9 788890 365386

www.life-demetra.eu

Regione Toscana

Ente Parco Regionale
Migliarino San Rossore
Massaciuccoli

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF

Sviluppo di una metodologia per l'analisi dell'impatto ambientale degli OGM: il progetto DEMETRA

Beneficiari

Istituto di Genetica Vegetale, UOS Firenze,
CNR (Coordinatore)
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari
e Forestali (GESAAF), Università di Firenze
Ente Parco Regionale Migliarino San Rossore Massaciuccoli
Regione Toscana

Durata progetto LIFE/08/NAT/IT/342 DEMETRA

01/01/2010 - 30/06/2013

Contatti del progetto
Coordinatore e responsabile scientifico

Cristina Vettori - CNR-IGV
Madonna del Piano 10
50019 Sesto Fiorentino
Firenze (Italia)
Uff. +39 055 5225728
Fax +39 055 5225729
cristina.vettori@cnr.it

Project Manager

Laura Bartalucci - Regione Toscana
Via di Novoli, 26
50127 - Firenze (Italia)
Uff. +39 055 4385268
Fax +39 055 4383134
laura.bartalucci@regione.toscana.it

Coordinamento Tecnico

Communication Manager
Alvaro Fruttuosi - Regione Toscana

Staff della Comunicazione

Marco Sulas - Regione Toscana
Simonetta Demuro - Regione Toscana

Si ringrazia per la traduzione
Mauro Catarzi - Regione Toscana

Website

www.life-demetra.eu

Sviluppo di una metodologia per l'analisi dell'impatto ambientale degli OGM: il progetto DEMETRA

Regione Toscana

Ente Parco Regionale Migliarino San Rossore Massaciuccoli

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF
DIPARTIMENTO DI GESTIONE DEI SISTEMI AGRARI, ALIMENTARI E FORESTALI

Sviluppo di una metodologia per l'analisi dell'impatto ambientale degli OGM: Il Progetto Demetra

Editori: Cristina Vettori, IGV-CNR, Italy, Davide Travaglini, GESAAF-UNIFI, Italy, Laura Bartalucci, Regione Toscana, Italy, Carla Lazzarotto, Regione Toscana, Italy, Donatella Paffetti, DISPAA-UNIFI, Italy, Lorenzo Chelazzi, ISE-CNR, Italy, Antonio Perfetti, Parco MSRM, Italy

Prefazione pag. 5

Capitolo 1
Descrizione delle aree di studio pag. 9

Capitolo 2
Flusso pollinico e ibridazione pag. 19
2.1 - Flusso Pollinico pag. 19
2.2 – Ibridazione pag. 27

Capitolo 3
Valutazione della biodiversità pag. 39
3.1 - Diversità vegetale (analisi floristica e vegetazionale) pag. 39
3.2 - Diversità dei macroinvertebrati pag. 59
3.3 - Diversità dei microrganismi pag. 79

Capitolo 4
Descrizione di un metodo di analisi per stabilire i rischi associati alle piante geneticamente modificate nell'ambiente pag. 99

Capitolo 5
Sistemi informativi gografici per la valutazione del rischio ambientale e il monitoraggio degli OGM pag. 121

Capitolo 6
La presenza della Regione Toscana nel Progetto Demetra pag. 139

Prefazione

Cristina Vettori[1], Laura Bartalucci[2], Carla Lazzarotto[2], Donatella Paffetti[3], Antonio Perfetti[4], Davide Travaglini[5]

[1]Istituto di Genetica Vegetale, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [2]Regione Toscana, Via di Novoli, 26, 50127 Florence (Italia); [3]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italia); [4]Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli, Loc. Cascine Vecchie, Tenuta di San Rossore, 56122 Pisa (Italia); [5]Dipartmento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Università di Firenze, Via San Bonaventura 13, 50145, Firenze (Italia)

Nel 2008 il programma comunitario LIFE+ dette l'opportunità di presentare un progetto per sviluppare e approfondire il tema della valutazione sperimentale dei rischi degli Organismi Geneticamente Modificati (OGM), tramite lo sviluppo di specifici sistemi di monitoraggio ambientale. A quel tempo l'Italia delineava un quadro legislativo che implicava la necessità di definire le regole di coesistenza per adempiere in pieno ai suoi obblighi con le leggi Comunitarie, ottemperando alla legislazione nazionale in vigore (legge n. 5/2005). In questo quadro regolatorio, la Regione Toscana promosse l'idea di sviluppare un progetto LIFE+ sul tema del monitoraggio degli OGM, per provare a colmare la lacuna relativa alla mancanza di strumenti standardizzati per dare corso al monitoraggio ambientale degli OGM e, nello stesso tempo, rispondere alla necessità di proteggere il suo territorio dai rischi generati dalle colture transgeniche.
Il progetto DEMETRA ("DEvelopment of a quick Monitoring index as a tool to assess Environmental impacts of Transgenic crops", cioè "Sviluppo di un indice di monitoraggio rapido come strumento per valutare l'impatto ambientale delle colture transgeniche") contribuisce a costruire una base comune a livello Comunitario per il monitoraggio degli OGM nell'ambiente, sia che siano coltivati per usi commerciali, sia che siano usati per scopi di ricerca.
L'obiettivo principale del progetto è la creazione di uno strumento innovativo per indirizzare rapidamente le opere di monitoraggio che gli Enti Pubblici dovrebbero implementare nei loro territori nei quali siano coltivate piante transgeniche. In particolare, su quando, dove e come la raccolta dei dati dovrebbe essere attivata.

Dove, quando e come indirizzare gli sforzi delle Autorità Pubbliche per la Sorveglianza Generale, per il monitoraggio di possibili effetti collaterali delle Piante Geneticamente Modificate (PGM), è l'obiettivo principale di questo progetto.
Un obiettivo che è particolarmente rilevante per gli enti pubblici che devono gestire direttamente problemi correlati con la coltivazione commerciale di PGM (come nel caso delle Regioni Italiane).
Questo progetto è stato sviluppato partendo dalle assunzioni messe in evidenza nei

“Risultati del Gruppo di Lavoro CE sulle Note d’indirizzo a integrazione dell’Allegato VII della Direttiva 2001/18/CE” (F. Gref, A. De Schrijver, B. Murray), le quali indicano che:

- non c’è alcuna indicazione su come i programmi di monitoraggio esistenti e gli schemi di infrastrutture di dati potrebbero supportare il monitoraggio degli OGM;
- non c’è nessun quadro normativo per regolare il coordinamento e l’armonizzazione del monitoraggio dei dati relativi agli OGM;
- i dati di monitoraggio dovrebbero includere dati numerici grezzi normalizzati, pronti ad essere analizzati da un sistema informatizzato.

Il progetto DEMETRA mira, con particolare riferimento all’ultimo punto in elenco, alla creazione di un “Quick Monitoring Index” (QMI), un indice di monitoraggio rapido, per la valutazione dei rischi potenziali generati da un insieme selezionato di colture transgeniche in ecosistemi o biotopi ben determinati.

L’indice tiene conto:
del livello di rischio generato da un insieme di potenziali colture transgeniche usate in un’area di studio
delle potenziali interazioni tra queste PGM e alcuni rilevanti parametri biologici, fisici e climatici raccolti e analizzati in alcuni siti nelle aree di studio.
L’indice è stato implementato in un Sistema Informativo Geografico (GIS) che, basandosi su dati geografici, può essere utilizzato per monitorare e mappare il livello di rischio generato da piante transgeniche in una determinata zona, sia che queste PGM siano realmente coltivate, sia che la loro presenza sia solo simulata.

Risultati del progetto

Le piattaforme QMI e GIS alimentate con i dati necessari, possono essere usate come uno strumento per mappare il livello di rischio ambientale generato da coltivazioni transgeniche in uno specifico ecosistema.
Inoltre, il progetto fornisce le linee guida per scegliere correttamente gli elementi da considerare durante la predisposizione di un sistema di monitoraggio.
Il progetto ha dato la possibilità di acquisire una serie di dati sulla biodiversità in aree dove le colture transgeniche non sono mai state usate. I data-set risultanti, riportati nei capitoli di questo libro, possono essere utilizzati al momento in cui delle colture transgeniche diventino di uso comune, permettendo una comparazione fra i parametri collegati alla biodiversità osservati.
Il sistema è stato studiato per una reale esportabilità in altre situazioni, ma lavorerà realmente solo dove un largo spettro di informazioni ambientali sia stato rilevato e reso disponibile per la Stima di Rischio Ambientale (Environmental Risk Assessment = ERA) e le applicazioni GIS.

Il progetto ha anche contribuito agli obiettivi della Comunicazione della Commissione COM (2006) 216 definitivo: “Fermare la perdita di Biodiversità entro il 2010 – e oltre” con particolare riguardo a:

- Settore 1:

Obiettivo 1 “Salvaguardare gli habitat e le specie più importanti dell’UE”, infatti il progetto ha mirato alla definizione di sistemi di monitoraggio corretti per gli OGM in aree sensibili;
Obiettivo 5 “Ridurre sensibilmente l’impatto delle specie esotiche invasive e dei genotipi esotici sulla biodiversità dell’UE”, dal momento che il progetto ha mirato ad individuare rischi particolari nell’uso degli OGM, che possono essere considerati come “genoma alieno”;

- Settore 4:

Obiettivo 10 “Potenziare in maniera sostanziale la base di conoscenze per la conservazione e l’uso sostenibile della biodiversità, all’interno dell’UE e nel mondo”, avendo il progetto mirato ad accrescere direttamente le conoscenze sulla biodiversità e le sue tendenze.

Per raggiungere gli obiettivi il progetto ha previsto le seguenti attività:

- Collezionare, analizzare e selezionare i parametri legati a condizioni meteorologiche locali, funzionalità del suolo, catene trofiche, usi del paesaggio, biodiversità e perdita di biodiversità per generare un modello, che è alla base della genesi di un metodo di Valutazione dei Rischi.
- Valutazione dell’idoneità dei dati raccolti rispetto ai più importanti sistemi di monitoraggio e selezione dei più importanti per la definizione di un indice di monitoraggio rapido (QMI).
- Sviluppare l’indice in modo da indicare la perturbazione potenziale che colture transgeniche potrebbero presentare in un certo ecosistema o biotopo con differenti intensità di coltivazione.
- Identificare e creare siti di studio specifici per generare simulazioni di applicazione del QMI.
- Creare una piattaforma GIS per sviluppare dei modelli geografici del QMI.
- Sviluppare linee guida e buone pratiche per applicare gli schemi di monitoraggio in aree ad alto rischio.

Inoltre, dal progetto ci si aspetta un contributo e un incremento delle conoscenze per lo sviluppo di Politiche Europee per la prevenzione dei rischi derivanti dall’uso commerciale delle colture GM.

Capitolo 1

Descrizione delle aree di studio

Cristina Vettori[1], Francesca Bottalico[2], Lorenzo Chelazzi[3], Silvia Fiorentini[2], Donatella Paffetti[4], Valeria Tomaselli[5], Davide Travaglini[2]

[1]Istituto di Genetica Vegetale, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [2]Dipartmento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Università di Firenze, Via San Bonaventura 13, 50145, Firenze (Italia); [3]Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [4]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italia); [5]Istituto di Genetica Vegetale, Consiglio Nazionale delle Ricerche,, via G. Amendola 165/A, 70126 Bari (Italia)

Le aree di studio sono state individuate all'interno del Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli, in provincia di Pisa (Toscana, Italia) (Fig. 1). Quest'area protetta è caratterizzata da una grande diversità di ecosistemi e dalla presenza di aree vocate all'agricoltura. Il progetto è stato focalizzato su tre aree di studio caratterizzate da differenti ecosistemi.

Area 1 (Lago di Massaciuccoli)

Fig. 1. Mappa dell'area del progetto di ricerca.
1. Zone umide del Lago di Massaciuccoli;
2. Pioppeti naturali e aree non coltivate;
3. Boschi misti e pinete, zone umide, aree coltivate

Il "Lago e Padule di Massaciuccoli" (Cod. Natura2000 IT5120021) si estende su un'area totale di 1.908,01 ha, ed è un "Sito d'importanza comunitaria" (SIC) secondo la direttiva 92/43/CEE. Inoltre, il SIC si sovrappone con il "Sito di importanza Regionale" (SIR) secondo la Legge Regionale 56/2000.

Questa zona è completamente compresa nel Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli. Nella zona considerata è compresa un'area protetta gestita dalla Lega Italiana per la Protezione degli Uccelli (LIPU). I terreni agricoli presenti in quest'area ricadono in proprietà private. Elemento tipico della zona è un lago di acqua dolce circondato da formazioni elofitiche (canneti e *Cladium* spp.) e da vegetazione palustre. Altri elementi caratteristici sono boschi mesofili, e profonde pozze di acqua dovute allo scavo della sabbia. Essa è caratterizzata da fitocenosi con *Cladium mariscus* e alter specie rare, come la

Periploca graeca (una delle poche stazioni italiane) e la *Drosera rotundifolia*, una specie di montagna molto rara nelle paludi.
Il Lago di Massaciuccoli e la sua circostante zona palustre è uno dei più importanti habitat umidi in Italia. È caratterizzato da un vasto lago di modesta profondità, in media meno di due metri, con ovvi problemi di eutrofizzazione a estese aree acquitrinose, soprattutto nella sua zona settentrionale.
Gli habitat di interesse comunitario (Annex I Dir. 92/43) sono piccole depressioni su substrato torboso, con una comunità di *Rhynchospora alba* e/o *R. fusca* (codice 71.50), e su paludi torbose neutre-basofile con dominanza di *Cladium mariscus* e/o *Carex davalliana* (codice 72.10). Tra le specie floricole la *Marsilea quadrifolia* è compresa nella Direttiva 92/43, Annex II.
Le specie animali sono molto più numerose; il sito è importantissimo per le specie avicole migratorie e svernanti. Tra le specie riveste certamente grande importanza il tarabuso (*Botaurus stellaris*), per il quale il lago è la più importante area di nidificazione a livello nazionale. Sottolineiamo, poi, la presenza di *Ixobrychus minutus*, *Ardea purpurea*, *Himantopus himantopus*, *Circus aeroginosus* and *Acrocephalus melanopogon*. Tutte queste specie sono collegate principalmente alle aree paludose ed in particolare ai canneti. Gli anfibi *Triturus carnifex*, un endemismo italiano, e il rettile *Emys orbicularis* sono specie di interesse comunitario, citate nell'Annex II della Dir. 92/43/CEE.

Area 2 (fiume Serchio) e Area 3 (fiume Arno)

Queste aree di studio sono nella zona SIC/SIR/ZPS "Selva Pisana" (Cod. Natura 2000 IT5170002) con una superficie totale di 9.648,34 ha. Il sito è interamente compreso nel Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli.
I terreni dell'area interessata dal progetto ricadono nella proprietà del demanio della Regione Toscana, gestita dal Parco Regionale.
La costa sabbiosa, per la maggior parte in regressione, è caratterizzata dalla tipica sequenza di formazioni vegetali delle brughiere sabbiose (comunità di *Cakile maritima*, seseleto, comunità di *Elymus farctus*, comunità di *Ammophyila littoralis*, comunità di *Phragmites australis* e comunità di piante del genere *Juniperus*). L'area è composta dall'habitat della duna costiera e, all'interno, dal sistema di dune fossili e spazi interdunali con alternanza di pinete, con *Pinus pinaster* o *Pinus pinea*, macchia alta, acque interne e terre salmastre, grandi boschi con *Quercus robur*. Le zone umide interne sono caratterizzate da mosaici di associazioni di *Salicornia* sp.pl., formazioni di piante elofitiche come comunità di *Phragmites australis* e comunità di *Carex* sp.pl., e terreni già coltivati, allagati in inverno.
Gli ecosistemi dunali e le zone umide retrodunali ospitano habitat e specie di flora e fauna con alto interesse di conservazione. Uno dei migliori esempi di habitat dunale in Toscana, con scarsa influenza umana, si trova nell'area considerata. L'habitat dunale di questa zona rappresenta uno dei migliori lungo la costa tirrenica e, insieme al vicino sito "Duna costiera di Torre del Lago", il solo in un buono stato di conservazione nella Toscana settentrionale. Queste considerazioni sono collegate agli habitat di interesse UE, come le "Dune mobili

nascenti", "Dune mobili lungo la battigia con *Ammophila arenaria* (dune bianche)", "Vegetazione annua delle linee di deposito marino", e agli habitat di interesse prioritario, come "Dune costiere con *Juniperus* spp." e, nella fascia dietro le dune, "*Acquitrini calcarei* con *Cladium mariscus* e *Caricion davallianae* spp.".
Le zone umide, comprese nell'area considerata, destano interesse a livello nazionale e, talvolta, internazionale, per lo svernamento degli uccelli acquatici e per la sosta durante la migrazione lungo la rotta costiera tirrenica.
L'habitat dunale e retrodunale ospita specie di piante rare, come *Solidago virgaurea* spp. *litoralis* (un endemismo della costa versiliese-pisana), *Stachys recta* var. *psammofila* (endemismo della costa tirrenica), *Periploca graeca* (una delle poche stazioni italiane), e diverse altre popolazioni di specie di interesse UE (in particolare *Burhinus oedicnemus*). Popolazioni in riproduzione di *Rhinolophus ferrumequinum* e *Myotis emarginatus*, specie incluse nell'Annex II della Dir. 92/43/CEE, vivono nell'area considerata. La colonia di *Rhinolophus ferrumequinum* è la sola conosciuta in Toscana e la maggiore in Italia; alcuni individui di questa colonia svernano in un edificio interno al sito.

In ogni area sono state identificate aree di studio permanenti e, tra queste, sotto-aree (sezioni, appezzamenti, ecc.) per la raccolta dei dati (Tab. 1).

Tabella 1. Aree di studio.

	Località	Sistema – sotto-area	Siti di campionamento
AREA 1 (Lago di Massaciuccoli)		Lago	6 punti per biodiversità 32 pioppi
		Pioppeta	30 pioppi
AREA 2 (Fiume Serchio)	Ontanelli	Area non coltivata-parcella S21	21 sotto-appezzamenti
	Fortino nuovo	Bosco misto con pioppo	21 sotto-appezzamenti 30 pioppi
	Fortino nuovo	Piantagioni di pioppo	30 pioppi
AREA 3 (Fiume Arno)	Cuiatta	Area coltivata-Parcella A6	Colture
	Cuiatta	Bosco misto	43 sotto-appezzamenti, 267 *Acer campestre*
	Colmate del Bozzone	Pineti	7 sotto-appezzamenti
	Colmate del Bozzone – Lame	Zone umide	10 appezzamenti

Descrizione della vegetazione dei siti di campionamento e delle aree di studio permanenti

Durante le operazioni di campionamento sono state scelte alcune piante e alcuni alberi (pioppi ed aceri) d'interesse per la ricerca. Le parcelle sono state delimitate, le piante marcate con cartellini, e le loro coordinate geografiche sono state determinate usando un GPS e inserite nel sistema GIS. Le parcelle di studio sono state disegnate secondo lo schema di Dengler (1999) usando un numero di moduli variabile in base all'estensione dell'area sotto esame. In particolare, è stato utilizzato un modulo piramidale con un'area quadrata di base di 1.000 m² e con aree più piccole di 100 m² e 10 m² posizionate lungo la

diagonale principale del quadrato di base. Dentro questi quadrati sono stati compiuti i rilievi di biodiversità vegetazionale, animale e dei microrganismi (Capitolo 4). L'identificazione delle parcelle permanenti ha permesso la ripetizione dei rilievi sulla biodiversità nello stesso punto per tutta la durata dello studio, consentendo la comparazione dei dati tra anni diversi.

Area di studio 1 (Lago di Massaciuccoli)

Il lago di Massaciuccoli ha un'estensione di 2.000 ettari ed è la più importante zona umida in Toscana. Il clima particolare di questa zona ha permesso la sopravvivenza di una vegetazione relitta. La popolazione avicola è molto differenziata. Il lago è un'importante sito di nidificazione e sosta per specie migratorie: infatti ci sono oltre 260 specie di uccelli. L'area di studio chiamata "Anghetto" ha un'estensione di circa 30 ha, ed è localizzata vicino a Massaciuccoli nel comune di Massarosa. È delimitata a nord-ovest dal Lago di Massaciuccoli e per il resto da canali (fosso Navicello) comunicanti con il lago stesso. La vegetazione è costituita principalmente da *Phragmites australis* (canneti) lungo i confini, lungo il lago ed i canali, e da *Cladium mariscus* (carice) nella parte centrale.

Fig. 2. Area di Studio 1 (Lago di Massaciuccoli).

L'intera area è quasi sempre sommersa eccetto i margini più esterni, gli argini, e alcuni punti più elevati, dove sono presenti anche alcuni esemplari spontanei di pioppo (Fig. 2).

In aggiunta alle cannucce e al carice, la vegetazione di questo ambiente è caratterizzata dalla presenza di *Solanum dulcamara*, *Iris pseudoacorus, Osmunda regalis, Hibiscus palustris* e *Periploca graeca.* Nelle acque dei canali e del lago sono specie comuni *Ceratophyllum demersum*, *Potamogeton pectinatus*, *Utricularia australis*, *Lemna gibba* e *Myriophyllum spicatum*.

Dato il particolare tipo di sito, i "punti" di campionamento, distribuiti nell'area meridionale del lago, sono stati identificati e al loro interno sono stati studiate le piante (erbe) e la biodiversità animale. Inoltre, gli esemplari di pioppo sono stati marcati per studiare la variabilità genetica e il flusso genico con una piantagione di pioppi presente vicino alla costa sudoccidentale del lago.

Area di studio 2 (fiume Serchio)

- Pioppeto naturale (Località Fortino nuovo)

L'area include un bosco misto caratterizzato dalla presenza di Pioppo bianco (*Populus alba* L.), Olmo (*Ulmus minor* L.), Frassino meridionale (*Fraxinus oxycarpa* Bieb.), Ontano nero (*Alnus glutinosa* L.), Pioppo grigio (*Populus x canescens* ((Aiton) Sm.)) e alcuni esemplari

di Farnia (*Quercus robur* L.). Questa formazione, pur avendo una fisionomia simile a una fustaia , è composta sia da individui originati da seme, sia da individui sviluppatesi da polloni. La copertura è irregolare e la rinnovazione è scarsa.

Fig. 3. Area di studio 2 (Fiume Serchio): pioppeto naturale (Località Fortino nuovo).

L'area presenta una morfologia pianeggiante, priva di affioramenti rocciosi e facilmente accessibile. Si estende per circa 7.400 m² e al suo interno sono stati delimitati tre moduli. Inoltre, sono stati marcati un totale di 30 pioppi e ne è stato determinato il sesso. Tra questi sono stati identificati 6 alberi di sesso femminile (Fig. 3). Un'area di 2.500 m² è stata delimitata con lo scopo di determinare le caratteristiche qualitative e quantitative del popolamento forestale (Fig. 3).

- *Area non coltivata – parcella S21 (Località Ontanelli)* Questa è un'area che non viene più coltivata da 10 anni. Questa sotto-area ha una superficie di circa 14.000 m², nella quale sono stati delimitati tre moduli (Fig. 4).

Area di studio 3 (fiume Arno)

- Bosco misto di latifoglie (Località Culatta)

Fig. 4. Area di studio 2 (Fiume Serchio): area non coltivata – Parcella S21 (Località Ontanelli).

L'area di studio è localizzata su un terreno pianeggiante, senza affioramenti rocciosi. Inoltre, essendo situata al termine di una strada forestale, è facilmente accessibile.

L'area delimita un bosco misto di latifoglie, caratterizzato dalla presenza di Farnia (*Quercus robur* L.), Frassino meridionale (*Fraxinus oxycarpa* Bieb.), Pioppo grigio (*Populus* x *canescens* ((Aiton) Sm.)), Acero campestre (*Acer campestre* L.), Carpino bianco (*Carpinus betulus* L.), Olmo (*Ulmus minor* L.), Ontano nero (*Alnus glutinosa* L.) e Pioppo bianco (*Populus alba* L.). La struttura verticale del soprassuolo stratificata con querce di considerevole altezza ed esemplari più giovani di altre specie, di dimensioni largamente variabili. La densità non è uniforme. La copertura è irregolare con aperture dovute alla caduta di piante. Il sottobosco è caratterizzato dalla presenza di rovo comune (*Rubus ulmifolius* Schott) e di biancospino comune (*Crataegus monogyna* Jacq.). La rinnovazione è scarsa probabilmente a causa dall'eccessivo carico di fauna che persiste nell'area. Questa formazione ricade nell'associazione di *Fraxino angustifoliae-Quercetum roboris* Gellini, Pedrotti, Venanzoni 1986. In questa sotto-area di circa 118.000 m², sono stati identificati 6 moduli, e due ulteriori plot di soli 100 m² al limite del bosco. Inoltre,

Fig. 5. Area di Studio 3 (Fiume Arno): bosco misto di latifoglie (Località Culatta).

un totale di 267 esemplari di *Acer campestre* (a impollinazione principalmente entomofila) sono stati contrassegnati (Fig. 5). Di questi, 32 sono stati poi scelti in modo da coprire significativamente l'area di distribuzione per studi sulla variabilità genetica. Un'area di 2.500 m² è stata analizzata con lo scopo di determinare le caratteristiche qualitative e quantitative del soprassuolo forestale.

- Pineta e zona umida (Colmate del Bozzone – Località Lame)

In questa area sono state considerate due tipi di formazioni vegetali.

Il primo tipo è una pineta pura di Pino domestico (*Pinus pinea*) di 100-120 anni di età. I pini hanno grandi chiome che esercitano una quasi colma. Il sottobosco è composto principalmente da strati erbosi.

Fig. 6. Area di Studio 3 (Fiume Arno): Pineta e zona umida (Colmate del Bozzone – Località Lame).

Il secondo tipo di vegetazione è un'area aperta, caratterizzata da prati estesi che molto probabilmente provengono dalla bonifica di paludi. Le due suddette formazioni sono divise da uno stretto canneto. In questa sotto-area di circa 25.000 m², una parcella è stata delimitata nella pineta e un'area di 2.500 m² è stata scelta per determinare le caratteristiche qualitative e quantitative del popolamento. Inoltre, sono stati delimitati 10 plot, ciascuno di 100 m², nella zona umida adiacente alla pineta (Fig.6).

- Area coltivata – parcella A6 (Località Culatta):

Quest'area è situata una zona destinata ad uso agricolo dal Parco Regionale MSRM, dove non è stato possibile identificare delle parcelle permanenti di studio, per non intralciare le attività del Parco. In questa area, mais, girasole e colza sono stati coltivati per la ricerca (Fig. 7). In particolare, l'indagine ha studiato il flusso e la trasmissione genetica tra colza coltivata e le relative forme selvatiche.

Fig. 7. Area di Studio 3 (Fiume Arno): coltivazioni di mais, girasole e colza dell'anno 2012.

Descrizione della struttura forestale

Al fine di descrivere la composizione delle

specie e la struttura delle formazioni boschive nel Parco di MSRM, la struttura forestale è stata indagata nelle seguenti aree di studio: “Bosco misto con pioppo naturale” (Area 2), “Bosco misto di latifoglie” (Area 3), “Pineta e zona umida” (Area 3). In ogni sotto area, i rilievi sono stati eseguiti su una parcella quadrata di 2.500 m² di superficie. In ciascuna parcella ed è stata determinata la posizione degli alberi vivi, di quelli morti (in piedi o a terra) e del legno morto sul terreno. Per gli alberi vivi, è stata annotata la specie e sono stati misurati i seguenti parametri: il diametro a petto d’uomo (DBH), l’altezza totale, di inserzione della chioma, e la proiezione a terra della chioma nelle quattro direzioni (N, E, S, O). Per gli alberi morti è stata annotata la specie e sono stati misurati i seguenti parametri: il diametro a petto d’uomo (DBH), l’altezza totale, e la classe di decomposizione. La descrizione della flora e della fauna nell’ecosistema forestale è stata integrata con un’analisi della composizione specifica e della struttura spaziale del popolamento, allo scopo di ottenere un set di dati utilizzabili per lo sviluppo di indicatori per il monitoraggio e per la loro implementazione in un sistema GIS. La tabella 2 mostra i parametri dendrometrici per il “Bosco misto con pioppo” (Area di studio 2 fiume Serchio, località Fortino nuovo). La distribuzione dei diametri in classi di diametro di 5 cm è mostrata nella figura 8.

Tabella 2. Bosco misto con Pioppo: numero di alberi, area basimetrica e volume per ettaro.

Specie	Numero n/ha	Area basimetrica m^2/ha	Volume[1] m^3/ha
Aceri	4	0.1	0.4
Frassini mediterranei	44	0.9	138.3
Olmi	28	1.4	10.1
Ontani neri	188	8.0	77.7
Pioppi	20	8.0	141.7
Totali	284	25.4	368.2

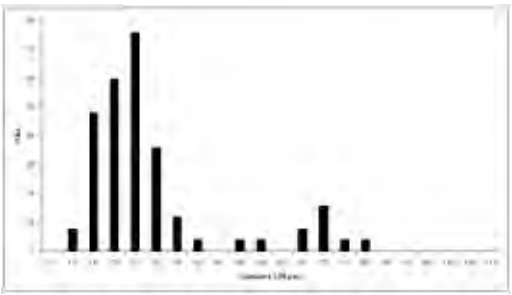


Fig. 8. Distribuzione del numero di piante in classi di diametro per il “Bosco misto con pioppo”

La tabella 3 mostra i parametri dendrometrici per il “Bosco misto di latifoglie” (Area di studio 3 – fiume Arno). La distribuzione del numero di piante in classi di diametro di 5 cm di ampiezza è mostrata nella figura 9.

[1] Il volume è stato calcolato utilizzando tavole di cubatura a doppia entrata (I.F.N.I., 1985).

Tabella 3. Bosco misto: numero di alberi, area basimetrica e volume per ettaro.

La tabella 4 mostra i parametri dendrometrici per la pineta di Pino domestico. La distribuzione del numero di piante in classi di diametro di ampiezza di 5 cm è mostrata nella figura 10.

Specie	Numero n/ha	Area basimetrica m^2/ha	Volume[1] m^3/ha
Acero	44	1.3	11.3
Biancospino	20	0.1	0.6
Farnia	28	9.5	151.5
Frassino mediterraneo	436	15.4	192.5
Olmo	80	1.6	11.7
Totali	**608**	**27.9**	**367.5**

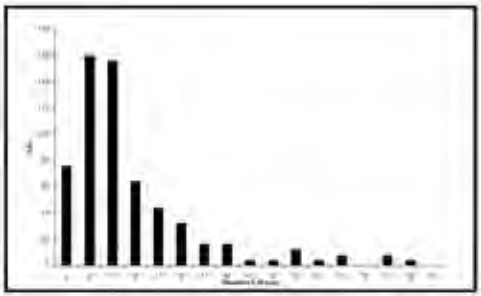


Fig. 9. Distribuzione del numero di piante in classi di diametro per il "Bosco misto di latifoglie"

Tabella 4. Pineta: numero di alberi, area basimetrica e volume per ettaro.

Specie	Numero n/ha	Area basimetrica m^2/ha	Volume[1] m^3/ha
Pine	92	33.2	517.9
Total	92	33.2	517.9

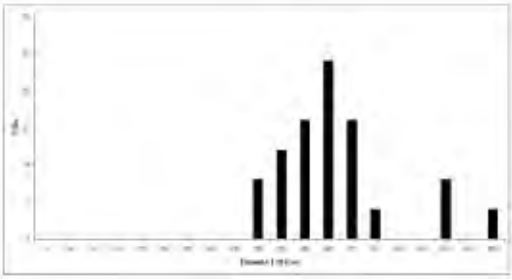


Fig. 10. Distribuzione del numero di piante in classi di diametro

Coltivazioni fatte dal 2010 al 2012

Le coltivazioni di mais, girasole e colza effettuate durante la ricerca sono riassunte nella

[2] Il volume è stato calcolato utilizzando tavole di cubatura a doppia entrata (I.F.N.I., 1985).
[3] Il volume è stato calcolato utilizzando tavole di cubatura a doppia entrata (I.F.N.I., 1985).

tabella seguente:

Tipi di stazioni meteorologiche

Località	Coltivazioni del 2010	Coltivazioni del 2011	Coltivazioni del 2012
1. Lago di Massaciuccoli			Piantagioni di pioppo da privati
2. Ontanelli, parcella S21		Piantagioni di pioppo presenti in MSRM	
3. Fortino Nuovo		Piantagioni di pioppo presenti in MSRM	
4. Culatta, parcella A6	Mais, girasole	Mais, girasole, colza*	Mais, girasole
5. Culatta, parcella A6		Mais	
6. Migliarino (vicino alla A11)	Colza* (coltivato dal privato Marchese Mazzorosa)		

* Il colza è una coltivazione autunno-vernina, quindi è seminata in agosto/settembre e la produzione è rilevata nella primavera (marzo/aprile) dell'anno successivo.

In considerazione delle esigenze della ricerca, le stazioni meteorologiche hanno caratteristiche diverse a seconda dell'area di studio nelle quali sono installate (Fig. 11):

1. Stazione meteorologica 1 (Area 1 – Lago di Massaciuccoli) misura i seguenti parametri:
- Intensità e direzione del vento a 4 m di altezza rispetto alla superficie del lago;
- Temperatura e umidità dell'aria a 3,5 m di altezza rispetto alla superficie del lago;
- Pioggia.

2. Stazione meteorologica 2 (Area 2, - località Ontanelli) misura i seguenti parametri:
- Intensità e direzione del vento a tre livelli (2,5 m, 5 m e 10 m);
- Temperatura dell'aria e umidità a 2 m;
- Temperatura e umidità del suolo a 10 m di profondità;
- Pioggia.

3. Stazione meteorologica 3 (Area 3 – località Culatta) misura i seguenti parametri:
- Intensità e direzione del vento a tre livelli (2,5 m, 5 m e 10 m);
- Temperatura dell'aria e umidità a 2 m;
- Temperatura e umidità del suolo a 10 m di profondità;
- Pioggia;
- Pressione atmosferica;
- Radiazione solare (globale, diffusa, soleggiamento, UV-A, UV-B).

Ogni 15 minuti la media, o la sommatoria, per la pioggia e la durata del soleggiamento è misurata e memorizzata. L'energia elettrica è fornita, ai sensori e al sistema di acquisizione, da pannelli fotovoltaici con batterie tampone.

Fig. 11. Immagini delle stazioni metereologiche nelle tre Aree di Studio.

Capitolo 2

Flusso Pollinico Ed Ibridazione

2.1 – Flusso Pollinico

Anna Buonamici[1], Stefano Biricolti[2], Elena Balducci[1], Davide Travaglini[3], Donatella Paffetti[2], Lorenzo Chelazzi[4], Alessandro Materassi[5], Gianni Fasano[5], Francesca Donnarumma[1], Cristina Vettori[1]

[1]Istituto di Genetica Vegetale, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [2]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italia); [3]Dipartmento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Università di Firenze, Via San Bonaventura 13, 50145, Firenze (Italia); [4]Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [4]Istituto per le Biometereologie, Sezione di Sassari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Traversa la Crucca 3, Località Baldinca, 07100 Li Punti, Sassari (Italia)

Introduzione

Informazioni sul flusso pollinico sono necessarie per valutare l'impatto potenziale sull'ecosistema di organismi geneticamente modificati (OGM). Per esempio, i dati sulla dispersione del polline sono necessari per valutare la distanza massima a cui i pollini transgenici possono arrivare e quindi individuare nell'area circostante i campi coltivati che potrebbero essere interessati da fenomini di "gene flow" ed in cui le specie "non bersaglio" sono presenti. Questa conoscenza è necessaria anche per identificare le condizioni ambientali che dovrebbero favorire il movimento del polline. Inoltre, informazioni sul flusso pollinico possono essere utili per stimare il raggio di dispersione del polline, utilizzando modelli di simulazione di dispersione (vedi capitolo 5).
Numerosi studi hanno analizzato il flusso e la deposizione del polline di mais utilizzando trappole polliniche (per es., Brunet et al., 2003; Devos et al., 2005; Walklate et al., 2004) mentre altri hanno valutato la distanza del flusso pollinico per il pioppo usando marcatori molecolari (per es., Burczyk et al., 2004; DiFazio et al. 2004).
Numerosi modelli di simulazione di diffusione del polline sono stati proposti negli ultimi anni (per es., Lavigne et al., 1996; Colbach et al., 2001a, 2001b; Klein et al., 2003; Balducci et al., 2007; Mazzoncini et al., 2007). Questi modelli, però, non considerano elementi importanti come l'altezza e la presenza di barriere naturali ed artificiali (per es. di siepi, frangivento) che possono giocare un ruolo importante nella diminuzione della concentrazione di granuli pollinici polline.
Il nostro lavoro si è incentrato sui dati di dispersione pollinica delle seguenti specie (agronomiche e forestali) che in un prossimo futuro potrebbero essere disponibili come

varietà geneticamente modificate: mais (*Zea mays* L.), colza (*Brassica napus* L.), girasole (*Helianthus annuus* L.), e pioppo (*Populus nigra x P. deltoides*). Le trappole polliniche poste a distanze diverse dalle coltivazioni sono state utilizzate per valutare le distante coperte dai granuli di polline delle specie selezionate ed i dati ottenuti sono stati impiegati in un modello di dispersione pollinica per stimare i livelli di contaminazione potenziale da parte delle colture di mais. Per quanto di nostra conoscenza, questo è il primo studio in cui sono state utilizzate le trappole polliniche per ottenere dati sulla dispersione pollinica per girasole, colza (piante a impollinazione anemofila ed entomofila) e alberi forestali come i pioppi (alberi a impollinazione anemofila). Vale la pena notare che anche nel caso di piante a impollinazione entomofila, l'impollinazione dovuta al vento – sebbene spesso trascurabile – è una componente che dovrebbe essere analizzata.
Inoltre, considerando l'importanza degli insetti nel trasporto del polline, il monitoraggio del flusso pollinico da parte delle api (*Apis mellifera*), insetto impollinatore, è stato effettuato durante l'intero periodo di fioritura del girasole nella campagna sperimentale del 2012.

