(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 887 574**

(51) Int. CI.:

G01N 1/14 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2016 PCT/IB2016/054256**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17017555**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2016 E 16753977 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 3325939**

(54) Título: **Procedimiento para la extracción de la savia de material vegetal y el aparato para realizar el procedimiento**

(30) Prioridad:

24.07.2015 IT UB20152481

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2021

(73) Titular/es:

AVANTECH GROUP S.R.L. (100.0%)
Via Masuccio Salernitano 28
84012 Angri (SA), IT

(72) Inventor/es:

YASEEN, THAER

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la extracción de la savia de material vegetal y el aparato para realizar el procedimiento

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de la savia de una muestra de material vegetal para realizar el diagnóstico de los organismos presentes en la misma mediante análisis molecular y serológico.

En la presente solicitud de patente, el término muestra de material vegetal se refiere a una cantidad de tejido vivo de una planta, particularmente un trozo de rama.

La descripción también se refiere a un aparato para realizar el procedimiento.

De acuerdo con el estado de la técnica, los procedimientos de extracción de savia comprenden una etapa de trituración del tejido vegetal, a veces también en presencia de nitrógeno líquido, con la adición de diversas sustancias químicas, a menudo nocivas, para poder purificar los ácidos nucleicos o proteínas presentes en la planta.

Por tanto, los procedimientos conocidos y convencionales para extraer los ácidos nucleicos o las proteínas del material vegetal deben realizarse en un laboratorio y requieren mucho tiempo, además de implicar el uso de materiales o kits de examen muy costosos.

En casos de epidemias extendidas sobre un territorio extenso, como, por ejemplo, la del olivo mediterráneo provocado por la bacteria *Xylella fastidiosa*, debido a que es necesario disponer en poco tiempo de muestras de savia, suficientes para realizar los análisis, recogidas en zonas distribuidas por el territorio incluso muy alejadas, los procedimientos convencionales de recogida y extracción de savia antes mencionados no tienen una aplicación adecuada.

La solicitud de patente WO 2012/035117 A1 divulga un procedimiento para la extracción de componentes de un material vegetal que comprende:

- preparar una muestra de material vegetal que tenga un primer y un segundo extremo, cada uno con una sección transversal predeterminada,
- inyectar un líquido a través de su primer extremo,
- recoger, en el segundo extremo de la muestra, el líquido que sale de la misma.

El propósito de la presente invención es disponer de un procedimiento para recoger y extraer la savia de una muestra de material vegetal que también se pueda utilizar directamente en el campo, en un corto período de tiempo, que supere los inconvenientes mencionados en relación con los métodos convencionales conocidos.

Otro propósito es tener un aparato fácilmente transportable para llevar a cabo el procedimiento también en el campo directamente en la planta de la cual se toma la muestra de la planta de la que se extrae la savia a examinar.

Tales propósitos se logran mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

También de acuerdo con la invención, el líquido a inyectar en la muestra de material vegetal y a recolectar junto con la savia comprende un tampón salino.

La invención se describirá ahora más con referencia a un aparato preferido para llevar a cabo el procedimiento, ilustrado como un ejemplo indicador y no con fines limitativos, en la Figura 1 del dibujo adjunto.

Con referencia a la citada Figura 1, el aparato comprende un dispositivo de bombeo 1, preferentemente en forma de jeringa, en cuya cavidad 2 se carga una dosis de tampón salino que, a través del pistón 3, accionado manualmente y por tanto a baja presión, empuja el tampón salino a través de la salida 4 de la jeringa 1.

Este último está conectado al racor de entrada 5 de un elemento filtrante 6.

Preferentemente, el elemento filtrante 6 está provisto de un filtro de al menos 0,22 µm con el fin de evitar que la posible presencia de hongos o bacterias en la savia de la muestra de material vegetal pueda migrar y contaminar el tampón salino presente en la jeringa 1 impidiendo su uso para la extracción de la savia de otra muestra diferente de material vegetal.

El racor de salida 7 del elemento de filtro 6 está conectado a un conducto tubular 8 que tiene preferentemente la forma de una manguera flexible, por ejemplo, con un diámetro de 5 mm y equipado con una longitud igual a aproximadamente 2-3 cm.

Entre el extremo 9 del conducto 8 y el primer extremo 11 de la muestra de material vegetal 12 hay un elemento de unión 10 para realizar tanto la conexión estanca como para adaptar la sección del conducto 8 a la sección transversal de la muestra de material vegetal 12 de la que se desea extraer la savia.

En el segundo extremo 13 de la muestra de material vegetal, frente al extremo 11, a través de un tubo de ensayo convencional, indicado con 14, se recoge el líquido, esquemáticamente indicado con 15, que sale de la muestra de material vegetal. Dicho líquido comprende tanto el tampón salino inyectado como la savia que lleva consigo atravesando la muestra de material vegetal 12.

De acuerdo con la invención, la muestra de material vegetal 12 consta de un segmento, tomado de una rama de la planta, con una edad media de entre uno y dos años.

Preferentemente, el segmento de rama tiene una longitud de entre 4 y 5 cm y una sección transversal con un diámetro de entre 3 y 5 mm.

