



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

CAMPIONAMENTO DI PIANTE DI MAIS PER LA VIGILANZA SUL DIVIETO DI COLTIVAZIONE DEL MAIS GENETICAMENTE MODIFICATO MON 810 IN ITALIA

Marzia De Giacomo e Barbara De Santis

Indice

• Introduzione	1
• Procedura di campionamento	2
1. Materiale vegetale da prelevare	2
2. Strumenti da utilizzare per il campionamento	3
3. Campione elementari, campione globale e aliquote	3
4. Metodologia di campionamento	4
5. Divieto di coltivazione del mais MON 810	5
6. Contaminazione accidentale	6
7. Formazione delle sei aliquote in campo	7
• Riepilogo della procedura di campionamento	8

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, ora Ministero della Transizione Ecologica, 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;



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

- Documento elaborato dall'Agencia 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 <https://www.arsial.it/wp-content/uploads/page/Procedure-operative-2016.pdf>;

Questo 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 geneticamente modificato (*Zea mais* L.) MON 810 permettendo di vietare la coltivazione di questo mais nei territori elencati nell'allegato alla decisione stessa, Italia compresa.

Procedura di campionamento

1. Materiale vegetale da prelevare

È preferibile effettuare il prelievo di foglie¹ verdi prima della fase di fioritura al fine di:

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

¹In condizioni normali di coltura la lunghezza delle foglie di mais è compresa tra 30 e 150 cm e la larghezza può raggiungere i 15 cm. (da www.assomais.it/caratteristiche-del-mais)



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

2. Strumenti da utilizzare per il campionamento

Per il campionamento si dovrà utilizzare la seguente attrezzatura:

- a) guanti monouso;
- b) taglierini, coltelli da innesto, forbici per l'asportazione delle parti vegetali;
- c) sacchi di plastica per la raccolta delle foglie verdi in campo;
- d) sagome (dime) di 5x5 cm per ricavare le porzioni di foglia;
- e) sacchetti richiudibili di diverse dimensioni o sacchetti antimanomissione;
- f) cartellini identificativi e sigilli di garanzia;
- g) contenitori termici e siberini (o ghiaccio secco) oppure frigorifero portatile;
- h) acqua e alcool denaturato per pulire gli strumenti utilizzati per il prelievo;
- i) strumentazione GPS;
- j) penna/pennarello indelebile.

3. Campione elementare, campione globale e aliquote

Il **campione elementare** è costituito da una porzione 5x5 cm di foglia giovane prelevata da una singola pianta.

Il **campione globale** è costituito dall'insieme dei campioni elementari che, come vedremo, saranno $6 \times n$, dove n è il numero delle foglie prelevate (vedi paragrafo 5), e deve essere omogeneo e sufficiente alla formazione delle 6 aliquote necessarie per le analisi di laboratorio.

Le **aliquote**, ottenute in laboratorio dal campione globale o formate in campo (vedi paragrafo successivo), sono 6 come di seguito riportato:

1. Aliquota per l'analisi di prima istanza;
2. Aliquota per l'analisi dell'identità varietale;
3. Aliquota per titolare/delegato del sito ispezionato;
4. Aliquota per l'analisi di revisione;
5. Aliquota di riserva;
6. Aliquota di riserva per l'autorità giudiziaria.



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

4. Metodologia di campionamento

Il prelievo delle foglie verdi deve essere effettuato in diversi punti del campo; a titolo di esempio si può utilizzare uno degli **schemi per l'individuazione delle aree di prelievo** riportati nella Figura 1.