Materiali e metodi

I dati sulla dispersione pollinica sono stati raccolti nel 2011 e nel 2012. Le aree coltivate sperimentali di mais, girasole, colza e pioppo sono state selezionate nel Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli (Toscana, Italia).
Una stazione meteorologica è stata installata nell'area di studio. Temperatura dell'aria e umidità dell'aria sono state misurate all'altezza di 2 m, mentre la velocità e la direzione del vento all'altezza di 2,5 m da anemometri ultrasonici. Tutti i parametri sono stati registrati ogni minuto e le medie calcolate e memorizzate ogni 15 minuti.
Lo studio della dispersione pollinica è stato condotto per valutare la massima distanza che il polline può raggiungere nell'area di studio. Per fare ciò, trappole polliniche sono state installate a distanze crescenti dal margine delle aree coltivate tenendo conto della componente del vento dominante durante la produzione di polline da parte delle coltivazioni (Fig. 1 e 2). La posizione delle aree coltivate e quella delle trappole polliniche è stata registrata usando un GPS ("Global positioning System").
Sono stati utilizzati campionatori pollinici "Sigma-2" (Verein Deutscher Ingenieure 2007) in quanto appropriati per il monitoraggio ambientale degli OGM. Il campionatore Sigma-2

Fig. 1. Disposizione delle trappole polliniche per mais e girasole in località Culatta nel 2011 (a); per colza in località Migliarino nel 2011 (b); per pioppo in località Ontanelli nel 2011 (c). I punti rossi rappresentano le trappole per il polline.

fornisce un metodo di campionamento standardizzato per le analisi microscopiche dirette del polline. Il polline cade all'interno della trappola depositandosi su un supporto posto alla base permettendone poi l'analisi diretta al microscopio ottico per determinare la specie e la quantità. Un esempio di preparazione della trappola pollinica con strisce "Silkostrip (Lanzoni srl)" per la raccolta di polline è mostrato in Fig. 3.

Fig. 2. Disposizione delle trappole polliniche per mais (a), per girasole (b), per colza (c) in località Culatta nel 2012; e per il pioppo nel Lago di Migliarino nel 2012. I punti rossi rappresentano le trappole per il polline in (a), (b) e (c); i punti gialli rappresentano le trappole per il polline in (d).

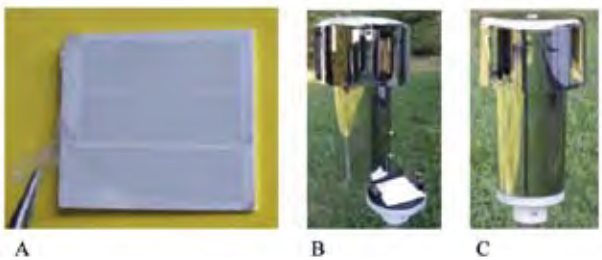


Fig. 3. A: preparazione di substrati con strisce "Silkostrip (Lanzoni srl)" per la raccolta del polline; **B:** le strisce sonoposte sul fondo della trappola pollinica; **C:** il campionatore pollinico Sigma-2 pronto per l'uso.

Le specie di polline sono state identificate in base alle loro caratteristiche morfologiche e strutturali come dimensione, forma, consistenza, ecc.

Su ogni piastra sono state messe tre strisce "Silkostrip (Lanzoni srl)". Dopo la rimozione dalla trappola, le strisce sono state adagiate su un vetrino porta oggetti diviso in otto rettangoli di 1 cm^2 (5 cm x 0,2 cm). Il conteggio dei granuli di polline è stato effettuato in ogni rettangolo per un totale di 32 letture per trappola pollinica e quindi per punto di campionamento. La concentrazione del polline è stata calcolata sulla base del numero dei granuli di polline visualizzati sulle strisce (n. granuli/cm^2). Per ogni punto di rilevamento la concentrazione di granuli pollinici è stata stimata come media delle letture (± deviazione standard).

Per studiare il flusso pollinico dovuto all'insetto impollinatore *Apis mellifera*, sono state installate otto arnie a distanze crescenti (1 km, 2 km, 3 km) dal campo sperimentale di girasole, ed ogni arnia rappresentava una stazione di campionamento del polline (Fig. 4). In questo modo, è stato possibile stimare la distanza alla quale il polline può essere trasportato dagli insetti impollinatori.

Un'apposita trappola per il polline è stata installata in ogni alveare permettendo di campionare il polline raccolto dalle api (Fig. 5).

Il campionamento del polline è stato condotto ogni due giorni per un totale di cinque ripetizioni, per un totale di 40 campioni.

La presenza di granuli di polline nella trappola pollinica del girasole coltivato è stata

determinata mediante analisi molecolare condotta in laboratorio con marcatori microsatelliti nucleari (nSSRs)

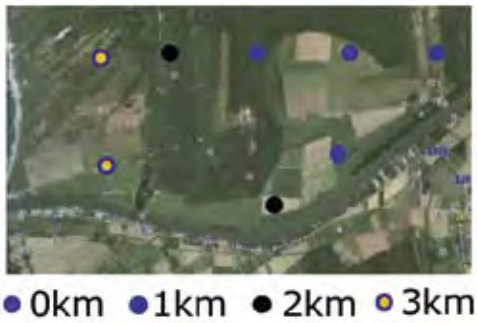


Fig. 4. Disposizione delle arnie a distanze crescenti dalla coltivazione di girasole localizzata in Culatta.

Fig. 5. Disposizione dell'arnia vicino la coltivazione di girasole localizzata in Culatta e campionamento del polline.

Risultati

Nel 2011, granuli di polline di mais sono stati trovati fino ad una distanza di 160 m (12 granuli pollinici/cm² nella trappola pollinica più lontana); il numero più alto di granuli di polline si verifica a 0 m, e decresce rapidamente fino a 20 m (da 87 a 15 granuli pollinici/cm²). Da 20 m fino a 160 m il numero di granuli di polline rimane più o meno costante (Fig. 6a).

L'andamento della concentrazione del polline in relazione alla distanza (in metri) è stata simile nel 2012 (Fig. 6a), la concentrazione del polline di mais tende a zero a differenti distanze, e non è stato trovato oltre i 300 m (Fig. 6 b-g).

Il colza è una pianta ad impollinazione sia entomofila che anemofila. Un numero rilevante di granuli pollinici di colza è stato trovato fino a 34 m di distanza (49 granuli pollinici/cm² nella trappola pollinica più lontana).

La concentrazione del numero di granuli pollinici scende rapidamente tra 0 m e 5 m (da 271 a 121 granuli di polline/cm²). Per la colza, il numero di granuli di polline rimane più o meno costante fino a 18 m dopo di che a distanze maggiori si dimezza a 49 granuli di polline/cm² (Fig. 7 a-b). Un andamento simile è stato riscontrato nell'area coltivata della "Culatta" nel 2012 (Fig. 7 c-d).

Anche se il girasole è una pianta a impollinazione entomofila, granuli di polline sono stati trasportati dal vento fino ad una distanza di 19 m (23 granuli pollinici/cm² nella trappola pollinica più lontana), con il più alto tasso di decrescita del numero di granuli di polline tra 0 e 10 m (da 161 a 18 granuli pollinici/cm²). Nel caso del girasole, il numero di granuli di polline rimane più o meno costante fino a 19 m (Fig. 8). Questi risultati sono stati confermati nel 2012.

Per il pioppo una considerevole quantità di polline è stata trovata fino a una distanza di 380 m nel 2011 e fino a una distanza di 540 m nel 2012, dove furono posizionate le

trappole più lontane. Il numero di granuli di polline rimane più o meno costante (circa 350 granuli pollinici/cm²) indipendentemente dalla distanza.

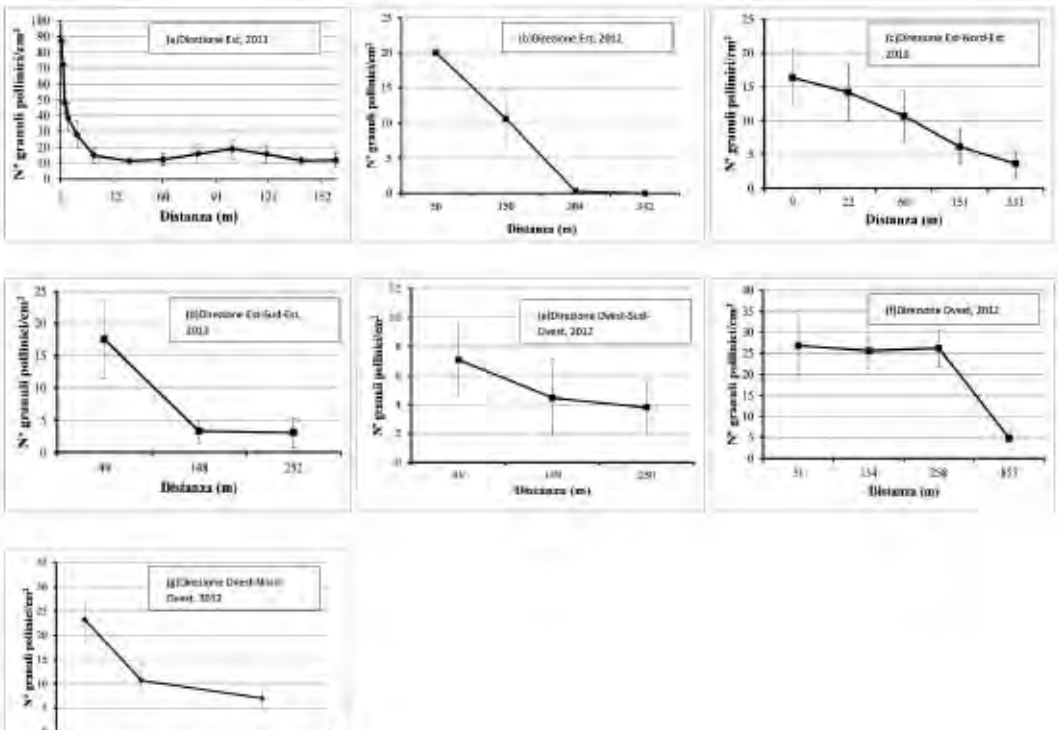


Fig. 6. Flusso pollinico in relazione alla distanza delle aree coltivate a mais seconda la direzione del vento registrato nel 2011 (a) e nel 2012 (b-g). Ogni punto rappresenta la media ± la deviazione standard dalla media.

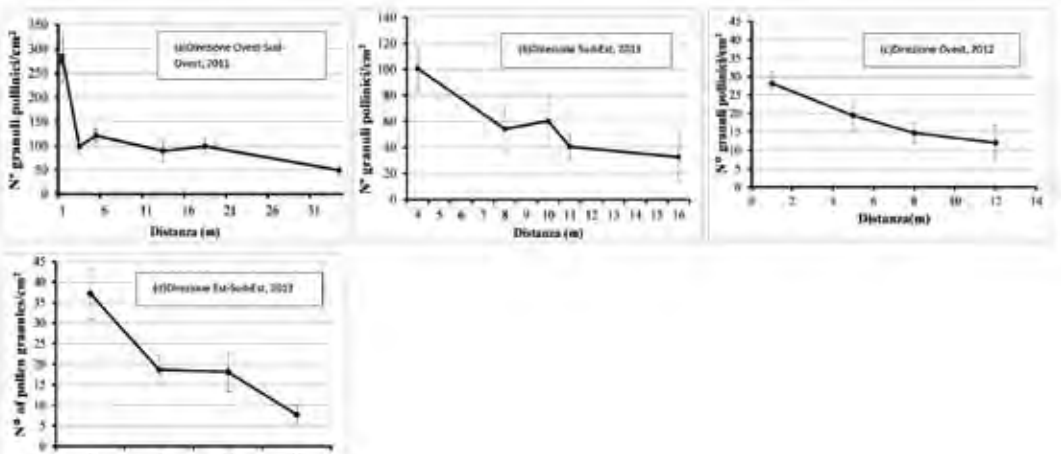


Fig. 7. Flusso pollinico in relazione alla distanza dalle aree coltivare a colza secondo la direzione del vento registrato nel 2011 (a-b) e nel 2012 (c-d). Ogni punto rappresenta la media ± la deviazione standard dalla media.

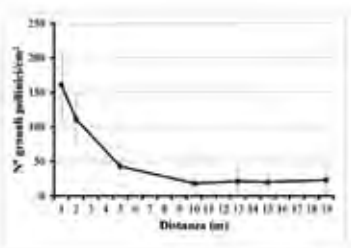


Fig. 8. Andamento del flusso pollinico in relazione alla distanza dalle aree coltivate a girasole in direzione nord-est registrato nel 2011. Ogni punto rappresenta la media ± la deviazione standard dalla media.

Conclusioni

I risultati raggiunti con i campioni di polline sono essenziali per raccogliere dati riguardanti la distanza coperta da un ipotetico polline transgenico che potrebbe avere un impatto sulla biodiversità e specie non-target.
Numerosi studi sono stati effettuati sulla dispersione del polline del mais considerando la concentrazione di polline a varie distanze ed altezze da una fonte di polline. Sopratutto, questi studi mostrano che la maggior parte del polline si trova entro 30-50 m dalla fonte.
D'altra parte, quando sono state considerate correnti d'aria convettive, la presenza di polline è stata osservata fino a 650 m da una fonte OGM conosciuta. (Devos et al. 2005).
La distanza entro la quale il polline può essere disperso dipende dalle condizione ambientali locali così come dalle condizioni climatiche predominanti (direzione del vento, umidità, temperatura, ecc.).
L'andamento della dispersione pollinica deve pertanto essere valutata usando un approccio caso per caso. I nostri risultati mostrano che il polline di mais è stato trovato fino a una distanza di 300 m dall'area coltivata.
Marcatori molecolari sono stati usati per lo studio del flusso genico della colza, del girasole e del pioppo (per es., DiFazio et al., 2004; Damgaard and Kjellsson, 2005; De-Lucas et al., 2008, Ureta et al., 2008).
Per la prima volta, il nostro studio descrive la dispersione del polline di pioppo da parte del vento con l'uso di trappole polliniche, ed il polline è stato trovato fino a una distanza di 540 m, la massima distanza analizzata.
Ciò nonostante, dati genetici riportati nel "Paragrafo 2.2 Ibiridazione" mostrano che il polline di pioppo può arrivare fino a una distanza superiore ai 2 km. Per la colza, ci sono alcuni studi che tengono conto solo della dispersione del polline della singola pianta da parte del vento (Lavigne et al., 1998; Klein et al., 2006).
Nei nostri studi noi troviamo che il polline della colza e del girasole arriva, rispettivamente, a 34 m e a 19 m.
Inoltre, dati genetici sul polline raccolto dalle arnie indicano che l'insetto impollinatore, *Apis mellifera*, può trasportare il polline di girasole fino a una distanza di 1 km.
L'andamento della dispersione del polline necessita di essere ulteriormente studiato in relazione alla possibilità di ibridazione ("out-crossing"), per proporre misure di contenimento anche per le future specie OGM che potrebbero essere poste in commercio.
Usando i dati forniti dal flusso pollinico, è stato possibile simulare la dispersione del polline come riportato nel "Capitolo 5 Sistemi di informazione geografica per la valutazione del rischio ambientale e il monitoraggio degli OGM".

Bibliografia

- Brunet, Y., Foueillassar, X., Audran, A., Garrigou, D., Dayau, S., Tardieu, L. (2003) Evidence for long-range transport of viable maize pollen. In: Boelt B. (ed) 1st European Conference on the Co-existence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Crops. Research Centre Flakkebjerg, 74–76.
- Burczyk, J., DiFazio, S. P., Adams, W. T. (2004) Gene Flow in Forest Trees: How far do genes really travel?. Forest Genetics 11: 179-192, 2004.
- Colbach, N., Clermont-Dauphin, C. & Meynard, J. M. (2001a) GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers. I. Temporal evolution of a population of rapeseed volunteers in a field. Agriculture, Ecosystems and Environment 83: 235–253.
- Colbach, N., Clermont-Dauphin, C., Meynard, J. M. (2001b) GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers. II. Genetic exchanges among volunteer and cropped populations in a small region. Agriculture, Ecosystems and Environment 83: 255–270.
- Damgaard, C., Kjellsson, G. (2005) Gene flow of oilseedrape (*Brassica napus*) according to isolation distance and buffer zone. Agriculture, Ecosystems and Environment 108: 291–301.
- De-Lucas, A. I., Robledo-Arnuncio, J. J., Hidalgo, E., Gonzalez-Martinez, S. C. (2008) Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. Heredity 100: 390–399.
- Devos, Y., Reheul D., De Schrijver, A. (2005) The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. Environmental Biosafety Research 4: 71-87.
- DiFazio, S. P., Slavov, G.T., Burczyk, J., Leonardi, S. & Strauss, S. H. (2004) Gene flow from tree plantations and implications for transgenic risk assessment. In: Christian Walter and Mike Carson (eds). Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century. Kerala (India), Research Signpost. 405-422.
- Klein, E. K., Lavigne, C., Foueillassar, X., Gouion, P.H., Larédo, C. (2003) Corn pollen dispersal: quasi-mechanistic models and field experiments. Ecological monographs 73: 131–150.
- Klein, E. K., Lavigne, C., Picault, H., Renard, M., Gouyon, P.H. (2006) Pollen dispersal of oilseed rape: estimation of the dispersal function and effects of field dimension. Journal of Applied Ecology 43: 141–151.
- Lavigne, C., Godelle, B., Reboud, X., Gouyon, P. H. (1996) A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. Theoretical and Applied Genetics 93: 1319–1326.
- Lavigne, C., Klein, E. K., Vallée, P., Pierre, J., Godelle, B., Renard, M. (1998) A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. Theoretical and Applied Genetics 96:

886-896.
- Mazzoncini, M., Balducci, E., Gorelli, S., Russu, R., Brunori, G. (2007) Coexistence scenarios between GM and GM-free corn in Tuscany region (Italy). Proceedings of Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM based Agricultural Supply Chain, 20-21 November 2007 Seville, Spain.
- Ureta, M. S., Carrerab, A. D., Cantamutto, M. A., Poverene, M. M. (2008) Gene flow among wild and cultivated sunflower, *Helianthus annuus* in Argentina. Agriculture, Ecosystems and Environment 123: 343–349.
- Verein Deutscher Ingenieure (2007) Monitoring the effects of genetically modified organisms (GMO) Pollen monitoring Technical pollen sampling using pollen mass filter (PMF) and Sigma-2-sampler. VDI 4330 Part 3. VDI-Handbuch Biotechnologie, Band 1: GVO-Monitoring.
- Walklate, P. J., Hunt, J. C. R., Higson, H. L., Sweet, J. B. (2004) A model of pollen - mediated gene flow for oilseed rape. Proc. R. Soc. Lond. B 271: 441-449.

Capitolo 2

Flusso Pollinico e Ibridazione

2.2 - Ibridazione

Donatella Paffetti[1], Anna Buonamici[2], Davide Travaglini[3], Mariaceleste Labriola[1,2], Francesca Bottalico[3], Silvia Fiorentini[3], Alessandro Materassi[4], Cristina Vettori[2]

[1]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italia);[2]Istituto di Genetica Vegetale, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [3]Dipartmento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Università di Firenze, Via San Bonaventura 13, 50145, Firenze (Italia); [3]Istituto per le Biometereologie, Sezione di Sassari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Traversa la Crucca 3, Località Baldinca, 07100 Li Punti, Sassari (Italia)

Introduzione

Il flusso genico tra piante coltivate e specie selvatiche affini avviene da migliaia di anni (Hancock et al. 1996, Ellstrand et al. 1999), ma solo di recente, stimolata dall'interesse per il "movimento del transgene", la comunità scientifica ha posto attenzione su problematiche inerenti il flusso genico sia tra varietà coltivate e specie selvatiche affini, che con altre specie coltivate, (Snow e Morán-Palma 1997, Hall et al. 2000, Ellstrand 2002). A prescindere dal fatto che i transgeni siano coinvolti, le conseguenze del flusso genico dalle coltivazioni possono essere problematiche. Geni di varietà coltivate potrebbero sostituire geni di specie selvatiche, riducendo la diversità genetica delle popolazioni selvatiche. I geni di varietà coltivate potrebbero anche diffondersi ad altre varietà coltivate o altre razze, contaminando i pools di semi. Questa contaminazione genetica detta "polluzione genetica" o "presenza accidentale", può avere conseguenze indesiderate, riducendo la qualità del seme (Friesen et al. 2003), mettendo a rischio la sicurezza del cibo (NRC 2004) e la produzione di cibo biologico, o nuocendo alle colture locali [North American Free Trade Agreement– Commission for Environmental Cooperation (NAFTA–CEC) 2004]. Se i risultanti ibridi presentano un minore adattamento alle condizioni ambientali dei loro parentali selvatici, la popolazione naturale potrebbe numericamente ridursi, mettendo a rischio la propria sopravvivenza (Ellstrand e Elam 1993, Levin et al. 1996). Se gli ibridi presentano un migliore adattamento rispetto ai loro parentali selvatici, gli ibridi possono diventare invasivi (Tiedje et al. 1989), sostituendo la popolazione naturale e di altre specie in aree coltivate e non. Le piante domesticate rappresentano linee che divergono dai loro progenitori da non più di qualche migliaio di generazioni fa. Di conseguenza non c'è nessuna ragione che faccia supporre che l'isolamento riproduttivo debba essere assoluto (Ellstrand et al. 1999).

Una delle principali problematiche correlate con l'ingegneria genetica vegetale è la possibilità che i transgeni possano "sfuggire" dalle coltivazioni e causare impatti negativi sull'ecosistema naturale (Rogers et al. 1995, Wolfenbarger e Phifer 2000). Il flusso genico verso i parentali selvatici si verifica per quasi tutte le coltivazioni nei siti dove queste vengono fatte crescere (Ellstrand et al. 1999). Comunque, quest'ultima problematica è di particolare interesse nel caso degli alberi forestali, perché non sono domesticati (Bradshaw e Strauss 2001), hanno un flusso genico potenzialmente esteso nello spazio (Hamrick et al. 1992, Slavov et al. 2002), e possono avere un grande effetto sui processi dell'ecosistema e sulla biodiversità essendo gli alberi le forme di vita dominanti (Wells et al. 1986) e le specie chiave degli ecosistemi. Gli impatti ecologici degli alberi transgenici dipenderanno principalmente dalle caratteristiche conferite dal transgene e dall'ambiente nel quale gli alberi crescono (Mullin e Bertrand 1998, James et al. 1998). La valutazione del rischio richiede, quindi considerazioni dettagliate sulle conseguenze ecologiche specifiche dei singoli transgeni nei diversi ambienti. Comunque, il flusso genico è un prerequisito per la valutazione di molti impatti ecologici ai limiti delle piantagioni, perciò i dati stimati di introgressione si applicheranno alla maggioranza delle valutazioni di rischio ambientale per gli alberi transgenici (Ellstrand 2001, Muir 2001). Il pioppo è diventata specie arborea modello nell'ingegneria genetica, poiché può essere facilmente trasformata e propagata *per via* agamica ed ha un genoma di piccole dimensioni (Boerjan 2005). Il portamento dell'albero, le caratteristiche agronomiche e la qualità del legno possono essere migliorate con l'ingegneria genetica (Pullman et al. 1998), evitando in tal modo le problematiche del miglioramento genetico convenzionale connesse con i lunghi cicli riproduttivi (Mathews e Campbell 2000). I potenziali rischi ambientali legati agli alberi GM sono diversi da quelli associati alle piante transgeniche coltivate sia su scala spaziale sia su scala temporale (van Frankenhuyzen e Beardmore 2004) essendo gli alberi perenni e longevi, al contrario delle piante coltivate che sono annuali.

Sono state considerate per la valutazione dell'ibridazione due specie: colza e pioppo. La scelta è stata condizionata dalla presenza di specie selvatiche affini con cui potenzialmente si può verificare l'ibridazione. Inoltre, essendo l'ibridazione determinata dal periodo fenologico, sia la colza che il pioppo coltivato presentano lo stesso periodo di sviluppo del fiore delle specie selvatiche a loro affini nelle aree di studio del progetto DEMETRA.

Risultati e discussione

1. Valutazione dell'ibridazione in pioppo

Nell'area protetta dal Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli sono state individuate due aree di studio permanenti (Area di Studio 1 e 2), che si trovano ad una distanza di 8 km l'una dall'altra e sono localizzate in ecosistemi diversi (Capitolo 1).
L'Area di Studio 1 è un'area umida, nella quale alberi singoli o a piccoli gruppi di pioppo sono dispersi lungo le sponde del Lago di Massaciuccoli (Fig. 1). In relazione allo strato erbaceo,

Fig. 1. Area di Studio 1 (Lago di Massaciuccoli).

le osservazioni fatte mostrano variabilità nella distribuzione, probabilmente per le caratteristiche micro-topologiche del sito. Le comunità di carici e canne crescenti nell'area devono essere riferite alla classe *Phragmito-Magnocaricetea* Klika. Questo sito è caratterizzato dalla presenza di specie rare o a rischio, come: *Periploca graeca* L., *Leucojum aestivum* L., *Hibiscus palustris* L. (Capitolo 3). In totale sono stati individuati 32 pioppi e di ognuno è stata registrata la posizione con GPS. Da ogni pioppo sono stati prelevati tessuti vegetali per le successive analisi di laboratorio.

Fig. 2. Area di Studio 2 (Fiume Serchio).

L'Area di Studio 2 è un Bosco misto di latifoglie di origine naturale, in prossimità del fiume Serchio, dove le specie arboree prevalenti sono pioppo, *Fraxinus angustifolia* e *Alnus glutinosa*, quest'ultima presente negli strati inferiori (Capitolo 1). Questi boschi con pioppo possono essere riferiti a *Carici remotae-Fraxinetum oxycarpae* Pedrotti (Capitolo 3). In quest'area all'interno di una parcella sperimentale, di 7.400 m², tutti gli alberi di pioppo (30 individui) sono stati individuati e la loro posizione rilevata con GPS (Fig. 2). Anche in questo caso, sono stati prelevati tessuti vegetali da ogni pioppo per le successive analisi di laboratorio. I pioppi nell'Area di Studio 2 sono stati morfologicamente classificati come appartenenti alla specie *Populus alba* L. (pioppo bianco) e all'ibrido *Populus x canescens* (Aiton.)Sm. (pioppo grigio). Quest'ultimo è un ibrido naturale di *P. alba* e *P. tremula* L., queste due specie parentali sono ecologicamente divergenti e si ibridano frequentemente in Europa. Inoltre, le specie di pioppo campionate, e classificate secondo la loro morfologia, sono state identificate tramite analisi della regione *trn*L-*trn*F del DNA del cloroplasto (cpDNA) (Tab. 1.).

Tabella 1. Siti variabili nella regione *trn*L-*trn*F del cpDNA delle specie di pioppo considerate.

	Siti variabili[a]		
	198	**279**	**478**
P. alba	T	A	A
P. x canescens	T	A	A
P. tremula	T	A	G
P. nigra	T	A	A
P. deltoides	G	G	A
P. x euramericana	G	G	A

[a] I primer utilizzati per l'analisi sono riportati in Taberlet et al. 1998, le reazioni di amplificazione, i cicli di amplificazione, e l'allineamento di sequenza sono stati eseguiti come riportato in Paffetti et al. 2007

Fig. 3. Area di Studio 2 (fiume Serchio). In giallo sono segnalate le posizioni dei pioppi grigi ed in rosso quelle dei pioppi bianchi.

Inoltre, i pioppi sono stati genotipitizzati (cioè ne è stato individuato il genotipo) usando 10 loci[1] microsatellitari nucleari (nSSR). Questi microsatelliti nucleari presentano varianti alleliche uniche e distintive per ognuna delle due specie. I risultati mostrano che, nella parcella di studio, 6 alberi appartengono al pioppo grigio, di cui 5 femmine e 1 maschio, e 23 alberi maschi e 1 femmina sono pioppi bianchi (Fig. 3 e Tab. 2).

La variante del cpDNA[2] è identica per tutti gli individui, essendo la madre dell'ibrido *P. x canescens* il *P. alba*. I valori di diversità genetica, riportati qui solo come media dei dati ottenuti con i 10 loci microsatelliti, appaiono essere bassi (Tab. 3), ma concordi con i dati precedentemente riportati in letteratura per popolazioni naturali delle due specie (vedi Lexer et al. 2005).

Tabella 2. Numero (ID), sesso e identificazione molecolare attraverso l'aplotipo del cpDNA e la genotipizzazione con nSSR di ogni pioppo considerato nell'Area di Studio 2.

ID pioppo	*Sesso*	*cpDNA aplotipo*	*nSSR genotipizzazione*
P1, P2, P3, P4, P6	♀	TAA	*P. x canescens*
P10	♂	TAA	*P. x canescens*
P7, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30	♂	TAA	*P. alba*
P5	♀	TAA	*P. alba*

Tabella 3. Variabilità genetica stimata. Numero di alleli (N), numero di alleli rari (N_{rare}), eterozigosi attesa (H_e) e indici di consanguinità (F_{IS}).

	P. x canescens				*P. alba*			
	N	H_e	N_{rare}	F_{IS}	N	H_e	N_{rare}	F_{IS}
Medie	1.4	0.174	0.00	0.002	3.0	0.350	0.25	-0.001

La struttura genetica spaziale del popolamento è stata dedotta mediante metodo Bayesiano, implementato nel programma Geneland sotto linguaggio R. I risultati mostrano che il popolamento è suddivisibile in quattro sottopopolazioni (Fig. 4) Le sottopopolazioni sono isolate geneticamente, come indicato dalle mappe di probabilità a posteriori, ma ogni sottopopolazione non sembra essere composta da alberi imparentati. La sottopopolazione indicata con il numero 3 è composta esclusivamente da alberi di pioppo grigio. Questo

[1] Primer e condizioni di amplificazione usate sono riportati in Tuskan et al. 2004 e Smulders et al. 2001.
[2] Il DNA del cloroplasto nel pioppo è ereditato per via materna.

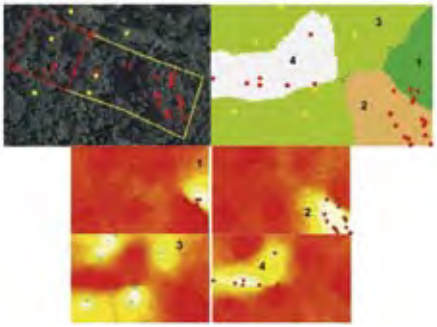


Fig. 4. Organizzazione spaziale in quattro sottopopolazioni e mappe di probabilità a posteriori di ogni sottopopolazione.

Fig. 5. Area di Studio 1 (Lago di Massaciuccoli). In giallo è riportata la posizione dei pioppi grigi, in rosso quella dei pioppi bianchi e in verde quella dei pioppi neri.

gruppo appare geneticamente più isolato degli altri.

Nell'Area di Studio 1 oltre alle due specie di pioppo, *P. alba* e *P. x canescens*, presenti nell'Area di Studio 2, sono stati identificati alberi attribuibili alla morfologia di *P. nigra* L. (pioppo nero). Questo è stato confermato dati dell'analisi di sequenza e di genotipizzazione (Fig. 5 e Tabella 4). Come atteso, l'aplotipo del cpDNA di *P. nigra* è identico a quello di *P. alba*, ma il pioppo nero presenta varianti alleliche dei microsatelliti tipiche della specie. Gli individui di pioppo nero presentano il livello più alto di diversità genetica tra tutte e tre le specie (Tab. 5).

Tabella 4. Numero (ID), sesso ed identificazione molecolare mediante l'aplotipo del cpDNA e la genotipizzazione nSSR di ogni albero di pioppo considerato nell'Area di Studio 1.

ID pioppo	*Sesso*	*cpDNA aplotipo*	*nSSR genotipizzazione*
PM1, PM2, PM3, PM5, PM6, PM10, PM17, PM20, PM29, PM30, PM31	♂	TAA	*P. alba*
PM12, PM23, PM25, PM27	♀	TAA	*P. alba*
PM4, PM11, PM13, PM16, PM18, PM19, PM21, PM24, PM28	♂	TAA	*P. x canescens*
PM22, PM26, PM32	♀	TAA	*P. x canescens*
PM8, PM15	♀	TAA	*P. nigra*
PM7, PM9, PM14	?	TTA	*P. nigra*

Tabella 5. Variabilità genetica stimata. Numero di alleli (N), numero di alleli rari (N_{rare}), eterozigosi attesa (H_e) e indici di consanguinità (F_{IS}).

	P. alba				*P. x canescens*				*P. nigra*			
	N	H_e	N_{rare}	F_{IS}	N	H_e	N_{rare}	F_{IS}	N	H_e	N_{rare}	F_{IS}
Medie	3.6	0.445	0.22	0.012	3.6	0.550	0.17	0.011	3.3	0.565	0.00	0.003

La struttura genetica spaziale del popolamento in questo caso si presenta suddivisibile in tre sottopopolazioni. Solo la sottopopolazione 1, come evidenziato dalle mappe di probabilità a posteriori, comprendente gli alberi della specie *P. nigra*, appare geneticamente isolata dalle altre. Invece tra le altre due sottopopolazioni, costituite da alberi di *P. alba* e *P. x canescens* il flusso genico è evidente e quindi non appaiono geneticamente isolate. Le tre sottopopolazioni non sono costituite da alberi legati da strette parentele (Fig. 6).
Entrambe le Aree di Studio sono adiacenti a piantagioni di pioppo. In particolare, l'Area di Studio 1 è limitrofa alla piantagione multiclonale di "Triplo" e alla piantagione multiclonale di "Onda". "Triplo" è un ibrido di *Populus deltoides* Bartr. (madre) e *P. nigra* (padre), ibrido definito *P. x euroamericana*. Invece "Onda" è una selezione di *P. deltoides*. L'Area di Studio 2 è adiacente a una piantagione di pioppo multiclonale, una selezione di *P. deltoides*. L'analisi della sequenza mostra che la madre delle varietà coltivate è *P. deltoides* e la genotipizzazione permette l'identificazione di ogni varietà coltivata (Tab. 6).
Dopo aver analizzato la fenologia delle specie, in particolare, dopo aver verificato corrispondenza temporale tra il periodo di produzione di polline da parte dei pioppi delle piantagioni e il periodo di ricettività dell'ovario dei pioppi femmina presenti nelle popolazioni naturali, il seme prodotto da queste ultime è stato raccolto, fatto germinare in laboratorio e quindi analizzato con gli stessi 10 loci microsatelliti utilizzati per identificare i parentali.

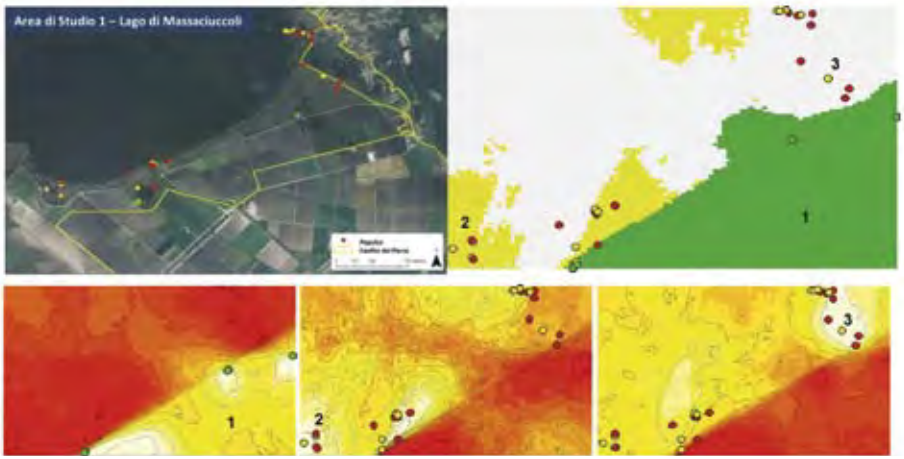


Fig. 6. Organizzazione spaziale in tre sottopopolazioni e mappe di probabilità a posteriori per ogni sottopopolazione.

Tabella 6. Numero (ID), sesso e identificazione molecolare mediante l'aplotipo del cpDNA e la genotipizzazione nSSR di ogni piantagione di pioppo.

ID pioppo	*Sesso*	*cpDNA aplotipo*	*nSSR genotipizzazione*
Piantagione di "Onda" (Area di Studio 2)	♂	GGA	*P. deltoides*
Piantagione di "Triplo" (Area di Studio 2)	♂	GGA	*P. x euroamericana*
Piantagione di pioppo (Area di Studio 1)	♂	GGA	*P. deltoides*

Il progetto DEMETRA non ha fatto uso di colture geneticamente coltivate, quindi i marcatori molecolari (le varianti alleliche) identificanti gli alberi di pioppo delle piantagioni sono stati utilizzati come traccianti del transgene. Un individuo o più individui della piantagione potrebbero fecondare alberi delle popolazioni naturali e quindi la variante allelica, il transgene, potrebbe essere trasferito dalla piantagione alla progenie.

Fig. 7. Incroci identificati nell'Area di Studio 1.

L'assegnazione di paternità è stata effettuata usando tutti i dieci loci nSSR analizzati con i metodi standard di massima verosimiglianza implementati in CERVUS 3.0 (Marshall et al. 1998).

Nell'Area di Studio 1, tutti gli incroci avvenuti per gli alberi madre PM11 (pioppo grigio), PM20 e PM23 (pioppo bianco) sono stati identificati (Fig. 7). Gli incroci hanno coinvolto individui maschili appartenenti ad entrambe le specie, ma, come atteso, non sono stati individuati ibridi di pioppo nero. Le distanze massime di incrocio, in un'area aperta come il Lago di Massaciuccoli hanno superato i 2 km. Nell'Area di Studio 2, gli incroci degli alberi

Fig. 8. Incroci identificati nell'Area di Studio 2.

madre P1, P2 e P6 appartenenti alla specie pioppo grigio, hanno coinvolto individui di pioppo bianco. Solo l'albero madre P2 di pioppo grigio ha prodotto progenie anche con l'albero maschio P10 della stessa specie.
L'albero madre P5, *P. alba*, ha prodotto progenie solo con individui della sua stessa specie (Fig. 8). L'albero madre P3, *P. x canescens*, ha prodotto progenie con individui della specie *P. alba* (Fig. 8). All'interno dell'area si sono ottenuti incroci ad una distanza massima di 50-60 m.

