



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
Nutrizione Sanità Pubblica Veterinaria

CAMPIONAMENTO DI PIANTE DI MAIS (MON 810) PER LA VIGILANZA SUL DIVIETO DI COLTIVAZIONE IN ITALIA

Marzia De Giacomo e Barbara De Santis

Introduzione

Il presente protocollo di campionamento è stato elaborato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), su richiesta del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare pervenuta a febbraio 2020, ai fini dell'attuazione del Piano generale per l'attività di vigilanza sugli OGM di cui al decreto ministeriale 8 novembre 2017.

Per l'elaborazione di questo protocollo di campionamento ci si è basati sui seguenti riferimenti:

- Risultati del progetto di ricerca: "Studio sperimentale sull'analisi quantitativa di mais Geneticamente Modificato (GM) nelle coltivazioni di mais - metodologia di campionamento per le coltivazioni in pieno campo.", finanziato dalla Regione Lazio, svolto dal Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria dall'Istituto Superiore di Sanità. Inizio 19.10.2012 – Fine 31.12.2013 Determina Dirigenziale n. A11011 del 29-10-12;
- Documento elaborato dall'Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura del Lazio (ARSIAL) in collaborazione con L'Istituto Superiore di Sanità (4.5 Metodologia di campionamento-Coltivazioni) e L'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana dal titolo "Procedure operative per lo svolgimento dell'attività di vigilanza e controllo sugli organismi geneticamente modificati L.R. 6 novembre 2006 n. 15", pubblicato nel 2016 e disponibile al link <http://www.arsial.it/arsial/wp-content/uploads/page/Procedure-operative-2016.pdf>;

Il protocollo di campionamento è sviluppato nel contesto della linea di Attività IV prevista dallo stesso decreto, cioè la vigilanza relativa al rispetto dei divieti di coltivazione adottati ai sensi del decreto legislativo 8 luglio 2003, n.224 così come modificato e integrato dal decreto legislativo 14 novembre 2016, n.227.

La decisione di esecuzione 2016/321 della Commissione europea ha modificato l'ambito geografico dell'autorizzazione alla coltivazione del mais MON 810 permettendo di vietare la coltivazione del mais geneticamente modificato (*Zea mays* L.) MON 810 nei territori elencati nell'allegato della decisione stessa, Italia compresa.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
Nutrizione Sanità Pubblica Veterinaria

Procedura di campionamento

Materiale vegetale da prelevare

È preferibile effettuare il prelievo dei campioni elementari in campo su foglie verdi prima della fase di fioritura al fine di:

- 1) facilitare le operazioni di prelievo grazie ad una migliore accessibilità a tutti i punti del campo, accesso che è limitato quando le piante raggiungono una maggiore altezza;
impedire che si verifichi un'eventuale impollinazione crociata dei campi vicini;
- 2) semplificare le operazioni analitiche in PCR che sono più complesse da realizzare quando le foglie sono secche (DNA degradato e minore resa di estrazione).

Strumenti utilizzati per il prelievo

Al momento del campionamento il tecnico incaricato dovrà essere dotato della seguente attrezzatura:

- a) guanti in lattice monouso;
- b) taglierini e/o coltelli da innesto per l'asportazione delle parti vegetali;
- c) secchi o sacchi di plastica tipo rifiuti per la raccolta del campione globale;
- f) cartellini identificativi e sigilli di garanzia;
- g) contenitori termici e siberini o ghiaccio secco oppure frigorifero portatile.

Metodologia di campionamento

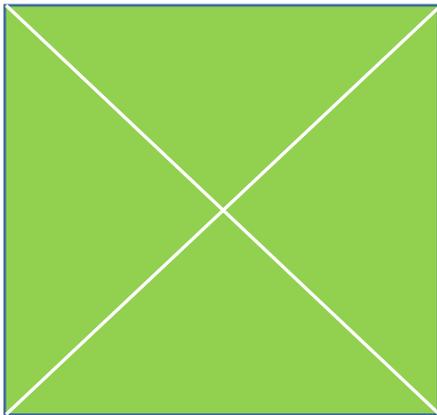
Il prelievo dei campioni elementari deve essere effettuato in diversi punti del campo. Ai fini della formazione del campione globale, dovrà essere prelevata da ciascuna pianta di mais una singola porzione di foglia cercando di ottenere porzioni delle stesse dimensioni. In alternativa, per il prelievo della porzione di foglia, potrà essere utilizzato apposito strumento punzonatore in grado di prelevare porzioni uguali di foglia (dischi).

