynalazek ma zastosowanie w przemyśle rolniczym, a także diagnostyce medycznej.

Zgłoszenie dotyczy opracowania sekwencji specyficznych oligonukleotydów dedykowanych detekcji kwasu nukleinowego *Fusarium oxysporum*, jego genu 28S rRNA (GenBank HM057281.1) z wykorzystaniem technologii LAMP (loop mediated isothermal amplification), która to metoda została przykładowo ujawniona w opisach patentowych WO0028082, WO0224902. Zgłoszenie dotyczy także opracowania metody detekcji, składu mieszaniny reakcyjnej, warunków temperaturowych oraz warunków liofilizacji reagentów. *Fusarium oxysporum* jest wszechobecnym grzybem z rodziny Nectriaceae. Gatunek został podzielony w zależności od gospodarzy, u których wywołuje daną chorobę. Należy do pasożytów wielu roślin. Jest czynnikiem etiologicznym fuzariozy. Objawia się ona wędnięciem naczyń, żółceniem liści, gniciem korzeni, defoliacją. W konsekwencji prowadzi do śmierci rośliny.

Fuzarioza powoduje duże straty w uprawach warzyw, owoców i roślin ozdobnych. W celu ochrony wykorzystuje się odmiany odporne na chorobę. Profilaktycznie przy podejrzeniu zagrożenia stosuje się chemiczne środki ochrony roślin.

Fusarium oxysporum z chińskich zgłoszeń patentowych CN106434993; CN102690887; CN103773854; CN103409518; CN103352078 znane jest wykorzystanie starterów w metodzie LAMP do potwierdzania obecności *Fusarium oxysporum* w próbce badanej. Zgłoszenia te dotyczą zestawów starterów nieposiadających specyficzności do gatunków infekujących m.in. uprawy pomidora w Europie. Ponadto nie wykazują one właściwości umożliwiających ich wykorzystanie w diagnostyce polowej z uwagi na wydłużony czas amplifikacji.

Nadal więc istnieje potrzeba zapewnienia takiego zestawu starterów oraz składu mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanych w metodzie diagnostycznej do wykrywania *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem metody LAMP, które będą skutkowały niskim limitem detekcji patogenu, uzyskiwanym w krótkim czasie. Nieoczekiwanie problem rozwiązał prezentowany wynalazek.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest zestaw starterów zdolnych do powielania sekwencji nukleotydowej *Fusarium oxysporum* charakteryzujący się tym, że zawiera zestaw starterów wewnętrznych zawierający następujące sekwencje nukleotydowe a) i b) oraz zestaw starterów zewnętrznych zawierający następujące sekwencje nukleotydowe c) i d):

- a) 5' GTTGCTACCCTAGACCCGACT 3' (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 5 lub sekwencja do niej komplementarna) połączona, korzystnie mostkiem TTTT, z sekwencją 5' GGTTCCGCCAATCCGTCAA 3' – (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 3 lub sekwencja do niej komplementarna)
- b) 5' GAAGTGGTCTACCCGGTAGCCA 3' – (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 6 lub sekwencja do niej komplementarna) połączona, korzystnie mostkiem TTTT, z sekwencją 5' TCGTCATGCGAGGTCTGT 3' – (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 4 lub sekwencja do niej komplementarna)
- c) 5' GGGTAGGTGACCAGGTTCA 3' sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 1 lub sekwencja do niej komplementarna
- d) 5' GAATCCGATGGTGGTAGTCC 3' sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 2 lub sekwencja do niej komplementarna. Równie korzystnie zestaw według wynalazku charakteryzuje się tym, że zawiera dodatkowo zestaw sekwencji nukleinowych starterów loop zawierający sekwencje nukleinowe o numerach SEQ ID NO: 7–5' CCTGTCCTTCGATTCAAGCC 3' i 8: 5' AATCGCCTCTCACGGCC 3' lub sekwencje do niej komplementarne.

Drugim przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania *Fusarium oxysporum* charakteryzujący się tym, że obejmuje powielanie wybranego regionu sekwencji nukleinowej *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem zestawu starterów zdefiniowanych w pierwszym przedmiocie wynalazku przy czym metodą powielania jest metoda LAMP, korzystnie o następującym profilu temperaturowym:

- 1) 65°C, 40 min.
- 2) opcjonalnie przy reakcjach typu end-point 80°C, 10 min.