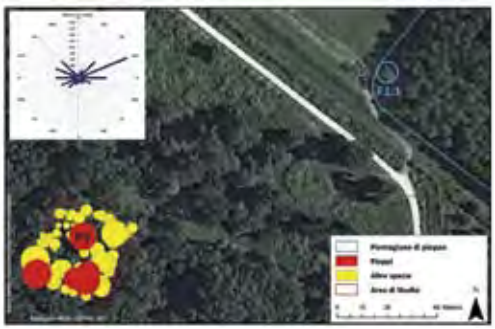


Fig. 9. Incrocio tra pioppi P 3 e F1.1.

Inaspettatamente nel caso dell'albero P3 si è avuta ibridazione con un individuo della piantagione di "Triplo".
Le analisi dei dati strutturali forestali (diametro ed altezza degli alberi) hanno mostrato che P3 è un albero di grandi dimensioni, che non ha barriere al flusso del polline dalla piantagione per competizione con altre chiome. Inoltre, con le analisi della direzione e velocità del vento, è stato possibile verificare che nel periodo di dispersione del polline e di ricettività dell'ovario, la direzione da est-nordest a ovest-sudovest del vento ha favorito la dispersione del polline dall'albero F1.1 ("Triplo") all'albero P3 (Fig. 9).

I dati confermano la presenza di *P x canescens* nel Bosco misto di latifoglie nell'area limitrofa al fiume Sercho all'interno del Parco. Inoltre, è stato possibile individuare la presenza di questi ibridi anche nell'area del Lago di Massaciuccoli oltre alla presenza di individui di pioppo nero. Nel bosco misto la sottopopolazione di *P. x canescens* appare isolata spazialmente e geneticamente.
Al contrario non si verifica la stessa situazione nell'area del lago. Le due sottopopolazioni di *P. alba* e *P. x canescens*, in questo caso, presentano livelli più alti di variabilità genetica e un evidente flusso genico.
Quindi le due sottopopolazioni non sono geneticamente isolate.
Probabilmente questa diversa situazione è da correlare alle differenti condizioni ambientali, uno spazio aperto in un caso che favorisce il flusso genico, uno spazio chiuso nell'altro.
L'evento di incrocio, tra alberi nell'Area di Studio 2 e la piantagione, suggerisce l'esistenza di possibili scambi genici tra una popolazione naturale e una piantagione, eventi che devono essere attentamente considerati quando piantagioni di pioppo sono impiantate in prossimità (2 km in spazi aperti e 50-60 m all'interno di popolamenti) di un ambiente naturale nel quale sono presenti forme autoctone affini. In effetti, in questi casi si potrebbe verificare "fuga del transgene" con conseguenze sulla variabilità genetica e sulla biodiversità in genere dei popolamenti autoctoni.
Comunque l'avvenuta ibridazione tra una piantagione ed un popolamento naturale apre problematiche inerenti la conservazione dei popolamenti naturali.

Fig. 10. Sinapis arcensis L.

2. Valutazione di ibridazione in colza

Alcune specie di piante spontanee appartenenti alle Brassicacee sono state scelte nelle aree protette del Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli, per valutare la possibile ibridazione e il flusso genico. La scelta delle Brassicacee è stata fatta considerando la fauna pronuba e il periodo di fioritura. Quindi *Sinapis arvensis* L. (senape selvatica) (Fig. 10) è stata considerata come una possibile candidata per l'ibridazione con *Brassica napus* L. var. *oleifera* D. C. (colza) (Capitolo 3). Al fine di verificare la possibilità d'ibridazione tra la colza e la senape selvatica sono stati utilizzati 10 loci microsatelliti nucleari[33].Tra questi, 2 loci presentano varianti alleliche in grado di distinguere la colza dalla senape selvatica. Nell'Area di Studio 3 (Località Culatta) nei confini del campo coltivato di colza sono state identificate 25 piante di senape selvatica (potenziali madri) la cui posizione è stata rilevata mediante GPS. Tutti i potenziali padri piante di colza sono stati campionati in un raggio di 3 m intorno alla senape selvatica (madre), quindi di ogni individuo di colza è stata registrata la distanza dalla senape, insieme alla direzione cardinale (Fig. 11). Circa 100 semi sono stati raccolti da ogni madre con apparati di raccolta "Arasystem" (Betatech bvba), e posti a germinare in laboratorio (Fig. 11). Le piante di senape selvatica (indicate con il colore rosso in Fig. 12) hanno varianti alleliche che le distinguono dalle due varietà di colza coltivate (CV1 e CV2 indicate rispettivamente con il colore nero e con il colore giallo in Fig. 12). Inoltre queste ultime presentano anche varianti alleliche in grado di distinguere una cultivar dall'altra. E' stato così possibile determinare, come atteso, che la maggior parte dei semi risultano essere prodotto di

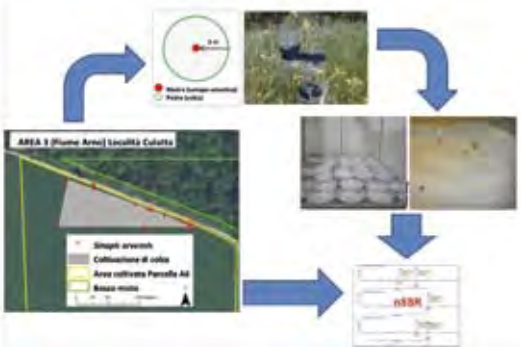


Fig. 11. Disegno sperimentale per la valutazione dell'ibridazione tra colza e senape selvatica.

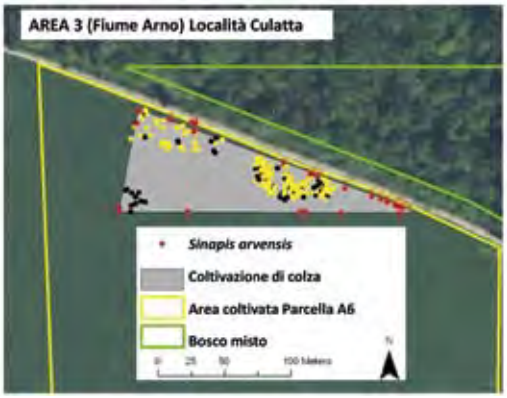


Fig. 12. Piante di Sinapis arvensis potenziali madri e piante di colza: CV1 in nero e CV2 in giallo.

[1] I microsatelliti sono riportati in Lowe et al. 2002, 2004, Szewc-Mc Fadden et al. 1996, Lagercrantz et al.1993.

autofecondazione di *Sinapis arvensis,* come aspettato, ma una minore percentuale risulta essere il prodotto di fecondazione tra individui diversi di senape selvatica e tra piante di senape selvatica e colza. In particolare la pianta di senape selvatica indicata con il numero 3 e la pianta indicata con il numero 10 hanno prodotto progenie ibrida con piante di colza della CV2.

I risultati indicano che se viene coltivato colza GM, la possibilità che i suoi geni modificati siano trasferiti a *S. arvensis* deve essere presa in seria considerazione.

Bibliografia

- Boerjan, W. 2005. Biotechnology and the domestication of forest trees. Curr. Opin. Biotechnol. 16: 159–166.
- Bradshaw, H.D. Jr. and S.H. Strauss 2001. Breeding strategies for the 21st century: Domestication of poplar. In Poplar Culture in North America. Edited by D.I. Dickmann, J.G. Isebrands, J.E. Eckenwalder, and J. Richardson. NRC Research Press, Ottawa pp. 383-394.
- Ellstrand, N.C. 2001. When transgenes wander, should we worry? Plant Physiology 125: 1543-1545.
- Ellstrand, N.C. and D.R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24: 217–242.
- Ellstrand, N.C., H.C. Prentice and J.F. Hancock. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Annual Review of Ecology and Systematics 30: 539-563.
- Ellstrand, N.C., H.C. Prentice and J.F. Hancock. 2002. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. In: Horizontal Gene Transfer, 2nd edn (eds Syvanen, M. & Kado, C.I.). Academic Press, San Diego, CA, pp. 217–234.
- Friesen, L.F., A.G. Nelson, and R.C. Van Acker. 2003. Evidence of contamination of pedigreed canola (*Brassica napus*) seedlots in western Canada with genetically-engineered herbicide-resistance traits. Agron. J. 95: 1342–1347.
- Guillot, G., F. Mortier, A. Estoup. 2005. Geneland: A program for landscape genetics. Molecular Ecology Notes 5: 712-715.
- Hall, L., K. Topinka, J. Huffman, L. Davis and A. Good. 2000. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. Weed Sci. 48: 688–694.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt and S.L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.
- Hancock, J.F., R. Grumet, and S.C. Hokanson. 1996. The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. Hortscience 31: 1081–1085.
- James, R.R., S.P. DiFazio, A.M. Brunner, and S.H. Strauss. 1998. Environmental effects of genetically engineered woody biomass crops. Biomass & Bioenergy 14: 403-414.

- Lagercrantz, U. 1998. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosomal fusions and frequent rearrangements. Genetics 150: 1217–1228
- Levin, D.A., J. Francisco-Ortega and R.K. Jansen. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. Conserv. Biol. 10: 10–16.
- Lexer, C., M.F. Fay, J.A. Joseph, M.S. Nica and B. Heinze. 2005. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. Mol. Ecol. 14: 1045–1057.
- Lowe, A.J., A.E. Jones, A.F. Raybould, M Trick, C.L. Moule and K.J. Edwards. 2002. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. Molecular Ecology Notes 2: 7-11
- Lowe, A.J., C. Moule, M. Trick and K.J. Edwards. 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in Brassica crop species. Theor Appl Genet 108: 1103–1112.
- Marshall T.C., J. Slate, L.E.B. Kruuk and J.M. Pemberton. 1998. Molecular Ecology, 7: 639-655.
- Mathews, J.H. and M.M. Campbell. 2000. The advantages and disadvantages of the application of genetic engineering to forest trees: a discussion. Forestry 73: 371–380.
- Muir, W.M. 2001. Potential environmental risks and hazards of biotechnology. Part 1. Risks and hazards. ISB News Report November 2001, pp. 6-9.
- Mullin, T.J. and S. Bertrand. 1998. Environmental release of transgenic trees in Canada potential benefits and assessment of biosafety. Forestry Chronicle 74: 203-218.
- National Research Council (NRC). 2004. Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects. National Academy Press, Washington, DC.

Capitolo 3

Valutazione della Biodiversità

3.1 – Diversità Vegetale (Analisi Floristica e Vegetazionale)

Valeria Tomaselli, Giuseppe Veronico, Giambattista Polignano

Istituto di Genetica Vegetale, Consiglio Nazionale delle Ricerche, via G. Amendola 165/A, 70126 Bari (Italy)

Le analisi della biodiversità vegetale nell'area di studio hanno riguardato il censimento delle specie vegetali (piante vascolari), la loro fenologia così come l'identificazione di quelle specie suscettibili di ibridazione con specie target coltivate, l'identificazione di comunità vegetali e la loro relazione con le principali caratteristiche ambientali.

Materiali e Metodi

All'interno dell'area di studio sono stati identificati e riconosciuti specifici siti sulla base delle principali caratteristiche ecologiche. I siti sono: Pioppeta naturale, Bosco misto, Pineta, incolto "Serchio" (parcella S21), area coltivata "Culatta" (parcella A6), prati umidi "Lame" e aree umide del lago Massaciuccoli. In ognuno di questi siti, sono state selezionate parcelle di campionamento permanenti, variabili per numero e dimensioni, secondo l'estensione e il tipo di vegetazione. Le principali parcelle sperimentali sono di 1000 m^2 divise, dove possibile, in sub-parcelle di 100 m^2 e 10 m^2, secondo lo schema dei quadrati nidificati proposto da Dengler (2009), per valutare gli schemi di diversità vegetale di parcelle individuali di particolare interesse, lungo gradienti ambientali, con specifici tipi di vegetazione, o per settori di paesaggio. Per la misura della biodiversità vegetale in ambienti boschivi, è stato usato un numero variabile di parcelle di 1000 m^2 (e sub-parcelle nidificate), secondo l'estensione dell'area sotto esame. Nel caso dei prati umidi delle "Lame", sono state scelte parcelle di 10 m^2, per la particolare topografia del sito. Nel caso delle zone umide di Massaciuccoli, il posizionamento di parcelle permanenti non è stato fattibile a causa della morfologia particolare del sito e il riconoscimento della biodiversità vegetale è stato fatto attraverso l'uso di parcelle sperimentali scelte casualmente durante la prima stagione. Il campionamento della flora vascolare è stato effettuato a partire dal mese di Marzo (per la flora precoce) fino al mese di Novembre (per le fioriture tardive e per la raccolta delle ultime fasi fenologiche). Sulla base degli esemplari raccolti, è stato creato un database. Per ogni *taxa* sono stati riportati: famiglia botanica, forma biologica (Raunkiaer 1934), gruppo corologico (Pignatti 1982; per evitare la frammentazione in gruppi e sottogruppi corologici, il corotipo è stato opportunamente unito in gruppi principali) e indice bio-ecologico, secondo Pignatti et al. (1996). La nomenclatura si basa su Conti et al.

(2005) e modifiche seguenti (2007). Sulla base di questo database, per ogni sito di studio sono stati calcolati: a) distribuzione delle specie in famiglie botaniche; b) distribuzione per forme biologiche; c) spettro corologico, evidenziando la distribuzione geografica.
I dati derivati dall'applicazione dell'indice bio-ecologico di Pignatti-Ellenberg sono stati elaborati. L'indice bio-ecologico è un valido sistema per correlare determinate condizioni ambientali con la presenza di specie o comunità vegetali in una data area, fornendo una gamma di informazioni sulle peculiarità ecologiche caratterizzanti l'area stessa (Ellenberg 1974, Pignatti et al. 1998). Secondo questo indice, a ogni specie è assegnato un valore per ognuno dei sei fattori ambientali, in base a una precisa scala numerica:

- Radiazione luminosa (L): da 1 a 9;
- Temperatura (T): da 1 a 9;
- Continentalità del clima (C): da 1 a 9;
- Umidità (U): da 1 a 12;
- Reazione del suolo (R): da 1 a 9;
- Disponibilità di nutrienti (N): da 1 a 9;
- Salinità (S): da 1 a 3.

I valori possono poi essere trasformati in un grafico-radar chiamato ecogramma (Pignatti et al. 1996). La presenza di specie a rischio/rare è stata effettuata seguendo le liste rosse nazionali e regionali (Conti et al. 1992, 1997). Le analisi sulla vegetazione sono state svolte seguendo il metodo fitosociologico di Zürich-Montpellier. (Braun-Blanquet 1964). I rilievi fitosociologici sono stati effettuati con la precedente selezione di parcelle e sub-parcelle, nel periodo Marzo-Ottobre 2010 e mappati usando un GPS. Le dimensioni delle parcelle variano da 1000 m^2 a 10 m^2, secondo il tipo di vegetazione e microtopografia. I rilievi sono stati catalogati in diverse matrici: vegetazione boschiva, vegetazione erbacea dei prati umidi e comunità nitrofile dei terreni incolti. Per ogni set di dati, è stata eseguita la *similarity analysis* dei rilievi usando il software SYN-TAX 2000 (Podani 2001). La scala di campionamento originale di Braun-Blanquet è stata trasformata nella scala ordinale secondo Van der Maarel (1979). È stato applicato il metodo di classificazione gerarchica (UPGMA). La diversità dei rilievi è stata misurata usando la distanza Euclidea. L'ordinamento dei set di dati è stato fatto usando il software PC-ORD 4.34. Nelle analisi di ordinamento si è utilizzato il metodo " Non metric Multidimensional Scaling (NMS)", basato sulla distanza Euclidea. I *syntaxa* sono stati assegnati secondo la classificazione di Riva-Martinez et al. (2001. 2002). Allo scopo di identificare, tra le specie spontanee indagate, quelle suscettibili di ibridazione potenziale, è stato selezionato un insieme di specie-bersaglio della famiglia delle *Brassicacee* (ossia quelle registrate nell'area di studio "Culatta") e la loro fenologia è stata costantemente osservata. Iniziando da Marzo 2010, e attraverso tutta la stagione vegetativa, sono stati registrati i dati fenologici per le specie-bersaglio identificate, su base mensile, secondo i protocolli BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, Chemische Industrie) (Schwartz 2003).

Analisi floristiche: distribuzione per famiglia botanica, forma biologica e gruppo corologico.

Un totale complessivo di 307 *taxa*, distribuito in 57 famiglie, è stato registrato nelle aree di studio durante il periodo di osservazione. *Poaceae* (17,6%), *Asteraceae* (12%) e *Cyperaceae* (8,5%) sono le famiglie prevalenti. Comparando la distribuzione delle specie nelle differenti aree di studio (Fig. 1-5), le *Poaceae* risultano la famiglia più rappresentata in tutti gli ambienti considerati, con il valore più alto (42%) registrato nella Pineta. La sola eccezione è nella Pioppeta, dove le *Cyperaceae* risultano la famiglia prevalente, probabilmente per il prolungato periodo di inondazione di questo ambiente. In generale, tutti gli ambienti igrofili, come i prati umidi ("Lame"), le zone umide del Lago Massaciuccoli, la Pioppeta e il Bosco misto, sono caratterizzate da una larga presenza di specie appartenenti alla famiglia delle *Cyperaceae*. Altre famiglie con percentuali significative sono *Asteraceae* e *Fabaceae*. Un alto tasso di *taxa* appartenenti alla famiglia delle *Ranunculaceae* si riscontra nei prati umidi.

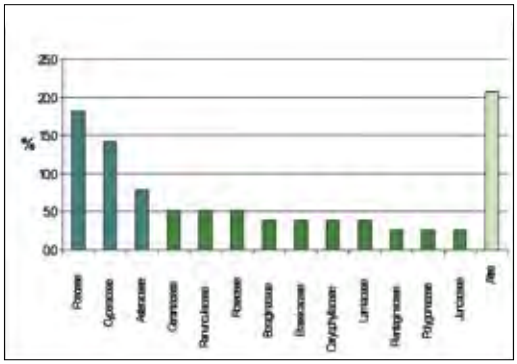


Fig. 1. Distribuzione per famiglia botanica delle specie raccolte nel Bosco misto.

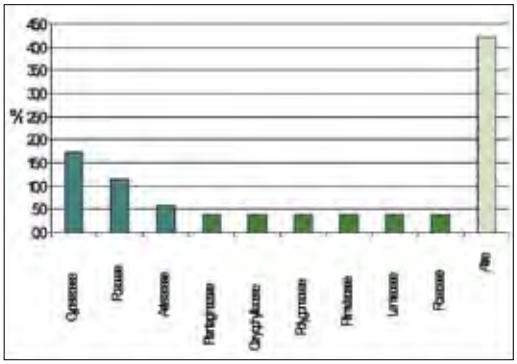


Fig. 2. Distribuzione per famiglia botanica delle specie raccolte nella Pioppeta.

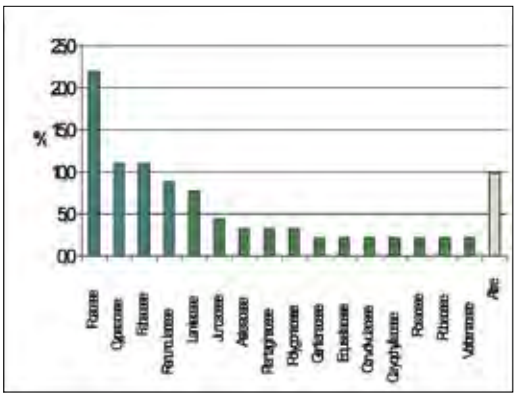


Fig. 3. Distribuzione per famiglia botanica delle specie raccolte nei prati umidi (Lame).

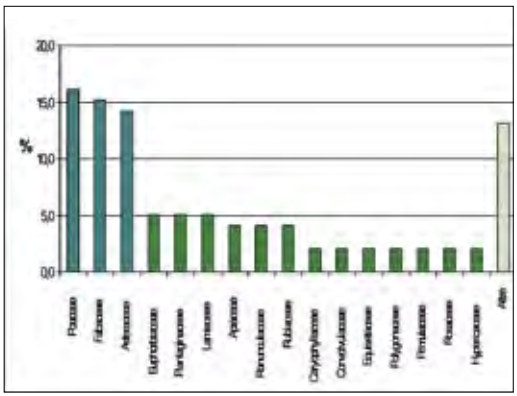


Fig. 4. Distribuzione per famiglia botanica delle specie raccolte negli incolti (Serchio).

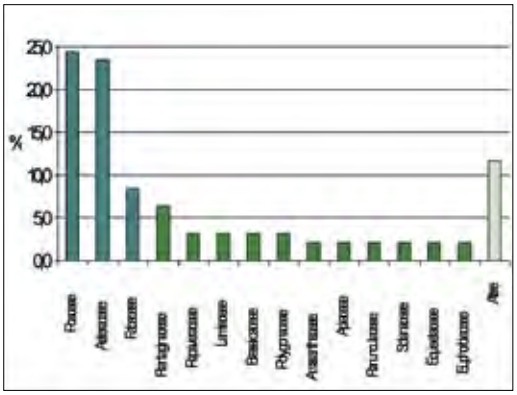


Fig. 5. Distribuzione per famiglia botanica delle specie raccolte nei prati umidi (Culatta).

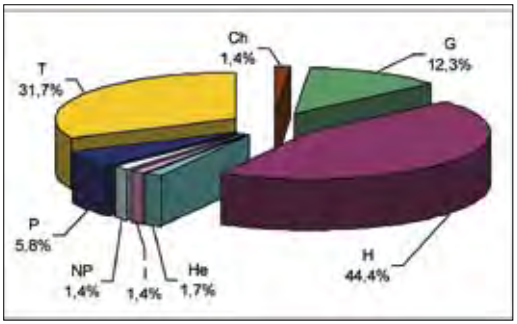


Fig. 6. Distribuzione delle specie raccolte nelle aree di studio per forma biologica.

Riguardo alla distribuzione delle specie secondo le forme biologiche (Fig. 6), le emicriptofite (H) sono quelle prevalenti con una percentuale totale del 44,4%, come ci si aspetta principalmente negli ambienti umidi rappresentati da boschi igrofili e comunità erbacee perennanti. Le terofite (T) sono in percentuale abbondante (32%), a causa della loro presenza massiva negli ambienti semi-naturali (terreni incolti) soggetti a intensive pressioni antropiche. Anche le geofite (G) e le fanerofite (P) hanno valori significativi. Vale la pena notare che le forme biologiche specificatamente legate agli ambienti umidi (elofite (He) e idrofite (I)), sebbene presentino un discreto numero di *taxa*, raramente raggiungono percentuali apprezzabili.

Lo spettro corologico (Fig. 7) mostra una chiara predominanza di tipi cosmopoliti e sub-cosmopoliti, con un valore molto alto (24%). Queste entità sono generalmente collegate ad ambienti nei quali la pressione antropica è molto elevata.

I corotipi euromediterranei presentano un

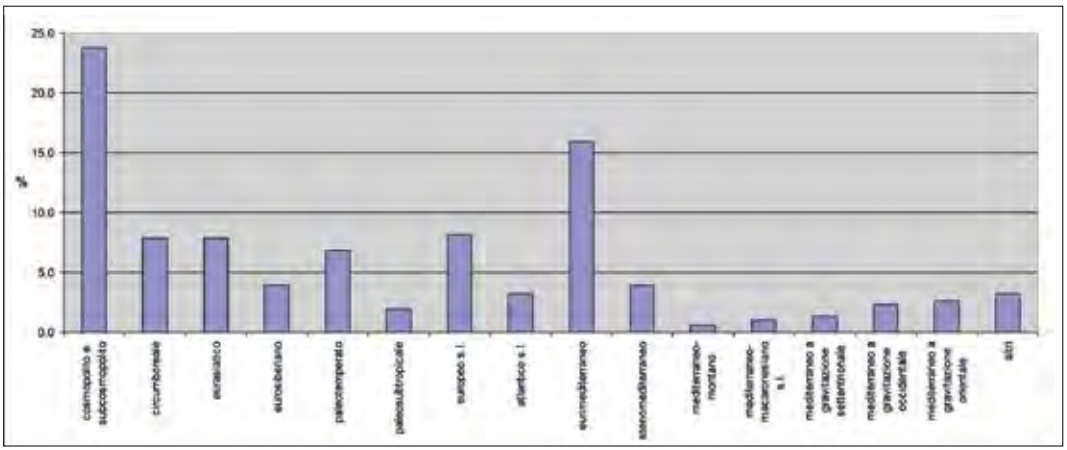


Fig. 7. Distribuzione delle specie raccolte nelle aree di studio per tipo corologico.

valore abbastanza significativo (16%). Altri corotipi rivestono percentuali del 7-8% circa e sono caratterizzati da larghi areali di distribuzione (Circumboreali, Euroasiatici, Europei,

Paleotemperati). Scarsa significatività ha la presenza di elementi mediterranei.

Gli ecogrammi di Pignatti-Ellenberg danno utili informazioni sull'ecologia delle aree di studio.
Per la radiazione luminosa (L), tutte le praterie mostrano valori alti, rivelando una componente significativa di specie vegetali che preferiscono l'insolazione diretta e costante, come ci si aspetta dalle comunità vegetali pratensi e come confermato dagli ecogrammi individuali di queste aree (incolti, prati umidi e zone umide). Il Bosco misto (Fig. 8 - A) e la Pioppeta naturale (Fig. 8 - B), presentano invece bassissimi valori di L, per la presenza di un grande numero di specie sciafile del sottobosco. La Pineta (Fig. 8 - C) differisce da tutte le altre aree di studio per gli alti valori di L e T, data la presenza di specie più termofile. L'umidità del suolo (U) ha un valore molto alto nella Pioppeta, nei prati umidi e nelle zone umide confermando, in queste aree, la prevalenza di *taxa* che necessitano di terreno ben rifornito di acqua e sopportanti lunghi periodi di sommersione. L'ecogramma della pineta mostra il valore di U più basso; questo ambiente è caratterizzato da suoli con alta permeabilità e da specie che tollerano un certo grado di siccità in estate.

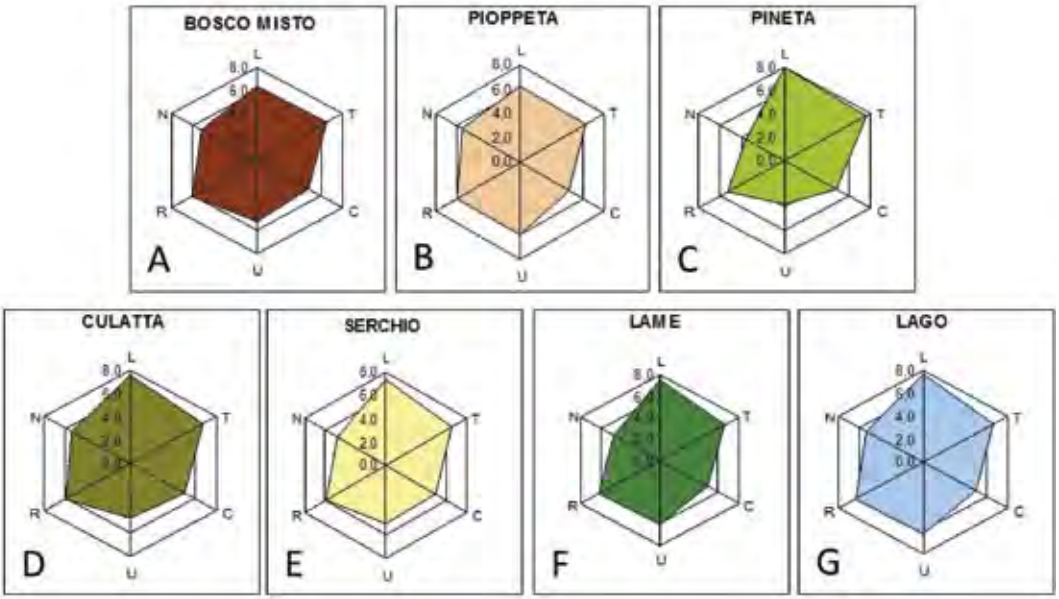


Fig. 8. Ecogrammi (Pignatti-Ellenberg) per i siti di studio: A) bosco misto; B) pioppeta; C) pineta; D) incolti "Culatta"; E) incolti "Serchio"; F) prati umidi "Lame"; G) zone umide del lago di Massaciuccoli.

La disponibilità di nutrienti (N) evidenzia la presenza di specie con crescita ottimale su suoli ben umificati, provvisti di materia organica e nutrienti. Questi valori sono leggermente superiori negli ambienti degli incolti (Fig. 8 - D e E) e, sorprendentemente, nella Pioppeta (Fig. 8 - B) e nelle zone umide (Fig. 8 - F e G). Nell'ultimo caso, il più alto valore di N è dovuto alla particolare posizione di alcune parcelle sperimentali, localizzate in prossimità

di confine tra zone umide e aree coltivate. Nella pineta c'è una forte presenza di piante che preferiscono suoli oligotrofici.

Analisi floristiche: specie rare e a rischio nelle aree di studio

È stato riscontrato un numero significativo di specie rare e a rischio, inserite nelle liste rosse nazionali e regionali, o nelle liste CITES o nell'Allegato II della Direttiva Habitat (Direttiva CEE 92/43).
Alcune di esse, tipiche dell'area del lago di Massaciuccoli, sono a rischio a livello nazionale: *Periploca graeca* L. (Fig. 9) e *Hibiscus palustris* L. (Fig. 10) [vulnerabile (VU)]; *Hydrocotyle vulgaris* L. [minacciata (EN) a livello nazionale] e *Anagallis tenella* (L.) L. [gravemente minacciata (CR) a livello nazionale]. Inoltre, è stato trovato un ricco contingente di piante a rischio a livello regionale: *Leucojum aestivum* L. subsp. *aestivum* [gravemente minacciata (CR)] e *Cladium mariscus* (L.) Pohl [a basso rischio (LR)], *Euphorbia palustris* L. [vulnerabile (VU)], *Carex panicea* L. [vulnerabile (VU)], *Carex vesicaria* L. [vulnerabile (VU)], *Oenanthe lachenalii* Gmelin [vulnerabile (VU)] e *Thelypteris palustris* Schott [vulnerabile (VU)]. Tutte le specie menzionate vivono nell'area del lago di Massaciuccoli e sono fortemente suscettibili di variazioni dei fattori ecologici direttamente influenzanti le zone umide e, in particolare, quelli relativi alla qualità ed al regime dell'acqua.
Finora, sono state trovate solo poche specie vegetali aventi interesse conservazionistico negli altri ambienti/aree di studio: *Ranunculus flammula* L., nei prati umidi delle "Lame", vulnerabile (VU) nell'intero territorio italiano; *Carex panicea* L., che cresce nello strato erbaceo del Bosco misto, vulnerabile (VU) a livello regionale; *Ranunculus ophioglossifolius* Vill vulnerabile (VU) a livello nazionale e trovato sia nelle "Lame" che nel Bosco misto.

Fig. 9. Periploca graeca

Fig. 10. Hibiscus palustris

Analisi floristica: fenologia e ibridazione potenziale

Un gruppo di specie appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* e registrato nell'area di studio "Culatta" è stato costantemente osservato, seguendone le fasi fenologiche, partendo

da Marzo 2010 e per tutta la stagione vegetativa. Le specie monitorate e registrate sono le seguenti: *Sinapis arvensis* L., *Cardamine hirsuta* L. (Fig. 11), *Capsella bursa pastoris* (L.) Medicus (Fig. 12), *Cardamine pratensis* L. and *Alliaria petiolata* (Bieb.) Cavara et Grande (Fig. 13). *Sinapis arvensis e Capsella bursa-pastoris* sono state localizzate negli incolti circostanti le aree coltivate, *Cardamine pratensis e Alliaria petiolata*, entrambe specie mesofile, sono state raccolte nello strato erbaceo del Bosco misto, mentre *Cardamine hirsuta* è stata trovata in ambedue gli ambienti.

Per rendere più facile l'interpretazione dei dati, è stata usata una specifica simbologia. Nella tabella 1 sono stati riportati i principali stadi fenologici delle specie osservate.

Sinapis arvensis è stata riconosciuta essere la miglior candidata per l'ibridazione potenziale con la colza coltivata (*Brassica napus* L. var. *oleifera* D.C.), per il periodo di fioritura più o meno simultaneo (e lungo) ma anche per la spiccata IHP (Introgressive hybridization propensity, propensione all'ibridazione interspecifica; Devos et al., 2009) e l'alta SC (sexual compatibily, compatibilità sessuale; Letorneau et al., 2003).

Fig. 11. Cardamine hirsuta

Fig. 12. Capsella bursa-pastoris

Fig. 13. Alliaria petiolata

Tabella 1. Fenologia delle *Brassicaceae* nell'area di studio "Culatta". "F" è incolto; "MW" è bosco misto.

Specie	Famiglia	Ambiente	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre
Sinapis arvensis L.	Brassicaceae	F	☼	☼	☼ ●	☼ ●	☼ ●	●	▭
Cardamine hirsuta L.	Brassicaceae	F/MW	☼	●	▭				
Capsella bursa-pastoris (L.)Medicus	Brassicaceae	F	☼	●	▭				
Cardamine pratensis L.	Brassicaceae	MW		☼	●	▭			
Alliaria petiolata (Bieb.)Cavara et Grande	Brassicaceae	MW			☼	●	▭		

☼ = full flowering
● = ripe fruits
▭ = seed dispersion

Analisi della vegetazione: fitocenosi

Lago di Massaciuccoli

Come già sottolineato da Tomei et al. (1997), le fitocenosi crescenti strettamente nelle zone umide del lago di Massaciuccoli sono divise nei seguenti tipi:

a) vegetazioni dominate da idrofite (ad esempio piante acquatiche, interamente o quasi sommerse nell'acqua, con l'eccezione delle foglie galleggianti; in questo gruppo sono incluse le fitocenosi con *Myriophyllum verticillatum* L. e quelle con *Ceratophyllum demersum* L., in acque eutrofiche; fitocenosi di *Potamogeton pectinatus* L. e, in acque oligotrofiche, cenosi di *Nymphaea alba* L.) - questa vegetazione può far riferimento all'habitat 3150 (laghi eutrofici naturali con vegetazione del *Magnopotamion* o *Hydrocharition*), secondo la Direttiva CEE 92/43);

b) vegetazioni dominate da elofite (ad esempio, piante "anfibie" con la parte inferiore sommersa per la maggior parte dell'anno e con foglie aeree; questo gruppo include la canna comune e molte specie appartenenti alle *Juncaceae* e *Cyperaceae*, tipiche dell'ambiente palustre).

c) prati umidi (praterie igrofile perenni) - habitat 6420 (Praterie umide mediterranee con piante erbacee alte del *Molinio-Holoschoenion*)

Nel secondo gruppo (elofite) ricadono le fitocenosi con *Phragmites australis* (Cav.) Trin. e quelle con *Cladium mariscus* (L.) Pohl.. Le fitocenosi di *Cladium mariscus* fanno riferimento all'associazione *Cladietum marisci* (Allorge 1922) Zobrist 1935, e corrispondono all'habitat prioritario 7210 (Paludi calcaree con *Cladium mariscus* e specie del *Caricion davallianae*) secondo la Direttiva CEE 92/43, e hanno un estensione molto limitata rispetto ai canneti. La *Phragmites australis* è una specie invasiva che tende a invadere le cenosi di *Cladium mariscus* e, col passare del tempo, a estendersi fino a sostituirle. I canneti sono riferiti all'associazione *Phragmitetum communis* (Koch 1926) Schmale 1939 (Fig. 14). In alcune aree marginali, lungo i confini tra gli argini e i canneti, si trovano popolazioni di *Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla (riferito all'associazione *Scirpetum lacustris* Schmale 1939). Spostandosi verso le aree interne, soggette al pascolo e ad altre attività umane, tendono a prevalere gli incolti caratterizzati da cenosi di erbacee sub-nitrofile perenni (classe *Artemisietea vulgaris* Lohmeyer, Preising & Tüxen ex von Rochow 1951).

Con riferimento alle analisi di specifiche aree di studio, molte di esse ricadono sotto le cenosi elofitiche e, precisamente, sotto quelle a *Phragmites australis* e *Schoenoplectus lacustris*. Due siti si estendono nell'area di transizione, caratterizzati da cenosi arbustive a *Rubus ulmifolius* Schott e *Calystegia sepium* (L.) R. Br. e con la presenza della rara *Periploca graeca* L.. Infine, due siti ricadono

Fig. 14. Lago di Massaciuccoli, Phragmitetum communis

nelle cenosi erbacee, dominate dalle specie sinantropiche e sub-nitrofile annuali e perenni delle aree incolte.

Prati umidi delle "Lame"

L'intera area di studio di S. Rossore è caratterizzata da una vasta estensione di zone umide. Nell'entroterra questi ambienti sono caratterizzati da acque dolci mentre, vicino la linea di costa, tendono a prevalere acque salate e salmastre (e quindi, cenosi di piante alofite e sub-alofite). A causa di questa variabilità della qualità dell'acqua e dei fattori edafici, le paludi salmastre e i prati umidi ospitano un'ampia gamma di tipi vegetazionali (Tomei et al. (2004)).

