

PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DI PIANTE AVVENTIZIE ALL'INTERNO DEI SITI DI STOCCAGGIO E MOVIMENTAZIONE DI MATERIALE VEGETALE GENETICAMENTE MODIFICATO DI BARBABIETOLA DA ZUCCHERO, COLZA, COTONE, MAIS E SOIA

Pietro Massimiliano Bianco¹, Valeria Giovannelli¹, Matteo Lener¹, Valentina Rastelli¹, Alfonso Sergio², Giovanni Staiano¹

¹Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

²Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Campania

Sommario

Introduzione	3
Procedura di campionamento.....	5
1. Materiale vegetale da prelevare.....	5
2. Campioni elementari e globali	5
3. Metodologia di campionamento all'interno del sito di stoccaggio	5
3.1. Area di campionamento	5
3.2. Formazione e identificazione del campione globale	5
4. Misure cautelative.....	6
5. Conservazione dei campioni globali.....	6
6. Strumenti utilizzati per il prelievo.....	6
Tabella 1. Riepilogo della procedura di campionamento all'interno del sito di stoccaggio.....	7
ALLEGATO I – SCHEDA DEL SITO	10
ADDENDUM - PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DI PIANTE AVVENTIZIE ALL'ESTERNO DEI SITI DI STOCCAGGIO E MOVIMENTAZIONE DI SEMENTI GENETICAMENTE MODIFICATE DI BARBABIETOLA DA ZUCCHERO, COLZA, COTONE, MAIS E SOIA.....	11
3. Metodologia di campionamento all'esterno del sito di stoccaggio	11
3.1. Area di campionamento	11

3.2. Formazione e identificazione del campione globale	11
Tabella 1 ADDENDUM. Riepilogo della procedura di campionamento all'esterno del sito di stoccaggio	12
ALLEGATO I ADDENDUM – SCHEDA DEL SITO	15

Introduzione

Il presente protocollo di campionamento è stato sviluppato dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca ambientale (ISPRA) su richiesta del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare ai fini dell'attuazione del Piano generale per l'attività di vigilanza sugli organismi geneticamente modificati (OGM) di cui al decreto ministeriale 8 novembre 2017; in particolare si riferisce alla linea di Attività II "Vigilanza relativa all'immissione sul mercato di OGM come tali o contenuti in prodotti, esclusa la coltivazione".

L'immissione sul mercato di OGM in Unione Europea è autorizzata ai sensi della direttiva 2001/18/CE o del regolamento (CE) n. 1829/2003. Il presente protocollo è stato redatto a supporto delle ispezioni sugli OGM attualmente autorizzati in base al regolamento (CE) n. 1829/2003. Questi OGM appartengono alle seguenti specie: barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris* L.), colza (*Brassica napus* L.), cotone (*Gossypium hirsutum* L.), mais (*Zea mays* L.), soia (*Glycine max* (L.) Merr.).

Le ispezioni verranno condotte in quei siti dove il materiale vegetale GM autorizzato viene utilizzato o detenuto per essere messo a disposizione di terzi, e dove è più probabile che possa avvenire una dispersione accidentale con potenziale conseguente insorgenza di piante avventizie.

L'ispettore dovrà compilare un verbale di ispezione di cui al modello C dell'Allegato II al decreto ministeriale 8 novembre 2017, uno per ogni sito, al quale andranno allegati:

- il verbale di campionamento di cui al modello F dell'Allegato II al decreto ministeriale 8 novembre 2017, che è specie-specifico;
- la scheda del sito (in allegato a questo documento), per la registrazione di informazioni utili quali coordinate GPS, osservazioni relative al sito di stoccaggio e all'area circostante (eventuali operazioni di sfalcio o di pulizia con erbicidi effettuate; presenza di popolazioni di selvatiche interfertili o coltivate della stessa specie).

Per l'elaborazione di questo protocollo di campionamento si è fatto riferimento ai seguenti documenti:

- protocollo di campionamento di Brassicacee sviluppato nell'ambito della convenzione ISPRA-ARPA Campania dal titolo "Progetto pilota per la redazione di protocolli di monitoraggio, campionamento e analisi, finalizzato alla valutazione della dispersione accidentale nell'ambiente di