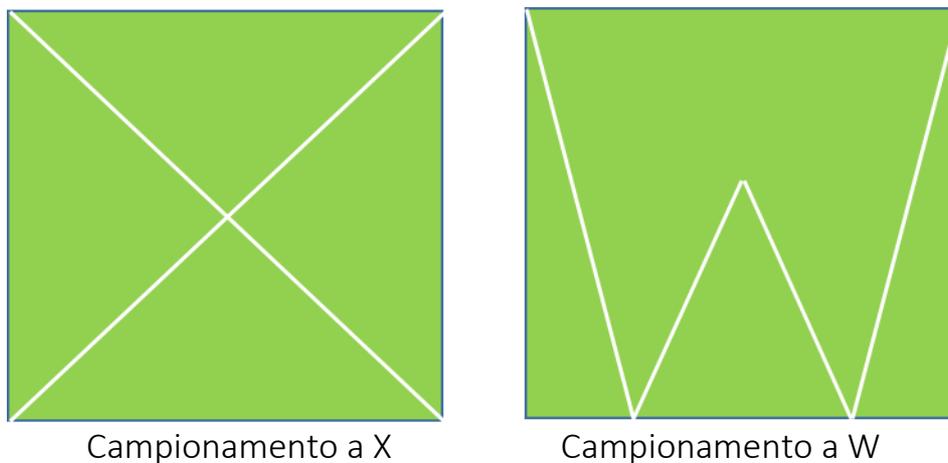


Fig.1. Schemi per l'individuazione delle aree di prelievo

Per agevolare l'individuazione delle aree di prelievo ci si potrà avvalere dell'ausilio di strumentazione GPS. Le aree di prelievo devono essere individuate in base alla morfologia del campo cercando di considerare tutta l'area. Adottando lo schema di campionamento ad X, ad esempio, si possono individuare 11 aree di prelievo di cui 9 lungo le diagonali (N.B. l'incrocio delle diagonali viene considerato una sola volta) e 2 aree di prelievo in corrispondenza della metà dei due lati superiore e inferiore. Da ciascuna area di prelievo si devono campionare 1, 2 o 3 piante a seconda dell'estensione del campo (vedi Paragrafo 5).

In un sacco di plastica di idonee dimensioni si raccolgono, "n" foglie da "n" piante differenti, a seconda delle dimensioni del campo come spiegato nel paragrafo 5.

Da ciascuna foglia si otterranno 6 campioni elementari (6 porzioni da 5x5cm).

Nel caso in cui si proceda alla **formazione delle aliquote in laboratorio** tutti i campioni elementari vanno inseriti in un unico sacchetto a formare il campione globale; il sacchetto va chiuso in campo con il sigillo di garanzia, identificato con il cartellino di identificazione (su cui è riportato il codice di identificazione con il n° verbale di ispezione e il n° verbale di campionamento) e consegnato al laboratorio di



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

riferimento in tempi congrui alla sua corretta conservazione, per impedirne la degradazione, utilizzando contenitori termici e siberini (o ghiaccio secco) oppure un frigorifero portatile.

Nel caso in cui si proceda alla **formazione delle aliquote in campo**(vedi paragrafo 7) ciascun sacchetto contenente l'aliquota va chiuso con il sigillo di garanzia, identificato con il cartellino di identificazione (su cui è riportato il codice di identificazione con il n° verbale di ispezione, il n° verbale di campionamento e il n° progressivo dell'aliquota) e trasferito al laboratorio di riferimento in tempi congrui alla sua corretta conservazione per impedirne la degradazione, utilizzando contenitori termici e siberini o ghiaccio secco oppure un frigorifero portatile.

Dopo ogni singola ispezione occorre pulire gli strumenti utilizzati per il prelievo prima con acqua e successivamente con alcool denaturato.

La formazione delle aliquote è descritta nel paragrafo 7.

Per quanto riguarda il numero di piante da campionare (**calcolo della numerosità campionaria**) può essere facilmente effettuato utilizzando il modello statistico elaborato nell'ambito dello studio sperimentale citato nell'introduzione. La macro sviluppata permette di determinare la numerosità 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.

5. Divieto di coltivazione del mais MON 810

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

Per la vigilanza sul divieto di coltivazione del mais MON810 si ipotizza una percentuale di piante GM elevata. Inoltre deve essere stabilito l'errore di stima che si vuole accettare, il tipo di test (unilaterale o bilaterale) e 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.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
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 campionare 11 piante. Questo numero permette di dire che il “valore vero” cade nell’intervallo compreso tra 0% e 100% (test bilaterale, con errore di stima del 50% e significatività del 100%).

Tab. 1. Numerosità campionaria per la vigilanza sul divieto di coltivazione del mais MON 810

Definizione della numerosità campionaria per un test BILATERALE				
Valore ipotetico atteso	50%			
Errore di stima	50%			
Probabilità che il valore vero cada nell’intervallo	1,00	→	Probabilità errore di campionamento	0
Popolazione N	100.000			
Ampiezza dell’intervallo entro cui cade il “valore vero”	Estremo inferiore	0,00%	Estremo superiore	100%
Numerosità campionaria n	11			

Per appezzamenti più piccoli, si consiglia di campionare ugualmente 11 piante. Per coltivazioni 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.**

6. Contaminazione accidentale

Nel caso in cui l’ispezione abbia lo scopo di verificare l’eventuale contaminazione accidentale di una coltivazione di mais convenzionale con mais GM cambierà il numero di foglie da prelevare.

