

ENGL Working Group "Seed Testing" (WG-ST) Report



Elena Perri

CRA-SCS Sede di Tavazzano - Laboratorio

Roma, 11-12 maggio 2015

WG-ST: il contesto

La situazione attuale:

- gli Stati Membri eseguono test sui lotti di sementi per testare la presenza di semi GM in lotti di sementi convenzionali.
- non esistono linee guida per testare lotti di sementi



WG-ST: il mandato

È stato richiesto da EC di preparare un parere riguardante l'analisi su campioni di sementi per la presenza non intenzionale di semi GM.

- per formulare questo parere il WG-ST tiene conto delle pratiche correnti di analisi delle sementi GM negli Stati membri dell'Unione Europea.
- poiché il limite di rilevamento pratico per le sementi GM in lotti di sementi convenzionali può essere abbassato mediante l'impiego di piani di sottocampionamento e con maggior sforzo nel test

*WGST è stato incaricato di valutare la relazione tra
sforzo (costi e fattibilità)
e limite teorico di rilevazione per le colture più importanti*

WG-ST: il lavoro

- 1° meeting (maggio 2014)
discussione e impostazione del lavoro
- 2° meeting (settembre 2014)
discussione finale e preparazione del documento
- presentazione del documento al ENGL Plenary meeting (dicembre 2014)
- aggiustamenti al documento
- presentazione del documento a DG SANTE, in valutazione

Niccolo Bassani (JRC)

Catelijne van Beekvelt (ILT, Netherlands)

Anke Belter (LAU, Germany)

Marc De Loose (ILVO, Belgien)

Luth Grohmann (BVL, Germany)

Ottmar Görlich (LGL, Germany)

Rupert Hochegger (AGES, Austria)

Joachim Kreysa (JRC)

Roy Macarthur (FERA, UK)

Marco Mazzara (JRC)

Heather Owen (SASA, UK)

Elena Perri (CRA, Italy)

Bojan Rajcevic (JRC)

Mathieu Rolland (GEVES, France)

Christian Savini (JRC)

Brigitte Speck (LTZ, Germany)

Slawomir Sowa (IHAR, Poland)

Daniela Villa (CRA, Italy)

WG-ST: la struttura

1. Introduction

- 1.1. Global seed market: relevance of the issue
- 1.2. Testing of seed lots for the unintentional presence of GM seeds
- 1.3. Review of the FVO reports of audits carried out in EU member states on the official control of genetically modified organisms (2009 - 2013)
- 1.4. Review of the questionnaire on GMO seed testing practice in EU Member States

2. Mandate

3. Definitions

4. EU legal basis on seed materials

5. The International Seed Testing Association and its Rules

- 5.1. ISTA rules for sampling

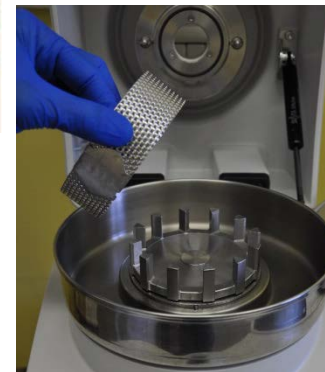
6. Seed testing workflow

- 6.1 Sampling
- 6.2 Setting up a test plan
- 6.3 Working sample/preparation and processing of sub-samples
- 6.4 Grinding
- 6.5 DNA-Extraction
- 6.6 Qualitative analysis by PCR

7. Test plan performance and related costs

Annex 1. Comparison of sampling definitions between CEN standards and ISTA rules

Annex 2. Estimation of limits of detection for test plans to detect GM seeds in seed lots



Relazione tra test plan e costi

Considerazioni

- un piano di sottocampionamento (test plan) si ottiene combinando la dimensione del campione con un certo numero di sottocampioni.
- i test plan comunemente impiegati sono in grado di fornire in modo affidabile un limite di rilevazione di circa il 0,1% di sementi geneticamente modificate in lotti di sementi:

Es. con l'impiego di Seedcalc. :

- campione di 3000 semi
- 3 sottocampioni di 1000 semi
 - se 3 sottocampioni negativi
 - %semi GM nel lotto $< 0,1\%$ con una probabilità 95%

Scopo principale del lavoro:

applicando test plan alternativi mostrare gli *effetti* su:

- ❖ LOD del test plan (da 0,1% a 0,01%)
- ❖ costi del test plan
 - >la dimensione del campione e/o >il numero di sottocampioni:



costi



LOD

Relazione tra test plan e costi

L'aumento di costo è dovuto:

- *proprietà del seme* (dimensione del genoma, del seme,...)
- *la strumentazione* impiegata (tipo di mulino)

Il documento:

- annex 2: “stima del limite di detection per i diversi test plan” (analisi statistica del test)
- assunzioni che definiscono quanto sforzo è richiesto per raggiungere il LOD di un test plan e il costo associato allo sforzo:
 - il lotto è funzionalmente omogeneo (variazioni nel lotto hanno solo un piccolo effetto sulla proporzione di OGM che si sta stimando)
 - il campionamento e l'estrazione di DNA sono imparziali rispetto la presenza di semi GM
 - il DNA è uniformemente disperso nell'estratto
 - 200ng DNA per reazione di PCR
 - %falsi positivi associata al test PCR bassa
 - PCR applicata a DNA fornisce un risultato positivo con una probabilità del 95% se almeno 10 copie di DNA (10 copie al LOD) da ogni seme del campione di lavoro sono presenti in PCR
 - limite massimo in volume di seme macinato in un'unica soluzione è di 800ml

Relazione tra test plan e costi

Relazione tra la stima di costo e il limite di rilevazione di un test plan (es. mais)

LOD of test plan	Working sample size (seeds)	Subsamples	Grinds	Cost
5%	68	2	2	69%
0,9%	378	2	2	69%
0,5%	680	2	2	69%
0,1%	3279	3	3	100%
0,05%	6435	5	5	162%
0,01%	31668	21	21	654%
0,005%	63210	42	42	1300%

- il LOD del piano è tra 5% e 0.005%
- campioni di dimensioni diverse sono combinati con un diverso numero di sottocampioni
- probabilità di falsi negativi in PCR $\leq 5\%$ (dove almeno 10 copie di DNA sono presenti)
- i costi sono stati normalizzati per il limite di detection di 0.1% di semi GM



Grazie per l'attenzione!

Elena Perri
CRA-SCS
Sede di Tavazzano Laboratorio
elena.perri@entecra.it