Trzecim przedmiotem wynalazku jest sposób diagnostyki fuzariozy charakteryzujący się tym, że obejmuje sposób wykrywania zdefiniowany w drugim przedmiocie wynalazku.

Czwartym przedmiotem wynalazku jest zestaw do diagnostyki fuzariozy charakteryzujący się tym, że zawiera zestaw starterów zdefiniowany w pierwszym przedmiocie wynalazku oraz 12,5 ul Warmstart

LAMP 2X Master Mix), przy czym poszczególne startery mają następujące stężenia: 0,12 μM F3; 0,12 μM B3; 0,93 μM FIP; 0,93 μM BIP; 0,23 μM LoopF; 0,23 μM LoopB, oraz znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA

– Fluorescent dye 50X (New England Biolabs) w ilości 0,5 μl , GreenFluorescent Dye (Lucigen) w ilości ≤ 1 μl lub EvaGreen $\leq 1\text{X}$ lub Syto-13 ≤ 16 μM lub SYTO-82 ≤ 16 μM lub inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Przykładowe realizacje wynalazku przedstawiono na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia charakterystykę specyficzności oraz czułości metody, gdzie specyficzny sygnał uzyskano z matrycą kwasu nukleinowego grzyba *Fusarium oxysporum* a fig. 2 ilustruje czułość metody wg wynalazku mierzonej przez nastawienie serii rozcieńczeń matrycy *Fusarium oxysporum* z minimalną ilością grzyba 177 kopii/ μl , gdzie przyrost produktu mierzono w czasie rzeczywistym.

Przykład 1 Izolacja materiału genetycznego

Autor: Schlechtendahl; Nazwa gatunku rośliny: gleba; Pochodzenie patogenu – kraj: PL; Pochodzenie patogenu – miejsce: Tomaszkowo koło Olsztyna; Data akcesu: 2014.08.01; Data izolacji: 2013; Metoda konserwacji: olej * glicerol * ciekły azot; Ofiarodawca: Sebastian Przemieniecki UWM Olsztyn; Numer kolekcji obcej: 3, pozyskanego z Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytut Badawczego w Poznaniu. Materiał genetyczny wyizolowano zmodyfikowaną metodą Murraya-Thompsona wg poniższego protokołu:

– Materiał rozcierano w moździerzu przy użyciu ciekłego azotu, następnie 100 mg suchej masy przenoszono do próbki typu Eppendorf.

– Do próbki dodawano 500 μl buforu lizującego, a następnie inkubowano próbki w 60°C przez godzinę.

Bufor do lizy:

100 mM Tris pH 7,5

100 mM EDTA

1% SDS

100 $\mu\text{g/ml}$ proteina K

1% merkaptioetanol

Proteinazę K oraz β -merkaptioetanol do buforu lizującego dodawano tuż przed zastosowaniem buforu w izolacji.

– Następnie dodawano 200 μl 5M NaCl oraz 0,1 objętości 10% CTAB

– Próbkę inkubowano w 65°C przez 20 min.

– Po inkubacji próbki schładzano, umieszczając je na lodzie. Dalej próbki wirowano przez 10 min w 4°C 10 000 rpm.

– Nadsącz przenoszono do nowej próbki typu eppendorf. Do izolatów dodawano równą objętość mieszaniny chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1), całość dokładnie mieszano przy użyciu wortexu przez 1 minutę.

– Próbkę wirowano przez 15 minut przy 10 000 rpm, w temperaturze 4°C.

– Górną fazę przenoszono do nowej próbki, a następnie ponownie ekstrahowano dodając równą objętość mieszaniny: chloroform: alkohol izoamyłowy (24:1), dokładnie mieszano i wirowano przez 15 minut przy 10 000 x g, w temperaturze 4°C.

– Po wirowaniu górną fazę przenoszono do nowej próbki, a DNA wytrącano przez dodanie 0,1 objętości 3M octanu sodu oraz trzech objętości 99,8% alkoholu etylowego.

– Przygotowaną mieszaninę inkubowano w temperaturze -20°C przez noc.

– Po inkubacji, próby wirowano przez 15 minut przy 16000 x g w temperaturze 4°C.

– Nadsącz usuwano, a osad przemywano 70% roztworem etanolu i wirowano przez 5 minut, przy 13 000 x g w 4°C.

– Osad DNA suszono do momentu wyparowania etanolu.