In questo caso è necessario supporre una percentuale di piante GM (valore ipotetico atteso) nell’intervallo 0,1% - 0,9%.

In tabella 2 è riportata la numerosità campionaria per verificare la presenza di contaminazione accidentale. Per una percentuale pari allo 0,50% di mais GM (test unilaterale, con errore di stima dello 0,5% e significatività del 90%) in una



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

popolazione di circa 100.000 piante, pari a circa 1 ha di terreno, la numerosità campionaria è pari a 326 piante, pari a circa lo 0,5% di quelle presenti in campo.

Tab. 2. Numerosità 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		100.000		
Ampiezza dell'intervallo entro cui cade il "valore vero"	Estremo inferiore	0,50%	Estremo superiore	1,00%
Numerosità campionaria n		326		

Come già riportato, al crescere della numerosità N della popolazione di origine, la numerosità campionaria n tende a rimanere costante. Quindi applicando il modello statistico ad una popolazione superiore a N=100.000 l'aumento della numerosità campionaria n è trascurabile, questo consente la sua applicazione anche a campi di maggiore estensione.

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

7. Formazione delle sei aliquote in campo

Da ogni singola foglia si prelevano 6 porzioni di 5x5cm, che costituiscono altrettanti campioni elementari, e si distribuiscono in 6 sacchetti richiudibili; ciascun sacchetto contenente "n" (11, 22, 33) campioni elementari costituisce una delle sei aliquote previste.

La formazione delle sei aliquote può essere effettuata in campo dall'ispettore o nel laboratorio di riferimento (vedi paragrafo 4). Alla formazione delle sei aliquote in laboratorio deve essere presente l'ispettore ed è invitato ad assistere anche il titolare del sito ispezionato o un suo delegato.

In entrambe i casi il titolare del sito ispezionato o un suo delegato può richiedere la consegna di una delle aliquote, in questo caso dovrà sottoscrivere l'avvenuta consegna nel verbale di campionamento e assicurare la corretta conservazione dell'aliquota.



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

Riepilogo della procedura di campionamento

Periodo di campionamento	Preferibilmente prima della fase di fioritura
Materiale da campionare	Foglie verdi
Dimensione del campione elementare	Porzione di foglia verde da 5X5 cm
Campionamento	<ul style="list-style-type: none">- individuare le aree di prelievo in base alla morfologia e alle dimensioni del campo (minimo 11);- prelevare da ciascuna pianta una singola foglia dalla quale verranno prelevate 6 porzioni da 5x5 cm;- raggruppare in un unico sacchetto richiudibile i campioni elementari per formare il campione globale da inviare al laboratorio oppure- procedere alla formazione delle 6 aliquote direttamente sul campo.
Cartellino di identificazione (da compilare e apporre sul sacchetto richiudibile)	<ul style="list-style-type: none">- codice di identificazione (vedi paragrafo 5);- materiale campionato;- data del campionamento;- firma dell'ispettore.
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 tra un'ispezione e la successiva;- usare sacchetti richiudibili e assicurarsi della loro corretta chiusura.
Trasporto	Effettuare il trasporto del campione globale o delle aliquote, dal campo alla sede del laboratorio di riferimento, tramite contenitori termici
Strumenti da utilizzare	<ul style="list-style-type: none">- guanti monouso;- taglierini, coltelli da innesto, forbici per l'asportazione delle parti vegetali;- sacchi di plastica per la raccolta delle foglie verdi;- sagome (dime) di 5x5 cm per ricavare le porzioni di foglia;- sacchetti richiudibili di diverse dimensioni o sacchetti antimanomissione;- cartellini identificativi e sigilli di garanzia;- contenitori termici e siberini (o ghiaccio secco) oppure frigorifero portatile;- acqua e alcool denaturato per lavare gli strumenti utilizzati per il prelievo;- strumentazione GPS;- penna / pennarello indelebile.

*per il verbale di ispezione fare riferimento 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**

**per il verbale di campionamento fare riferimento al modello F dell'Allegato II del decreto ministeriale 8 novembre 2017.