- colza geneticamente modificato nella regione Campania” (non ancora pubblicato);
- documento elaborato dal Consiglio per la ricerca in agricoltura e l’analisi dell’economia agraria (CREA), Centro Difesa e Certificazione, sede di Tavazzano (autrice Elena Perri) dal titolo “Prelievo di materiale vegetale da piante di colza spontanee presenti nei luoghi di stoccaggio di semi destinati alla trasformazione” (non ancora pubblicato);
 - documento di raccomandazioni “Monitoring of Spontaneous Populations of Genetically Modified Plant Species in the Environment - Experiences and Recommendations for the Design of a Monitoring Programme”, preparato per il Gruppo di interesse sugli OGM del network EPA/ENCA dall’Ufficio federale per l’ambiente della Svizzera e dall’Agenzia federale per la conservazione della Natura della Germania, e pubblicate nel 2019 sul sito del network dell’EPA al link https://epanet.eea.europa.eu/reports-letters/reports-and-letters/ig-gmos_monitoring-genetically-modified-plants.pdf/view;
 - documento elaborato dall’Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione dell’Agricoltura del Lazio (ARSIAL) 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>.

All’interno dei siti di stoccaggio dove avviene movimentazione di materiale GM, i titolari dell’azienda sono tenuti ad applicare le norme HACCP (*Hazard Analysis of Critical Control Point*) che includono il trattamento con erbicidi o l’eradicazione manuale delle piante avventizie presenti al fine di ridurre i potenziali rischi connessi alla dispersione accidentale. Tali pratiche non sono applicate all’area esterna al sito, dove quindi è più probabile che piante avventizie, cresciute in seguito a dispersione accidentale di sementi, possano sopravvivere e riprodursi. Per questo motivo l’ISPRA ritiene che, per meglio valutare eventuali effetti ambientali connessi alla dispersione accidentale delle sementi GM movimentate nel sito di stoccaggio, il campionamento dovrebbe essere esteso all’area esterna prospiciente il sito. A tal fine è stato predisposto un protocollo di campionamento applicabile all’esterno del sito di stoccaggio (Addendum).

Procedura di campionamento

1. Materiale vegetale da prelevare

Per facilitare l'estrazione del DNA durante l'attività analitica devono essere prelevate preferibilmente foglie giovani, nel periodo antecedente la fioritura. Nel caso non sia possibile prelevare le foglie, sono comunque da preferirsi altre parti giovani della pianta.

2. Campioni elementari e globali

Le foglie (o le altre parti) prelevate dalla singola pianta costituiscono il campione elementare.

Il campione globale è costituito dall'insieme dei campioni elementari e deve essere omogeneo e sufficiente alla formazione delle aliquote richieste per legge per le analisi di laboratorio. A tal fine da ciascuna pianta dovrà essere prelevata una quantità di tessuto vegetale di circa 20 cm: per barbabietola da zucchero, colza, cotone, soia, che hanno foglie più piccole, potrebbe essere necessario campionare più foglie; per il mais, le cui foglie sono piuttosto lunghe, si potrà scegliere una porzione di circa 20 cm.

Il laboratorio di riferimento procederà a ricavare dal campione globale le aliquote e a conservarle. Alla formazione delle aliquote è invitato ad assistere il titolare del sito di stoccaggio o un suo delegato, se richiesto dall'interessato stesso sul verbale d'ispezione. Una delle aliquote rimane a disposizione del titolare del sito di stoccaggio per eventuali controanalisi.

3. Metodologia di campionamento all'interno del sito di stoccaggio

3.1. Area di campionamento

Il campionamento effettuato all'interno del perimetro del sito deve interessare tutta l'area ricadente in tale perimetro.

Tutti gli individui presenti delle specie oggetto di ispezione devono essere campionati.

3.2. Formazione e identificazione del campione globale

Il campione globale non può essere costituito da più di 50 foglie, perché di difficile gestione per un laboratorio di analisi. Per i siti in cui gli individui da prelevare sono numerosi si suggerisce di fare dei sottocampioni da 10 foglie, da imbustare separatamente e poi raggruppare in un unico sacchetto che andrà a costituire il campione globale. In questo caso anche i sottocampioni vanno identificati (è sufficiente usare un pennarello indelebile) riportando il codice di

identificazione del campione globale e un numero progressivo identificativo da 1 a n, dove n è il numero dei sottocampioni.

Ogni campione globale è confezionato in un sacchetto “presto-chiuso”, su cui si appongono il cartellino di identificazione adesivo e il sigillo di garanzia identificato con un proprio codice alfanumerico.

Il cartellino di identificazione riporta le seguenti indicazioni:

- codice di identificazione del campione globale: è costruito unendo il numero del verbale d'ispezione, il codice del verbale di campionamento (costituito dalla sigla della specie come riportato nella tabella 1 e dal numero progressivo del verbale) e dal numero del sigillo di garanzia;
- materiale campionato: indica la parte della pianta campionata;
- data del campionamento;
- firma dell'ispettore.