– Wyizolowane genomowe DNA rozpuszczano w 50 μl wody wolnej od DNaz. Próby przechowywano w -20°C.

Izolat oceniono spektrofotometrycznie za pomocą NanoDrop ND2000 (ThermoFisher) a następnie dokonano stosownego przeliczenia stężenia DNA na liczbę kopii genomu grzyba *Fusarium oxysporum*. Na figurze widoczny jest charakterystyczny dla reakcji LAMP układ prążków w próbkach zawierających matrycę DNA patogenu, brak natomiast produktu w NTC; linia 1.: marker mas (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, NewEngland Biolabs); linia 2.: NTC; linia 3.: 177 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 4.: 887 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 5.: 1773 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 6.: 3546 kopii

Fusarium oxysporum; linia 7.: 8865 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 8.: 17731 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 9.: 35462 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 10.: 88655 kopii *Fusarium oxysporum*; linia 11.: 177309 kopii *Fusarium oxysporum*.

Przykład 2 Sekwencje starterów

Sekwencje specyficznych oligonukleotydów wykorzystywanych do detekcji materiału genetycznego *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem technologii LAMP przedstawiono i scharakteryzowano poniżej.

1. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNAF3: 5' GGGTAGGTGACCA-GTTCA 3' stanowi sekwencję identyczną z genem 28S rRNA *Fusarium oxysporum* (nić 5'-3'), który od strony 3' końca sąsiaduje ze starterem *Fusarium oxysporum* F2.
2. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNAB3: 5' GAAT-CCGATGGTGGTAGTCC 3' stanowi komplementarny fragment genu 28S rRNA *Fusarium oxysporum* (nić 5'-3') oddalona o 161 nukleotydów od końca 3' oligonukleotydu 1, który od strony 5' sąsiaduje ze starterem B2.
3. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNAF2: 5' GGTTGCGCAAATCCGTC-CAA 3' stanowi sekwencję identyczną z genem 28S rRNA *Fusarium oxysporum* (nić 5'-3') oddalona o 5 nukleotydów od końca 3' oligonukleotydu 1, który sąsiaduje ze starterem F3 od strony 5'.
4. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNAB2: 5' TCGTCATGCGA-GGTCTGT 3' stanowi komplementarny fragment genu 28S rRNA *Fusarium oxysporum* (nić 5'-3') oddalona o 141 nukleotydów od końca 3' oligonukleotydu 1, który od końca 3' sąsiaduje ze starterem B3.
5. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNAF1c: 5' GTTGCCTACCCTAGAC-CCGACT 3' stanowi komplementarny fragment genu 28S rRNA *Fusarium oxysporum* (nić 5'-3') oddalona o 62 nukleotydy od końca 3' oligonukleotydu 1.
6. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNAB1c: 5' GAAGTGGTCTAC-CCGGTAGCCA 3' stanowi sekwencję identyczną z genem 28S rRNA *Fusarium oxysporum* (nić 5'-3') oddalona o 94 nukleotydy od końca 3' oligonukleotydu 1.
7. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNALoopF: 5' CCTGTCCTTCGATT-CAAGCC 3'.
8. Sekwencja oligonukleotydu *Fusarium oxysporum* 28S rRNALoopB: 5' AATCGCCTCT-CACGGCC 3'.

Sekwencje oligonukleotydów F1c i F2 zostały połączone mostkiem TTTT i wykorzystane w postaci FIP. Sekwencje oligonukleotydów B1c i B2 zostały połączone mostkiem TTTT i wykorzystane w postaci BIP.

Przykład 3

Metoda amplifikacji genu 28S *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o następującym składzie mieszaniny reakcyjnej.

12,5 ul WarmStart LAMP 2X Master Mix

0,12 μM F3

0,12 μM B3

0,93 μM FIP

0,93 μM BIP

0,23 μM LoopF

0,23 μM LoopB

Znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA – Fluorescent dye 50X (New England Biolabs) w ilości 0,5 ul lub GreenFluorescent Dye (Lucigen) w ilości ≤1 ul lub EvaGreen ≤1X lub Syto-13 ≤16 μM lub SYTO-82 ≤16 μM lub inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Matryca DNA ≥1 kopia/reakcję.

Całkowita objętość reakcyjna dopełniona do 25 μl wodą wolną od DNaz i RNaz.