Per agevolare l'individuazione delle aree di prelievo ci si potrà avvalere dell'ausilio di strumentazione GPS. Le aree di prelievo (minimo 10) devono essere individuate in base alla morfologia del campo cercando di considerare tutta l'area. A titolo di esempio si può utilizzare uno degli schemi riportati nella Figura 1. In ciascuna area dovrà essere prelevato lo stesso numero di piante calcolato in base al rapporto tra il numero totale di campioni elementari e le aree di campionamento individuate.

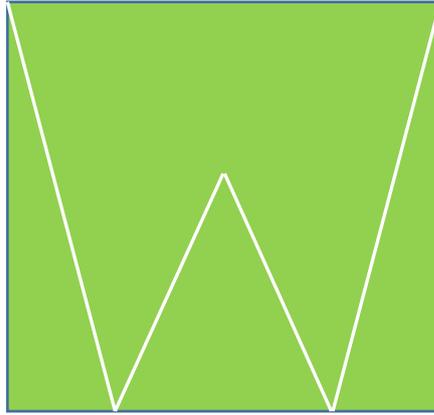


ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
Nutrizione Sanità Pubblica Veterinaria

Fig.1



Campionamento a X



Campionamento a W

Calcolo della numerosità campionaria

Il calcolo della numerosità campionaria (numero di piante da campionare) può essere facilmente effettuato utilizzando il modello statistico elaborato nell'ambito dello studio sperimentale citato. La macro sviluppata permette di determinare la popolazione campionaria stabilendo a priori la sensibilità (valore ipotetico atteso), l'accuratezza (errore di stima) e significatività (probabilità che il valore cada nell'intervallo) che si vuole ottenere nella realizzazione dei piani di controllo.

Nella progettazione di un piano di campionamento è necessario definire lo scopo del controllo:

Divieto di coltivazione con sementi MON 810 e/o contaminazione accidentale delle sementi.

Per l'impiego non consentito di sementi GM si ipotizzare una percentuale di piante GM elevata. Nel secondo caso è necessario supporre una percentuale di piante GM (valore ipotetico atteso) nell'intervallo 0,1% - 0,9%.

Inoltre deve essere stabilito l'errore di stima che si vuole accettare, il tipo di test (unilaterale o bilaterale) ed il livello di significatività.

L'errore di stima comprende anche l'errore associato alla fase analitica che per bassi livelli di concentrazione è di circa il 50% del valore misurato.

Si evidenzia che la scelta di utilizzare un errore di stima molto basso e/o una significatività più alta comporta un aumento della numerosità campionaria.

Divieto di coltivazione con sementi MON 810



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
 Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
 Nutrizione Sanità Pubblica Veterinaria

In figura 2 è riportata la numerosità campionaria per verificare il rispetto del divieto di coltivazione. Per una percentuale pari al 50% GM in una popolazione di circa 100.000 piante, pari a circa 1 ha di terreno, sarà sufficiente prelevare 11 campioni elementari. Questo numero permette di dire che il "valore vero" cade nell'intervallo compreso tra 0,0% e 100% (test bilaterale, con errore di stima dello 50% e significatività del 100%).

Fig. 2 popolazione campionaria per impiego non consentito

Definizione della numerosità campionaria per un test BILATERALE				
Valore ipotetico atteso	50,00%			
Errore di stima	50,00%			
Probabilità che il valore vero cada nell'intervallo	1,00	➔	Probabilità errore di campionamento	0,00
Popolazione N	100000			
Ampiezza dell'intervallo entro cui cade il "valore vero"	estremo inferiore	0,00%	estremo superiore	100,00%
Popolazione campionaria n	11			

Per appezzamenti più piccoli, si consiglia di campionare almeno 10 piante. Per coltivazione di grandi dimensioni, considerando che l'aumento della popolazione N (numero di piante) non influenza in modo significativo la numerosità campionaria, si suggerisce di procedere come di seguito riportato:
 ≤ 10 ha campionare 11 piante
 10-20 ha campionare 22 piante
 ≥ 20 ha campionare 33 piante

Il materiale vegetale prelevato da ogni pianta costituisce un campione elementare (CE) I CE ottenuti vengono riuniti per formare il campione globale (CG) che dopo macinazione andrà a formare i campioni finali (CF) da sottoporre ad analisi. E' consigliabile raggiungere un peso pari a circa 0,5 Kg per permettere la formazione di CF con un peso sufficiente allo svolgimento delle analisi in PCR.