4. Misure cautelative

È necessario evitare eventuali contaminazioni da un campione globale all'altro, quindi si raccomanda l'uso di guanti monouso e la pulizia dell'attrezzatura utilizzata (con soluzione disinfettante cui deve seguire un risciacquo con acqua). I guanti monouso vanno cambiati e l'attrezzatura utilizzata va pulita quando vengono campionate specie diverse nello stesso sito di ispezione e quando l'ispezione prevede il campionamento in siti diversi. Inoltre è necessario l'utilizzo di sacchetti richiudibili per i sottocampioni e “presto-chiuso” per il campione globale di cui si assicurerà l'effettiva chiusura.

5. Conservazione dei campioni globali

I campioni globali confezionati devono essere conservati all'interno di contenitori termici (come borse-frigo con siberini o ghiaccio secco oppure frigoriferi portatili) a una temperatura di +4°C fino alla consegna al laboratorio di analisi, che deve avvenire quanto prima possibile. I campioni vanno consegnati direttamente al laboratorio; in alternativa si possono spedire tramite corriere, utilizzando sistemi che garantiscano il mantenimento della temperatura controllata.

6. Strumenti utilizzati per il prelievo

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

- guanti monouso;

- soluzione disinfettante;
- acqua;
- forbici o altro materiale utile per il prelievo delle parti vegetali;
- sacchetti richiudibili e sacchetti “presto-chiuso”;
- contenitori termici e siberini o ghiaccio secco oppure frigorifero portatile;
- cartellini di identificazione adesivi e sigilli di garanzia numerati;
- penna / pennarello indelebile.

Tabella 1. Riepilogo della procedura di campionamento all'interno del sito di stoccaggio

Specie autorizzate all'immissione sul mercato in UE ai sensi del regolamento (CE) 1829/2003	<ul style="list-style-type: none"> - barbabietola da zucchero (<i>Beta vulgaris</i> L.); - colza (<i>Brassica napus</i> L.); - cotone (<i>Gossypium hirsutum</i> L.); - mais (<i>Zea mays</i> L.); - soia (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.).
Sigla specie	<ul style="list-style-type: none"> - barbabietola da zucchero (BA); - colza (COL); - cotone (COT); - mais (MA); - soia (SO).
Periodo di campionamento	periodo antecedente la fioritura, da verificare in base alle condizioni climatiche regionali.
Materiale da campionare	foglia giovane.
Dimensione del campione elementare	circa 20 cm.
Campionamento all'interno del sito di stoccaggio	<ul style="list-style-type: none"> - l'area di campionamento è tutta l'area all'interno del perimetro del sito di stoccaggio; - campionare tutti gli individui presenti delle specie oggetto di ispezione; - fino a 50 foglie: il campione globale, specie-specifico, è costituito dai campioni elementari raggruppati in un unico sacchetto, sigillato e identificato con il cartellino di identificazione e il sigillo di garanzia; - oltre le 50 foglie: il campione globale,

	<p>specie-specifico, è costituito da sottocampioni da 10 foglie imbustati separatamente e poi raccolti in un unico sacchetto “presto-chiuso”, sigillato e identificato con il cartellino di identificazione e il sigillo di garanzia;</p> <ul style="list-style-type: none"> - i sottocampioni devono essere identificati riportando sul sacchetto il codice di identificazione del campione globale e un numero progressivo identificativo da 1 a n dove n è il numero dei sottocampioni.
Cartellino di identificazione (da compilare e apporre sul sacchetto del campione globale)	<ul style="list-style-type: none"> - codice di identificazione del campione; - materiale campionato (parte della pianta); - data del campionamento; - firma dell'ispettore.
Codice di identificazione del campione globale	<ul style="list-style-type: none"> - numero del verbale d'ispezione; - codice del verbale di campionamento (costituito dalla sigla della specie come riportato sopra e dal numero progressivo del verbale); - numero del sigillo di garanzia.
Misure cautelative	<ul style="list-style-type: none"> - indossare guanti monouso e cambiarli nei casi indicati nel paragrafo 4; - pulizia dell'attrezzatura usata per ottenere il campione; - per i sottocampioni usare sacchetti richiudibili; - per il campione globale usare solo sacchetti “presto-chiuso” e assicurarsi della corretta chiusura.
Conservazione	assicurare il mantenimento del campione a una T di 4°C, fino alla consegna al laboratorio.
Strumenti utili	<ul style="list-style-type: none"> - guanti monouso; - soluzione disinfettante; - acqua; - forbici o altro materiale utile per il prelievo;