Przykład 4

Metoda amplifikacji genu 28S rRNA dla *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o składzie mieszaniny reakcyjnej scharakteryzowanej w przykładzie 2 o następującym profilu temperaturowym:

- 1) 65°C, 40 min.
- 2) opcjonalnie przy reakcjach typu end-point 80°C, 10 min.

Przykład 5

Metoda amplifikacji i detekcji genu 28S rRNA dla *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o składzie mieszaniny reakcyjnej scharakteryzowanej w przykładzie 2 o profilu temperaturowym scharakteryzowanym w przykładzie 3 i sposobie detekcji opisanym poniżej.

Użyty barwnik fluorescencyjny wykazujący zdolność oddziaływania z dwuniciowym DNA dodany do mieszaniny reakcyjnej w ilości 0,5 ul lub stężeniu $\leq 1X$; $\leq 16 \mu M$ odpowiednio dla barwnika GreenFluorescent Dye (Lucigen); EvaGreen; SYTO-13 i SYTO-82 przed rozpoczęciem reakcji, pomiar w czasie rzeczywistym i/lub typu end-point. Długość fali wzbudzenia w zakresie zbliżonym do barwnika FAM – 490–500 nm (optymalnie 494 nm) dla barwników Fluorescent dye 50X (New England Biolabs), GreenFluorescent Dye (Lucigen); EvaGreen; SYTO-13 oraz dla barwnika SYTO-82 535 nm (optymalnie 541 nm) długość fali emisji w zakresie 509–530 nm (optymalnie 518 nm) dla barwników GreenFluorescent Dye (Lucigen); EvaGreen; SYTO-13 oraz dla barwnika SYTO-82 556 nm (optymalnie 560 nm), sposób detekcji, czas rejestracji zmian począwszy od 15 minuty od rozpoczęcia reakcji dla *Fusarium oxysporum* oraz kontroli negatywnej.

Przykład 6

Metoda przygotowania i liofilizacji odczynników do detekcji amplifikacji i detekcji genu 28S rRNA grzyba *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o składzie mieszaniny reakcyjnej scharakteryzowanej w przykładzie 2 o profilu temperaturowym scharakteryzowanym w przykładzie 3 i sposobie detekcji opisanym w przykładzie 4.

Przykład 7 Opis procesu liofilizacji

Komponenty reakcji mieszano zgodnie ze składem opisanym w przykładzie 2, poza matrycą DNA, do całkowitej objętości 25 μl . Mieszaninę przeniesiono do probówek o pojemności 0,2 ml i poddano procesowi liofilizacji zgodnie z poniższymi parametrami.

Mieszanina umieszczona w probówkach została wstępnie schłodzona do -25°C. Następnie prowadzono proces liofilizacji w temperaturze -80°C przez 3–8 godzin pod ciśnieniem 5^{-2} mBar.

Przykład 8 Czułość metody

Czułość określono przez nastawienie serii rozcieńczeń matrycy kwasu nukleinowego grzyba uzyskanej w wyniku izolacji próbki kolonii grzyba *Fusarium oxysporum*; Autor: Schlechtendahl; Nazwa gatunku rośliny: gleba; Pochodzenie patogenu – kraj: PL; Pochodzenie patogenu – miejsce: Tomaszkowo koło Olsztyna; Data akcesu: 2014.08.01; Data izolacji: 2013; Metoda konserwacji: olej * glicerol * ciekły azot; Ofiarodawca: Sebastian Przemieniecki UWM Olsztyn; Numer kolekcji obcej: 3, pozyskanego z Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytut Badawczego w Poznaniu, *Fusarium oxysporum* z minimalną ilością grzyba 177 kopii/ μl , gdzie przyrost produktu mierzono w czasie rzeczywistym – Figura 2 (RealTime-LAMP dla serii rozcieńczeń *Fusarium oxysporum*).

Czas, po którym możliwa jest detekcja emitowanej fluorescencji dla poszczególnych próbek przedstawiono w tabeli 1.

Scharakteryzowane startery umożliwiają detekcję *Fusarium oxysporum* przy minimalnej ilości 177 kopii/ μl .