Fig. 15. Prati umidi, area di studio "Lame"

I prati umidi del sito "Lame" (Fig. 15), costituiscono un ambiente variegato con un intricato mosaico di tipi vegetazionali correlati a differenti periodi alluvionali, all'umidità del suolo ed ad altri fattori edafici. Questo è chiaramente dimostrato dalla *cluster analysis* (UPGMA-Euclidean) che evidenzia tre sub-cluster (A1, A2 e B), ognuno dei quali collegato ad un particolare regime idrico (Fig. 20). I risultati della *cluster analysis* sono confermati dal diagramma di ordinamento (Fig. 21), mostrante i rilievi dei prati umidi dispersi in tre gruppi corrispondenti ai tre principali sub-cluster. Lungo l'asse 1, si evidenzia un gradiente chiaramente collegato all'umidità del suolo e al periodo di sommersione. Il primo gruppo sulla sinistra del grafico (corrispondente al sub-cluster A2) è formato da quelle posizioni caratterizzate da un lungo periodo di sommersione. La presenza e l'abbondanza di *Eleocharis uniglumis* (Link) Schultes*, Cyperus longus* L.*, Gratiola officinalis* L. (Fig. 16) ci porta a riferire la vegetazione alla classe *Phragmito-Magnocaricetea* Klika in Klika & Novák 1941 e all'associazione *Magnocaricion elatae* Koch 1926 (Fig. 17). Il gruppo nella parte centrale del grafico (corrispondente al sub-cluster A1) è formato dalla maggior parte delle stazioni, caratterizzate da un periodo di sommersione più breve e riferibile, sulla base della composizione floristica [*Carex distans* L.*, C. divisa* Huds. (Fig. 18)*, C. hirta* L. (Fig. 19)*, Holcus lanatus* L.*, Poa trivialis* L.*, Ranunculus repens* L.*, Juncus inflexus* L.], alla classe *Molinio-Arrhenateretea* Tüxen e all'associazione *Menho-Juncion inflexi* De Foucault 1984 (ordine *Plantaginetalia majoris* Tüxen & Preising in Tüxen 1950). Il gruppo sulla destra del grafico, con solo due rilevamenti (corrispondenti alla classe B) è rappresentato dalle posizioni più asciutte, localizzate nelle parti elevate delle aree umide, e caratterizzate da un periodo di sommersione molto breve o assente e dalla dominanza di *Anthoxanthum odoratum* L. e *Gaudinia fragilis* (L.)Beauv.. In Fig. 22 viene dato uno schema delle principali comunità vegetali riscontrate nel sito.

Questi tipi di vegetazione possono essere riferiti all'habitat 6420 (Praterie umide mediterranee con piante erbacee alte del *Molinio-Holoschoenion*), secondo l'Allegato I della Direttiva Habitat.

Fig. 16. Gratiola officinalis

Fig. 17. Vegetazione con Eleocharis uniglumis (Magnocaricion)

Fig. 18. Carex divisa

Fig. 19. Carex hirta

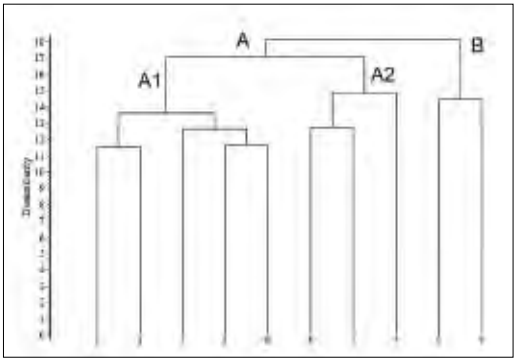


Fig. 20. Analisi per cluster dei gruppi vegetazionali nel sito "Lame"

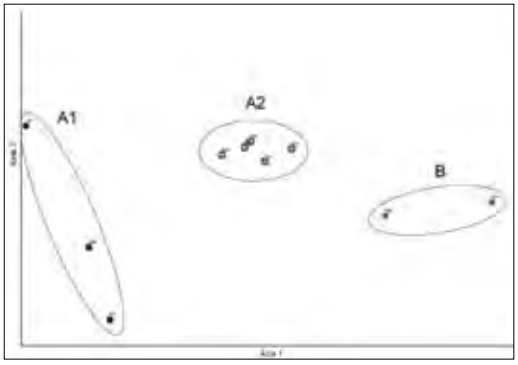


Fig. 21. Diagramma di ordinamento delle stazioni del sito "Lame"; spiegazione nel testo.

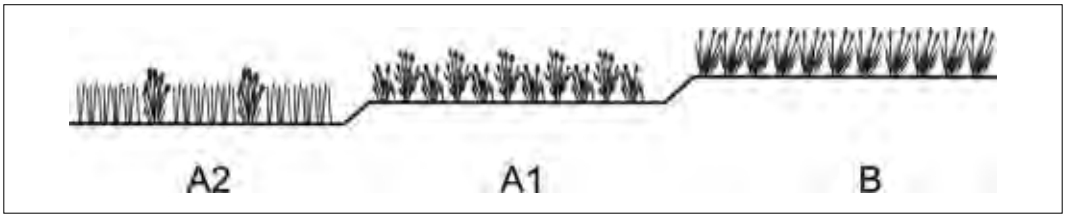


Fig. 22. Transetto schematico ideale della vegetazione dei prati umidi delle "Lame", dalle zone soggette a periodi prolungati di sommersione (sinistra), alle arre più elevate soggette (o no) a periodi di sommersione più brevi (destra). A2) comunità igrofile a Eleocharis uniglumis e Cyperus longus (classe Phragmito-Magnocaricetea); A1) comunità meso-igrofile a Carex sp.pl. (classe Molinio-Arrhenatheretea); B) comunità mesofile a Anthoxanthum odoratum (classe Molinio-Arrhenatheretea).

Incolti "Serchio"

Le terre incolte analizzate nell'area "Serchio" sono aree semi-naturali in ripresa dopo un lungo periodo di coltivazione (piantagioni di pioppo). Questi incolti sono circondati da vari ambienti, come altre piantagioni di pioppo, fasce boschive, pascoli, prati umidi e canali di scolo.

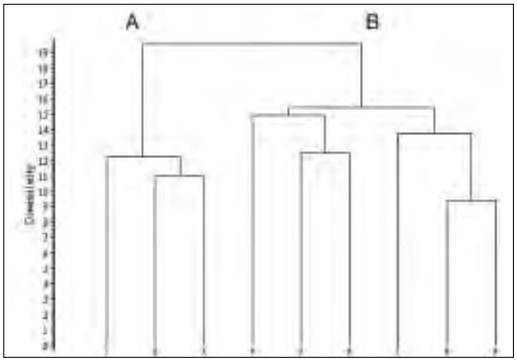


Fig. 23. Cluster analysis delle stazioni ad incolto nel sito "Serchio"

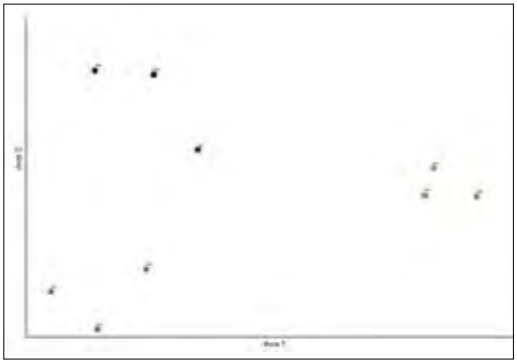


Fig. 24. Diagramma di ordinamento delle unità di vegetazione dell'incolto nel sito "Serchio"; in nero e in azzurro, le unità caratterizzate da una componente ricca in mesofile (classe Molinio-Arrhenatheretea) e igrofile (classe Phragmito-Magnocaricetea). In arancione, le unità caratterizzate da ruderali e foraggere nitrofile perenni (classe Artemisietea vulgaris). Maggiori spiegazioni nel testo.

L'alto numero di specie registrate nelle tre parcelle degli incolti del "Serchio" è correlato alla particolare natura del sito. Qui le specie tipiche degli incolti sono mischiate con altre provenienti dagli ambienti circostanti (ecotono).

Le analisi dei cluster (UPGMA – Distanza euclidea) evidenziano che su nove sub-parcelle è chiara una distinzione in due gruppi ecologici (Fig. 23).

Si differenziano ben due cluster principali: cluster (A) comprendente gli insiemi della parcella S1 (sub-parcelle S1.1, S1.2, S1.3), caratterizzate da una componente floristica nitrofila e ricca in terofite; cluster (B) comprendente gli insiemi della parcella S2 (sub-parcelle S2.1, S2.2, S2.3) e la parcella S3 (S3.1, S3.2, S3.3) e caratterizzata da una componente floristica ricca in specie perenni mesofile e sub-nitrofile. Il risultato delle analisi dei cluster è confermato dal diagramma di ordinamento, mostrante i rilievi degli incolti del sito "Serchio" disperse in due gruppi (Fig. 24) corrispondenti ai due cluster principali.

Il gruppo sulla sinistra del grafico (corrispondente al cluster B) è formato da quelle stazioni caratterizzate da componenti ricche in specie mesofile della classe *Molinio-Arrhenatheretea* e dell'ordine *Plantaginetalia majoris* (*Mentha suaveolens* Ehrh*., Holcus lanatus* L*., Lotus tenuis* W. et K., *Trifolium repens* L*., Potentilla reptans* L.). Classe e ordine includono piante da mesofile a igrofile, perenni, spesso di prati umidi concimati e cenosi dei pascoli su suoli profondi e umidi, periodicamente inondati (e, in questo caso, ricchi in nutrienti organici). Queste stazioni sono caratterizzate anche dalla presenza e dalla relativa abbondanza di *Phragmites australis, Mentha aquatica* L*., Lythrum salicaria* L., specie di ambienti paludosi e lacustri (*Phragmito-Magnocaricetea*; Fig. 25, 26 e 27) e una componente sub-nitrofila della classe *Galio-Urticetea* Passarge ex Kopecký 1969 [ad esempio *Dipsacus fullonum* L. (Fig. 28)*, Eupatorium cannabinum* L.]. Il gruppo sulla destra del grafico (corrispondente al cluster A) è formato da quelle stazioni caratterizzate da una ricca componente di alte erbe e foraggere perenni e biennali, specie ruderali e nitrofile crescenti su suoli ricchi di sostanza organica (classe *Artemisietea vulgaris* Lohmeyer, Preising & Tüxen ex von

Fig. 25. Lythrum salicaria

Fig. 26. Stazione con Lythrum salicaria e Phragmites australis

Fig. 27. Mentha aquatica

Fig. 28. Dipsacus fullonum

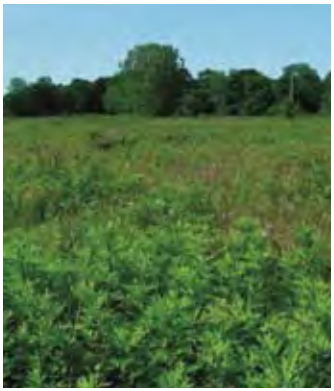


Fig. 29. Sito "Serchio", incolti con Artemisia verlotiorum

Fig. 30. Artemisia verlotiorum

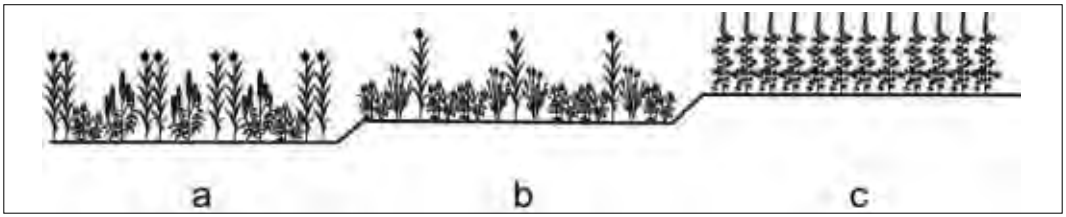


Fig. 31. *Transetto schematico ideale della vegetazione, dalle zone più basse soggette a periodi prolungati di sommersione (sinistra), alle aree marginali (destra). a) comunità igrofile a Phragmites australis e Lythrum salicaria (classe Phragmito-Magnocaricetea); b) comunità meso-igrofile a Mentha aquatica (classe Molinio-Arrhenatheretea); c) comunità nitrofile a Artemisia verlotiorum (classe Artemisietea vulgaris).*

Rochow 1951), con una chiara dominanza di *Artemisia verlotiorum* Lamotte (Fig. 29 e 30) (ordine *Artemisietalia vulgaris* Lohmeyer in Tüxen 1947). È pure presente un contingente di specie del *Molinio-Arrhenatheretea*, a indicare una marcata umidità del suolo, anche durante il periodo estivo.
In Fig. 31 viene dato uno schema delle principali comunità vegetali riscontrate nel sito

Incolti "Culatta"

La parcella nel sito "Culatta" è un tipico incolto in un contesto agricolo (Fig. 32). Secondo la classificazione proposta da Rivas-Martinez et al. (2002), molte delle specie individuate nel sito appartengono allo *Stellarietea mediae* Tuxen, Lohmeyer & Preising ex von Rochow, che comprende le cenosi annuali composte da specie ruderali nitrofile e semi-nitrofile (*Sinapis arvensis* L.*, Papaver rhoeas* L.*, Sonchus asper* (L.) Hill., *Phalaris paradoxa* L.*, Alopecurus myosuroides* Hudson*, Phalaris minor* Retz.*, Avena fatua* L.*,* etc.). In questo caso specifico, molte delle specie appartengono a tipiche popolazioni di erbe infestanti i campi coltivati. Vale la pena notare che nella tarda estate, quando gran parte delle specie primaverili da fiore sono appassite, appare un gruppo di specie annuali con ciclo tardo estivo – autunnale. Le più frequenti sono *Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv. (Fig. 33), *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (Fig. 34), *Amaranthus graecizans* L..

Nella parcella analizzata, e anche nelle aree marginali circondanti gli incolti e i campi coltivati del sito "Culatta", è stato registrato un contingente significativo di specie perenni, sub-nitrofile e nitrofile della classe *Artemisietea vulgaris* Lohmeyer, Preising & Tuxen ex von Rochow [*Helmintotheca echioides* (L.) Holub*, Daucus carota* L., *Picris hieracioides* L. (Fig. 35)*, Elymus repens* (L.) Gould subsp. *repens, Cirsium vulgare* (Savi) Ten., *Symphyotrichum squamatum*

Fig. 32. Sito "Culatta", incolto (in primavera)

(Spreng.) G. L. Nesom, ecc.].
Lungo il limite dei campi coltivati ed incolti, in corrispondenza con le linee di confine dei fossi di drenaggio o delle siepi delimitanti la vegetazione boschiva del vicino bosco misto (Fig. 37), la vegetazione è caratterizzata da specie erbacee mesofile, perenni, come *Holcus lanatus* L. (Fig. 36)*, Plantago major* L., *Rumex conglomeratus* Murray, *Verbena officinalis* L., *Sporobolus indicus* (L.) R. Br., *Cynodon dactylon* (L.) Pers., riferenti alla classe *Molinio-Arrhenatheretea* e all'ordine del *Plantaginetalia majoris*.

Fig. 33. Echinochloa crusgalli, sito "Culatta"

Fig. 34. Setaria viridis, sito "Culatta"

Fig. 35. Picris hieracioides, sito "Culatta"

Fig. 36. Holcus lanatus, sito "Culatta"

Fig. 37. Sito "Culatta", confini tra campi coltivati e vegetazione boschiva.

Boschi misti decidui

Per quanto riguarda la vegetazione boschiva, i boschi misti decidui (Fig. 38) possono essere riferiti all'associazione *Fraxino angustifoliae-Quercetum roboris* Gellini, Pedrotti & Venanzoni 1986. Specie guida è *Quercus robur* L..
Lo strato erbaceo è caratterizzato dalla presenza di *Iris foetidissima* L. (Fig. 39), specie guida dell'associazione.

Nella parcella BM6, è stata trovata una variante in *Populus alba* L., come descritta da Tomei et al. (2004).

Fig. 38. Il bosco misto deciduo

Fig. 39. Iris foetidissima

Le analisi dello strato erbaceo permettono di evidenziare alcune differenze ecologiche nelle otto parcelle analizzate, altrimenti non ben identificabili sulla base della composizione del solo livello arboreo. Queste differenze sono poste in relazione con la variazione del periodo alluvionale e dell'umidità del suolo. Le specie più frequenti e prevalenti (in copertura) sono *Carex remota* L. e *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv.. Ciononostante, la loro distribuzione è molto incostante quando si comparano parcelle diverse. *Carex remota* tende a prevalere in quelle parcelle soggette a periodi di sommersione prolungata (BM3 e BM8), con copertura variabile di circa il 40-75% (dipende dalla copertura totale dello strato erbaceo). In questi casi, *Brachypodium sylvaticum* o non è stato trovato o solo sporadicamente con bassi tassi di copertura (BM8), mentre un gruppo di specie igrofile, solitamente caratteristiche delle marcite allagate o delle zone umide, come *Juncus effusus* L.*, Poa palustris* L.*, Myosotis scorpioides* L.*, Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv., sono presenti con alti valori di copertura. Un'attenzione speciale è stata rivolta alle analisi della parcella BM8. Essa è caratterizzata dalla parte centrale, inferiore soggetta ad intense e prolungate alluvioni e la parte circostante con un breve periodo di sommersione. La parte centrale ha un livello erbaceo povero, con grandi zone di terreno nudo e gruppi sparsi di *Carex remota e Juncus effusus* (Fig. 40 e 41). Appena il livello del suolo aumenta, la copertura erbosa diventa più cospicua con *Carex remota* e altre specie come *Carex sylvatica* L.*, Rumex sanguineus* L.*, Poa palustris* L.*,* ecc..

Fig. 40. Carex remota

Nelle postazioni più elevate con sommersioni brevi (o inesistenti) e suoli drenanti (BM 4, BM5, BM6) la copertura di *Brachypodium sylvaticum* raggiunge valori elevati (70-90%), diventando fisiognomicamente prevalente. La tendenza del gradiente ecologico

collegato all'umidità del suolo (e al periodo di sommersione) e strettamente correlato alla composizione dello strato erbaceo è rappresentato schematicamente in Fig. 42, che rappresenta un transetto ideale dello strato erbaceo, nelle zone basse, soggette a periodi di sommersione molto prolungati, alle postazioni più elevate, soggette progressivamente a meno alluvioni e con suoli ben drenanti. I boschi misti igrofili descritti possono essere riferiti all'habitat 91F0 - "Boschi ripari misti di *Quercus robur*, *Ulmus laevis* e *Ulmus minor*, *Fraxinus excelsior* o *Fraxinus angustifolia*, lungo i grandi fiumi (*Ulmenion minoris*)", secondo l'Allegato I della "Direttiva Habitat".

Fig. 41. Juncus effusus

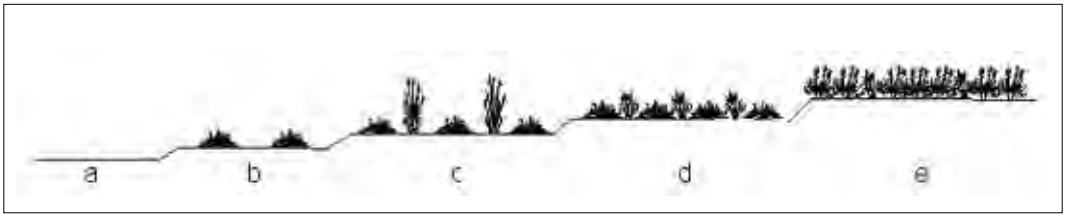


Fig. 42. Un transetto ideale dello strato erbaceo, dalla parte bassa (sinistra), soggetta a periodi di sommersione molto prolungati, alle postazioni più elevate (destra). a) suolo nudo, a lungo allagato in inverno e umido in estate; b) ciuffi sparsi di Carex remota; c) ciuffi sparsi di Carex remota e Juncus effusus; d) alta copertura di Carex remota e altre specie come Carex sylvatica; e) livello erbaceo denso con Brachypodium sylvaticum.

Pioppeta

Il bosco di pioppi naturali è caratterizzato da marcate condizioni di umidità, come evidenziato dall'alta percentuale di specie appartenenti alla famiglia delle *Cyperaceae* (17,3%). Secondo le analisi della vegetazione, la pioppeta naturale va riferita all'associazione *Carici remotae-Fraxinetum oxycarpae* Pedrotti (1970) 1992. Risulta essere un bosco planiziale e la componente arborea consiste per gran parte di *Fraxinus angustifolia* Vahl subsp. *oxycarpa* (Willd.) Franco & Rocha Afonso. In questo caso specifico, nella parcella P1, soggetta a prolungati periodi di sommersione, c'è un'importante presenza di *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. *Populus* sp. pl. ha una presenza significativa in tutte tre le parcelle. Nello strato erbaceo, *Carex remota* L. è la specie più frequente e talvolta dominante, come descritto da Pedrotti & Gafta (1996). La comparazione degli strati erbacei delle tre parcelle mostra importanti differenze in termini di composizione floristica. Le specie dominanti sono *Mentha aquatica* L. nella parcella P1 (Fig. 43), *Agrostis stolonifera* L. nella parcella P2, mentre nella parcella P3 la specie con la copertura maggiore è *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv.. Questa sorta di gradiente tra le tre parcelle è causato dalla differenza di umidità del suolo e dalla diversa durata del periodo di sommersione in inverno, con quella più lunga in P1 e con la più corta in P3 (Fig. 44). La composizione specifica

Fig. 43. Pioppeta, plot P1. La Mentha aquatica ha un'alta copertura nello strato erbaceo

dello strato erbaceo della parcella P1, insieme con l'alta copertura (oltre il 50%) di *Alnus glutinosa* suggerisce l'attribuzione di questa vegetazione all'associazione *Alno glutinosae-Fraxinetum oxycarpae* (Br.-Bl. 1915) Tchou 1946 che, secondo Arrigoni (1990), rappresenta la vegetazione planiziale igrofila più evoluta e matura.

I boschi igrofili descritti possono essere riferiti all'habitat 91F0 – "Boschi misti ripari di *Quercus robur*, *Ulmus laevis* e *Ulmus minor*, *Fraxinus excelsior* o *Fraxinus angustifolia*, lungo i grandi fiumi (*Ulmenion minoris*)", secondo l'Allegato I della Direttiva Habitat.

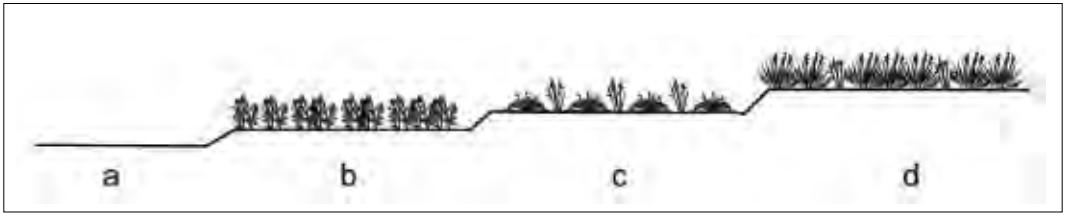


Fig. 44. Un transetto ideale dello strato erbaceo, nella parte bassa (sinistra), soggetta a periodi di sommersione molto prolungati, alle postazioni più elevate (destra). a) suolo nudo, a lungo allagato in inverno e umido in estate; b) strato erbaceo con Mentha aquatica; c) strato erbaceo con Agrostis stolonifera; d) denso strato erbaceo con Brachypodium sylvaticum.

Pineta

La pineta locata nel sito "Colmate Bozzone", è un bosco artificiale, costituito da una piantagione di *Pinus pinea* L. che ha sostituito il primitivo bosco di querce. I Pini raggiungono percentuali di copertura del 70-80%. Uno strato arbustivo ben strutturato non è ancora sviluppato. La presenza di alcuni arbusti, come *Asparagus acutifolius* L. e *Smilax aspera* L., implica un potenziale sviluppo di una componente arbustiva sclerofilla. Lo strato erbaceo consiste di circa 30 specie. Un gruppo di specie mesofile, con *Anthoxanthus odoratum* L.*, Dactylis glomerata* L.*, Elymus repens* (L.) Gould*, Gaudinia fragilis* (L.) P. Beauv.*, Festuca arundinacea* Schreb. (classe *Molinio-Arrhenatheretea*) proviene dagli ambienti dei prati umidi ("Lame") limitrofi, mentre una quantità di specie xerofile e sub-nitrofile (*Bromus hordeaceus, Hypochoeris glabra, Vulpia bromoides, Urospermum*

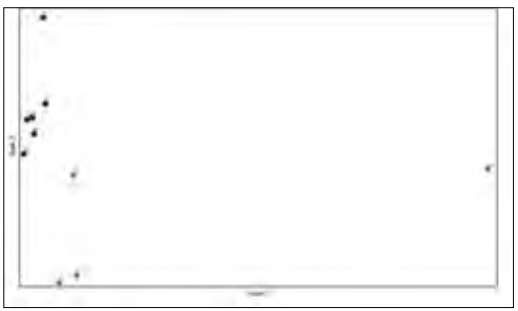


Fig. 45. Il diagramma di ordinamento (NMS) degli strati erbacei delle parcelle di 1000 m2 scelte per la vegetazione boschiva. In nero, il bosco misto; in azzurro, la pioppeta naturale; in rosso la pineta.

dalechampii, Avena barbata, Brixa maxima) indica una generale siccità di questo ambiente comparato con gli altri due ambienti boschivi esaminati.
Le analisi di ordinamento applicate alle componenti erbacee di parcelle di 1000 m^2 selezionate per la vegetazione boschiva, mostrano molto chiaramente come la parcella Pineta sia certamente segregata, sulla destra del grafico, da quelle dei boschi igrofili, sulla sinistra (Fig. 45).

Bibliografia

- Braun-Blanquet, J. 1964. Pflanzensoziologie. Grundz¨uge der Vegetationskunde. 3. Aufl., Springer Verl., Wien & New York, 330 pp.
- Conti, F., A. Manzi and F. Pedrotti 1992. Libro rosso delle piante d'Italia. 537 pp. Ministero dell'Ambiente, Ass. Ital. per il WWF, S.B.I., Poligrafica Editrice, Roma.
- Conti, F., A. Manzi and F. Pedrotti 1997. Liste rosse regionali delle piante d'Italia. 139 pp. WWF Italia, Società Botanica Italiana, TIPAR Poligrafica Editrice, Camerino.
- Conti, F., G. Abbate, A. Alessandrini and C. Blasi (eds) 2005. An annotated checklist of the Italian vascular flora, Palombi Ed., Roma.
- Conti 2007?
- Dengler, J. 2009. A flexible multi-scale approach for standardised recording of plant species richness patterns. Ecological Indicators 9: 1169–1178
- Devos, Y., A. De Schrijver and D. Reheu 2009. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives. Environ Monit Assess 149: 303–322
- Ellenberg, H. 1974. Zeigerwerte der Gefäpflanzen Mitteleuropas (Indicator values of vascular plants in Central Europe) Scripta geobotanica 9, II edition (1979), III edition (1992). Gottingen.
- Letourneau, D. K., G.S. Robinson and J. A. Hagen 2003. Bt crops: Predicting effects of escaped transgenes on the fitness of wild plants and their herbivores. Environ. Biosafety Res. 2: 219-246.
- Pignatti, S. 1982. Flora d'Italia. Edagricole, Bologna.
- Pignatti, S., H. Ellenberg and S. Pietrosanti 1996. Ecograms for phytosociological tables based on Ellenberg's Zeigerwerte. Annali di botanica 8: 5-14.
- Pignatti S., E. Dominici and S. Pietrosanti 1998. La biodiversità per la valutazione della qualità ambientale. Atti Convegni Lincei 145: 63-80. Accad. Naz. dei Lincei, Roma.
- Podani, J. 2001. SYN-TAX 2000, computer program for multivariate analysis in ecology and taxonomy. Scientia Publishing, Budapest.
- Raunkiaer, C. 1934. The life forms of plants and statistical plant geography, being the collected papers of C Raunkiaer. Clarendon, Oxford.
- Rivas-Martínez, S., T.E. Díaz, F. Fernández González, J. Izco, J. Loidi, M. Lousa and A. Penas 2001. Syntaxonomical checklist of vascular plant communities of Spain and Portugal to association level. Itinera Geobot 14: 5–341.

- Rivas-Martínez, S., T.E. Díaz, F. Fernández González, J. Izco, J. Loidi, M. Lousa and A. Penas 2002. Addenda to the syntaxonomical checklist of vascular plant communities of Spain and Portugal. Itinera Geobot 15: 433–922.
- Schwartz, M.D. 2003. Phenology: An Integrative Environmental Science (ed. Schwartz). Kluwer Academic Publishers, New York, NY.
- Tomei, P.E., A. Barsanti and E. Guazzi 1993. La carta della vegetazione delle paludi e del lago di Massaciuccoli. Lago di Massaciuccoli: 13 ricerche finalizzate al risanamento, pp. 275-288. Non sembra inserito nel testo
- Tomei et al. 1997?
- Tomei, P.E., A. Bertacchi, A. Sani and M.O. Consiglio 2004. La vegetazione della tenuta di San Rossore. Note esplicative della carta della vegetazione di Rossore 1:10.000. Pacini Ed., Pisa.
- Van der Maarel, E. 1979. Transformation of cover-abundance values in phytosociology and its effects on community similarity. Vegetatio 39: 97–114.

Capitolo 3

Valutazione della Biodiversita'

3.2 – Diverdità dei Macroinvertebrati

Isabella Colombini, Filippo Cimò, Lorenzo Chelazzi

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia)

Introduzione

Per creare una banca dati sull'artropodofauna presente nel Parco Regionale Migliarino - San Rossore - Massaciuccoli è stata svolta una ricerca bibliografica degli studi effettuati all'interno del Parco.
Questi studi sono prevalentemente faunistici e rivolti a specifici ordini o famiglie di macroinvertebrati favorendo una migliore conoscenza di alcuni gruppi rispetto ad altri senza valutare i livelli di diversità nei singoli habitat.
Sono stati consultati 205 lavori ed è stato creato un elenco di specie. Per ciascuna specie è stato fornito il Phylum, la classe, l'ordine, la famiglia, la specie, il descrittore, la località di raccolta e la fonte bibliografica. Da quest'analisi è risultato che nel Parco sono state censite un totale di 1456 specie di cui i taxa più studiati sono risultati gli Arthropoda Hexapoda con il 91,7 % di specie. Gli ordini meglio conosciuti sono i Coleoptera con 632 specie, i Lepidoptera (308 specie), gli Hymenoptera (191 specie), i Thysanoptera (59 specie), ed i Diptera (42 specie). Nell'elenco delle 1456 specie sono comprese 8 specie (Coleoptera: *Cerambyx cerdo*, *Lucanus cervus*, *Osmoderma eremita*; Lepidoptera: *Callimorpha quadripunctaria*, *Lycaena dispar*; Odonata: *Lindenia tetraphylla*; Gastropoda *Anisus vorticulus*,*Vertigo moulinsiana*) la cui conservazione richiede la designazione di zone speciali di conservazione (Direttiva 92/43/CEE del Consiglio del 21 maggio 1992) di cui 2 sono specie prioritarie (*Osmoderma eremita, Callimorpha quadripunctaria*).
Inoltre 6 specie sono (Coleoptera: *Cerambyx cerdo*, *Osmoderma eremita*; Lepidoptera: *Lycaena dispar, Zerynthia polyxena*; Odonata: *Lindenia tetraphylla*; Gastropoda *Anisus vorticulus*) di interesse comunitario che richiedono una protezione rigorosa (Direttiva 92/43/CEE del Consiglio del 21 maggio 1992). In fine 43 specie (5 Mollusca, 5 Lepidoptera, 26 Coleoptera, 5 Odonata, 1 Diptera, 1 Hymenoptera) sono risultate incluse nella lista delle specie d'interesse regionale secondo la L.R. 56/2000, la cui conservazione può richiedere la designazione di siti di interesse regionale (SIR).
Lo studio condotto nell' ambito del Progetto Demetra ha avuto lo scopo di valutare la ricchezza in specie, l'abbondanza e la diversità dei macroinvertebrati nei differenti siti

di studio e sulle infiorescenze delle coltivazioni sperimentali di mais, girasole e colza e sull'infiorescenze di pioppo naturale. Per questo sono stati usati sistemi standardizzati di campionamento ripetibili nello spazio e nel tempo molto efficienti ed indispensabili per studi ecologici ma meno efficaci per studi faunistici.
Un altro scopo del lavoro è stato quello di determinare il ruolo delle colture sperimentali, (possibili OGM) nelle catene trofiche.
Per questo sono stati usati gli isotopi stabili del carbonio ed azoto, già largamente utilizzati in differenti campi come quello antropologico (Boyd et al. 2008), archeologico (Gil et al. 2011), agrario (Briones et al. 2001), ecologico (Colombini et al. 2011) e conservazionistico (Darimont et al. 2007).

Materiali e Metodi

Siti di studio

Lo studio della diversità animale è stato compiuto in diversi siti delle tre aree di studio del Parco

Area 1, Zona Lago di Massaciuccoli

Sistema Lago

L'area indagata è costituita da una vasta zona umida del lago di Massaciuccoli, che confina a sud con i campi coltivati.
La zona è stata analizzata considerando differenti ambienti (Fig. 1):
a) area a *Phragmites australis* bruciato (incendiato l'inverno precedente allo studio condotto) (Fig. 2),
b) area del "chiaro dei cacciatori",
c) area canale Anghetto (argine esterno confinante con i campi coltivati),
d) area canale Anghetto argine interno con *Periploca graeca* (Fig. 3)
e) area a sfagneto (*Sphagnum* sp*)*.
Nel sistema lago sono stati indagati 2 punti in ciascuna delle cinque tipologie individuate.

Area 2, zona Serchio

Località Ontanelli:

Incolto S21

L'indagine è stata compiuta in un area incolta con *Artemisia coerulescens* come pianta dominante dove precedentemente esisteva una pioppeta coltivata (Fig. 4). Lo studio è stato compiuto nelle 3 parcelle 30 x 30 m indagate dai botanici.

Località Fortino nuovo

Bosco con pioppo:

In questo sito (Fig. 5) lo studio è stato effettuato in 2 punti per ciascuna delle due parcelle 30 x 30 m indagate dai botanici.

Area 3, zona Arno

Località Culatta

Parcella A6

a) Campo di girasole (Fig. 6)
b) Campo di mais (Fig. 7)
c) Campo incolto
d) Campo colza
e) Campo patata

Nella Parcella A6 sono stati analizzati un totale di cinque punti, uno per tipologia, situati nel centro di ogni appezzamento.

Località Culatta

Bosco misto di latifoglie

Nel Bosco misto di latifoglie (Fig. 8), l'indagine si è svolta nelle quattro parcelle 30 x 30 m indagate dai botanici.

Località Colmate del Bozzone

Pineta

In questo sito i tre punti di campionamento erano situati all'interno della fascia a pino domestico compresa tra la strada con corso nord-sud e la zona umida (Le Lame) che arriva fino al mare.

Località Colmate del Bozzone - Lame

Zona umida

Habitat Natura 2000: 6420 (Praterie umide mediterranee con piante erbacee alte del *Molinio-Holoschoenion*).

In questo sito (Fig. 9 e 10) sono stati indagati sette punti posti nelle immediate vicinanze di 7 parcelle di 10 x 10 m studiate dai botanici.

Campionamenti

Allo scopo di determinare la diversità dei macroinvertebrati sono stati applicati metodi standard di trappolamento con trappole a caduta. Le raccolte sono state effettuate in primavera e autunno. Ogni trappola a caduta era costituita da un bicchiere di plastica, di 9 cm di diametro, interrato fino al bordo superiore e munito ognuno di quattro inviti disposti a croce per aumentarne l'efficienza (Fig. 11). Le trappole a caduta installate con glicole etilenico sono state tenute attive per 48 ore consecutive in modo da intercettare gli invertebrati notturni e diurni.

Per studiare la diversità associata alle infiorescenze e come questa cambiasse nel tempo, in primavera/estate sono state campionate le infiorescenze di colza, girasole e mais delle colture sperimentali. In ciascuna parcella coltivata intorno a mezzogiorno sono state

raccolte 9 infiorescenze. Nel caso del girasole le raccolte sono state effettuate anche dopo l'alba e prima del tramonto, per un totale di 27 campioni al giorno allo scopo di evidenziare eventuali differenze nelle presenza dell'entomofauna durante il giorno nei momenti a diversa insolazione (importante per l'attività degli insetti specialmente se volatori). Le infiorescenze racchiuse in un sacco di polietilene sono state tenute in freezer per alcuni minuti in modo da facilitare la raccolta dei macroinvertebrati che successivamente sono stati smistati e conservati.
Per verificare come cambiasse la diversità animale in relazione al grado di fioritura delle singole specie coltivate i campionamenti sono stati ripetuti settimanalmente in modo da comprendere l'intero periodo di fioritura.
Nel periodo di fine inverno/inizio primavera lo stesso tipo di analisi è stato compiuto anche sulle infiorescenze maschili e femminili del pioppo (*Populus canescens*). I pioppi indagati sono stati quelli di un bosco con pioppi naturali e pioppi naturali sparsi lungo gli argini del Lago di Massaciuccoli precedentemente individuati e georeferenziati.
I macroinvertebrati così catturati sono stati conservati in alcool etilico a 75° e successivamente smistati a livello specifico. Là dove non è stato possibile identificare le specie, gli esemplari sono stati attribuiti a morfospecie (con morfospecie indichiamo una specie definita tramite caratteristiche morfologiche non ancora attribuita ad una specie identificata da nomenclatura binomia. In questo testo per semplicità le morfospecie saranno chiamate con il nome di "specie").
Per l'analisi delle catene trofiche le raccolte dei macroinvertebrati sono state effettuate sia con trappole a caduta sia con aspiratori direttamente sulle infiorescenze (Fig. 12). In ogni area di studio sono state installate per un periodo di 24 ore un numero congruo di trappole in rapporto alle tipologie dell'habitat. Gli animali così raccolti sono stati posti in freezer e successivamente seccati e conservati in stufa a 37°C. Per le analisi isotopiche del carbonio ed azoto ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) i campioni sono stati preparati triturando in mortaio 5 animali di ciascuna specie, al fine di omogenizzarne i tessuti. Una quantità pari a 0.3 mg è stata raccolta in apposite micro-capsule di stagno necessarie per l'immissione dei campioni in un spettrometro di massa.