	<ul style="list-style-type: none">- sacchetti richiudibili e “presto-chiuso”;- contenitori termici e siberini o ghiaccio secco o frigorifero portatile;- cartellini di identificazione e sigilli di garanzia numerati;- penna / pennarello indelebile.
--	---

ALLEGATO I - SCHEDE DEL SITO

Numero verbale di ispezione

Data

Nome sito di stoccaggio	
Coordinate geografiche GPS	
Area di campionamento	Indicare orientativamente le dimensioni
Osservazioni	Indicare se sono state effettuate eventuali operazioni di sfalcio o di pulizia con erbicidi. Indicare la presenza di popolazioni di selvatiche interfertili della stessa specie prelevata.

Specie oggetto di ispezione	Codice specie	N. individui campionati	N. sottocampioni	Codice campione
Barbabietola da zucchero	BA			
Colza	COL			N. verbale ispezione-COL-N. verbale campionamento-N. sigillo
Cotone	COT			
Mais	MA			
Soia	SO			

Nome ispettore

Firma

ADDENDUM - PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DI PIANTE AVVENTIZIE ALL'ESTERNO DEI SITI DI STOCCAGGIO E MOVIMENTAZIONE DI SEMENTI GENETICAMENTE MODIFICATE DI BARBABIETOLA DA ZUCCHERO, COLZA, COTONE, MAIS E SOIA

Questo ulteriore protocollo è un addendum del “PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DI PIANTE AVVENTIZIE ALL'INTERNO DEI SITI DI STOCCAGGIO E MOVIMENTAZIONE DI SEMENTI GENETICAMENTE MODIFICATE DI BARBABIETOLA DA ZUCCHERO, COLZA, COTONE, MAIS E SOIA”.

Quanto riportato nell'Introduzione e nei paragrafi 1, 2, 4, 5 e 6 del documento di riferimento indicato sopra è valido e applicabile anche nel contesto del campionamento all'esterno del sito di stoccaggio.

Di seguito quindi si riportano solo le specifiche relative alla metodologia di campionamento di piante avventizie all'esterno dei siti di stoccaggio (paragrafo 3), alla tabella riepilogativa e alla scheda del sito (allegato I).

3. Metodologia di campionamento all'esterno del sito di stoccaggio

3.1. Area di campionamento

L'area di campionamento, immediatamente prospiciente il sito di stoccaggio, deve essere di 1 km². Nel caso non sia possibile definire un'area di tali dimensioni (perché nell'area individuata ci sono proprietà private o comunque essa non sia accessibile), si raccomanda di effettuare il campionamento lungo la strada pubblica, secondo un transetto lineare di minimo 2 km e massimo 5 km. La metodologia di campionamento si differenzia in base alla densità degli individui di piante avventizie delle specie oggetto di ispezione. Si possono verificare due possibili situazioni: situazione di bassa densità (≤ 30 piante/4 m²), campionare ogni individuo delle specie oggetto di ispezione; alta densità (> 30 piante / 4 m²), campionare in maniera random il 20% degli individui delle specie oggetto di ispezione.

3.2. Formazione e identificazione del campione globale

Il campione globale non può essere costituito da più di 50 foglie, perché di difficile gestione per un laboratorio di analisi. Per i siti in cui gli individui da prelevare sono numerosi si suggerisce di fare dei sottocampioni da 10 foglie, da imbustare separatamente e poi raggruppare in un unico sacchetto che andrà a costituire il campione globale. In questo caso anche i sottocampioni vanno identificati (è sufficiente usare un pennarello indelebile) riportando il codice di identificazione del campione globale e un numero progressivo identificativo da 1 a n, dove n è il numero dei sottocampioni.

Ogni campione globale è confezionato in un sacchetto “presto-chiuso”, su cui si appongono il cartellino di identificazione adesivo e il sigillo di garanzia identificato con un proprio codice alfanumerico.

Il cartellino di identificazione riporta le seguenti indicazioni:

- codice di identificazione del campione: identifica il campione globale ed è costruito unendo il numero del verbale d’ispezione, il codice del verbale di campionamento (costituito dalla sigla OUT*, dalla sigla della specie come riportato nella tabella 1 e dal numero progressivo del verbale) e dal numero del sigillo di garanzia;
- materiale campionato: indica la parte della pianta campionata;
- data del campionamento;
- firma dell’ispettore.