Tabela 1 Czas niezbędny do detekcji fluorescencji dla poszczególnych stężeń *Fusarium oxysporum*

Próbka	Czas przekroczenia linii bazowej fluorescencji [min]
<i>Fusarium oxysporum</i> NTC	Nieokreślony
<i>Fusarium oxysporum</i> 177 kopii	33,511887
<i>Fusarium oxysporum</i> 887 kopii	30,302065
<i>Fusarium oxysporum</i> 1773 kopii	29,911076
<i>Fusarium oxysporum</i> 3546 kopii	27,424047
<i>Fusarium oxysporum</i> 8865 kopii	23,639772
<i>Fusarium oxysporum</i> 17731 kopii	20,899029
<i>Fusarium oxysporum</i> 35462 kopii	20,484673
<i>Fusarium oxysporum</i> 88655 kopii	18,59475

Wyższość metody amplifikacji oraz oligonukleotydów scharakteryzowanych w niniejszym opisie patentowym nad testami bazującymi na technologii RealTime-LAMP polega na znacznie wyższej czułości, którą przedstawiono na figurze 1 oraz skróceniu czasu analiz przedstawionego na figurze 2 oraz tabeli 1.

Lista sekwencji

<110> Genomtec S.A.

<120> Zestaw starterów do wykrywania Fusarium oxysporum, sposób wykrywania Fusarium oxysporum z wykorzystaniem zestawu starterów oraz zestaw do wykrywania Fusarium oxysporum

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1 28S rRNAF3

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 1

GGGTAGGTGACCAGGTTCA 19

<210> 2 28S rRNAB3

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 2

GAATCCGATGGTGGTAGTCC 20

<210> 3 28S rRNAF2: 5'

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 3

GGTTCGCCAAATCCGTCAA 19

<210> 4 28S rRNAB2

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 4

TCGTCATGCGAGGTCTGT 18

<210> 5 28S rRNAF1c

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 5

GTTGCCTACCCTAGACCCGACT 22

<210> 28S rRNAB1c

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 6

GAAGTGGTCTACCCGGTAGCCA 22

<210> 7 28S rRNALoopF

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 7

CCTGTCCTTCGATTCAAGCC 20

<210> 8 28S rRNALoopB

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 8

AATCGCCTCTCACGGCC 17

<210> 9 28S rRNA

<211> 24

<212> DNA

<213>

<223> gen

<400> 9

cgctcgagcg	cgctcgtgga	tttcgcgtat	tgtaatttca	acacgagcgg	ggtcaaatcc	60
tttgacagcg	acttagctgt	gcgaaacggt	cctgtaagca	gtagagtagc	cttgttgta	120
cgatctgctg	agggtaagcc	gtccttcgcc	tcgatttccc	caatgggttc	tccggatttc	180
tggagacttg	taggggttgt	gggatttttg	atgtgtcgtc	tccggacggg	cggtgcaggg	240
tagtcgagtt	agacttgggtg	gaattccgtc	gataggagtt	ccgtcgagtc	tggtcagctg	300
tgtgttggac	ggtgtagggt	aggetgcttg	gacatggctg	gttcgaggat	cgattcgagg	360
gccggcctgt	cgatgatgtg	tgatgtatgc	ggtctagggt	aggttggttt	gtcttggttc	420
galltgatgt	cggclcccgt	gcaggccaga	glgagggggg	lccagggtag	gtgcagggla	480
ggcagcttag	atltggtcga	tctggaggtc	gattctccgg	ctggcggatc	tgacactgtc	540