Elaborazione statistica

I dati raccolti sono stati inseriti in un database elettronico (Microsoft Excel) e poi analizzati tramite tecniche di statistica descrittiva. Per ciascun caso sono stati calcolati gli indici di diversità Alpha (all'aumentare dell'indice aumenta la diversità, Fisher et al. 1943) e di Shannon H' (i cui valore aumenta all'aumentare del numero dei taxa rinvenuti: 0 una sola specie nella comunità) e l'indice di dominanza di Simpson D (0 = tutti i taxa sono ugualmente presenti; 1 = un solo taxa prevale nella comunità, Simpson, 1949) e l'indice di omogeneità J' Pielou (indica il grado di omogeneità con cui gli individui sono divisi nei taxa e si calcola: indice di Shannon/ln del numero delle specie, Pielou, 1978) (Colombini et al. 2002). Tutti gli indici sono stati calcolati per ciascuna località di studio, per l'infiorescenze

e per stagione tramite il programma open source BioDiversity PRO.
Altro tipo di analisi compiuto è stata la stima delle percentuali di compresenza delle diverse specie individuate nelle aree di studio scelte nei diversi periodi di campionamento e sulle infiorescenze calcolate con l'indice di Renkonen (percentuale di specie in comune sul totale delle specie, Renkonen, 1938).

Risultati

Analizzando gli invertebrati catturati nelle diverse aree di studio con sistemi standard di trappolamento (trappole a caduta ad intercettazione, raccolte su fiori di pioppo, girasole, mais e colza) è stato registrato un totale di 443 specie su un numero complessivo di 11782 individui catturati. In questo caso i taxa più numerosi sono risultati gli Arthropoda Hexapoda con il 77,6 % di specie di cui l'ordine dei Coleoptera è risultato quello più ricco di specie (n = 145). Per le zone indagate sono risultate importanti come numero di specie anche gli Hymenoptera (n = 64) ed i Diptera (n = 42).

Campionamenti con trappole a caduta
Considerando i campionamenti eseguiti nei singoli siti di studio (Tab. 1) il più alto numero di catture è stato prevalentemente registrato in primavera con il massimo nella zona umida (Le Lame) in Località Colmate del Bozzone. Invece i valori minimi sono stati ottenuti dai campionamenti effettuati nelle colture sperimentali di mais e girasole. Anche per ciò che riguarda il numero di specie i valori maggiori sono stati ottenuti a primavera nel sito dell'incolto S21 in Località Ontanelli con 66 specie, seguito dal Sistema lago del Lago di Massaciuccoli con 58 specie. Ad autunno vi è stata una generale tendenza ad una diminuzione sia dell'abbondanza che del numero di specie in tutte le località di studio ad eccezione delle parcelle con le colture sperimentali dove è avvenuto il contrario. In questa stagione la zona umida (Le Lame) ha registrato il numero più elevato di specie.
Nei siti di studio gli indici di diversità α sono risultati mediamente 13,95 in primavera e 11,41 in autunno. Considerando singolarmente i diversi siti di studio constatiamo che in alcuni casi l'indice α è superiore in primavera rispetto all'autunno ed in altri casi avviene l'opposto (Tab. 1). Il più alto indice di diversità animale (31,75) è stata riscontrato a primavera in località Ontanelli - Incolto S21 e sempre in questa stagione in Zona Lago di Massaciuccoli - Sistema Lago (19,84). Il più basso indice di diversità è stato riscontato in primavera (4.93) in Località Culatta Parcella A6 Campo patate.
In generale i valori dell'indice di Pielou (Tab. 1) registrati in primavera sono superiori a quelli ottenuti in autunno. Invece i valori dell'indice di Simpson hanno registrato una tendenza inversa. In particolare in primavera nella zona umida delle Lame è stato registrato il minor valore dell'indice di Pielou (0.424) e il maggior valore dell'indice di dominanza di Simpson (0.454) indicando la presenza di una comunità animale meno omogenea rispetto agli altri siti di studio dovuta alla presenza di alcune specie dominanti. Il caso opposto si è verificato in primavera nel campo in cui è stato coltivato il girasole. In questa località la comunità dei

macroinvertebrati è risultata uniformemente distribuita, come dimostrato dall'alto indice di Pielou, e non ci sono state specie dominanti (vedi il basso valore dell'indice di Simpson).
Mettendo a confronto i popolamenti di macroinvertebrati delle due zone umide che sono state prese in considerazione, le sponde del Lago di Massaciuccoli e le Lame delle Colmate del Bozzone, risulta che in entrambe le stagioni nel primo caso dominano gli Amphipoda con un'unica specie, mentre nel secondo caso gli Araneae con due differenti specie a seconda della stagione.
Nei due siti incolti indagati, uno in località Ontanelli e l'altro in località Culatta, in primavera in entrambi predominano i Formicidae, mentre in autunno nel primo gli Isopoda in maniera molto evidente e nel secondo gli Heteroptera.
Mettendo a confronto le due tipologie di bosco indagate, bosco con pioppo in località Fortino Nuovo e bosco misto a latifoglie in località Culatta, risulta che in entrambi i casi i macroinvertebrati dominanti sono gli Araneae ed i Formicidae. Gli Araneae predominano in primavera seguiti dai Formicidae i quali diventano predominanti in autunno insieme ai Collembola. Gli Araneae ed i Formicidae risultano più abbondanti anche nel bosco a pino domestico delle Colmate del Bozzone anche se questa località è stata indagata solo durante l'estate.
Nei campi in località Culatta, dove sono state eseguite le culture sperimentali di mais, girasole e patata, l'ordine più abbondante è risultato quello degli Orthoptera. Ad autunno pur continuando a dominare l'ordine degli Orthoptera è stato registrato un aumento dei Coleoptera con specie appartenenti alla famiglia dei Carabidae. Questi, insieme ai Collembola, sono i macroinvertebrati che sono risultati i più abbondanti in primavera nelle coltivazioni della colza sperimentale.
Delle 269 specie catturate con le trappole a caduta in tutti i siti campionati un certo numero è risultato esclusivo di un singolo sito anche stagionalmente (Tab. 2). Per esempio nel caso del Sistema lago del Lago di Massaciuccoli in autunno su un numero totale di 58 specie 24 sono risultate esclusive di questa località per questa stagione mentre in primavera il numero di specie totali è stato di 29 con solo 2 specie esclusive. Le specie esclusive d'autunno erano costituite per il 50 % da Coleoptera Carabidae e da Araneae. Nessuna specie esclusiva è stata riscontrata in primavera nelle coltivazioni sperimentali di mais e girasole.
Confrontando le percentuali di compresenza delle diverse specie individuate nelle aree di studio calcolate con l'Indice di Similarità di Renkonen (percentuale di specie in comune sul totale delle specie) (Tab. 3) per 17 confronti è stato ottenuto una compresenza di specie maggiore del 20 %. E' da notare che le maggiori somiglianze si riscontano all'interno di ambienti simili come nel caso delle coltivazioni sperimentali (Tab. 3, casi 7-14) oppure nel caso di ambienti semi-naturali (Tab. 3, casi 15-25). La maggiore sovrapposizione è stata registrata a primavera in Località Culatta Parcella A6 fra il Campo girasole ed il Campo di mais (53,3 %). Infatti i valori di similarità ottenuti fra le due coltivazioni nella stessa stagione sono maggiori che all'interno delle singole coltivazioni in stagioni differenti. Nel caso di ambienti semi-naturali, nel bosco misto di latifoglie e nel bosco con pioppo, è

stata riscontrata un'alta somiglianza del popolamento animale nelle due stagioni. E' da rilevare infine la bassa sovrapposizione della popolazione di macroinvertebrati delle Lame nelle due diverse stagioni.

Campionamenti sulle infiorescenze di pioppo, girasole, mais e colza

Considerando i campionamenti eseguiti sulle infiorescenze (Tab. 4) il più alto numero di catture e di specie è stato registrato per il girasole (rispettivamente n = 4397 e n = 109) mentre i valori minimi sono stati ottenuti sulle infiorescenze del pioppo maschio del Lago di Massaciuccoli (rispettivamente n = 58 e n = 13) (Fig. 13 e 14). I valori degli indici di diversità α più bassi sono risultati sulle infiorescenze dei pioppi maschi specialmente in località Fortino Nuovo (α = 3.42). Da notare inoltre che l'α diversità delle infiorescenze dei pioppi femmina del Lago di Massaciuccoli è superiore a quella registrata nei maschi (rispettivamente α = 9.36 e α = 5.20) e una comunità di macroinvertebrati più uniforme (vedi alto indice di Pielou). Il valore più alto dell'indice di dominanza ottenuto per i pioppi maschi indica che vi è una specie dominante. I valori massimi dell'indice di diversità α sono stati registrati sulle infiorescenze di girasole mostrando anche una comunità di macroinvertebrati poco uniforme (vedi indice di Pielou). Anche in questo caso il valore dell'indice di dominanza suggerisce la presenza di una specie dominante.

Nel sistema lago del Lago di Massaciuccoli i campionamenti sono stati eseguiti sulle infiorescenze di piante naturali di pioppo maschio e femmina in quattro settimane consecutive durante il periodo di fioritura. Sui maschi è stato campionato un totale di 13 specie su 58 esemplari catturati, mentre sulle femmine la ricchezza di specie (n = 26) e l'abbondanza d'individui (n = 141) è stata nettamente superiore. Sui pioppi maschi le specie maggiormente campionate appartengono ai Thysanoptera e agli Araneae (rispettivamente 48.3 e 32.7 %). Sulle infiorescenze femminili la specie *Altica oleracea* dei Chrysomelidae è risultata la più abbondante (12 %) seguita dai Diptera (11 %) e dal coleottero Chrysomelidae, *Neocrepidodera brevicollis* (9,7 %).

Nella zona Serchio in Località Fortino Nuovo i campionamenti sono stati eseguiti in tre settimane consecutive solo sulle infiorescenze di piante naturali di pioppo maschio durante il periodo di fioritura. Sono state campionate un totale di 16 specie su 363 esemplari catturati (Tab. 4). Sui pioppi maschio sono state maggiormente catturate le larve dei Diptera Tabanidae raggiungendo una percentuale del 75 % seguite da una specie di coleotteri Coccinellidae con il 9,4 %.

Nella zona Arno in località Culatta sulle infiorescenze di girasole sono stati eseguiti campionamenti per cinque settimane consecutive per un totale di 135 fiori. Sono state campionate un totale di 109 specie su 4397 esemplari catturati (Tab. 4). La specie *Scoloposthetus decoratus* degli Heteroptera è risultata la più abbondante (39,9 %) seguita con valori simili dal coleottero Latridiidae *Cortinicaria gibbosa*, dall'omottero *Macrosteles variatus* e dall'eterottero *Cymus melanocephalus* (rispettivamente 14,2, 13,8 e 13,3 %).

Sulle infiorescenze femminili di mais sono stati eseguiti campionamenti per quattro settimane consecutive per un totale di 36 piante campionate. Sono state campionate un

totale di 63 specie su 908 esemplari catturati (Tab. 4). La larva dei Lepidoptera, *Ostrinia nubilalis*, specie target nel caso di piante di mais OGM, è risultata la più abbondante (22,7 %) seguita con valori simili dal coleottero Latridiidae *Cortinicaria gibbosa*, dall'eterottero *Scoloposthetus decoratus* e da una specie appartenente ai tisanotteri (rispettivamente 20,7, 18,1 e 16 %).
Sulle infiorescenze della colza sono stati eseguiti campionamenti per quattro settimane consecutive per un totale di 51 campioni. Sono state campionate un totale di 56 specie su 2022 esemplari catturati (Tab. 4). Una specie appartenente ai tisanotteri è risultata la più abbondante (36,1 %) seguita da adulti e larve del coleottero Nitidulidae *Meligethes aeneus* e dal curculionide *Ceuthorrhyncus napi* (rispettivamente 21,9, 12,5 e 7,5 %).
Per l'infiorescenze del pioppo sono state campionate 16 specie esclusive, di cui 2 esclusive del pioppo maschio e 9 esclusive del pioppo femmina. Nel caso della colza le specie esclusive sono risultate 22. Per ciò che riguarda l'infiorescenze del girasole e del mais le specie esclusive sono state rispettivamente 44 e 19, invece 22 specie sono risultate comuni ed esclusive delle due cultivar. L'80,62 % del popolamento come numero di individui e il 33,94 % delle specie delle infiorescenze del girasole sono comuni rispettivamente con il popolamento e le specie del mais. Mentre il 95,48 % del popolamento e il 58,73 % delle specie delle infiorescenze del mais sono comuni con il popolamento e le specie del girasole.
Confrontando le percentuali di compresenza delle diverse specie individuate sulle infiorescenze calcolate con l'Indice di Similarità di Renkonen (Tab. 3: 1-6) per 2 confronti (mais contro girasole e pioppo femmina contro pioppo maschio del Lago di Massaciuccoli) è stato ottenuto una compresenza di specie maggiore del 20 %. Da notare la scarsa compresenza registrata tra il popolamento del pioppo maschio di Massaciuccoli con il corrispondente di Fortino Nuovo.

Variazioni temporali del popolamento animale su girasole

I campionamenti eseguiti sulle infiorescenze di girasole sono stati effettuati alla distanza di 7 giorni l'uno dall'altro, campionando ogni volta 9 infiorescenze a tre differenti ore del giorno (06.00, 12.00 e 18.00). E' stato adottato questo tipo di disegno sperimentale per individuare se ci fossero differenze nel popolamento animale presente sulle infiorescenze a seconda dello stato di fioritura della coltivazione sperimentale e dell'ora del giorno. Da questo tipo di indagine è emerso che ad ogni campionamento e ad ogni ora del giorno l'ordine maggiormente presente è quello degli Heteroptera seguito dagli Homoptera e dai Coleoptera (Tab. 5 A e B). Gli Heteroptera raggiungono il loro massimo di presenza alla quinta settimana con un valore di due o tre volte superiore rispetto alle precedenti settimane. Un trend simile è presente anche nei Coleoptera che raggiungono il loro massimo alla quinta settimana ma con valori quasi dieci volte superiori ai campionamenti precedenti. Gli Homoptera, invece, pur avendo nel totale una presenza simile a quella dei Coleoptera (rispettivamente 15,83 % e 15,42 %) non superano mai valori del 6

% (seconda settimana) scendendo al 1,2 % nell'ultimo campionamento (Tab. 5 A). Anche considerando le variazioni orarie (alba, mezzogiorno e tramonto) della presenza d'invertebrati sulle infiorescenze di girasole (Tab. 5 B) troviamo differenti comportamenti a seconda degli ordini. Gli Heteroptera come gli Aranaea, i Diptera, ecc. sono ugualmente presenti in ogni ora del giorno, mentre gli Homoptera ed i Coleoptera sono maggiormente presenti all'alba. In altri casi, come per i Thysanoptera, l'infiorescenza di girasole viene frequentata specialmente nel mezzo del giorno.

Catene trofiche

Le analisi degli isotopi stabili del $\delta^{13}C$ e del $\delta^{15}N$ hanno evidenziato l'appartenenza del girasole ($\delta^{13}C$ = -26,94‰), della colza ($\delta^{13}C$ = -27,12‰) e del pioppo($\delta^{13}C$ = -28,21‰) al gruppo delle piante C3 (Colombini et al 2011, Jahren & Kraft 2008) mentre quella del mais ($\delta^{13}C$ = -12,38‰ e $\delta^{13}C$ = -12,36‰) alle piante C4 (Fig. 15). Considerando la totalità delle analisi eseguite (Fig. 15) sono state individuate due catene trofiche (a, b) che hanno origine da differenti livelli. I valori di $\delta^{15}N$ più bassi ottenuti riguardano, nel caso della catena trofica "a", consumatori primari come molluschi polmonati (0,46‰), collemboli (-1,9‰) e blattidi (-1,1‰) che si nutrono di funghi, alghe unicellulari terrestri, batteri etc. Nel caso della catena trofica "b" i valori più bassi di $\delta^{15}N$ sono dovuti sempre a consumatori primari, lepidotteri Noctuidae (1,6‰; 2,3‰; 3,1‰) che però si nutrono di piante C3. In entrambi i casi i valori più alti di $\delta^{15}N$ riguardano macroinvertebrati predatori appartenenti agli ordini degli Araneae e dei Coleoptera. Da notare che dalle indagini eseguite su mais, appartenente alle piante C4, è stata evidenziato un'unica specie appartenente ai Lepidoptera (larve di *Ostrinia nubilalis*).
Analizziamo ora le due catene trofiche partendo dagli ordini che ospitano prevalentemente consumatori primari. Dell'ordine degli Ortoptera (Fig. 15) sono state indagate tre specie appartenenti a tre famiglie Acrididae, Tettigonidae e Grillydae (con valori di $\delta^{15}N$ crescenti dal primo al terzo). I Grillydae mostrano un valore del $\delta^{15}N$ (5,95‰) e del $\delta^{13}C$ (-27,4‰) di poco superiore all'arricchimento trofico se la fonte alimentare fosse il pioppo[1]. La specie appartenente ai Tettigonidae ($\delta^{15}N$ =4,81‰) può gravitare in un area che ha come base trofica la colza mentre la specie degli Acrididae ($\delta^{15}N$ =2,25‰) appare estranea ad una catena trofica che abbia come punto di partenza le tre cultivar C3 considerate.
Riguardo i Lepidoptera, tutti consumatori primari, sono state indagate specie appartenenti alle famiglie dei Noctuidae, dei Pieridae e dei Piralidae (Fig. 10). Le specie appartenenti alle prime due famiglie gravitano tutte in ambito delle cultivar C3 con valori di $\delta^{15}N$ compresi tra 1,6 e 5,1‰ e valori del $\delta^{13}C$ compresi tra -25,9 e -28,5‰. La specie *Ostrinia nubilalis* appartenente alla famiglia dei Piralidae presenta valori di $\delta^{15}N$ (3,29‰) e di $\delta^{13}C$ (-11,5‰)

[1] In numerosi studi sui segnali isotopici tra fonte trofica e consumatore è stato stabilito che il contenuto isotopico di un animale è mediamente di 1‰ (δ13C) e di 3,4‰ (δ15N) più alto di quello della sua fonte alimentare quando questa è monospecifica (DeNiro and Epstein, 1978, 1981). Pertanto i ret-tangoli rappresentati nelle Figure 15 e 16 indicano il salto trofico tra le possibili fonti alimentari (girasole, mais, colza e pioppo) e il loro possibile consumatore primario.

tali da rendere chiara la sua totale dipendenza trofica dal mais.
L'ordine degli Hymenoptera comprende forme sia di consumatori primari che di secondari. Sono state indagate quattro specie: 2 appartenenti alle famiglie Formicidae, una a quella degli Apidae ed una a quella dei Vespidae (Fig. 15). Le specie appartenenti alle prime due famiglie presentano valori di $\delta^{15}N$ tra 0,75 e 3,9‰ dimostrando di essere dei consumatori primari ma di non appartenere alla catena trofica che parte dalle piante C3 ("b"). La specie appartenente alla famiglia dei Vespidae presenta un valore di $\delta^{15}N$ di 7,3‰ mostrando un livello trofico tipico di un consumatore secondario e un'appartenenza alla catena trofica "b".
L'ordine dei Diptera comprende forme sia di consumatori primari che di secondari. Sono state indagate sei specie appartenenti alle famiglie dei Chironomidae, Culicidae, Simuliidae, Bibionidae, Syrphidae e Tabanidae (Fig. 15). Quest'ultima specie pur essendo un consumatore secondario presenta un valore di $\delta^{15}N$ (4,8‰) inferiore a quello dei Chironomidae (6,4‰) e dei Simuliidae (7,7‰) entrambi consumatori primari. Da notare che la specie appartenente alla famiglia dei Simuliidae presenta un arricchimento trofico esattamente di 1‰ per il $\delta^{13}C$ e di 3,4‰ per il $\delta^{15}N$ rispetto ai fiori di girasole mostrando una diretta correlazione fra fonte trofica ed consumatore.
L'ordine dei Coleoptera è un ordine molto eterogeneo dal punto di vista trofico (Fig. 16). Comprende forme di consumatori primari, di detritivori ad ampio spettro e di consumatori secondari anche di livello elevato. Nell'analisi compiuta sono state trovate specie con segnali isotopici del $\delta^{15}N$ che vanno da -1,2‰ (Cerambicidae) a 11,6‰ (Carabidae) e appartenenti ad ambedue le catene trofiche individuate. Un gruppo di 4 specie delle famiglie Cerambicidae, Buprestidae Tenebrionidae ed Oedemeridae, tutti consumatori primari appartenenti alla catena trofica "a", ha segnali isotopici per $\delta^{15}N$ molto bassi compresi tra -1,2‰ e 1,03‰. Un altro gruppo di 12 specie, tutti consumatori secondari ed appartenenti ad ambedue le catene trofiche, ha segnali isotopici per $\delta^{15}N$ compresi tra 4,2‰ (Carabidae) e 11,6‰ (Carabidae). C'è da notare, che specie appartenenti ad una stessa famiglia possono presentare differenti segnali isotopici che li collocano a differenti livelli trofici. Inoltre, ci sono 4 specie appartenenti alle famiglie dei Carabidae, Coccinellidae e Cicindelidae (tutti predatori) che presentano valori del $\delta^{15}N$ compresi tra 4,2‰ e 6,9‰ e del $\delta^{13}C$ compresi tra -26,4‰ e -24,2‰. Per questo motivo vengono collocati nella catena trofica che parte dalle piante C3 ("b") e in particolare dalla colza e dal girasole. Altro elemento interessante è la specie della famiglia dei Silphidae che, pur essendo collocata nelle vicinanze del gruppo precedente, non è un predatore ma un necrofago di vertebrati. Questo presenta un valore del $\delta^{15}N$ (8,3‰) inferiore a quello di due specie (uno Staphylinidae 9,8‰ ed un Carabidae 11,6‰) predatrici di altri macroinvertebrati.
Anche nel caso dell'ordine degli Araneae, tutti predatori, possono essere distinti due raggruppamenti appartenenti alle due catene trofiche (Fig. 10). Un primo gruppo, composto da 5 specie appartenenti alle famiglie dei Linyphiidae, Thomisidae, Agelenidae, Cybaeidae e Lycosidae, ha segnali isotopici per $\delta^{15}N$ compresi tra 2,17‰ e 4,41‰ e del $\delta^{13}C$ compresi tra -26,14‰ e -22,6‰ e si colloca lungo la catena trofica "a". Il secondo

gruppo, invece, è proprio della catena trofica “b” a cui sono legate le cultivar ed è formato da 4 specie che hanno segnali isotopici per $\delta^{15}N$ compresi tra 3,7‰ e 7,4‰.
Infine sono state prese in considerazione alcune specie appartenenti a differenti ordini e di differenti livelli trofici (Fig. 10). Anche in questo caso si può distinguere l’appartenenza alle due catene trofiche con un gruppo di consumatori primari che si colloca lungo la catena trofica “a” a cui appartiene anche la specie dei Chilopoda (predatori). Alla catena trofica “b” appartengono le due specie dei Labiduridae e degli Homoptera entrambi consumatori primari e due specie di predatori, Anisoptera e Zygoptera. Da notare che gli Homoptera possono essere legati troficamente alla colza e a loro volta essere prede degli Zygoptera. Da fonti bibliografiche (Evans et al. 2012) sono stati ricavati alcuni dati riguardanti i segnali isotopici del $\delta^{15}N$ e del $\delta^{13}C$ di due uccelli insettivori che si nutrono in volo (balestruccio e rondone) e due insettivori che si nutrono sulla vegetazione (luì grosso e luì verde). I loro livelli trofici sono risultati paragonabili a quello di alcuni macroinvertebrati predatori come ragni e coleotteri.

Discussione e Conclusioni

La tendenza generale di un’elevata abbondanza e ricchezza di specie di macroinvertebrati ottenuta in primavera è da imputarsi prevalentemente a due fattori: ai cicli biologici delle singole specie e alla presenza in questo periodo di consistenti fioriture specialmente in alcuni ambienti aperti, come Le Lame e le zone incolte, piuttosto che nelle zone boscate. Al contrario, nei campi a girasole e mais la maggiore abbondanza e ricchezza di specie è stata registrata ad autunno. Infatti, in primavera, ci troviamo di fronte a situazioni di estrema semplicità di ambienti dovuta alla preparazione dei terreni per le coltivazioni e per la presenza di colture monospecifiche. In autunno, invece, avendo lasciato *in situ* le coltivazioni, l’ambiente ha recuperato una certa complessità dovuta anche alla crescita di vegetazione erbacea selvatica e/o infestante.
Alti valori dell’α diversità animale sono stati registrati nel periodo delle fioriture oltre che in ambienti omogenei con alta copertura e complessità vegetale (come le zone aperte ed incolte) anche in zone che presentono eterogeneità di ambienti con caratteristiche ecotonali (rive del Lago di Massaciuccoli in primavera). La drastica diminuzione del valore dell’α registrata in autunno al Lago di Massaciuccoli è dovuta all’abbassamento del livello delle acque e quindi al generale disseccamento dell’ambiente. Il basso valore dell’α riscontrato nel campo sperimentale di patate a primavera è da imputarsi alle sue esigue dimensioni e al fatto che era circondato da zone preparate per l’agricoltura e quindi prive di vegetazione.
Le comunità animali sono risultate differenziate a seconda dei siti indagati ma si sono avute differenze anche in tipologie ambientali simili come zone umide, incolti, boschi e coltivazioni.
Le differenze riscontrate nel popolamento animale fra le due zone umide, il Lago di Massaciuccoli e Le Lame delle Colmate del Bozzone, sono da imputarsi a più fattori

come l'eterogeneità degli ambienti dovuta al diverso regime idrico, alle specie vegetali presenti e quindi alla maggiore o minore copertura vegetale e al tipo di gestione. Infatti Le Lame sono omogeneamente ricoperte da praterie umide con piante erbacee alte (*Molinio-Holoschoenion*) che rimangono allagate per tutto l'inverno e parte della primavera da acque d'origine meteorica. All'inizio del periodo secco questa zona viene falciata meccanicamente per mantenere un ambiente idoneo ad un certo tipo di fauna ornitica. Al Lago di Massaciuccoli, invece, sono state indagate differenti tipologie di ambienti ripariali umidi come una zona a *Phragmites australis*, una zona nuda di confine tra la cannuccia e le acque del lago, due argini di confine del lago (uno con prato ed uno con *Periploca graeca*) ed infine una torbiera con sfagno. Ognuna di queste zone era soggetta a una differente tipologia di gestione. Per esempio la zona indagata a cannuccia era stata incendiata durante l'autunno precedente, la zona del "chiaro" veniva regolarmente pulita dalla vegetazione da parte dei cacciatori e l'argine a prato era sistematicamente falciato dalle autorità locali preposte alla gestione delle acque. Solo nel caso della zona a *Periploca graeca* e a sfagno si avevano condizioni semi-naturali in cui però vi erano delle variazioni dovute al livello delle acque del lago.
Nei due siti incolti indagati, uno in località Ontanelli e l'altro in località Culatta, le differenze del popolamento animale sono prevalentemente da imputarsi al differente uso del suolo precedente alla situazione di incolto. Infatti nel primo caso la parcella era stata adibita alla coltura del pioppo mentre nel secondo caso si trattava di terreni seminativi ora a riposo. Le precedenti situazioni colturali hanno causato l'insorgere di differenti specie vegetali che conseguentemente hanno causato una differenziazione anche al livello del popolamento animale. Infatti in località Ontanelli la specie dominante era *Artemisia coerulescens* con caratteristiche arbustive e propria di terreni degradati argillosi e salsi, mentre in quello che era seminativo in località Culatta si è sviluppata una vegetazione erbacea molto eterogenea. Contrariamente a quello che ci si potesse aspettare, la maggiore diversità animale è stata riscontrata là dove apparentemente c'era una maggiore omogeneità vegetale.
Per ciò che riguarda le tipologie a bosco, bosco con pioppo in località Fortino Nuovo e bosco misto a latifoglie in località Culatta, le differenze del popolamento animale sono risultate esigue specialmente a primavera. Infatti ambedue le tipologie di bosco indagate presentono caratteristiche comuni come ampie zone allagate durante i periodi invernali, scarsa presenza di sottobosco arbustivo e presenza di enormi quantità di legno morto dovuto al tipo di gestione che prevede di lasciare *in situ* alberi morti e ramaglie. Anche nel caso del bosco a pino domestico le differenze riscontrate sono state basse anche se in questo caso si tratta di rilevamenti eseguiti in periodo estivo. I bassi valori di diversità animale riscontrati nei campi sperimentali in primavera, rispetto alle altre località indagate, sono dovute alla preparazione dei terreni che precede la semina, alle operazioni di diserbo meccanico e alla presenza di monocolture. Infatti le prime due operazioni comportano sconvolgimento e omogeneizzazione nella parte superficiale del substrato e l'eliminazione della vegetazione erbacea con conseguenze devastanti sulla comunità dei macroinvertebrati. La mancanza di specie esclusive nei campi adibiti a coltivazioni

è da imputarsi al tipo di uso del suolo che comporta ogni volta la ricolonizzazione da parte dei macroinvertebrati dalle zone circostanti. Al contrario, la grande presenza di specie esclusive riscontrata a Massaciuccoli dipende dalla peculiarità dell'ambiente e dalla distanza geografica dai siti di confronto. Naturalmente la maggiore somiglianza fra i popolamenti animali si trova non tanto in uno stesso ambiente confrontando due stagioni differenti quanto in ambienti simili nella stessas stagione: in primavera bosco di latifoglie vs bosco con pioppo naturale, i vari campi coltivati con cultivar coltivati contemporaneamente, ecc.

Per indagare la possibilità di ibridazione entomofila a partire dalle possibili coltivazioni OGM come mais, girasole, colza e pioppo, sono stati compiuti rilevamenti scanditi nel tempo per verificare come cambiasse il popolamento animale associato alle infiorescenze a seconda dello stato di fioritura. Questo tipo di indagine ha evidenziato un'altissima frequentazione da parte dei macroinvertebrati delle infiorescenze più vistose e a impollinazione entomofila, quali girasole e colza, dove è risultato alto anche il numero di specie. Di tutte le specie presenti nelle colture sperimentali, di cui molte sono i volatori, un grande numero è risultato esclusivo, cioè non presente in altre situazioni indagate. Nel caso di girasole e mais un alto numero di specie è risultato esclusivo di ambedue confermando l'alta similarità fra i popolamenti ottenuta tenendo conto anche della totalità delle specie presenti (vedi Indice di Renkonen). Il numero delle specie dei macroinvertebrati e la diversità riscontrata sulle infiorescenze di pioppo, a impollinazione anemofila, è risultato inferiore a quello delle specie a impollinazione entomofila. Le maggiori differenze si sono riscontrate fra i pioppi maschi e femmine di una stessa località piuttosto che fra piante dello stesso sesso di località diverse. E' stato riscontrato, inoltre, in ambedue i sessi un basso numero di specie esclusive indicando forse una frequentazione casuale di queste infiorescenze.

Lo studio temporale condotto sull'infiorescenze di girasole ha dimostrato che esistono cambiamenti nella composizione del popolamento sia a lungo periodo, come l'evoluzione della fioritura complessiva dell'intera coltura, sia di breve periodo, come l'evoluzione giornaliera. Nel primo caso questo può dipendere dal maggiore o minore potere attrattivo dell'intero campo dovuto al suo stato generale di maturazione. Inoltre le variazioni orarie del popolamento animale indicano che esistono differenti strategie d'uso dell'infiorescenza del girasole. Una presenza costante può indicare una dipendenza totale da questo microambiente mentre la presenza di una parte della popolazione nelle ore mattutine o nelle ore centrali della giornata indica che questo microambiente non è prioritario. Nel caso di frequentazioni nelle prime ore del giorno può indicare, per esempio, che le infiorescenze siano sfruttate come rifugio notturno e che le attività di foraggiamento siano svolte altrove. In altri casi, invece, l'infiorescenza di girasole può servire come fonte di approvvigionamento trofico ma che le ore notturne vengano trascorse altrove (vedi le api). Queste ipotesi vengono confermate dall'alto numero di specie e dall'alto numero di esemplari che si trovano su girasole.

Lo studio dettagliato sulle catene trofiche legate alle coltivazioni sperimentali ha dimostrato l'esistenza di due catene trofiche con due differenti sorgenti primarie. Una fonte primaria è

costituita presumibilmente da funghi, muschi, licheni e batteri (Colombini et al. 2011) mentre l'altra è rappresentata dalle piante C3 compresi girasole, colza e pioppo. Una terza fonte primaria che si distingue dalle altre è costituita dalle piante C4 alla cui categoria appartiene il mais. Nelle due catene i consumatori primari possono essere selettivi verso la fonte stessa mentre via via che si passa a livelli superiori la selettività diminuisce aumentando la possibilità di scambio fra le due catene trofiche. Come consumatore primario del mais è stato trovato solo la larva del lepidottero *Ostrinia nubilalis* senza trovare però i suoi diretti predatori. Ai vertici delle catene trofiche individuate, naturalmente troviamo i predatori come i ragni e i coleotteri carabidi che mostrano livelli trofici simili a quelli di passeriformi insettivori sia che predino, a seconda della specie, direttamente sulle infiorescenze o in volo. Gli uccelli presentando raggi d'azione superiori a quelli degli insetti volatori predatori, possono foraggiare in zone geograficamente distanti anche attingendo a catene trofiche simili. Per cui gli uccelli insettivori che si nutrano direttamente sui fiori possono costituire un possibile vettore di trasporto di polline anche a distanze superiori a quelle operate da insetti impollinatori.

Bibliografia

- Boyd, M., T. Varney, C. Surette and J. Surette. 2008. Reassessing the northern limit of maize consumption in North America: stable isotope, plant microfossil, and trace element content of carbonized food residue. J. Archaeol. Sci. 35 :2545–2556.
- Brillouin, L. 1962. Science and information theory. New York, Academic Press, 2nd ed.
- Briones, M.J.I., R. Bol, D. Sleep, D. Allen and L. Sampedro. 2001. Spatio-temporal variation of stable isotope ratio in earthworm under grassaland and cropping systems. Soil Biol. Biochem. 33: 1673-1682.
- Colombini I., M. Brilli, M. Fallaci, E. Gagnarli and L. Chelazzi. 2011. Food webs of a sandy beach macroinvertebrate community using stable isotopes analysis. Acta Oecol. 37: 422-432.
- Colombini I., M. Fallaci and L. Chelazzi. 2002. Measures of biodiversity based on arthropod communities. pp. 110-119. *In*: F. Scapini (ed.). Baseline research for the integrated sustainable management of Mediterranean sensitive coastal ecosystems. Istituto Agronomico per l'Oltremare.
- Darimont, C.T., P.C. Paquet and T.E. Reimchen. 2007. Stable isotopic niche predicts fitness of prey in a wolf–deer system. Biol. J. Linn. Soc. 90: 125–137.
- DeNiro, M.J. and S. Epstein. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochim. Cosmochim. Ac. 42: 495–506.
- DeNiro, M.J. and S. Epstein. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. Geochim. Cosmochim. Ac. 45: 341–351.
- Evans, K.L., J. Newton, J.W. Mallord and S. Markman. 2012. Stable isotope analysis provides new information on winter habitat use of declining avian migrants that is relevant to their conservation. PLoS ONE 7(4): e34542. doi:10.1371/journal.pone.0034542

- Fisher, R.A., A.S. Corbet and C.B. Williams. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. J. Anim. Ecol.12: 42–58.
- Gil, A.F., G.A. Neme and R.H. Tykot. 2011. Stable isotopes and human diet in central western Argentina. J. Archaeol. Sci. 38: 1395-1404.
- Jahren, A.H. and R.A. Kraft. 2008. Carbon and nitrogen stable isotopes in fast food: Signatures of corn and confinement. PNAS 105: 17855–17860.
- Krüger, O. and G.C. McGavin, 1997. The insect fauna of Acacia species in Mkomazi game reserve, north-east Tanzania. Ecol. Entomol. 22: 440–444.
- Pielou, E.C. 1978. Population and community ecology: Principles and methods VIII . New York, Gordon and Breach Science Publishers.
- Renkonen, O. 1938. Statistisch-ökologische Untersuchungen über die terrestrische Käferwelt der finnischen Bruchmoore. Ann. Zool. Soc. Zool. Bot. Fenn. 6: 1–231.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. Nature 163: 688.

Tabella 1. Indici di diversità calcolati stagionalmente per le differenti località e per le coltivazioni sperimentali (n= numero; sp = specie).