* Si suggerisce l’utilizzo della sigla OUT per distinguere i campioni prelevati all’esterno da quelli prelevati all’interno del sito di stoccaggio.

Tabella 1 ADDENDUM. Riepilogo della procedura di campionamento all’esterno del sito di stoccaggio

Specie autorizzate all'immissione sul mercato in UE ai sensi del regolamento (CE) 1829/2003	<ul style="list-style-type: none"> - barbabietola da zucchero (<i>Beta vulgaris</i> L.); - colza (<i>Brassica napus</i> L.); - cotone (<i>Gossypium hirsutum</i> L.); - mais (<i>Zea mays</i> L.); - soia (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.).
Sigla specie	<ul style="list-style-type: none"> - barbabietola da zucchero (BA); - colza (COL); - cotone (COT); - mais (MA); - soia (SO).
Periodo di campionamento	periodo antecedente la fioritura, da verificare in base alle condizioni climatiche regionali.
Materiale da campionare	foglia giovane.
Dimensione del campione elementare	circa 20 cm.
Campionamento all'esterno del sito di stoccaggio	<ul style="list-style-type: none"> - l’area di campionamento è 1 km² o transetto lineare di 2-5 km; - in situazione di bassa densità (≤ 30 piante/4 m²), campionare ogni individuo delle specie oggetto di ispezione; - in situazione di alta densità (> 30 piante/4

	<p>m²), campionare il 20% degli individui delle specie oggetto di ispezione, in maniera random;</p> <ul style="list-style-type: none"> - fino a 50 foglie: il campione globale, specie-specifico, è costituito dai campioni elementari di ogni specie raggruppati in un unico sacchetto, sigillato e identificato con il cartellino di identificazione e il sigillo di garanzia; - oltre le 50 foglie: il campione globale, specie-specifico, è costituito da sottocampioni da 10 foglie imbustati separatamente e poi raccolti in un unico sacchetto, sigillato e identificato con il cartellino di identificazione e il sigillo di garanzia; - i sottocampioni devono essere identificati riportando sul sacchetto il codice di identificazione del campione globale e un numero progressivo identificativo da 1 a n dove n è il numero dei sottocampioni.
<p>Cartellino di identificazione (da compilare e apporre sul sacchetto del campione globale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - codice di identificazione del campione; - materiale campionato (parte della pianta); - data del campionamento; - firma dell'ispettore.
<p>Codice di identificazione del campione globale OUT</p>	<ul style="list-style-type: none"> - numero del verbale d'ispezione; - codice del verbale di campionamento (costituito dalla sigla OUT, dalla sigla della specie come riportato sopra e dal numero progressivo del verbale); - numero del sigillo di garanzia.
<p>Misure cautelative</p>	<ul style="list-style-type: none"> - indossare guanti monouso e cambiarli nei casi indicati nel paragrafo 4; - pulizia dell'attrezzatura usata per ottenere il campione; - per i sottocampioni usare sacchetti richiudibili; - per il campione globale usare solo sacchetti "presto-chiuso" e assicurarsi della corretta chiusura.

Conservazione	assicurare il mantenimento del campione a una T di 4°C, fino alla consegna al laboratorio.
Strumenti utili	<ul style="list-style-type: none">- guanti monouso;- soluzione disinfettante;- acqua;- forbici o altro materiale utile per il prelievo;- sacchetti richiudibili e “presto-chiuso”;- contenitori termici e siberini o ghiaccio secco o frigorifero portatile;- cartellini di identificazione e sigilli di garanzia numerati;- penna / pennarello indelebile.

ALLEGATO I ADDENDUM – SCHEDA DEL SITO

Numero verbale di ispezione

Data

Nome sito di stoccaggio	
Coordinate geografiche GPS	
Area di campionamento	Specificare se 1 km ² o transetto lineare di 2-5 km
Osservazioni	Indicare se sono state effettuate eventuali operazioni di sfalcio o di pulizia con erbicidi. Indicare la presenza di popolazioni di selvatiche interfertili o coltivate della stessa specie prelevata. Indicare il tipo di area (urbana, naturale, semi-naturale)

Specie oggetto di ispezione	Codice specie	N. individui campionati	N. sottocampioni	Codice campione
Barbabietola da zucchero	BA			
Colza	COL			N. verbale ispezione-OUT*- COL-N. verbale campionamento-N. sigillo
Cotone	COT			
Mais	MA			
Soia	SO			

* Si suggerisce l'utilizzo della sigla OUT per distinguere i campioni prelevati all'esterno da quelli prelevati all'interno del sito di stoccaggio.

Nome ispettore

Firma