gaaacgagat	gcgaggggtg	tagggtaggc	tagtttcgta	cttgccaggt	tgcgatttgg	600
acgagatatg	tggtttaggg	taggctctag	ggtaagtaga	attcagattt	cgtcgccgat	660
agttttctgt	gggtgatgg	taggtacagg	gtaggcaaat	ctctctccgg	ccagtacttg	720
tctcgtggtc	gtgagtcgat	ttttttgttt	tgccatacta	ttgaattttg	cggaaattca	780
aaagtggctc	gggagtcocg	cctggcgtgc	gtccgactcg	aacatcgtcg	gtgtacatat	840
gagagggagt	aatccggccc	ggccggggcc	catcgcgagc	tgccgggtag	gtaaaagtaa	900
aaaagltglt	aagaggcgcg	glglcggcgl	gcttglalll	gcgggagaga	atlatctggg	960
ggtgctgggt	agccgggaag	acttggacgg	atctggcccc	ggaatgggtc	tgggcctgga	1020
ttctggtgtg	gtgtagggta	gggtaggcgt	agatagatga	gtggtctagg	gtagatacag	1080
ggtagccaga	cgtctgggat	atagtatggg	ggtgtagggg	aggtctggac	accgttttcc	1140
actttgccct	tcgcttttagt	cgagggagga	tgatcttggc	tgggacggag	gtgtagggta	1200
ggcttaatth	acgattacat	gatctgtgtc	actctagggt	aggtgaaaat	cccatatata	1260
tctgatcaca	tttgggtgaag	aggtgggtttg	gctggtgaga	tggacaaaag	tgcaatgtag	1320
aattatatgt	gattttgcaa	aagtgggtgt	gaaattggaa	agtcggtttt	cccgcacaga	1380
tgagagcacg	tttgaggtgc	catgagatgc	acctctccga	gacgacctca	acggtaccac	1440
ccatgtggtg	gtcgggctcc	tgtgcggccg	tccagggcgg	gataagtaga	gaatgtggtg	1500
gtgtagggta	ggtgaccagg	ttcagggtag	gttcgccaaa	tccgtcaatc	cggcttgaat	1560
cgaaggacag	glctlagggta	ggccagagtc	gggtctaggg	laggcaaccg	tcaccctcga	1620
agtggctctac	ccggtagcca	acttcaatcg	cctctcacgg	ccgccacaga	cctcgcacga	1680
cgacgggact	accaccatcg	gattcgcctt	ggtcgaaata	gctggtatat	gcacttttga	1740
aaaaatgctg	gcaaaatggt	tttgtggttt	ggtggctgtg	agtcgatttt	tttgttttcc	1800
catacaaatg	aattttgcgg	aaaataaaaa	gtggcccacg	aggcagtcct	ggcgtgcggc	1860
ccactaaaac	ggtctcggag	ggtatatgag	aaggagcaa	atccggccga	gcctgaaagg	1920
gtgaggacaa	accgggcgag	caacctctca	gtatcagatc	ttgcagactt	ccactgcgtg	1980
tccctctgta						1990

Zastrzeżenia patentowe

- Zestaw starterów zdolnych do powielania sekwencji nukleotydowej *Fusarium oxysporum*, **znamienny tym**, że zawiera zestaw starterów wewnętrznych zawierający następujące sekwencje nukleotydowe a) i b) oraz zestaw starterów zewnętrznych zawierający następujące sekwencje nukleotydowe c) i d):
 - 5' GTTGCCTACCCTAGACCCGACT 3' (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 5 lub sekwencja do niej komplementarna) połączona, korzystnie mostkiem TTTT, z sekwencją 5' GGTTCCGCAAATCCGTCAA 3' – (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 3 lub sekwencja do niej komplementarna)
 - 5' GAAGTGGTCTACCCGGTAGCCA 3' – (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 6 lub sekwencja do niej komplementarna) połączona, korzystnie mostkiem TTTT, z sekwencją 5' TCGTCATGCCGAGGTCTGT 3' – (sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 4 lub sekwencja do niej komplementarna)
 - 5' GGGTAGGTGACCAGGTTCA 3' sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 1 lub sekwencja do niej komplementarna
 - 5' GAATCCGATGGTGGTAGTCC 3' sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 2 lub sekwencja do niej komplementarna.
- Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera dodatkowo zestaw sekwencji nukleotydowych starterów loop zawierający sekwencje nukleotydowe o numerach SEQ ID NO: 7–5' CCTGTCCTTCGATTCAAGCC 3' i 8: 5' AATCGCCTCTCACGGCC 3' lub sekwencje do niej komplementarne.
- Sposób wykrywania *Fusarium oxysporum*, **znamienny tym**, że obejmuje powielanie wybranego regionu sekwencji nukleotydowej *Fusarium oxysporum* z wykorzystaniem zestawu starterów zdefiniowanych w zastrz. 1 albo 2 przy czym metodą powielania jest metoda LAMP, korzystnie o następującym profilu temperaturowym:
 - 65°C, 40 min.
 - opcjonalnie przy reakcjach typu end-point 80°C, 10 min.