De lo descrito anteriormente, se puede apreciar que el procedimiento de extracción de la savia de acuerdo con la invención se realiza inyectando la muestra de material vegetal 12 utilizando la jeringa 1 de forma axial, con un tampón salino y recogiéndola, en el tubo de ensayo 14, en el extremo 13, una cantidad de aproximadamente 100-200 µl de líquido que consiste en tampón salino y savia.

La operación se lleva a cabo en el campo en un tiempo muy corto, del orden de 30-60 segundos, lo que hace que el procedimiento sea altamente productivo, particularmente cuando se deben tomar numerosas muestras de savia de forma rápida y en lugares alejados entre sí.

De esta manera, el líquido extraído no necesita operaciones de preparación y puede ser sometido directamente a los análisis serológicos convencionales, como ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) o DTBIA (ensayo inmunológico de transferencia directa de tejidos) ampliamente utilizado en el diagnóstico de organismos vegetales de diferentes tipos como virus, bacterias y hongos.

Solo en el caso en el que el líquido recogido en el tubo de ensayo 14 necesite ser sometido a técnicas de análisis molecular, como por ejemplo LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle) o PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), es necesario someterlo al calentamiento previo convencional a 95°C durante al menos 10 minutos con el fin de extraer y desnaturalizar los ácidos nucleicos de los organismos presentes en el tejido vegetal que se examina.

La invención, como se ilustra y describe anteriormente, puede sufrir variantes, particularmente en términos de forma y tamaño con respecto a la muestra de material vegetal de la que se extrae la savia, todo ello en cualquier caso cubierto por el ámbito de protección de la invención como se reivindica a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la extracción de savia de material vegetal que comprende:

- preparar una muestra (12) de material vegetal que tiene un primer (11) y un segundo extremos (13), estando separados los extremos longitudinalmente entre sí y teniendo cada uno una sección transversal predeterminada, siendo la muestra un segmento tomado de una rama de una planta con una edad media de entre uno y dos años,
- inyectar la muestra, a través de su primer extremo (11), con una cantidad predeterminada de líquido de extracción y
- recoger, en el segundo extremo (13) de la muestra, el líquido que sale de la misma.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho segmento de rama tiene una longitud de al menos 4 cm y una sección transversal con un diámetro de al menos 3 mm.

3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho líquido de extracción comprende un tampón salino.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que incluye una etapa en la que el líquido de extracción, antes de su inyección en dicha muestra de material vegetal, se hace pasar a través de un elemento filtrante.

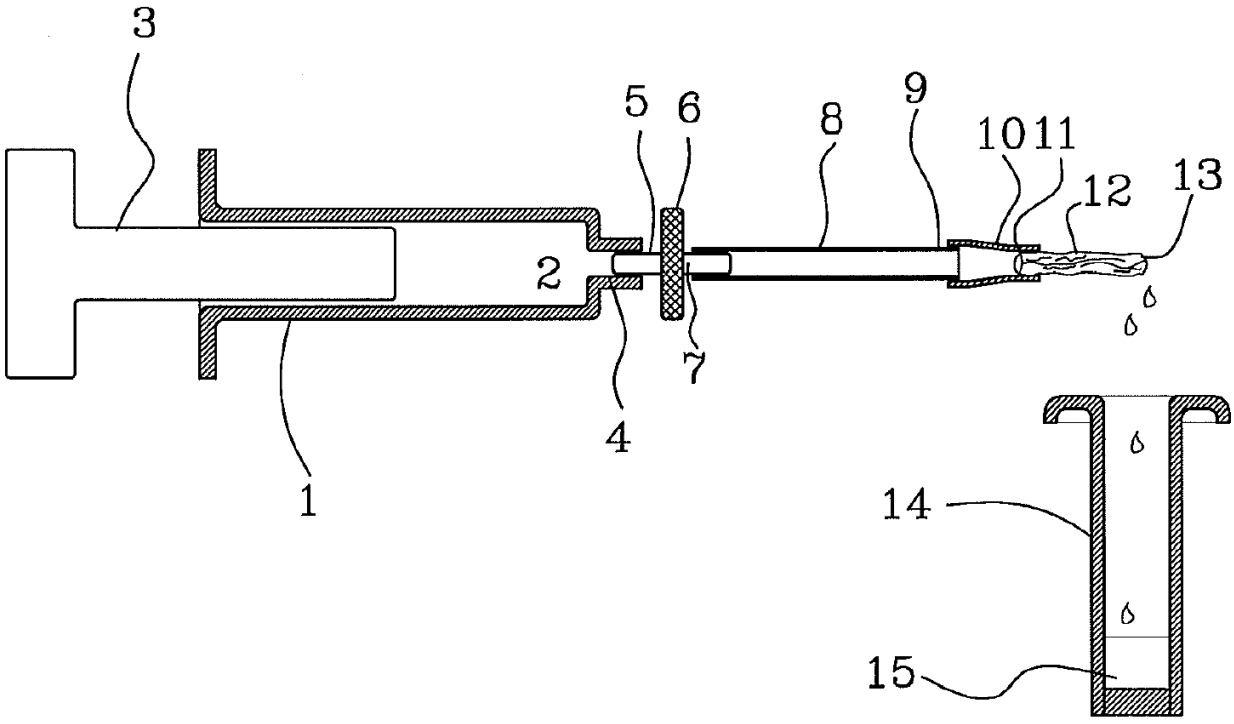


FIGURA 1