	Totale n	sp n	Alpha	Shannon H'	Shannon H max	Pielou J'	Simpsons D
MASSACIUCCOLI							
Lago primavera	349	58	19,841	1,319	1,763	0,748	0,078
Lago autunno	248	29	8,52	1,012	1,462	0,692	0,167
ONTANELLI							
Incolto S21 primavera	222	66	31,75	1,553	1,82	0,854	0,048
Incolto S21 autunno	160	33	12,61	1,106	1,519	0,728	0,176
FORTINO NUOVO							
Bosco con pioppo primavera	343	46	14,295	1,193	1,663	0,717	0,102
Bosco con pioppo autunno	182	27	8,769	0,751	1,431	0,525	0,39
CULATTA A6							
Campo girasole primavera	21	10	7,478	0,933	1	0,933	0,09
Campo girasole autunno	78	22	9,429	1,067	1,322	0,807	0,12
Campo mais primavera	37	13	7,132	1	1,114	0,897	0,098
Campo mais autunno	37	15	9,388	0,982	1,176	0,835	0,134
Campo Incolto primavera	141	34	14,224	1,281	1,531	0,836	0,066
Campo Incolto autunno	199	31	10,293	1,244	1,491	0,834	0,081
Campo colza	269	38	12,076	1,086	1,58	0,688	0,129
Campo patate primavera	41	12	4,927	0,833	1,041	0,8	0,184
Campo patate autunno	95	28	13,386	1,177	1,447	0,814	0,096
CULATTA							
Bosco misto primavera	294	44	14,348	1,246	1,643	0,758	0,104
Bosco misto autunno	119	35	16,706	1,26	1,544	0,816	0,088
COLMATE DEL BOZZONE							
Pineta estate	238	33	10,403	1,141	1,519	0,751	0,12
Lame primavera	627	52	13,47	0,728	1,716	0,424	0,454
Lame autunno	193	37	13,596	1,239	1,568	0,79	0,098

Tabella 2. Specie esclusive dei singoli siti indagati con le trappole a caduta.

	n esclusive	n totali	%
Massaciuccoli autunno	24	58	41,4
Lame primavera	16	52	30,8
Lame autunno	15	37	40,5
Incolto primavera	14	66	21,2
Pioppeta primavera	14	46	30,4
Pineta estate	11	33	33,3
Bosco misto primavera	9	44	20,5
Campo incolto primavera	8	34	23,5
Bosco misto autunno	7	35	20
Incolto autunno	7	33	21,2
Campo patate autunno	5	28	17,9
Pioppeta autunno	5	27	18,5
Campo incolto autunno	4	31	12,9
Campo mais autunno	2	15	13,3
Campo patate primavera	2	12	16,7
Massaciuccoli primavera	2	29	6,9
Campo girasole autunno	1	22	4,5
Campo mais primavera	0	13	0
Campo girasole primavera	0	10	0

Tabella 3. Percentuali di compresenza delle diverse specie individuate nelle aree di studio e sulle infiorescenze calcolate con l'indice di Renkonen (f= femmina, m= maschio, n= numero; sp = specie).

		n	n sp	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Campo girasole primavera	7	21	10	10,3	8,3	13,6	8,3	10,8	15,8	18,8	3,8	4,7	3,3	9,0	2,4	7,0	4,9	3,7	2,8	8,3	1,5
Campo girasole autunno	8	78	22		13	29,6	12	18,1	6,3	16,3	6,5	9,6	5,7	13,5	12,2	7,3	12,2	7,9	11,4	10,9	6,7
Campo mais primavera	9	37	13			16,7	8,3	12,8	13,6	17,1	5,6	9,1	6,6	0,4	4,4	11,5	4,5	5,4	5,3	10,5	4,4
Campo mais autunno	10	37	15				11,4	8,3	8	20,4	7,3	4,1	3,1	13	12	8	6,7	5,2	7,7	7,3	7,4
Campo incolto primavera	11	141	15					18,2	13,2	12,7	8,3	11,3	16,2	8	6,4	13,6	6,4	5,3	7,1	8,6	7,0
Campo incolto autunno	12	199	15						10,3	12,5	10,3	15,8	6,4	13	12,3	11,3	12,3	6,9	9,6	9,1	7,1
Campo patate primavera	13	41	15							4	1,8	2,2	4,9	4	0	4	0	1,8	0	0	1,5
Campo patate autunno	14	95	15								7,5	10,3	3,9	1	8,9	8,2	7	7,3	7,8	9,6	8,9
Bosco misto primavera	15	294	15									12,5	11,6	8	16,7	18,2	14,9	14,3	16,4	12,3	6,3
Bosco misto autunno	16	119	15										11,5	11	13,3	16,8	11,3	11,0	13,6	10,2	6,9
Lame primavera	17	627	52											3	9,1	14,6	10,3	11,4	11,4	6,6	10
Lame autunno	18	193	37												11,1	12,0	13	9,2	16,4	13,9	10,5
Pineta estate	19	238	33													15,1	11,7	12,9	17,3	14,8	7,1
Incolto primavera	20	222	66														13,6	17,9	14,8	15,9	11,6
Incolto autunno	21	160	33															14,3	21,9	20	8,3
Pioppeta primavera	22	343	46																14,1	8,7	10,5
Pioppeta autunno	23	182	27																	16,3	4,9
Massaciuccoli primavera	24	349	58																		12,8
Massaciuccoli autunno	25	248	29																		

		n	n sp	2	3	4	5	6
Fiori girasole	1	4397	109	46,2	12,2	1,7	4,7	0,8
Fiori mais	2	908	63		11,0	1,3	4,7	1,3
Fiori colza	3	2022	56			2,6	3,8	1,4
Fiori pioppo m Massaciuccoli	4	58	13				25,4	3,6
Fiori pioppo f Massaciuccoli	5	141	26					2,4
Fiori pioppo m Fortino Nuovo	6	363	16					

>20
20/>10
10/>5
5/>2.5
2.5/<2.5

Tabella 4. Indici di diversità calcolati per le infiorescenze (f= femmina, m= maschio, n= numero; sp = specie).

	Totale n	sp n	Alpha	Shannon H'	Shannon H max	Pielou J'	Simpsons D
PIOPPO m Fortino Nuovo	363	16	3,422	0,477	1,204	0,396	0,572
PIOPPO m Massaciuccoli	58	13	5,206	0,766	1,114	0,688	0,267
PIOPPO f Massaciuccoli	141	26	9,363	1,147	1,415	0,81	0,095
GIRASOLE Culatta	4397	109	20,256	2,171	4,691	0,463	0,218
MAIS Culatta	908	63	15,395	2,343	4,143	0,566	0,156
COLZA Culatta	2022	56	10,657	0,897	1,748	0,513	0,205

Tabella 5. Infiorescenze di girasole: catture totali, nelle cinque settimane di rilevamento (A) e nelle tre ore del giorno (B).

A	Totale	1	2	3	4	5
Totale n	4397	549	1098	552	633	1565
	%	%	%	%	%	%
Heteroptera	53,95	6,78	11,53	6,94	7,35	21,36
Homoptera	15,83	3,52	6,00	3,12	2,98	1,21
Coleoptera	15,42	0,48	1,52	0,18	2,39	10,85
Araneae	4,62	0,66	1,64	0,77	0,71	0,84
Diptera	1,61	0,50	0,41	0,18	0,14	0,39
Hymenoptera	1,80	0,30	0,48	0,18	0,39	0,45
Lepidoptera	1,09	0,43	0,45	0,07	0,09	0,05
Neuroptera	0,75	0,14	0,14	0,05	0,16	0,27
Thysanoptera	4,78	0,66	2,75	1,05	0,20	0,11
Altro	0,16	0,02	0,05	0,02	0,00	0,07

B	6.00	12.00	18.00
	%	%	%
Heteroptera	18,8	17,5	17,7
Homoptera	8,4	4,2	3,2
Coleoptera	7,1	4,8	3,5
Araneae	1,7	1,7	1,2
Diptera	0,8	0,3	0,5
Hymenoptera	0,6	0,8	0,5
Lepidoptera	0,5	0,3	0,3
Neuroptera	0,5	0,1	0,1
Thysanoptera	1,1	3,0	0,7
Altro	0,1	0,1	0,1

Fig. 1. Lago di Massaciuccoli; Sistema Lago. Dislocazione dei siti di campionamento (per ulteriori spiegazioni vedi testo).

Fig. 2. Lago di Massaciuccoli; Sistema Lago. Area a Phragmites australis bruciato (a della Fig. 1).

Fig. 3. Lago di Massaciuccoli; Area canale Anghetto. Argine interno con Periploca graeca (d della Fig. 1).

Fig. 4. Località Ontanelli; Incolto S21. Area incolta con Artemisia coerulescens.

Fig. 5. Località Fortino nuovo; Bosco con pioppo. Allagamenti invernali.

Fig. 6. Località Culatta; Coltivazione sperimentale di girasole.

Fig. 7. Località Culatta; Coltivazione sperimentale di mais.

Fig. 8. Località Culatta; Bosco misto di latifoglie in inverno.

Fig. 9. Colmate del Bozzone. Molinio-Holoschoenion in primavera.

Fig. 10. Colmate del Bozzone. Fioritura primaverile.

Fig. 11. Trappola ad intercettazione per macroinvertebrati attivi sul terreno.

Fig. 12. Cattura di macroinvertebrati sulle infiorescenze di girasole.

Fig. 13. Api che bottinano su girasole.

Fig. 14. Osmia sp. (Hymenoptera, Apoidea) su colza.

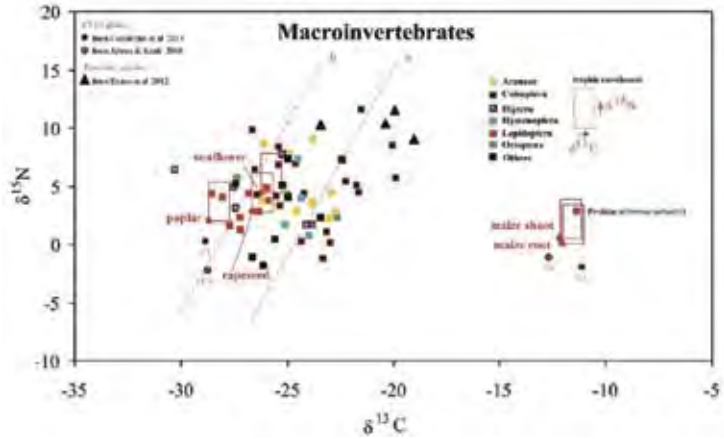


Fig. 15. Isotopi stabili del δ13C e del δ15N relativi alle piante ed ai macroinvertebrati indagati (per altre spiegazioni vedi nota nel testo).

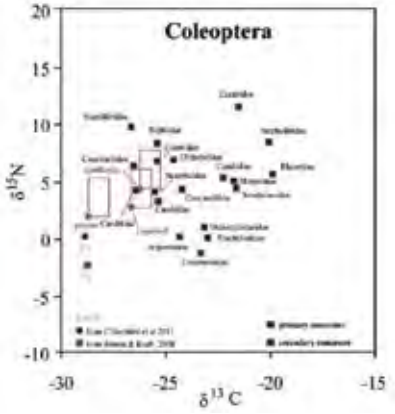


Fig. 15. Isotopi stabili del δ13C e del δ15N relativi ai Coleoptera indagati (per altre spiegazioni vedi nota nel testo).

Capitolo 3

Valutazione della Biodiversità

3.3 – Diversità dei Microrganismi

Enrico Casalone[1], Francesco Vitali[1], Cesarea Caroppo[1], Giuliana Senatore[1], Cristina Vettori[2], Cristina Indorato[1], Giorgio Mastromei[1]

[1]Dipartimento di Biologia, Università di Firenze, Italia; [2]Istituto di Genetica Vegetale, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia)

Introduzione

Il suolo è la più grande riserva di biodiversità del pianeta. La biodiversità del suolo è principalmente rappresentata dalla comunità microbiche di batteri (Ward 2002, Torsvik et al. 2002) e funghi (Gams 2007); un grammo di suolo può contenere tra 10^9 e 10^{11} cellule batteriche (Torsvik et al. 2002, Watt et al. 2006) e fino a 200 m di ife fungine (Leake et al. 2004). I tipi di vegetazione, insieme con l'umidità del suolo e la disponibilità di carbonio e di nutrienti, possono influenzare la composizione della comunità microbica del suolo (Buckley and Schimdt 2002). L'influenza della vegetazione ha luogo principalmente nel volume di suolo dove i processi mediati da microrganismi sono sotto l'influenza delle radici delle piante, il cosiddetto ambiente della rizosfera. Il concetto di rizosfera è stato definito più di 100 anni fa (Hiltner 1904). I microrganismi sono più abbondanti nella rizosfera se comparati con il corrispondente terreno non rizosferico (Berg and Smalla 2009). Si trovarono fino a più di 30.000 unità tassonomiche operative (OTU) batteriche e di archea nel microbioma rizosferico (Mendes 2011). Le radici delle piante modificano continuamente l'ambiente pedologico tramite la rizodeposizione, un processo che, rilasciando una larga gamma di composti a basso e ad alto peso molecolare (Hinsinger et al. 2005), crea una pressione selettiva sulla comunità microbica locale (da Rocha et al. 2009, Koranda et al. 2011, Lambers et al. 2009, Paterson et al. 2007, Pinton et al. 2007) e modella la composizione e l'attività della popolazione microbica (da Rocha et al. 2009) in modo pianta-specifico (Berg and Smalla 2009). Viceversa, i microrganismi sotterranei influenzano indirettamente e direttamente la produttività, diversità e composizione della comunità delle piante (van der Heijden et al. 2008). La dinamica dei microrganismi del suolo ha implicazioni importanti per la risposta alle perturbazioni dell'ecosistema sotto la superficie del suolo.

La maggior parte della nostra conoscenza sull'influenza che i fattori ambientali possono esercitare sulla diversità microbica del suolo sono i risultati di studi focalizzati su erbacee coltivate e specie di piante arboree di interesse agricolo e solo di rado sono state studiate

piante spontanee. Quindi, al fine della conservazione della diversità naturale, è importante riconoscere possibili modificazioni che le attività umane possano produrre nelle comunità microbiche del suolo e nelle loro interazioni con piante spontanee in ambienti naturali. A tale riguardo, sono di particolare rilevanza gli incrementi nelle colture geneticamente modificate (GM) degli ultimi decenni (Carpenter 2011) e il conseguente aumento del livello di attenzione sulle possibili influenze negative che i caratteri portati da piante geneticamente modificate (GMP) potrebbero avere sull'ambiente e sul biota benefico del suolo, portando potenzialmente ad alterazioni nella funzione del suolo stesso; tra queste preoccupazioni ambientali, quella dell'impatto non intenzionale che le GMP potrebbero avere sui microbi associati al suolo, specialmente i batteri della rizosfera. E' quest'ultima un'area ancora poco studiata e compresa (Filion 2008, Kowalchuk et al. 2003). La produzione da parte di colture transgeniche di proteine insetticide come la proteina Bt di *Bacillus thuringiensis*, sono esempi di un possibile impatto di GMP sui microrganismi del suolo. Le proteine Bt sono rilasciate dagli essudati radicali di Bt-mais e da biomasse di Bt-piante durante e dopo il raccolto (Saxena and Stotzky 2001) e rappresentano un rischio potenziale di esposizione per organismi non-bersaglio (de Vaufleury et al. 2007). Esempi ulteriori sono gli agenti tossici, come antibiotici, erbicidi e altri prodotti di geni marcatori selezionabili introdotti in piante transgeniche insieme al transgene. Sebbene i dati sui loro effetti sulla diversità microbica siano limitati, questi agenti potrebbero manifestare attività contro una larga gamma di batteri e funghi associati a piante naturali (Miki and McHugh 2004). I prodotti delle GMP transgeniche possono influenzare direttamente o indirettamente organismi che sono bersagli non-intenzionali; ma sono anche altri i rischi associati all'uso delle GMP: (1) la mobilitazione del transgene nell'ambiente dovuta al flusso genico veicolato dal polline, da una pianta a un'altra (Hüsken et al. 2010); e (2) il trasferimento genico orizzontale (HGT), tra piante ed altri organismi; i microrganismi sono gli ospiti finali più probabili di un evento HGT, ma essi funzionano anche come ospiti intermedi nel trasferimento ulteriore di un gene transgenico ad altri organismi (procarioti ed eucarioti) (Brigulla and Wackernagel 2010, Keese 2008). Nell'insieme, il flusso genico veicolato dal polline e gli HGT possono spostare nel tempo e nello spazio eventuali effetti tossici di prodotti transgenici sulla biodiversità naturale.

Per le ragioni sopra espresse, la valutazione del rischio ambientale delle colture GM rimane l'oggetto di numerosi studi (Sparrow 2010). Ogni valutazione del rischio ambientale da colture GM deve tenere conto, tra l'altro, della biodiversità attuale del luogo dove le GMP dovrebbero essere coltivate, prima che la coltivazione cominci. Riguardo alla diversità microbica del suolo, la sua esplorazione è un compito impegnativo (Zhang and Xu 2008). Infatti, più del 99% delle cellule microbiche nel suolo non sono coltivabili con le procedure standard di laboratorio (da Rocha et al. 2009, Van der Heijden et al. 2008). I metodi che si basano su amplificazione diretta e analisi del 16S rDNA permettono un campionamento più completo di comunità microbiche e stanno rapidamente sostituendo la coltivazione dei microrganismi come metodica per confrontare la composizione (tipo di batteri presenti),

la ricchezza (il numero di tipi) e la struttura (la distribuzione di frequenza o di relativa abbondanza di tipi) (Zhang e Xu 2008) delle comunità microbiche.
In questo studio si sono perseguite due obiettivi principali:

1. la valutazione della biodiversità attuale delle comunità batteriche e fungine (in termine di composizione, ricchezza e struttura) e la sua variazione stagionale nei suoli associati con radici superficiali di pioppi e aceri e di piante erbacee in differenti siti del Parco Regionale di Migliarino-San Rossore-Massacciuccoli.
2. L'identificazione di specie microbiche indicatrici da usare nella definizione di un indice di monitoraggio del rischio.

Per valutare la diversità microbica si è ricorso a:

c. un approccio coltura-dipendente. In questo caso si è usata una strategia di diluizione e piastramento su piastre selettive per ottenere conte vitali batteriche e fungine. Inoltre, si è stabilita una collezione di isolati rappresentante le principali componenti dei microrganismi coltivabili nei suoli analizzati.
d. Un approccio coltura-indipendente. A questo scopo, si è usata l'analisi T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). La T-RFLP è basata sull'amplificazione di una regione bersaglio di DNA cromosomico comune alla maggioranza delle specie di interesse, questa tecnica utilizza *primer* PCR, dei quali almeno uno è marcato all'estremità 5' con una molecola fluorescente, progettati su regioni conservate della regione bersaglio. Il pool di prodotti PCR è poi digerito con un enzima di restrizione, e sulla base dell'eterogeneità di sequenza tra le specie, sono prodotti frammenti terminali fluorescenti di diverse dimensioni. Questi sono separati mediante elettroforesi capillare, risultando in una serie di picchi che costituiscono un profilo della comunità microbica del campione di suolo. Obiettivo della T-RFLP fu il gene 16S-rDNA e la regione ITS, rispettivamente per batteri e funghi. I profili T-RFLP sono stati usati per valutare la variabilità stagionale delle comunità microbiche associate a diverse piante.

Per identificare gli indicatori batterici da usare nella valutazione del rischio di colture geneticamente modificate, si trae vantaggio dalla capacità di identificare, mediante analisi computerizzata con il software residente nel sito MiCA, le specie microbiche della comunità confrontandole dimensione dei frammenti di restrizione (T-RF) della T-RFLP (Shyu et al. 2007) con i dati disponibili, per le stesse sequenza bersaglio, in database pubblici.
Solamente T-RF con caratteristiche adeguate sono stati scelti come indicatori: (1) devono essere presenti in una percentuale di campioni ≥ 20% di uno specifico gruppo di essi (per esempio, tipo di albero); (2) devono rappresentare almeno l'1% della comunità. Dopo, si cercherà nella letteratura scientifica quali tra le specie batteriche così identificate risulta essere un possibile bersaglio non-intenzionale di prodotti transgenici da colture di GMP.

Risultati e discussione

Caratteristiche dei siti e campionamento dei suoli

Questo studio fu condotto in tre diversi siti (Tab. 1) localizzati in due differenti Aree nel

Parco Regionale di Migliarino–San Rossore–Massaciuccoli (Toscana, Italia). I siti e i suoli corrispondenti furono classificati come: (A) Sito 1, bosco misto igrofilo deciduo con suolo "Humic Eutradept", termico, misto, medio-grossolano; (B) Sito 2, pioppeta coltivato, suolo sconosciuto; (C) Sito 3, bosco misto deciduo meso-igrofilo, con suolo Fragic Hapludalfs, fine, misto, termico.

Tabella 1. Caratteristiche dei siti di campionamento.

Sito	Area (m^2)	Distanza media tra aree (m)	Distanza media tra gli alberi(m)	Alberi campionati[a]	N° di campioni	Densità di campionamento[b]
1	7,000	1-2 (325)	51	PN	7	23.3 %
2	27,745	2-3 (8250)	7	PC	4	n.d.
3	118,000	3-1 (8310)	217	A	11	4.12 %

[a] PN, *Populus alba*; PC, *Populus nigra* x *Populus deltoides*; A, *Acer campestre* [b] percentuale di alberi campionati sul numero totale di alberi della stessa specie in quel sito

Le caratteristiche chimiche dei suoli dei siti di campionamento sono riportati in tabella 2 ordinati per anno e stagione.

Tabella 2. Caratteristiche chimiche dei suoli dei siti di campionamento ordinati per anno e stagione.

Tipo di albero	Stagione	Anno	% di umidità (SD)[a]	pH[b]	% materia organica[b]
PN	A	2010	37,56% (0,042)	7,10	15,09
PN	I	2011	33,71% (0,022)	7,10	14,17
PN	P	2011	33,48% (0,052)	7,10	14,42
PN	E	2011	15,29% (0,043)	7,30	12,35
PN	A	2011	21,07% (0,033)	7,40	14,70
PN	I	2012	29,05% (0,031)	7,40	12,87
PN	P	2012	27,11% (0,046)	7,20	16,26
PN	E	2012	16,97% (0,056)	7,30	15,32
PC	P	2011	17,51% (0,027)	7,70	9,51
PC	E	2011	4,88% (0,012)	7,80	10,10
PC	A	2011	14,43% (0,010)	7,70	9,41
PC	I	2012	23,74% (0,020)	7,60	9,27
PC	P	2012	17,95% (0,033)	7,50	10,91
PC	E	2012	4,37% (0,017)	7,90	12,20
A	I	2011	32,08% (0,059)	7,20	15,69
A	P	2011	21,95% (0,045)	6,60	16,99
A	E	2011	15,14% (0,039)	7,20	15,81
A	A	2011	16,90% (0,034)	6,80	14,83
A	I	2012	25,84% (0,058)	7,00	14,03
A	P	2012	24,93% (0,079)	7,00	14,81
A	E	2012	12,51% (0,033)	7,00	15,98
BULK	E	2012	n.d.	8,00	7,65
C	E	2012	n.d.	7,90	8,21
M	E	2012	n.d.	7,90	8,10

[a] I valori dell'umidità sono stati determinati individualmente su tutti i campioni di suolo e riportati come valori medi stagionali; tra parentesi sono indicati i valori della deviazione standard.
[b] Sono riportati i valori, determinati con il metodo "Loss on Ignition", di un pool di suoli della stessa stagione.

I suoli associati a sette pioppi naturali (*Populus alba*: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P11) nel sito 1, quattro pioppi coltivati (ibrido "Triplo" clone *Populus nigra* x *Populus deltoides*: PC1, PC2, PC3, PC4) nel sito 2 e undici aceri (*Acer campestre*: A9, A13, A104, A112, A119,

A142, A182, A204, A249, A260) nel sito 3, furono campionati stagionalmente dall'autunno 2010 all'estate 2012, a una distanza di circa 20 cm dai tronchi degli alberi, utilizzando un pianta-bulbi (10 cm di larghezza x 15 cm di profondità). I suoli così raccolti furono messi buste di plastica sterile e immediatamente conservati a 5°C; lo stesso giorno, i campioni erano portati nel laboratorio dove erano setacciati sequenzialmente con setacci di acciaio inossidabile con dimensione dei fori di 5 mm e 2 mm. I suoli setacciati erano suddivisi in aliquote che erano immagazzinate a 4 °C per le conte microbiche totali, la determinazione del contenuto di umidità, di materia organica (mediante Loss on Ignition), del pH, , e a -80 °C per l'analisi molecolare.

Le tabelle 3 e 4 riportano il tipo e il numero dei campioni di suolo raccolti durante l'intero progetto, ordinati per anno e stagione, e inoltre il tipo di analisi fatte su ogni campione.

Tabella 3. Origine e numero dei campioni di suolo, ordinati per anno e stagione, dai diversi siti e analisi effettuate.

Area	Sito	Anno	Stagione[a]	Campioni			Analisi effettuate		
				Pioppi naturali (PN)	Pioppi coltivati (PC)	Aceri (A)	Colturale	Molecolare	Chimica del suolo
AREA 2	1 (Fortino nuovo)	2010	A	7	-	-	□	□	□
		2011	W	7	-	-	□	□	□
		2011	SP	7	-	-	□	□	□
		2011	SU	7	-	-	□	□	□
		2011	A	7	-	-	□	□	□
		2012	W	7	-	-	□	□	□
		2012	SP	7	-	2[b]	□	□	□
		2012	SU	7	-	-	□	□	□
	2 (Fortino nuovo)	2011	W	-	4	-	□	□	□
		2011	SP	-	4	-	□	□	□
		2011	SU	-	4	-	□	□	□
		2011	A	-	4	-	□	□	□
		2012	W	-	4	-	□	□	□
		2012	SP	-	4	-	□	□	□
		2012	SU	-	4	-	□	□	□
AREA 3	3 (Culatta)	2011	SP	-	-	11	□	□	□
		2011	SU	-	-	11	□	□	□
		2011	A	-	-	11	□	□	□
		2012	W	-	-	11	□	□	□
		2012	SP	-	-	11	□	□	□
		2012	SU	2[b]	-	11	□	□	□

[a] A, Autunno W, Inverno; SP, Primavera; SU, Estate; [b] Controlli

Tabella 4. Origine e numero dei campioni di suolo per le piante erbacee e analisi effettuate.

Area	Sito	Anno	Stagione[a]	Campioni			Analisi effettuate		
				terreno compatto	*Brassica napus* (C)	*Synapis arvensis* (M)	Colturale	Molecolare	Chimica del suolo
AREA 3	4 (Culatta)	2012	E	2[b]	5	13			

[a] E, Estate, [b] Controlli

Variazioni stagionali delle comunità microbiche del suolo in ogni sito di campionamento

La tabella 5 riporta il numero di ceppi microbici (batteri e funghi) isolati dalle piastre per la conta vitale durante l'intero progetto e conservate come colture pure per formare una collezione di ceppi. I ceppi batterici cono tenuti a -80°C in una soluzione di glicerolo al 20%, i ceppi fungini sono tenuti a 4° C in acqua distillata. Per ogni isolato è stata fatta una descrizione della colonia e della morfologia cellulare riportata in una banca dati con un collegamento alla foto della colonia. La collezione di colonie pure è rappresentativa dei maggiori tipi di colonie di batteri aerobici eterotrofi coltivabili presenti nei suoli campionati.

Tabella 5. Numero di colture pure di ceppi batterici e fungini e loro origine.

Tipo di albero	Batteri	Funghi
PN	194	177
PC	39	37
A	153	138
TOTAL	386	352

A seguire ci sono i dati relativi a siti differenti in diverse aree del Parco dove furono effettuati i campionamenti del suolo per la caratterizzazione microbica. Per ogni sito sono riportati: (1) conte batteriche e fungine vitali ottenute su piastre di terreno selettivo; (2) diversità batterica e fungina (espressa come Ricchezza, Uniformità e Indice di Shannon) come valutato con l'analisi "Terminal Restriction Length Polymorphism" (T-RFLP); (3) analisi di similarità delle comunità fungine e batteriche del suolo; (4) analisi di corrispondenza (CA) per le comunità batteriche e fungine; (5) mappa di calore e distanze di Bray-Curtis tra gruppi di campioni rappresentanti diverse comunità batteriche e fungine.

<u>AREA 2-SITO 1 (FORTINO NUOVO), CAMPIONAMENTI SU PIOPPI NATURALI</u>

I valori delle conte batteriche vitali da pioppi naturali nel Sito 1 sono sempre almeno di due ordini di grandezza maggiori di quelli relativi ai funghi. Non c'è alcuna chiara evidenza di influenza stagionale sulle conte microbiche vitali (Fig. 1).

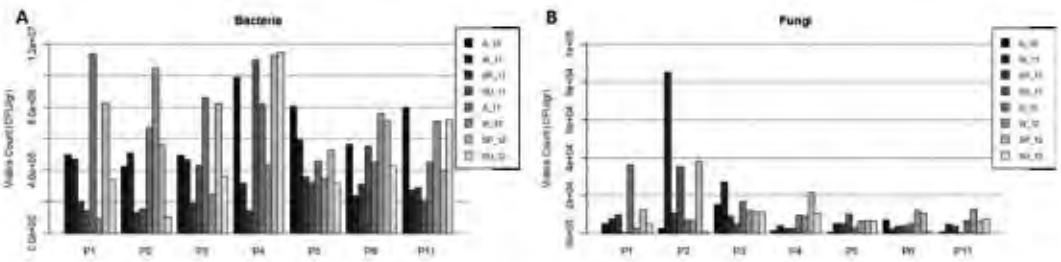


Fig. 1. A. Valori medi stagionali di conte batteriche vitali in campioni di suolo da pioppi naturali nel Sito 1. B. Valori medi stagionali di conte fungine vitali in campioni di suolo da pioppi naturali nel Sito 1. Le stagioni sono riportate seguendo la legenda in tabella 3; i numeri si riferiscono agli anni di campionamento.

Come si può vedere in tabella 6, i valori di ricchezza delle comunità batteriche e fungine, corrispondenti al numero di T-RF in ogni profilo di comunità microbica, dove ogni T-RF corrisponde idealmente a una distinta Unità Tassonomica Operazionale (OTU), variano di stagione in stagione ma non seguono uno specifico andamento stagionale. L'area relativa di ciascun picco (T-RF), come misura dell'abbondanza delle specie, è necessaria per calcolare Uniformità e indice di Shannon. I valori di Uniformità delle comunità di batteri e funghi sono alti, quelli fungini maggiori di quelli batterici, e non sono influenzati dalla stagionalità. L'indice di Shannon tiene conto sia della Ricchezza che dell'Uniformità della comunità, così è un buon indice sintetico di diversità. Nel nostro caso, i valori dell'indice di Shannon descrivono comunità di batteri e funghi a diversità medio-alta. La stretto campo di variazione dei valori dell'indice di Shannon tra le diverse stagioni suggerisce che la stagionalità ha solo un'influenza limitata sulle comunità microbiche, sebbene le comunità siano strutturalmente diverse.

Tabella 6. Analisi della diversità di comunità batteriche e fungine in campioni di suolo da pioppi naturali nel Sito 1. Ricchezza, Uniformità e Indice di Shannon sono stati calcolati tramite l'analisi dei dati T-RFLP. I dati riportati sono i valori medi di campioni di suolo stagionali.

	Bacteria			Fungi		
	Richness	Evenness	Shannon	Richness	Evenness	Shannon
A_10	19	0.80	2.33	18	0.83	2.65
W_11	23	0.85	2.63	17	0.91	2.57
SP_11	23	0.84	2.60	14	0.86	2.25
SU_11	23	0.81	2.54	13	0.89	2.25
A_11	24	0.83	2.65	13	0.92	2.31
W_12	26	0.83	2.70	22	0.93	2.87
SP_12	26	0.80	2.60	24	0.93	2.93
SU_12	18	0.83	2.35	18	0.93	2.62

L'analisi di similarità tra comunità (*clustering*) (Fig. 2) e la CA (Fig. 3) non mostrano alcun ordinamento particolare nei campionamenti dei pioppi naturali. Infatti non c'è né un ordinamento dei campioni basato sul tempo (per stagione, per anno), né su singoli individui (per lo stesso albero in stagioni diverse). Inoltre, le comunità microbiche associate con gli aceri di controllo non formano un gruppo distinto, suggerendo che, nella formazione della struttura delle comunità microbiche, le differenze tra tipi di alberi non sono predominanti.

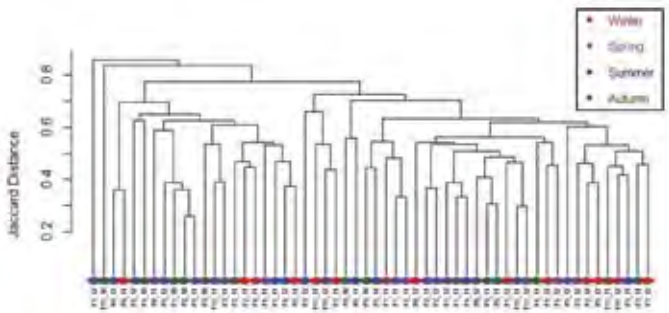


Fig. 2. . UPGMA clustering di comunità batteriche nei campioni di suolo da pioppi naturale nel Sito 1.

Nell'analisi CA, i campioni invernali si raggrupparono, mostrando una minore variabilità rispetto agli altri.

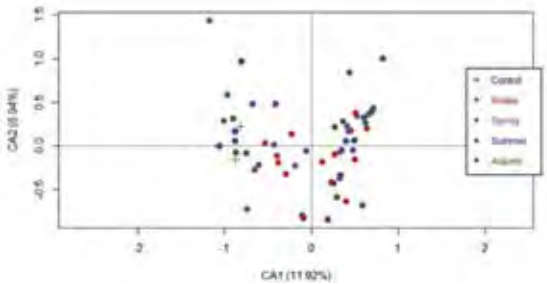


Fig. 3. Analisi delle Corrispondenze (CA) delle comunità batteriche in campioni di suolo da pioppi naturali nel Sito 1. I simboli + indicano gli aceri campionati come controllo nello stesso sito.

L'analisi dei gruppi (Fig. 4) delle comunità fungine mostra un ordinamento che è parzialmente influenzato da singoli individui (stesso albero in stagioni diverse) ma non dalla stagione o dall'anno. Il grafico dell'ordinamento delle CA (Fig. 5) conferma questa osservazione. Gli aceri di controllo, come visto per le comunità microbiche, non si raggruppano insieme.

AREA 2-SITO 2 (FORTINO NUOVO), CAMPIONAMENTO DI PIOPPI COLTIVATI

I valori delle conte batteriche vitali sono sempre di almeno due grandezze maggiori di quelle fungine. Non c'è alcuna chiara evidenza dell'influenza stagionale sull'abbondanza microbica (Fig. 6).

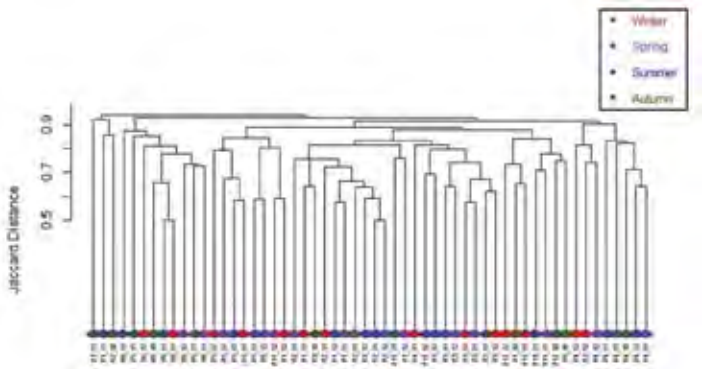


Fig. 4. UPGMA clustering delle comunità fungine nei campioni di suolo da pioppi naturali nel Sito 1.

Come si può vedere nella tabella 7, il valore di ricchezza delle comunità batterica e fungina, come osservato in precedenza per il pioppo naturale nel Sito 1, varia da stagione in stagione ma non segue uno andamento stagionale. Le comunità fungine mostrano una gamma di variazione della ricchezza maggiore di quelle batteriche. I valori di Uniformità delle comunità di batteri e funghi sono alti, più alti nei funghi, e non sono influenzati dalla stagionalità. I valori dell'indice di Shannon descrivono comunità di batteri e funghi

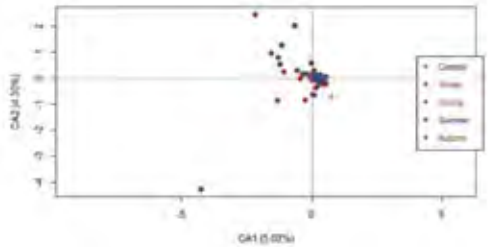


Fig. 5. Analisi delle Corrispondenza (CA) delle comunità fungine nei campioni di suolo da pioppi naturali nel Sito 1. I simboli + indicano aceri campionati come controlli nello stesso sito.

a diversità medio-alta con una ridotta variabilità di tipo stagionale, suggerendo che la stagionalità, similmente al pioppo naturale nel Sito 1 , non ha effetti rilevanti sulla diversità delle comunità microbiche.

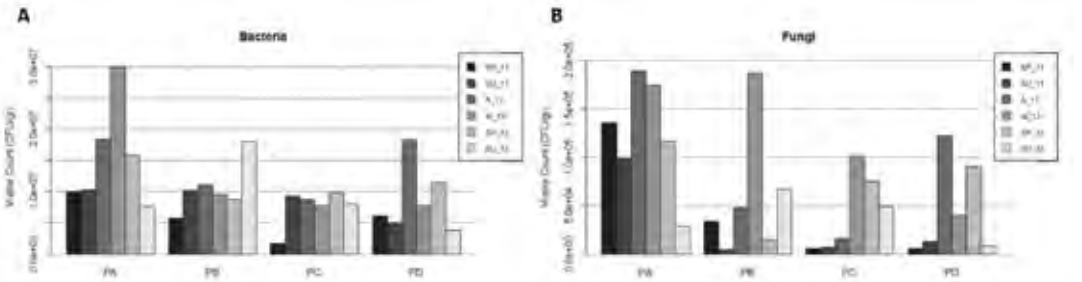


Fig. 6. A. Valori medi stagionali della conta batterica vitale nel campione di suolo da pioppi coltivati nel Sito 2. B. Valori medi stagionali della conta fungina vitale nel campione di suolo da pioppi coltivati nel Sito 2. Per l'identificazione delle stagioni vedi la legenda di Fig. 1.

Tabella 7. Analisi della diversità delle comunità batteriche e fungine nei campioni di suolo dai pioppi coltivati nel Sito 2. Ricchezza, Uniformità e Indice di Shannon sono stati calcolati dall'analisi dei dati T-RFLP. I dati riportati sono valori medi da campioni di suolo stagionali. L'analisi dei gruppi (Fig. 7) mostra un chiaro, ma non esclusivo, ordinamento su base

	Batteri			Funghi		
	Ricchezza	Uniformità	Shannon	Ricchezza	Uniformità	Shannon
SP_11	18	0.75	2.16	12	0.91	2.27
SU_11	17	0.81	2.27	14	0.91	2.35
A_11	20	0.79	2.35	10	0.95	2.20
W_12	20	0.84	2.52	17	0.91	2.53
SP_12	18	0.81	2.30	13	0.89	2.27
SU_12	20	0.81	2.40	14	0.90	2.30
SP_11	18	0.75	2.16	12	0.91	2.27
SU_11	17	0.81	2.27	14	0.91	2.35

temporale per i campionamenti dell'estate 2012 e della primavera 2011. Un terzo gruppo più grande (quello più a destra) ha una composizione mista che include tutti i campioni dell'inverno 2012, dell'estate 2011 e della primavera 2012. I campioni dell'autunno 2011 sono sparpagliati tra questi ultimi tre gruppi. Le stesse divisioni sono ben visibili nel grafico dell'ordinamento CA (Fig. 8), suggerendo che, almeno in parte, la composizione delle comunità batteriche nei campioni da pioppi coltivati sia influenzata dalla stagionalità.