4. Sposób diagnostyki fuzariozy, **znamienny tym**, że obejmuje sposób wykrywania zdefiniowany w zastrz. 3.
5. Zestaw do diagnostyki fuzariozy, **znamienny tym**, że zawiera zestaw starterów zdefiniowany w zastrz. 1 albo 2 oraz 12,5 ul Warmstart LAMP 2X Master Mix), przy czym poszczególne startery mają następujące stężenia: 0,12 μM F3; 0,12 μM B3; 0,93 μM FIP; 0,93 μM BIP; 0,23 μM LoopF; 0,23 μM LoopB, oraz znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA – Fluorescent dye 50X (New England Biolabs) w ilości 0,5 ul, GreenFluorescent Dye (Lucigen) w ilości ≤ 1 ul lub EvaGreen $\leq 1\text{X}$ lub Syto-13 $\leq 16 \mu\text{M}$ lub SYTO-82 $\leq 16 \mu\text{M}$ lub inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Rysunki

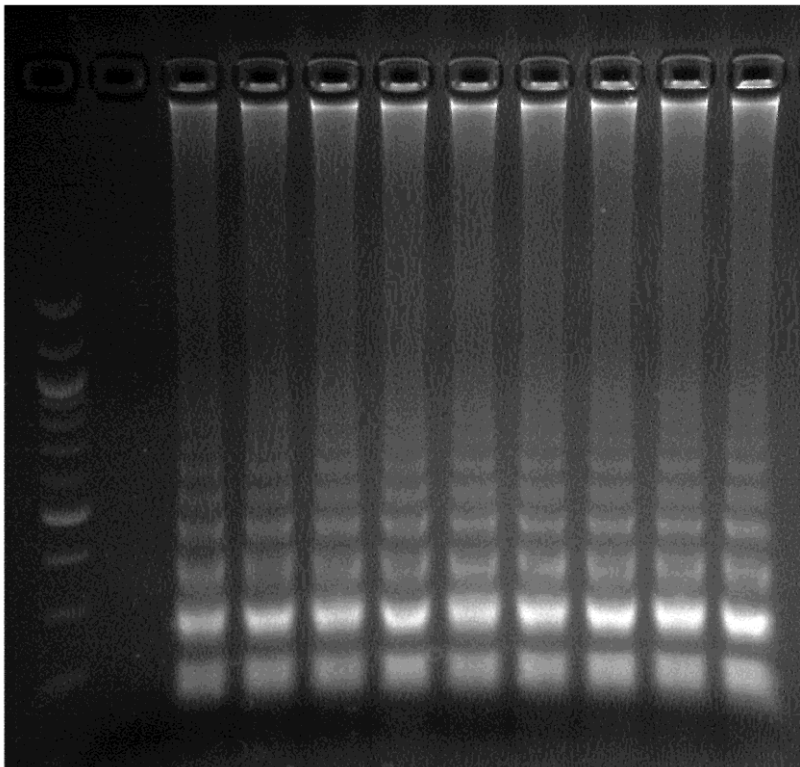


Fig. 1

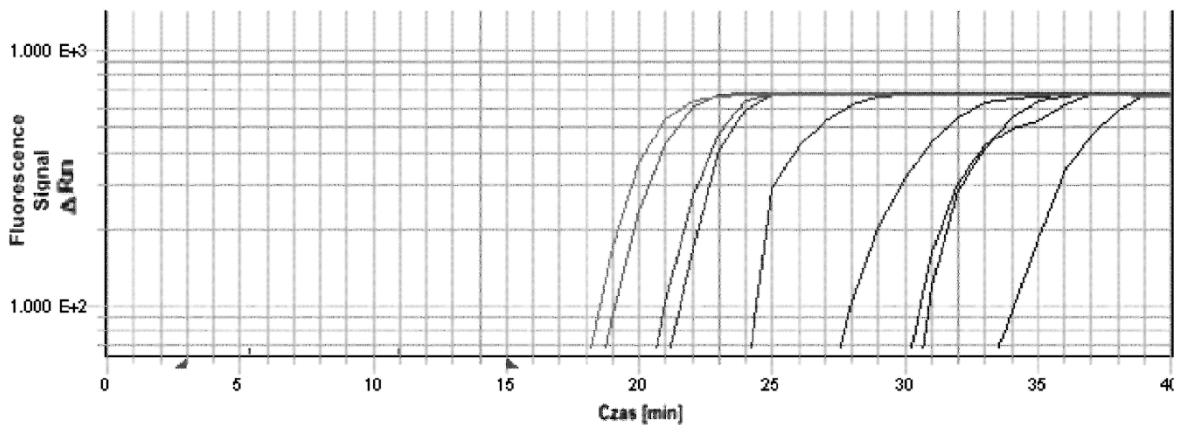


Fig.2