Contaminazione accidentale

In figura 3 è riportata la numerosità campionaria per verificare la presenza di contaminazione accidentale. Per una percentuale pari allo 0.5% di mais GM (test unilaterale, con errore di stima dello 0.5% e significatività del 90%) in una popolazione di circa 100.000 piante, pari a circa 1 ha di terreno, attraverso il prelievo su un numero di piante pari a circa lo 0,5% di quelle presenti in campo (326).

Fig.3 popolazione campionaria per contaminazione accidentale

Definizione della numerosità campionaria per un test UNILATERALE				
Valore ipotetico atteso	0,50%			
Errore di stima	0,50%			
Probabilità che il valore vero cada nell'intervallo	0,90	➔	Probabilità errore di campionamento	0,10
Popolazione N	100000			
Ampiezza dell'intervallo entro cui cade il "valore vero"	estremo inferiore	0,50%	estremo superiore	1,00%
Popolazione campionaria n	326			



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
Nutrizione Sanità Pubblica Veterinaria

Come già riportato, al crescere della numerosità N della popolazione di origine, la numerosità n campionaria tende a rimanere costante. Quindi applicando il modello statistico ad una popolazione superiore a $N=100000$ l'aumento della popolazione campionaria è trascurabile, questo consente la sua applicazione anche a campi di maggiore estensione.

Il materiale vegetale prelevato da ogni pianta costituisce un campione elementare (CE). I CE ottenuti vengono riuniti per formare il campione globale (CG) che dopo macinazione andrà a formare i campioni finali (CF) da sottoporre ad analisi.

Gli esempi riportati rappresentano un buon compromesso tra affidabilità dei risultati e praticabilità delle operazioni di campionamento.

Trasporto, ricezione e conservazione dei campioni presso il laboratorio di riferimento

Il trasporto dei campioni globali alla sede del laboratorio incaricato avviene tramite contenitori refrigerati. Durante la fase di ricezione e conservazione dei campioni, il laboratorio adotta tutte le precauzioni necessarie a prevenire ed escludere qualsiasi rischio di alterazione e/o di contaminazione.

Per garantire la rappresentatività dei campioni finali è necessario che le sei aliquote o campioni finali vengano formati dal campione globale omogeneizzato mediante macinazione di tutte le foglie. Questa operazione deve quindi essere effettuata in un laboratorio che dispone delle attrezzature necessarie allo scopo.

Riepilogo delle procedure di campionamento

Periodo di campionamento	Preferibilmente prima della fase di fioritura
Materiale da campionare	Foglie
Dimensione del campione elementare	Foglia o porzione di foglia a seconda della finalità del controllo
Campionamento	<ul style="list-style-type: none">- individuare le aree di prelievo in base alla morfologia e le dimensioni del campo (minimo 10).- prelevare da ciascuna pianta campionata una singola porzione di foglia (campione elementare)- raggruppare in un'unica busta i campioni elementari per formare il campione globale
Cartellino di identificazione (da compilare e apporre sulla busta)	<ul style="list-style-type: none">- codice di identificazione del campione- materiale campionato- data del campionamento- firma dell'ispettore



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
Dipartimento di Sicurezza Alimentare,
Nutrizione Sanità Pubblica Veterinaria

Verbale di ispezione	- compilare il verbale di ispezione*
Verbale di campionamento	- compilare il verbale di campionamento**
Misure cautelative	<ul style="list-style-type: none">- guanti monouso- pulizia dell'attrezzatura usata per ottenere il campione- usare solo buste richiudibili e assicurarsi della corretta chiusura
Trasporto	Effettuare il trasporto dei campioni globali, dal campo alla sede del laboratorio incaricato alla formazione dei campioni finali, tramite contenitori termici
Strumenti utili	<ul style="list-style-type: none">- guanti in lattice monouso- forbici o altro materiale utile per il prelievo- sacchi di plastica tipo rifiuti o sacchetti di plastica da congelatore- contenitori termici e siberini- cartellini di identificazione e sigilli di garanzia numerati

*verbale di ispezione di cui al modello E dell'Allegato II al decreto ministeriale 8 novembre 2017: **Modello di verbale d'ispezione per l'accertamento di sospetta coltivazione di OGM vietata ai sensi del Titolo III bis del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224 accompagnato dal**

**verbale di campionamento di cui al modello F dell'Allegato II del decreto ministeriale 8 novembre 2017.