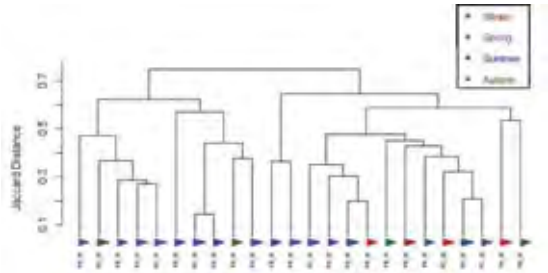


Fig. 7. UPGMA clustering delle comunità batteriche nei campioni di suolo da pioppi coltivati nel Sito 2.

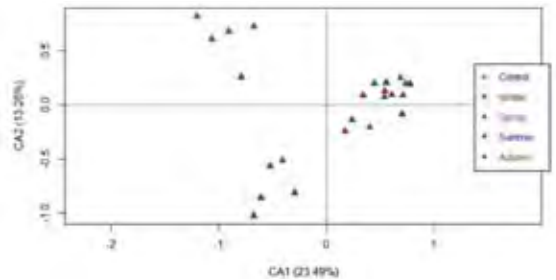


Fig. 8. Analisi delle Corrispondenze (CA) delle comunità batteriche in campioni di suolo da pioppi coltivati nel Sito 2.

L'analisi dei gruppi (Fig. 9) e la CA (Fig. 10) non mostrano alcun ordinamento specifico dei campioni. Infatti, non c'è né un ordinamento dei campioni su base temporale (per stagione ed anno) né uno su base individuale (per lo stesso albero da differenti stagioni).

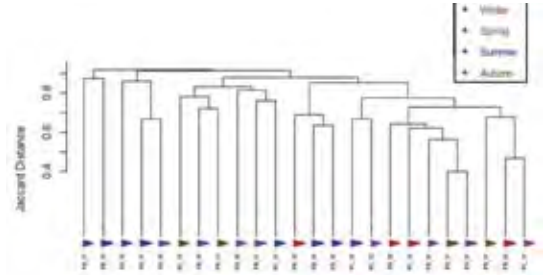


Fig. 9. UPGMA clustering delle comunità fungine nei campioni di suolo da pioppi coltivati nel Sito 2.

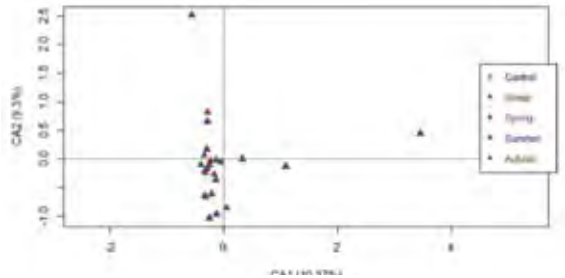


Fig. 10. Analisi delle Corrispondenze (CA) delle comunità fungine in campioni di suolo da pioppi coltivati nel Sito 2.

AREA 3-SITO 3 (CULATTA), CAMPIONAMENTO SU ACERI.

I valori delle conte batteriche vitali da aceri nel Sito 3 sono sempre almeno di due ordini di grandezza maggiori di quelle fungine. Non c'è alcuna chiara evidenza di influenza stagionale sulle conte microbiche vitali (Fig. 11).

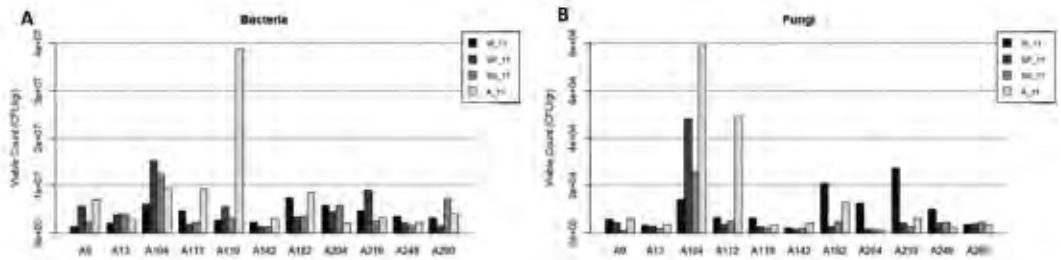


Fig. 11. A. Valori medi stagionali della conta batterica vitale nel campione di suolo da aceri nel Sito 3. B. Valori medi stagionali della conta fungina vitale nel campione di suolo da aceri nel Sito 3. Per l'identificazione delle stagioni vedi la legenda di Fig. 1.

Come si può vedere nella tabella 8, il valori di ricchezza delle comunità batteriche e fungine, come già osservato per i pioppi naturali e coltivati, variano da stagione a stagione ma non seguono uno andamento stagionale. A differenza dei campioni da pioppi, le comunità fungine negli aceri mostrano una gamma di variazione della ricchezza più ridotta di quelle batteriche. I valori di uniformità delle comunità di batteri e funghi sono alti, più alti nei funghi, e non sono influenzati dalla stagionalità. I valori dell'indice di Shannon descrivono comunità di batteri e funghi a diversità medio-alta con una gamma ridotta di variazione stagionale, suggerendo che la stagionalità, similmente ai pioppi naturali e coltivati, ha solamente bassi effetti sulla diversità delle comunità microbiche. A differenza dei pioppi, i valori di diversità di batteri e funghi mostrano schemi simili di variazione da stagione a stagione.

Tabella 8. Analisi della diversità di comunità batteriche e fungine nei campioni di suolo da aceri nel Sito 3. Ricchezza, Uniformità e Indici di Shannon sono stati calcolati tramite analisi dei dati T-RFLP. I dati riportati sono valori medi da campioni stagionali del suolo.

	Batteri			Funghi		
	Ricchezza	Uniformità	Shannon	Ricchezza	Uniformità	Shannon
W_11	15	0.80	2.16	14	0.93	2.42
SP_11	19	0.77	2.27	12	0.91	2.16
SU_11	25	0.79	2.55	15	0.92	2.46
A_11	21	0.79	2.40	13	0.91	2.27
W_12	27	0.82	2.69	18	0.90	2.52
SP_12	28	0.82	2.71	22	0.92	2.81
SU_12	19	0.77	2.26	14	0.86	2.25
W_11	15	0.80	2.16	14	0.93	2.42

Nell'analisi dei gruppi (Fig. 12) è chiaramente visibile un gruppo di campioni dell'inverno 2011. Inoltre, altri campioni mostrano una tendenza a raggrupparsi insieme in base all'anno di campionamento; per esempio, tutti quelli dell'estate 2012 si aggregano insieme

con molti della primavera 2011. La CA (Fig. 13) mostra pure un distinto ordinamento dei campioni dell'inverno 2011 (non specificato), con una varianza maggiore lungo la seconda componente. I campioni di controllo da pioppi nello stesso sito non paiono differire sostanzialmente dagli altri.

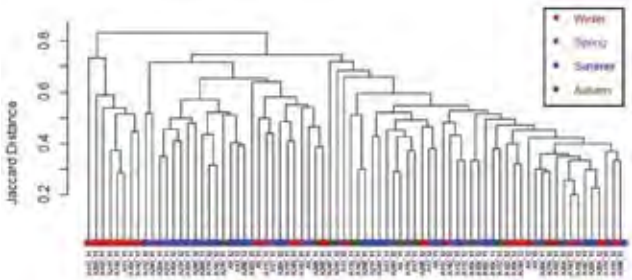


Fig. 12. UPGMA clustering di comunità batteriche nei campioni di suolo da aceri nel sito 3.

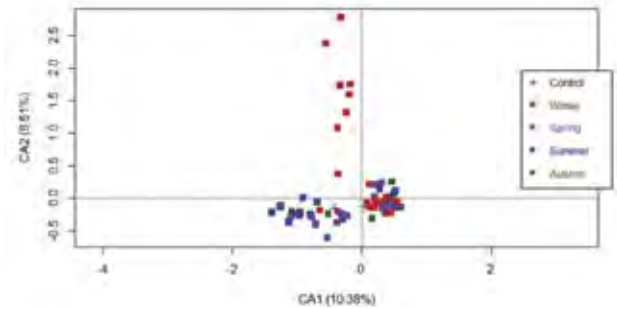


Fig. 13. Analisi delle corrispondenze (CA) di comunità batteriche nei campioni di suolo da aceri nel Sito 3. I simboli + indicano pioppi campionati come controlli nello stesso sito.

La Fig. 14 mostra una tendenza nelle comunità fungine a formare gruppi di campioni dallo stesso albero indipendentemente dalla stagione di campionamento. La CA (Fig. 15) non mostra alcun ordinamento particolare dei campioni.

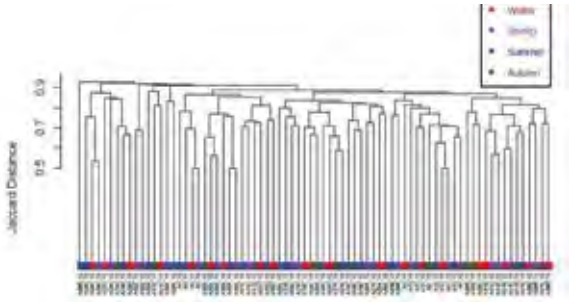


Fig. 14. UPGMA clustering di comunità fungine in campioni di suolo da aceri in Sito 3.

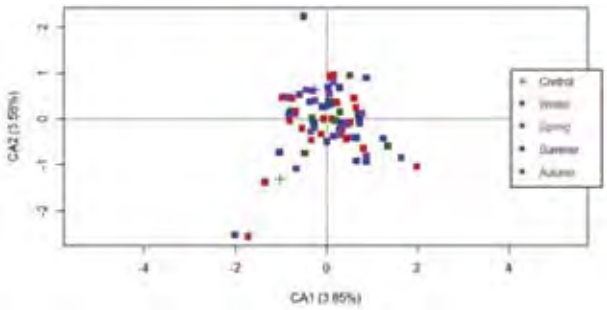


Fig. 15. Analisi delle Corrispondenze (CA) di comunità fungine in campioni di suolo da aceri in Sito 3. I simboli + indicano i pioppi campionati come controlli nello stesso sito.

AREA 3-SITO 4 (CULATTA-PARCELLA A6), CAMPIONAMENTI SU PIANTE ERBACEE.

Come si può vedere nella tabella 9, i valori della Ricchezza e dell'indice di Shannon delle comunità batteriche da suoli rizosferici di piante erbacee sono più alti che nel suolo non rizosferico. Invece, le comunità fungine da suoli zirosferici di piante erbacee e quelli da suoli non rizosferici mostrano valori della Ricchezza più simili, ma i valori dell'indice di Shannon sono più bassi nel secondo tipo di suolo.

Tabella 9. Analisi della diversità delle comunità batteriche e fungine nei campioni di suolo rizosferico da piante erbacee e nel suolo non rizosferico (BULK) nel Sito 4. Ricchezza, Uniformità ed Indice di Shannon sono stati calcolati dall'analisi di dati T-RFLP.

	Batteri			Funghi		
	Ricchezza	Uniformità	Shannon	Ricchezza	Uniformità	Shannon
BULK	9	0.86	1.84	15	0.89	2.36
C	18	0.81	2.31	16	0.93	2.56
M	15	0.83	2.21	17	0.93	2.58

Le analisi dei gruppi (Fig. 16) e la CA (Fig. 17) mostrano due aggregazioni, una contiene solo ma non tutti i suoli da *B. napus* dai campionamenti del luglio 2012 e i due campioni di suolo non rizosferico, la seconda è più ampia e raccoglie tre piccoli gruppi: uno contiene solo campioni di *B. napus* e uno la maggioranza dei campioni di *Sinapis arvensis*.

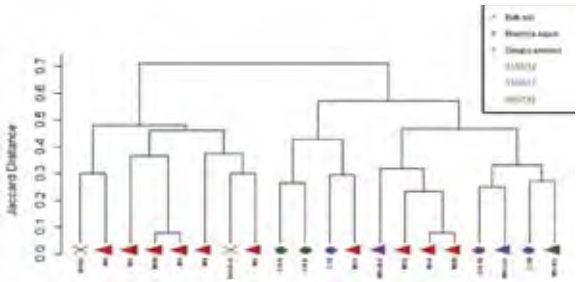


Fig. 16. UPGMA clustering di comunità batteriche in campioni di suolo da piante erbacee e terreno compatto nel Sito 4.

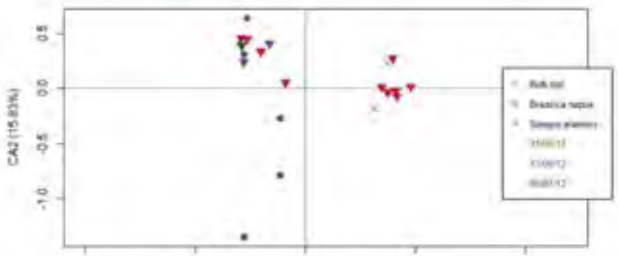


Fig. 17. Analisi delle Corrispondenze (CA) di comunità batteriche nei campioni di suolo da piante erbacee e terreno compatto nel Sito 4.

La Fig. 18 mostra come le comunità batteriche da suolo di *S. arvensis* e *B. napus* siano diverse una dall'altra e da quelle del suolo non rizosferico, con *B. napus* che mostra la maggiore differenziazione.

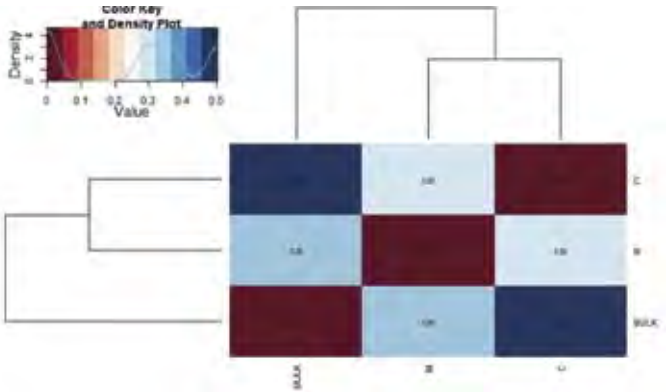


Fig. 18. Mappa di calore rappresentante le distanze di Bray-Curtis tra profili di comunità batteriche da suoli associati a piante erbacee e suolo non rizosferico (C, B. napus; M, S. arvensis; BULK, suolo non rizosferico). I profili sono ottenuti dalla frequenza delle presenze di ogni T-RF in ogni gruppo di profili (C, M o BULK).

Le analisi dei gruppi (Fig. 19) e CA (Fig. 20) non mostrano alcun ordinamento particolare dei campioni.

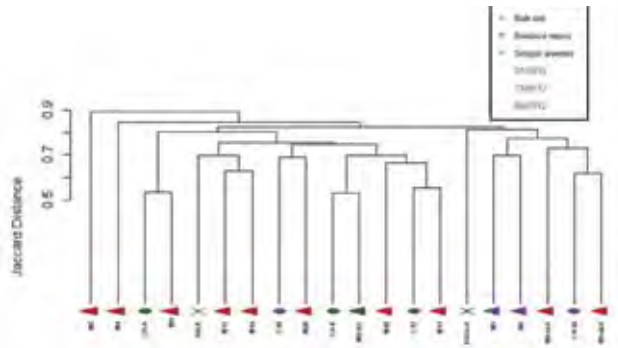


Fig. 19. UPGMA clustering di comunità fungine in campioni di suolo da piante erbacee e terreno compatto nel Sito 4.

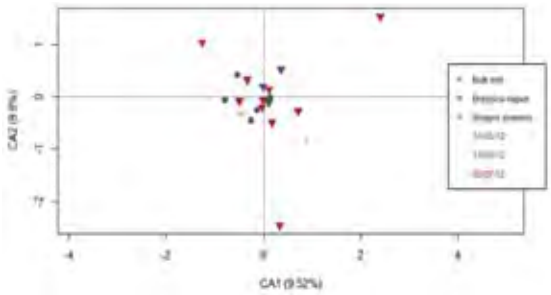


Fig. 20. Analisi delle Corrispondenze (CA) delle comunità fungine nei campioni del suolo da piante erbacee e terreno compatto in Sito 4.

La Fig. 21 mostra come le comunità batteriche dai suoli di *S. arvensis* e *B. napus* sono diverse una dall'altra e, in un modo comparabile, da quelle dei suoli non rizosferici.

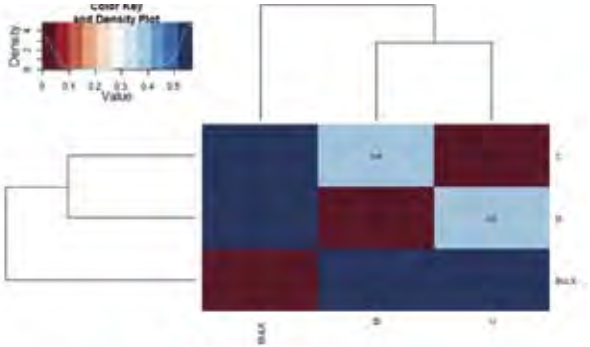


Fig. 21. Mappa di calore rappresentante le distanze di Bray-Curtis tra profili di comunità fungine da campioni di suolo da piante erbacee e suoli non rizosferici (C, B. napus; M, S. arvensis; BULK, suolo non rizosferico). I profili sono ottenuti dalla frequenza delle presenze di ogni T-RF in ogni gruppo di profili (C, M o BULK).

COMPARAZIONE TRA SITI

Dopo la presentazione dei dati concernenti le analisi della diversità microbica nei vari siti di campionamento, qui riportiamo dati riferentesi alla comparazione tra siti. Questa comparazione è importante perché permette di valutare differenze tra comunità che sono dovute a componenti specifiche come il tipo di suolo o il tipo di albero dai quali le comunità provengono.

La Fig. 22 mostra un chiaro raggruppamento di campioni basato sul tipo di suolo/albero (A, PN, e PC). I profili di comunità batteriche nei suoli da pioppi coltivati nel sito 2 sono altamente diversi rispetto alle comunità da aceri e pioppi naturali, la diversità più grande è osservata con gli aceri. Aceri e pioppi naturali sono più simili l'uno all'altro. Inoltre, osservando la variabilità intra-gruppo, i profili di comunità da suoli di acero e pioppi naturali in stagioni differenti sono meno diversi di quelli all'interno dei pioppi coltivati. Queste osservazioni potrebbero suggerire che il regime di coltivazione (pioppi coltivati) influenza la struttura delle comunità batteriche.

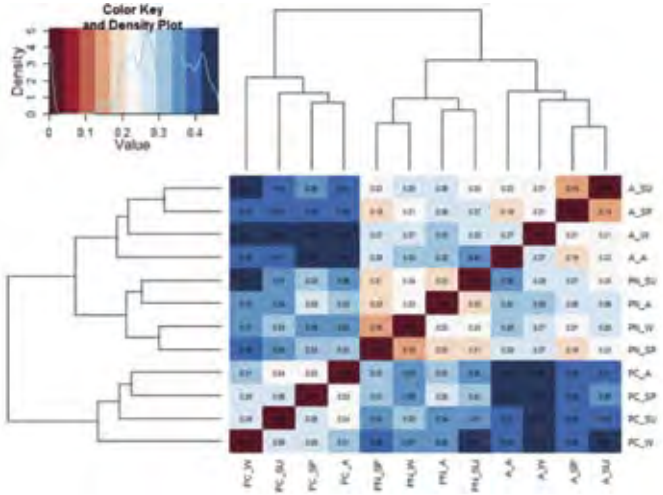


Fig. 22. Mappa di calore rappresentante le distanze di Bray-Curtis tra i profili di comunità batteriche di suoli da siti differenti e poi da alberi diversi (A, Aceri; PN, Pioppi Naturali; PC, Pioppi Coltivati). I profili sono ottenuti come frequenza delle occorrenze di ogni T-RF in ogni gruppo di profili (A, PN o PC).

La Fig. 23 mostra un chiaro raggruppamento di campioni basato sul tipo suolo/albero (A, PN, e PC). Come le comunità batteriche, i profili di comunità fungine da suoli di pioppi coltivati sono altamente diverse rispetto a quelle da aceri e pioppi naturali. Soprattutto il livello di diversità fungina è più alto. Inoltre, osservando la variabilità intra-gruppo, profili da pioppi coltivati in stagioni differenti sono più variabili che quelli da pioppi naturali e comparabili a quelli tra aceri. Questa osservazione suggerisce che, come già visto per le comunità batteriche, la coltivazione influenza anche la struttura delle comunità fungine.

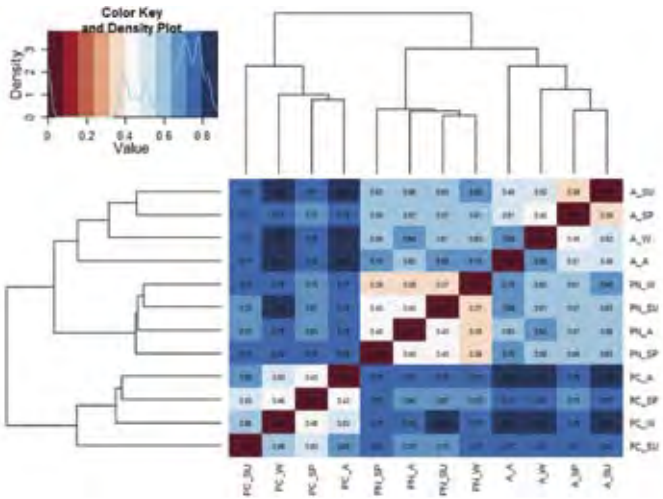


Fig. 23. Mappa di calore rappresentante le distanze di Bray-Curtis tra i profili di comunità fungine di suoli da siti differenti e poi da alberi diversi (A, Aceri; PN, Pioppi Naturali; PC, Pioppi Coltivati). I profili sono ottenuti come frequenza delle occorrenze di ogni T-RF in ogni gruppo di profili (A, PN o PC).

IDENTIFICAZIONE DI INDICATORI APPROPRIATI

Per identificare gli indicatori batterici da usare nella valutazione del rischio da colture GM abbiamo scelto di utilizzare quei T-RF che fossero presenti in una percentuale di campioni ≥ 20% di uno specifico gruppo di campioni (per esempio, tipo di albero) e che rappresentassero almeno l'1% della comunità. Questi indicatori T-RF e le corrispondenti specie microbiche sono riportati in tabella 10.

Tabella 10. Lista di T-RF che sono stati proposti come indicatori appropriati nella valutazione del rischio da colture GM e le corrispondenti specie batteriche identificate presuntivamente mediante MiCA.

LUNGHEZZA T-RF	IDENTIFICAZIONE Mica	PC		PN		A	
		Frequenza delle occorrenze	Abbondanza Relativa (%)	Frequenza delle occorrenze	Abbondanza Relativa (%)	Frequenza delle occorrenze	Abbondanza Relativa (%)
[illegible]	*unidentified*	0,54	3,24	0,46	5,54	0,51	4,06
[illegible]	*unidentified*	0,79	1,46	0,77	1,94	0,88	3,84
105	*Ochrobactrum anthropi* *Rhizobium sp.*	not present	–	0,91	0,13	0,08	0,15
[illegible]	*Xanthobacter autotrophicus*	1,00	2,12	0,64	2,25	0,60	2,52
LUNGHEZZA T-RF	IDENTIFICAZIONE Mica	PC		PN		A	
		Frequenza delle occorrenze	Abbondanza Relativa (%)	Frequenza delle occorrenze	Abbondanza Relativa (%)	Frequenza delle occorrenze	Abbondanza Relativa (%)
117	*Dinoroseobacter shibae* *Janthinobacterium sp.* *Parvibaculum lavamentivorans* *Rhodobacter sphaeroides Sphingopyxis sp.*	0,54	0,86	not present	–	0,01	0,02
162	*unidentified*	0,88	2,23	0,63	1,28	0,16	0,38
166	*Bacillus cereus*	not present	-	0,50	1,62	0,01	0,04
416	*unidentified*	0,25	0,57	0,05	0,75	not present	-
[illegible]	*Rhodobacter sphaeroides* *Sphingomonas sp.*	0,54	11,93	0,57	12,85	0,55	11,27
[illegible]	*Acidocella sp.*	0,96	16,56	0,38	6,54	0,48	11,70
[illegible]	*Polaromonas sp.* *Roseiflexus sp.* *Variovorax sp.*	0,50	1,79	0,54	2,88	0,60	2,98
[illegible]	*Rhodoferax ferrireducens*	1,00	10,74	0,82	10,05	0,69	4,66
443	*Dehalococcoides sp.* *Frankia sp.*	0,29	0,55	0,02	0,03	not present	-
[illegible]	*Arthrobacter sp.* *Clostridium beijerinckii* *Kitasatospora putterlickiae* *Kribbella jejuensis* *naphthalene-utilizing bacterium* *Slackia heliotrinireducens* *soil actinomycete* *Streptomyces sp.*	0,67	2,63	0,63	3,97	0,77	8,94

	Agromyces sp. *Arthrobacter sp.* *Clostridium phytofermentans* *Pseudomonas sp.* *Thermoanaerobacter sp.*	0,67	7,56	0,73	7,00	0,77	5,52
	Exiguobacterium sibiricum	0,63	16,07	0,63	8,53	0,79	8,70
475	*Alcaligenaceae bacterium* *Brevibacillus sp.* *Burkholderia sp.* *Cupriavidus necator*	0,42	1,53	0,27	1,99	0,09	0,50
	Stenotrophomonas maltophilia	0,50	19,38	0,61	28,78	0,60	32,76
	Bacillus sp. *Myxococcus sp.* *Paenibacillus rhizosphaerae* *Staphylococcus aureus*	0,38	0,77	0,48	3,90	0,45	1,97

Codice colore: rosso, ubiquitario; giallo, esclusivo PN; verde scuro, esclusivo PC; verde chiaro, esclusivo PN+PC

Bibliografia

- Berg, G. and K. Smalla. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Ecol. 68: 1–13.
- Brigulla, M. and W. Wackernagel. 2010. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 1027-1041.
- Buckley, D.H. and T.M. Schimdt. 2002. Exploring the biodiversity of soil: a microbial rain fores. pp.183-208. In: J. Staley and A. Reysenbach (eds). Biodiversity of Microbial Life. Wiley, New York.
- Carpenter, J.E. 2011. Impact of GM crops on biodiversity. GM Crops 2: 7-23.
- da Rocha, U.N., L. van Overbeek and J.D. van Elsas. 2009. Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. FEMS Microbiol. Ecol. 69:313-328.
- Filion, M. 2008. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations? Microb. Biotechnol. 1: 463–475.
- Gams, W. 2007. Biodiversity of soil inhabiting fungi. Biodiver. Conserv. 16: 69-72.
- Hiltner, L. 1904. Uber neue erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie. Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftgesellschaft 98: 59-78.
- Hinsinger, P, G.R. Gobran, P.J. Gregory and W.W. Wenzel. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytol. 168: 293-303.
- Hüsken, A., S. Prescher and J. Schiemann. 2010. Evaluating biological containment strategies for pollen-mediated gene flow. Environ. Biosafety Res. 9: 67-73.
- Keese, P. 2008. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. Environ. Biosafety Res. 7: 123-149.
- Koranda, M., J. Schnecker, C. Kaiser, L. Fuchslueger, B. Kitzler, C.F. Stange, A. Sessitsch, S. Zechmeister-Boltenstern and A. Richter. 2011. Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech – The influence of plant C exudates. Soil Biol. Biochem. 43: 551–558.

- Kowalchuk, G.A., M. Bruinsma and J.A. van Veen. 2003. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. Trends Ecol. Evol. 18: 403-410.
- Lambers, H., C. Mougel, B. Jaillard and P. Hinsinger. 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. Plant and Soil 321: 83-115.
- Leake, J.R*., D.* Johnson*, D.P.* Donnelly*, G.E.* Muckle*, L.* Boddy and D.J Read. 2004*.* Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning*. Can. J. Bot.* **82:** 1016–1045*.*
- Mendes, R., M. Kruijt, I. de Bruijn, E. Dekkers, M. van der Voort, J.H. Schneider, Y.M. Piceno, T.Z. DeSantis, G.L. Andersen, P.A. Bakker, J.M. Raaijmakers. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science 332: 1097-100.
- Miki, B. and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. J Biotechnol. 107: 193–232.
- Paterson, E, T. Gebbing, C. Abel, A. Sim and G. Telfer. 2007. Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. New Phytol. 173: 600-610.
- Pinton, R., Z. Varanini and Nannipieri P. 2007. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC Press.
- Saxena, D. and G. Stotzky. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. Soil Biol. Biochem. 33: 1225-1230.
- Shyu, C., T. Soule, S.J. Bent, J.A. Foster and L.J. Forney. 2007. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. Microb. Ecol. 53: 562-570.
- Sparrow, P.A. 2010. GM risk assessment. Mol. Biotechnol. 44: 267-275.
- Torsvik, V., L. Øvreås and T.F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. Science 296: 1064-1066.
- Van der Heijden, M.G.A, R.D. Bardgett and N.M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystem. Ecol. Letters 11: 296-310.
- de Vaufleury, A., P.E. Kramarz, P. Binet, J. Cortetc, S. Cauld, M.N. Andersene, E. Plumeya, M. Coeurdassiera and Kroghf P.H. 2007. Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms. Pedobiol. 51: 185-194
- Ward, B.B. 2002. How many species of prokaryotes are there? Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 10234-10236.
- Watt, M., P. Hugenholtz, R. White and K. Vinall. 2006. Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Environ. Microbiol. 8: 871-884.
- Zhang, L. and Z. Xu. 2008. Assessing bacterial diversity in soil. J. Soils Sediments 8: 379–388.

Capitolo 4

Delineazione di un metodo di analisi per valutare i rischi per l'ambiente delle piante geneticamente modificate

Francesca Donnarumma[1], Donatella Paffetti[2], Davide Travaglini[3], Chiara Lisa[3], Anna Buonamici[1], Francesca Bottalico[3], Cristina Vettori[1]

[1]Istituto di Genetica vegetale, Divisione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [2]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italia); [3]Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Università di Firenze, Via San Bonaventura 13, 50145, Firenze (Italia)

Introduzione

Definizione di un metodo di valutazione del rischio

I recenti sviluppi e le applicazioni della biotecnologia, specialmente dell'ingegneria genetica, hanno rivoluzionato la produzione ed il miglioramento delle piante ed incrementato la disponibilità di nuove caratteristiche di pregio così come il rapido sviluppo di piante transgeniche resistenti agli insetti ha portato grandi benefici economici ed ha causato una riduzione significativa dell'uso di insetticidi chimici. Comunque l'introduzione di piante transgeniche nell'ecosistema agricolo potrebbe comportare rischi ecologici (Li et al. 2012). Per queste ragioni, la controversia verso l'utilizzo di piante geneticamente modificate (GM) continua ad essere argomento di riviste scientifiche.

I fautori dei prodotti (organismi) GM a supporto della propria tesi riportano i benefici che derivano dal loro utilizzo come l'incremento del raccolto, un maggior nutrimento, e la resistenza alle malattie. Gli oppositori mettono in evidenza i possibili rischi che includono l'incertezza circa la sicurezza del cibo, la contaminazione delle specie native con elementi genetici provenienti da organismi GM, ed il pericolo per la biodiversità (de Jesus et al 2006).

A causa dei possibili impatti ambientali delle piante GM, c'è un urgente bisogno di definire un metodo "di rischio" per valutare il loro possibile impatto negativo sull'ambiente. Queste valutazioni ci permettono di definire delle misure preventive per mitigare od evitare gli effetti negativi che potrebbero risultare da rischi potenziali (de Jesus et al 2006)

Analisi dei possibili rischi causati dagli organismi geneticamente modificati

Secondo la società ecologica americana (ESA), i possibili rischi degli OGM potrebbero

includere: 1) la diffusione di nuovi patogeni o di ceppi più resistenti, 2) l'esasperazione degli effetti dei patogeni esistenti tramite ibridazione con i relativi organismi transgenici, 3) il danno alle specie non-target, come organismi del terreno, insetti, uccelli ed altri animali, 4) la distruzione delle comunità biotiche e 5) la perdita irreparabile o cambiamenti nelle diversità delle specie o diversità genetica dentro le specie (Snow e al. 2005). Il rilascio degli OGM evidenzia le difficoltà generali nel prevedere la casualità e l'estensione degli effetti ambientali a lungo termine quando degli organismi non-nativi sono introdotti nell'ecosistema. Le modificazioni genetiche, possono potenzialmente creare cambiamenti che accrescono l'abilità dell'organismo di diventare una specie invasiva. Gli impatti ecologici potenziali dovuti all'invasività dipendono dalle opportunità esistenti per instaurarsi non intenzionale della persistenza ed il flusso del gene di un organismo introdotto. Ognuno di essi a turno, dipende dai vari componenti della sopravvivenza o riproduzione di un organismo o del suo ibrido (Wolfenbarger e Phifer, 2000)

Grandi zone di coltivazione possono incrementare la possibilità di tali rischi per il sovrapporsi con le specie parentali compatibili; perciò aumenta la possibilità che il gene della pianta, introdotto con mutazioni genetiche o con altre tecniche più tradizionali, si diffonda nelle specie selvatiche.

I mutamenti genetici potrebbero cambiare la possibilità degli incroci (Bergelson et al. 1998), sebbene questo non sia stato riportato nelle specie studiate. Gli impatti ecologici del trasferimento del polline, un meccanismo riproduttivo tramite cui l'introgressione può avvenire, dipende dal fatto se gli ibridi sopravvivono e si riproducono. Gli andamenti della sopravvivenza o della riproduzione tra piante transgeniche ed i controlli suggeriscono, ma non indicano, la possibilità dell'introgressione del transgene nelle popolazioni naturali, dipendenti dal susseguente flusso genico e da pressioni selettive (Snow et al. 2005). Non tutti gli studi sostengono queste conclusioni e le conseguenze ecologiche negli habitats non-agricoli e negli ecosistemi rimangono da studiare (Wolfenbarger e Phifer 2000).

Benefici potenziali

Riduzione degli impatti ambientali dai pesticidi. Come riportato nelle regolamentazioni, i rischi potenziali degli OGM dovrebbero essere valutati e paragonati ai possibili benefici ambientali, così come ai rischi provenienti dalle pratiche convenzionali e agricole come le coltivazioni biologiche. Per esempio le coltivazioni transgeniche resistenti agli insetti e tolleranti gli erbicidi possono diminuire l'uso di sostanze chimiche pericolose per l'ambiente usate per debellare le malattie (Wolfenbarger e Phifer 2000).

La capacità di effettuare controlli può promuovere pratiche di non-aratura che possono diminuire l'erosione del suolo e la perdita di acqua ed incrementare le sostanze organiche del suolo. Degli studi sono necessari per valutare se i terreni migliorano come risultato di raccolte geneticamente modificate per la tolleranza agli erbicidi.

Inoltre, se i raccolti geneticamente modificati incrementano la produttività, alcuni suggeriscono che i benefici ambientali includeranno la conservazione degli habitats naturali in quanto possono essere ridotte le aree ad utilizzo agricolo. Comunque i potenziali

benefici ambientali dei raccolti geneticamente modificati per l'aumento della produttività possono essere maggiori nei paesi in via di sviluppo dove l'output agricolo è pronto per maggiori miglioramenti (Wolfenbarger e Phifer 2000). Le piante transgeniche possono aumentare la rimozione di metalli pesanti tossici dai terreni inquinati e dalle acque, isolarli dentro tessuti di piante disponibili per il raccolto (Zhu et al. 1999), oppure trasformare le sostanze inquinanti in forme meno tossiche (Bizily et al. 2000).
La mitigazione dell'ambiente tramite piante transgeniche non sono state ancora molto usate, pertanto non sono ancora stati misurati i benefici ambientali (Wolfenbarger e Phifer 2000).

Problemi relativi alla definizione del metodo di valutazione dei rischio

L'ambiente e la variabilità delle cultivar complicano la valutazione dei rischi. Gli ecosistemi sono complessi e non tutti i rischi associati al rilascio di nuovi organismi, inclusi i transgenici, possono essere identificati e tanto meno considerati. Possono sopravvenire dei rischi sconosciuti al crescere della frequenza e della scala delle introduzioni (Levin et al. 1989). Infatti alcune conseguenze, come la probabilità del flusso genico, sono in funzione delle scale spaziali delle aree d'introduzione (Klinger et al. 1992). Le relazioni ecologiche includono molte interazioni a cascata e di ordini più alti che sono difficili da provare e da valutare per scale temporali e spazi limitati. A scale spaziali più alti, c'è maggiore possibilità per il contatto con specie sensibili o habitats o per i cambiamenti a livello di paesaggio perché a scale maggiori più ecosistemi possono essere alterati (Snow et al. 2005). Gli organismi transgenici, come i raccolti geneticamente modificati, rilasciati nell'ambiente, interagiranno potenzialmente con una diversità di habitats nel tempo e nello spazio, ed i potenziali rischi da un singolo tipo di organismo transgenico possono variare di conseguenza. La valutazione del rischio dovrà essere specialmente sensibile ai fattori temporali e spaziali (Wolfenbarger e Phifer 2000). Sono necessari studi rigorosi e precisi dei benefici e dei rischi associati agli OGM. Ecologisti, biologi e vari specialisti in altre discipline dovrebbero essere coinvolti più attivamente nella ricerca tesa a quantificare i benefici ed i rischi causati dagli OGM nell'ambiente. A causa della complessità dei sistemi ecologici, questa ricerca dovrebbe essere portata oltre livelli temporali e spaziali (Snow et al. 2005).

Valutazione dei rischi ambientali degli OGM.

La valutazione del rischio è molto usato nelle decisioni circa il rilascio delle piante geneticamente modificate nell'ambiente (EFSA 2010). La valutazione del rischio ambientale (Enviromental Risk Assesment - ERA) è usato nelle decisioni circa l'approvazione di un organismo GM (Fitz Patrik et al. 2009). Le possibili influenze delle piante e delle pratiche relative alla loro coltivazione devono essere valutate e questa valutazione deve essere eseguita con le analisi del rischio (de Jesus et al. 2006). Lo scopo della valutazione del rischio è aiutare a prendere decisioni, e non ad incrementare la conoscenza scientifica per se (Hill e Sendashonga 2003, Romeis 2009). Richieste di nuovi dettagli per la valutazione

del rischio dovrebbero essere perciò limitate a quelle necessarie per raggiungere una conclusione di rischio accettabile. Se i dati conformi su cui basare una decisione regolatoria sono già disponibili, la tentazione di richiedere dati addizionali per rispondere a domande scientifiche interessanti non dovrebbe esistere (Raybould 2007): le valutazioni del rischio dovrebbero essere basati su dettagli "utili a sapersi" non "belli da sapere". Un ampio consenso è stato sviluppato secondo il quale se c'erano rischi ambientali potenziali di piante transgeniche questo richiede la valutazione del rischio, che deve essere fatta "caso per caso", tenendo conto del transgene, dell'organismo ricevente, dell'ambiente di rilascio e della frequenza e scala di introduzione prevista (Andow and Zwahlen 2006). L'analisi del rischio segue un approccio strutturato in tre distinti ma correlati passaggi: valutazione del rischio, gestione del rischio, comunicazione del rischio.

Background: linee guida dell'EFSA sulla valutazione del rischio ambientale (EFSA, 2010)

La valutazione di rischi ambientali possono causare un'alta confidenza dei minimi rischi verificando teorie - "ipotesi di rischio" - che predicono la probabilità di eventi dannosi inaccettabili. La creazione di ipotesi di rischio ed un progetto per verificarle è chiamato "formulazione del problema". L'effettiva formulazione del problema cerca di massimizzare la possibilità di scoprire effetti che indichino rischi potenziali; se tali effetti non sono individuati, il rischio minimo è indicato con alta confidenza (Raybould, 2006). Secondo le linee guida dell'EFSA (2010), la valutazione del rischio segue 6 *fasi*: 1) formulazione del problema che include l'identificazione del rischio, 2) caratterizzazione del pericolo, 3) caratterizzazione dell'esposizione, 4) caratterizzazione del rischio, 5) strategie di gestione del rischio, e 6) valutazione del rischio totale.

Fase 1: Formulazione del problema incluso l'identificazione del pericolo.

Il contesto del problema per la valutazione del rischio riflette i valori che derivano dagli obiettivi e dalle politiche ambientali generali che indirizzano l'analisi del rischio. Stabilire il contesto del problema serve ad impostare i parametri utili alla valutazione del rischio, quali: gli obiettivi di protezione, gli scopi ambientali, gli standard di valutazione (Suter, 2000) e la metodologia di valutazione. Il processo di integrare la probabilità e le conseguenze di esposizione, in termini di danno, costituisce la base della valutazione del rischio ambientale (ERA). Come primo passo per la valutazione del rischio ambientale (ERA), la formulazione del problema (FP) permette di stabilire i parametri che sono di grande rilevanza al fine della valutazione. Una inadeguata formulazione del problema può compromettere l'intera valutazione del rischio ambientale e aggiungere un livello di incertezza nelle conseguenti decisioni da prendere. I frequenti risultati di questo tipo di errore sono le continue richieste di maggiori dati, sproporzionate misure adottate per l'attenuazione dei rischi ed errata comunicazione dei risultati del rischio; questo si traduce in aumento delle preoccupazioni circa l'impatto ambientale (Johnson et al., 2007; Raybould, 2006) ed in un ritardo nel processo decisionale. Alcuni autori sostengono che tale ritardo potrebbe

causare un maggiore impatto ambientale a causa dei conseguenti ritardi nell'introduzione di prodotti benefici per l'ambiente (Raybould 2006, 2007). Inoltre, una valutazione del rischio ambientale con una inadeguata formulazione del problema può avere risultati non adeguatamente specificati o inappropriati del valore ambientale da proteggere (benefici inclusi i processi attraverso i quali l'ambiente produce risorse) o portare ad una insufficiente chiarezza per quanto riguarda lo scopo e l'uso dei dati da raccolti. Questo rapporto rappresenta un quadro di riferimento per una corretta formulazione del problema che può essere applicato per la valutazione del rischio ambientale nell'utilizzo di piante geneticamente modificate (Wolt et al., 2010).

Fase 2: Caratterizzazione del pericolo.

La caratterizzazione del pericolo in questo documento-guida è definito come la valutazione qualitativa e/o quantitativa del danno ambientale associato con il rischio presente in una o più ipotesi della formulazione del problema. La grandezza di ogni potenziale effetto ambientale negativo deve, se possibile, essere espressa in termini quantitativi piuttosto che qualitativi (Liu e Agresti, 2005); il pericolo identificato può essere posto su una scala di gravità.

Fase 3: Caratterizzazione dell'esposizione.

Questa fase serve per valutare l'esposizione - intesa come probabilità degli effetti negativi che possono esserci - e per stimare quantitativamente l'esposizione al danno ambientale. Per ogni rischio caratterizzato e identificato non può essere possibile valutarne la precisa esposizione (probabilità). La probabilità di esposizione può essere espressa sia qualitativamente usando una categoria descrittiva preordinata (per esempio "alta", "moderata", "bassa", o "trascurabile") sia quantitativamente con una misura relativa di probabilità (da zero a uno, dove lo zero rappresenta l'impossibilità ed uno la certezza) (EFSA, 2010).

Fase 4: Caratterizzazione del rischio.

Il rischio è caratterizzato dalla combinazione dell'entità delle conseguenze di un pericolo e la probabilità che tali conseguenze si verifichino (EC, 2002). In questo documento guida è descritto come la stima quantitativa o semi quantitativa, della probabilità di accadimento e della gravità degli effetti nocivi, basata sulla formulazione del problema, e caratterizzazione del pericolo e dell'esposizione. La caratterizzazione del rischio deve indicare se la formulazione del problema (inclusa l'identificazione dei pericoli), la caratterizzazione del pericolo e dell'esposizione sono completi.

Fase 5: Strategie per la gestione del rischio.

Quando la caratterizzazione del rischio (fase 4) identifica dei rischi, i richiedenti devono proporre misure per la loro gestione. Queste strategie di gestione del rischio dovrebbero mirare a ridurre i rischi identificati associati con le piante geneticamente modificate ad un

livello di nessuna (minima) preoccupazione e dovrebbe prendere in considerazione aree definite di incertezza.
I richiedenti dovrebbero descrivere la gestione del rischio in modo da ridurre il pericolo e/o l'esposizione, e la conseguente riduzione in termini di rischio dovrebbe essere quantificata (quando possibile).
Se i richiedenti hanno identificato le caratteristiche di gestione del rischio (ad esempio, la fertilità ridotta) in piante geneticamente modificate che possono ridurre questi rischi, l'affidabilità e l'efficacia di queste caratteristiche dovrebbero essere valutati. Inoltre, se i richiedenti pongono restrizioni o condizioni sul rilascio di una pianta geneticamente modificata, al fine di ridurre i rischi, l'efficacia e l'affidabilità di queste misure dovrebbero essere valutate.

Fase 6: Valutazione globale del rischio e conclusioni.

Una valutazione generale del rischio delle piante geneticamente modificate dovrebbe prendere in considerazione i risultati della valutazione del rischio ambientale e dei livelli di incertezza associati, il peso delle prove e le strategie di gestione del rischio proposte (fase 5) nell'ambiente ricevente (in cui saranno introdotte).
La valutazione complessiva del rischio dovrebbe comportare una informazione qualitativa e, se possibile, una guida quantitativa per la gestione del rischio. I richiedenti dovrebbero spiegare chiaramente quali ipotesi sono state fatte durante la valutazione del rischio ambientale e qual è la natura e l'entità delle incertezze associate con il rischio. Quando nella valutazione complessiva del rischio siano stati identificati dei rischi, i richiedenti dovranno indicare perché certi livelli di rischio potrebbero essere accettabili.

Modello concettuale e piano di analisi

Il modello concettuale descrive lo scenario plausibile di come possa derivare un danno (uno svantaggio) dall'utilizzo di colture geneticamente modificate in modo tale che questo permetta una caratterizzazione del rischio. Il fine del modello concettuale è quello di comunicare prontamente come sarà condotta la valutazione del rischio ambientale.
I modelli concettuali assumono molte forme, come semplici dichiarazioni, un profilo delle attività, diagrammi di flusso o diagrammi. I modelli concettuali descrivono le relazioni fondamentali tra il rilascio di piante geneticamente modificate e le possibili conseguenze ambientali di tale rilascio.
Il modello concettuale descrive il percorso per l'analisi impostando il problema in prospettiva e stabilendo le relazioni proposte tra esposizione ed effetto (Wolt et al., 2010). Una volta che degli scenari ragionevoli per l'analisi sono stati identificati e descritti attraverso modelli concettuali, essi devono formare un piano di analisi. Il piano di analisi descrive le varie misure da adottare per la valutazione, le conseguenti caratterizzazioni, gli studi che devono essere condotti ed il livello appropriato per l'analisi. È importante sottolineare che il piano di analisi prescrive il modo in cui i risultati devono essere espressi per la caratterizzazione del rischio (Wolt et al., 2010).

Procedura a più livelli.

Un livello all'interno della valutazione del rischio è un processo che viene avviato da una decisione di raccogliere informazioni e dati, e si conclude con una decisione o che il rischio può essere ed è valutato sulla base delle informazioni e dei dati disponibili, o che il rischio non può essere valutato e informazioni aggiuntive o dati sono necessari (Andow and Zwahlen, 2006). La gestione del rischio dovrebbe essere possibile ad ogni livello del processo di valutazione.

In un primo momento, le prove in sequenza dovrebbero essere indirizzate a domande di massima utilizzando disegni sperimentali semplici con risultati inequivocabili che possano dare proiezioni prudenziali; per esempio valutazioni di primo livello concettualmente adeguate dovrebbero avere una bassa percentuale di determinazione del rischio di falsi-negativi, ma può anche avere una alta percentuale di falsi-positivi, che richiederanno valutazioni di livello superiore (Wolt et al., 2010).

L'utilità delle prove in sequenza e della valutazione per le piante geneticamente modificate è sempre più riconosciuta (Dutton et al., 2003, Garcia-Alonso et al. 2006, Romeis et al. 2008). Gli schemi pubblicati variano nelle loro specificità, come il numero di livelli e la natura delle prove, ma tutti riconoscono la natura critica di approcci differenziati per iterativamente affrontare il rischio in modo coerente con il livello di preoccupazione e con il livello di incertezza nella valutazione.

Secondo Andow e Zwhalen (2006) all'interno di un livello, i processi di raccolta delle informazioni e dei dati si distinguono dal processo della valutazione dei rischi e dei processi decisionali. Questo permette di intensificare il processo graduale (a più livelli) regolandolo a seconda della natura dell'analisi di rischio e della decisione da sostenere. Inoltre, quando un'autorità indipendente (con il supporto di esperti scientifici) effettua la valutazione dei rischi, la valutazione può essere basata su un insieme più ampio di dati e, quindi, può essere più precisa di quella che sarebbe se ogni singolo gruppo di ricerca valutasse il rischio in base ai dati solo in loro possesso.

La procedura a più livelli può guidare la valutazione del rischio ambientale in un approccio analitico con elementi comuni adottati in vari regimi di regolamentazione, rafforzando la capacità di valutazione del rischio ambientale per rispondere ad appropriate domande necessarie per la gestione del processo decisionale dei rischi e aumentare l'accettazione del processo di valutazione del rischio ambientale a livello globale.

Mentre l'adozione di un processo di valutazione del rischio ambientale coerente non può garantire l'accettazione globale di una particolare valutazione del rischio ambientale, migliorerà la comprensione e faciliterà la valutazione dei rischio ambientale condotta all'interno di contesti diversi (Wolt et al. 2010).

Nonostante una generale mancanza di accordo nella definizione dell'analisi del rischio, vi è un ampio consenso sul fatto che la valutazione del rischio ambientale su più livelli è essenziale per ripartire le risorse a rischi più gravi, riducendo gli sforzi ai rischi meno gravi (Andow and Wzahlen, 2006).

Procedura caso per caso

Secondo Snow et al. (2005), i benefici e i rischi ambientali associati con gli organismi geneticamente modificati dovrebbero essere valutati rispetto ad opportuni scenari di base, con la dovute considerazione sull'ecologia dell'organismo ricevente il tratto, il tratto stesso, e l'ambiente/i in cui l'organismo verrà introdotto. I risultatati in questi primi lavori implicano anche che la valutazione del rischio dovrebbe essere condotta sulla base di una proceduta "caso per caso". La valutazione di casi specifici di rischio necessitano di considerare la fonte e gli ambienti di destinazione, le caratteristiche biologiche ed ecologiche dell'organismo transgenico, e l'entità e la frequenza delle introduzioni (Andow and Zwahlen, 2006). Il principio "caso per caso", largamente accettato da molti paesi e organizzazioni internazionali, è stato applicato per stabilire delle procedure e metodi di valutazione sicuri per gli organismi geneticamente modificati. Secondo il principio del "caso-per-caso", per ogni organismo geneticamente modificato una procedura di valutazione sicura per un "specifico-evento" deve essere stabilita tenendo in considerazione il suo organismo ricevente, la manipolazione genetica, il gene target, ecc. Il principio di caso-per-caso garantisce che lo schema di valutazione di sicurezza per un organismo geneticamente modificato sia abbastanza specifico e sensibile in grado di trovare fattori di rischio potenziali per la sicurezza alimentare (Deng et al. 2008). Per la definizione del metodo di valutazione del rischio, seguiamo la procedura base del caso-per-caso, intendendo che le varie necessarie informazioni possono dipendere dalla specie delle piante geneticamente modificate interessate, dai geni introdotti, dagli usi che se ne vogliono fare, dall'ambiente in cui possono essere potenzialmente introdotte, prendendo in considerazione anche le specifiche esigenze di ogni coltivazione e la presenza nello stesso ambiente di altre piante geneticamente modificate (EFSA, 2010).

Inoltre, i risultati devono essere espressi nel peggiore dei casi, nel senso che in caso di mancanza di dati per la formulazione di una stima, quella stima deve essere preferita in modo tale che gli effetti genetici negativi non siano sottovalutati (Perry et al. 2010).

Aree di interesse

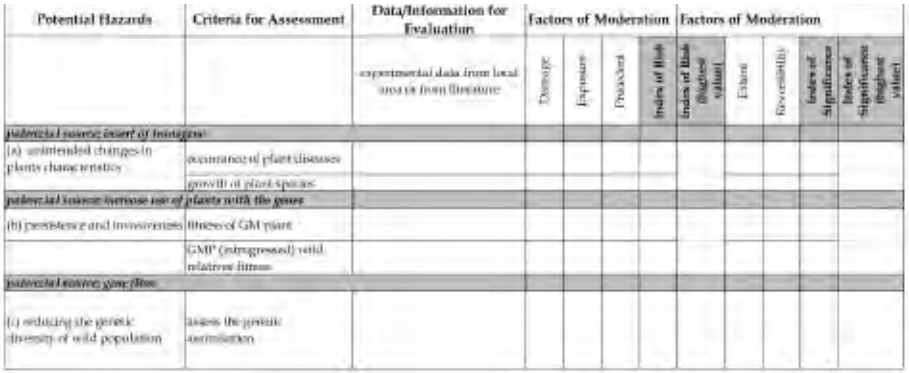
Il Comitato OGM dell'EFSA considera sette aree specifiche d'interesse da affrontare da parte dei richiedenti e valutatori del rischio durante l'ERA (1) persistenza ed invasività delle piante GM, o dei loro parentali compatibili, includendo il trasferimento genico da pianta a pianta; (2) trasferimento genico da pianta a microrganismi; (3) interazione della pianta GM con organismi "target" e (4) interazione della pianta GM con organismi "non-target", includendo i criteri per la selezione di specie appropriate e di gruppi funzionalmente rilevanti per la valutazione del rischio; (5) impatto di colture specifiche, delle tecniche di gestione e di raccolta; includendo considerazioni sui sistemi di produzione e l'ambiente(i) ricevente(i); (6) effetti su processi biogeochimici; e (7) effetti sulla salute umana ed animale. Ogni specifica area d'interesse è considerata in un modo strutturato e sistematico; che segue i sei passaggi sopra descritti.

Nei nostri studi, abbiamo focalizzato l'attenzione sulle prime quattro aree d'interesse,

valutando la validità della raccolta di dati e la loro comparazione con quelli riportati in letteratura per la definizione del metodo di Valutazione del Rischio.

Metodo proposto

Il metodo è focalizzato sul passo della valutazione del rischio che identifica e valuta i rischi associati con il rilascio e la coltivazione di GMP. Il metodo proposto è basato sulle procedure descritte da de Jesus et al. (2006), seguendo le linee guida delineate dall'EFSA (2010). La procedura disegnata da de Jesus et al. (2006), prova ad assegnare valori per parametri specifici; questi valori rendono possibile descrivere e comparare le misure del rischio con strumenti quantificabili. I pericoli potenziali sono organizzati, per essere analizzati, secondo la loro potenziale sorgente di esposizione, come inserti genetici, proteine espresse, caratteristiche della GMP, flusso genico, introduzione della tecnologia, e effetti indesiderati (imprevisti). Tutti le preoccupazioni correlate alle piante geneticamente modificate, o almeno quelli al momento più discussi, possono essere sistemati in questi gruppi (de Jesus et al. 2006).



Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation				Factors of Moderation				
		experimental data from local area or from literature	Damage	Exposure	Probability	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Significance	Index of Significance (highest value)
potential source: insert of transgene											
(a) unintended changes in plants characteristics	appearance of plant diseases										
	growth of plant species										
potential source: increase use of plants with the gene											
(b) persistence and invasiveness	fitness of GM plant										
	GMP (introgressed) wild relatives fitness										
potential source: gene flow											
(c) reducing the genetic diversity of wild population	assess the genetic assimilation										

Fig. 1. Fogli di lavoro per la Compilazione degli Indicatori di Rischio. Esempio di rischio potenziale di AREA 1 (vedi il testo per i dettagli).

La metodologia di valutazione del rischio è eseguita in due passaggi: (1) completare un foglio di lavoro preformattato per compilare gli indicatori di rischio, e (2) disegnare l'esito sulla Matrice di Valutazione. Prima, un foglio di lavoro è costruito per caratterizzare tutti i pericoli potenziali correlati alle GMP e assegnare un livello di rischio e la sua significatività nel contesto dell'attività da svilupparsi. La figura 1 mostra il foglio, su questo i pericoli potenziali sono raggruppati secondo la loro sorgente di esposizione, insieme con almeno un criterio di valutazione di ciascuno. Queste voci sono predeterminate sul foglio per tenere conto di un'accurata valutazione dei rischi collegati sulla base caso-per-caso. Nella tabella 1 ogni pericolo è codificato con una lettera che lo identifica nella Matrice di Valutazione. La letteratura è cruciale per supportare la caratterizzazione del rischio perché l'assegnazione dei valori deve corrispondere con le informazioni descritte dall'utente nel campo corrispondente. L'identificazione dei rischi potenziali è fatta secondo la fase "1" descritta

nelle linee guida dell'EFSA (vedi sopra). Un indice di rischio e un indice di significatività per ogni rischio potenziale è stato calcolato usando i dati dalla letteratura (Fig. 1). Questi comprendono i "Fattori di Moderazione", come danno, esposizione, precedente, entità e reversibilità. L'indice di rischio è calcolato come il prodotto del: "danno x esposizione x precedente"; il "danno" indica il livello o l'intensità dell'impatto che la GMP potrebbe avere sul sistema, se gli effetti avversi si realizzassero effettivamente; "l'esposizione" è correlata al livello al quale qualche componente è esposto al danno, e il "precedente" considera le precedenti manifestazioni di effetti negativi, come conseguenza dell'evento in questione (Tab. 1). Per ulteriore caratterizzazione, i rischi possono essere valutati in accordo al contesto dell'attività da sviluppare. Per esempio, l'Indice di Significatività considera il luogo dove la GMP sarà coltivata, l'identificazione e la valutazione di effetti negativi potenziali, e la valutazione della situazione ambientale corrente. Questo indice è calcolato come il prodotto di "estensione x reversibilità". I valori sono mostrati in tabella 2. In questa procedura, sono rispettati i passi 2 e 3 delle linee guida EFSA (vedi sopra).

Tabella 1. Valori da attribuire ai Fattori di Moderazione che comprendono l'Indice di Rischio.

Indice di rischio: danno*esposizione*precedente		
Fattori di moderazione	**Livelli**	**Valori**
Danno	trascurabile	0
	basso	1
	moderato	2
	alto	4
Esposizione	trascurabile	0
	basso	1
	moderato	2
	alto	4
Precedente	no	1
	si	2

Tabella 2. Valori da attribuire ai Fattori di Moderazione che comprendono l'Indice di Significatività.

Indice di Significatività: estensione*reversibilità		
Fattori di moderazione	**Livelli**	**Valori**
Estensione	Locale (contenuto dove la GMP è coltivata)	1
	Regionale (proprietà or distanza d'impollinazione)	2
	Diffuso (area influenzata indirettamente)	4
Reversibilità	Naturalmente reversibile (senza gestione)	1
	Reversibile con gestione semplice (per esempio, cambio di tecnologia)	2
	Reversibile con gestione complessa (costi alti ed uso di metodologie non convenzionali)	4
	Irreversibile	8

Gli indici sono stai combinati usando una matrice allo scopo di valutare il rischio per l'ambiente e le misure richieste per prevenire gli effetti negativi delle piante GM. La "Matrice di Valutazione" è costruita su due assi, dove l'asse "x" sta per le classi dell'Indice

di Rischio e l'asse "y" sta per la classe dell'Indice di Significatività. I risultati dall'Indice di Rischio e l'indice di Significatività sono segnati nella Matrice secondo la loro posizione (i punti sono tracciati usando lettere che rappresentano ciascun pericolo potenziale). Il livello di intervento raccomandato è così classificato:
Niente restrizioni – quando il pericolo potenziale non ha alcuna possibilità significativa di divenire un rischio.
Monitoraggio richiesto – quando il pericolo deve essere osservato per evitare effetti negativi.
Gestione richiesta – quando devono essere prese delle ulteriori misure per prevenire impatti.
Restrizioni richieste – quando l'attività può essere fatta sotto regole o misure restrittive e, inoltre, sono richieste frequenti osservazioni per evitare impatti potenziali.
Non raccomandato – quando i pericoli potenziali mostrano un alto livello di rischio e significatività. In questo caso le misure di biosicurezza possono essere inefficaci per prevenire o mitigare rischi di questa portata.

La "Matrice di Valutazione" è costruita secondo i passi 4 e 5 delle linee guida EFSA (2010) (Fig. 2).
Il passaggio seguente implica di compilare e analizzare i risultati dalle matrici e dai fogli di lavoro. Ogni pericolo potenziale segnato nella matrice richiede delle misure secondo il livello di mitigazione. Queste misure di biosicurezza devono considerare tutti i dati descritti nel foglio di lavoro, così come le specificità della GMP, l'attività sotto analisi, e la situazione ambientale (fase 6 delle linee guida dell'EFSA, 2010).

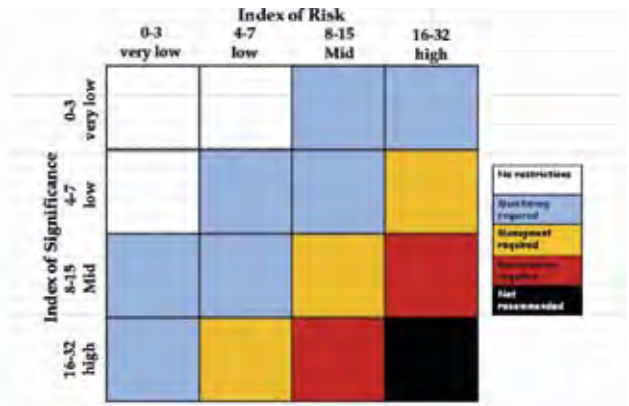


Fig. 2. La Matrice di Valutazione è il passaggio finale di questo strumento di Valutazione del Rischio. La Matrice di Valutazione dà una vista d'insieme dei rischi potenziali e stabilisce a quale livello deve essere portata la gestione del rischio. L'asse "x" rappresenta le classi dell'Indice di Rischio e l'asse "y" rappresenta le classi dell'Indice di Significatività.

Caso di studio: Bt-*Populus* spp.

Per capire meglio il metodo proponiamo un caso di studio sui possibili effetti nell'ambiente del pioppo tremulo con inserito il transgene di *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), tenendo conto

dei dati riportati in letteratura e dell'area studiata nel progetto DEMETRA.
I pioppi giocano un ruolo importante nello sviluppo economico del bosco (Hu et al. 2001), per questa ragione uno dei principali obiettivi dell'ingegneria genetica degli alberi è produrre piante che siano resistenti a vari tipi di infestazioni (Genissel et al. 2003, Pena et al. 2001). La trasformazione più comune per la resistenza alle infestazioni implica l'uso dei geni di *B. thuringiensis* (*Bt*), che rendono possibile alla pianta la produzione di tossine Cry letali per certi insetti target. *B. thuringiensis* è un batterio del suolo con più ceppi che produce una varietà di endotossine proteiche cristalline, ognuna delle quali colpisce specifici gruppi di insetti. Così, differenti ceppi di *Bt* sono tossici per i lepidotteri (farfalle e falene), coleotteri (maggiolini), e ditteri (zanzare, mosche nere, e moscerini dei funghi). In questi insetti, piccole quantità di tossina (parti per miliardo) danneggiano il sistema intestinale, e gli insetti tipicamente muoiono entro il giorno di una singola ingestione. Un ceppo di *Bt* è comunemente usato in agricoltura sia biologica che convenzionale come spray insetticida, e non è tossico per gli esseri umani o la maggior parte degli altri organismi, incluse le api da miele e le piante (Snow et al. 2005). I geni codificanti la tossina *Bt* sono stati isolati e inseriti nel genoma di numerose piante coltivate, tra le quali mais, cotone, e patata e anche in alberi forestali, come i pioppi. Però, ci sono considerevoli rischi per l'evoluzione della resistenza alle infestazioni in popolazioni naturali che devono essere valutate e minimizzate (Hialten et al. 2012). La tossina *Bt* provoca danni cellulari nell'intestino medio dell'insetto, sono state identificate più di 150 proteine Cry (Schnepf 1998) tra le quali, per esempio, le proteine Cry3Aa che colpiscono gli insetti coleotteri e le famiglie *cry1* e *cry2* efficaci contro specie di lepidotteri (Hussein 2005). Lavori precedenti riportano che nella prova in campo di piante transgeniche resistenti agli insetti, la densità delle loro larve, il tasso di danneggiamento fogliare e il numero di pupe per unità di superficie del suolo potrebbero essere buoni indici per valutare la resistenza agli insetti degli alberi transgenici. Pertanto, potrebbe essere vantaggioso per la produzione di legname, la tutela ambientale e il controllo degli insetti se questi alberi transgenici potessero essere utilizzati. Il pioppo transgenico potrebbe essere piantato tra altri pioppi, o anche tra altre specie per il controllo degli insetti come è stato fatto in prove sperimentali in campo (Hu et al. 2001). Sicuramente, gli effetti negativi di questi alberi transgenici dovrebbero essere studiati ulteriormente.

Esempio ipotetico (1)

I rischi potenziali caratterizzati nel nostro caso di studio sono stai posti in relazione a quattro aree di interesse e codificati da differenti lettere:

1) AREA 1: Persistenza ed invasività della pianta GM, o dei suoi parenti compatibili, incluso trasferimento genico da pianta a pianta (Fig. 3)
   (a) cambiamenti inattesi nelle caratteristiche delle piante
   (b) persistenza ed invasività
   (c) riduzione della diversità genetica della popolazione naturale

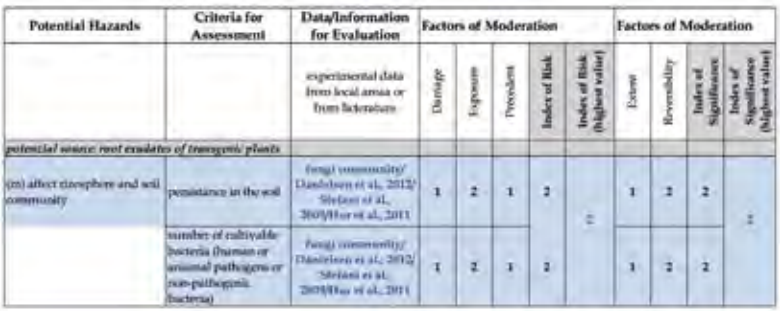
AREA 1

Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation				Factors of Moderation			
		experimental data from local area or from literature	Damage	Exposure	Prevalent	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Significance	Index of Significance (highest value)
potential source: insert of transgene											
(a) unintended changes in plant characteristics	occurrence of plant diseases	Hjältén et al., 2012	0	2	1	0	0	2	1	2	2
	growth of plant species	Hjältén et al., 2012	0	2	1	0		2	1	2	
potential source: increase use of plants with the genes											
(b) persistence and invasiveness	fitness of GM plant	Davis et al., 2006	1	2	1	2	2	2	2	4	4
	GMP (introgressed) wild relatives fitness										
potential source: gene flow											
(c) reducing the genetic diversity of wild population	assess the genetic assimilation	Ronald, 1992/Lexer et al., 2005 P3 (populus nP. canescens (XF111)P.deltoides (origin)	2	4	1	8	8	2	4	8	8
	wind direction and natural barriers	Ronald, 1992/Lexer et al., 2005 P3(populus nP. canescens (XF111)P.deltoides (origin)	2	4	1	8		2	4	8	
	rate and distance of outcrossing										
	pollen dispersal mediated by natural vectors (wind and animals)	Ronald, 1992/Lexer et al., 2005 P3(populus nP. canescens (XF111)P.deltoides (origin)	2	4	1	8		2	4	8	

Fig. 3. Foglio di lavoro AREA 1 per la Compilazione degli Indicatori di Rischio per il caso di studio: Bt-Populus.

2) AREA 2: Trasferimento genico da pianta a microrganismi (Fig. 4)
   (m) interessa la rizosfera e la comunità del suolo
3) AREA 3: Interazione della pianta GM con organismi target (TO) (Fig. 4)
   (n) processi ecologici che colpiscono la biodiversità degli organismi target
4) AREA 4: Interazione delle pianta GM con organismi non-target (NTO) (Fig. 4)
   (n2) processi ecologici che colpiscono la biodiversità degli organismi non-target.

AREA 2



Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation				Factors of Moderation			
		experimental data from local areas or from literature	Damage	Exposure	Prevalent	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Significance	Index of Significance (highest value)
potential source: root exudates of transgenic plants											
(m) affect rizosphere and soil community	persistance in the soil	fungi community/ Danielsen et al., 2012/ Stefani et al., 2010/Blum et al., 2011	1	2	1	2	2	1	2	2	2
	number of cultivable bacteria (human or animal pathogens or non-pathogens bacteria)	fungi community/ Danielsen et al., 2012/ Stefani et al., 2010/Blum et al., 2011	1	2	1	2		1	2	2	

AREA 3

Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation					Factors of Moderation			
		experimental data from local area or from scientific literature	Damage	Exposure	Prevalence	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Significance	Index of Significance (highest value)
potential scenario fed with high concentration of transgenic leaf protein											
(e)cological processes that affect biodiversity	survival and growth rates of TO	Lepidoptera (Yin et al., 2009; Yang et al., 2014; Concepcion Ql et al., 2007; Xu et al., 2013; Cao et al., 2009; Zhang et al., 2013	4	4	3	16	16	1	4	4	4
	mode of action of the active GM plant product towards the TO	Concepcion Hjaltenn et al., 2012	4	4	3	16		1	4	4	
	proportion of populations of the TO exposed to the GM plant in the receiving environment	Xu et al., 2013	4	4	3	16		1	4	4	

AREA 4

Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation					Factors of Moderation			
		experimental data from local area or from scientific literature	Damage	Exposure	Prevalence	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Significance	Index of Significance (highest value)
potential scenario fed with high concentration of transgenic leaf protein											
(e)Ecological processes that affect biodiversity	survival and growth rates of non target species	Lepidoptera; Homoptera; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2013	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fig. 4. Fogli di lavoro AREA 2, 3 e 4 per la Compilazione degli Indicatori di Rischio per il caso di studio: Bt-Populus.

I valori assegnati ai fattori di moderazione è stata basata sui dati di letteratura. Inoltre, si è osservato un evento di ibridazione nell'area di studio (rischio potenziale c) nell'AREA 1) tra due pioppi: P3 (*Populus x canescens*) X F1.1 (*Populus x euramericana*).
Questo evento è stato tenuto in conto perché potrebbe essere considerato una conseguenza del flusso genico e, nel caso di piante geneticamente modificate, l'incorporazione di transgeni potrebbe risultare in una maggiore invasività o perdita di biodiversità con i relativi taxa, a seconda della quantità di flusso genico di generazione in generazione e il(i) tratto(i) transgenico(i), come riportato anche da Snow et al. (2005).

Considerando la distribuzione delle "lettere" all'interno della Matrice di Valutazione (Fig. 5), potrebbero essere suggerite diverse gestioni del rischio.
La maggior parte dei pericoli potenziali analizzati non pone rischi significativi, quindi non richiede azioni aggiuntive.
Mentre, i pericoli potenziali codificati come "n" denotano l'effetto su organismi target e il rischio potenziale codificato come "c" segnala la possibile conseguenza del flusso genico, richiedendo alcune restrizioni per monitorare il rischio.

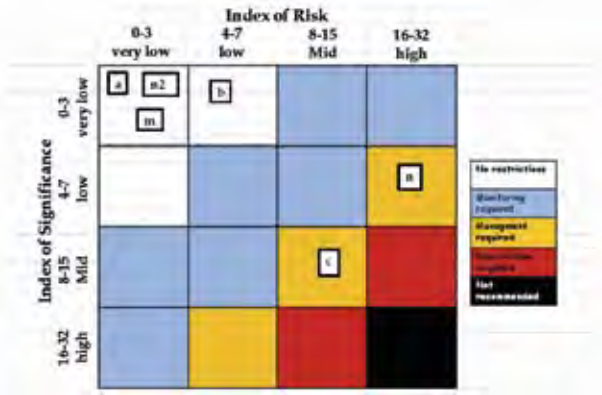


Fig. 5. Matrice di Valutazione del caso di studio: Bt-Populus. La Matrice di Valutazione dà una vista d'insieme dei rischi potenziali e stabilisce a quale livello di rischio deve essere tenuta la gestione. Le lettere denotano i rischi potenziali (vedi Fig. 3, 4).

Caso di studio: Bt-*Brassica napus*

Una serie di colture è stata trasformata con geni della delta-endotossina di *Bt* per produrre piante transgeniche con alti livelli di resistenza alle infestazioni da lepidotteri. I parassitoidi sono importanti nemici naturali delle larve di lepidotteri e gli effetti delle piante *Bt* su questi insetti non-target devono essere studiati per evitare l'inutile distruzione del controllo biologico (Shuler et al. 2004). In particolare, la colza (*Brassica napus*) transgenica è una delle prime colture geneticamente modificate.

Linee sperimentali transgeniche Bt-producenti di *B. napus* sono state generate per conferire un vantaggio selettivo in presenza di insetti defogliantori di Brassica, inclusa la tignola delle crocifere (*Plutella xylostella* L.), il "cabbage looper" e il "corn earworm" (Halfhill et al., 2002). Un numero di colture orticole transgeniche Bt-producenti di *Brassica* sono anche state sviluppate, usando il gene *cry1Ac* di *Bt*, disegnato per controllare la tignola delle crocifere, un parassita di importanza globale in una varietà di crocifere coltivate (Mason et al. 2003).

Brassica napus è una specie di particolare interesse, in quanto è ad incrocio parziale, forma popolazioni infestanti, e ha numerosi parentali naturali. Come una coltura a impollinazione incrociata, il suo tasso d'incrocio naturale è pari al 30%, e tende ad incrociarsi con altre specie di Brassica. Il rischio ecologico della colza transgenica è stato trattato dagli scienziati di tutto il mondo. Ci sono due vie per il flusso pollinico della colza transgenica, una potrebbe avere luogo tra la colza transgenica e altre specie selvatiche affini, e l'altra potrebbe aversi tra la colza transgenica e non transgenica. Perché il gene possa veramente passare verso il colza convenzionale, è necessario avere una sufficiente distanza d'isolamento tra la colza transgenica in coltivazione (Tang et al. 2005). Quindi la probabilità del flusso genico mediato dal polline è stata esaminata in numerosi studi. Segnalazioni di flusso genico in *B. napus* dimostrano generalmente che la quantità di fecondazione incrociata diminuisce all'aumentare della distanza dalla sorgente di polline. L'insorgenza e la frequenza del flusso genico intraspecifico mediato dal polline (tasso di

impollinazione incrociata) possono variare in base alla cultivar, al modello sperimentale, alla topografia locale e alle condizioni ambientali. Il tasso di incrocio da un campo all'altro dipende anche dalla dimensione e disposizione delle popolazioni donatrice e ricevente e dal rapporto tra le dimensioni delle parcelle donatrice e ricevente (Hüsken et al., 2007). La presenza del tratto *Bt* nelle popolazioni di crocifere selvatiche e la persistenza del tratto *Bt* nella *B. napus* infestante o selvatica potrebbe anche avere un potenziale impatto ecologico sulle popolazioni di insetti – aumentando, ad esempio, l'esposizione delle popolazioni di tignola delle crocifere alla tossina *Bt* e la successiva selezione di individui resistenti, o può addirittura risultare in numeri inferiori di tignola delle crocifere, grazie all'eliminazione di una fonte di cibo alternativa (Mason et al., 2003). Nonostante la difficoltà di confrontare diversi esperimenti con differenti livelli di incrocio, abbiamo effettuato un caso-studio di *Bt-B. napus*.

Esempio ipotetico (2).

Il pericolo potenziale che caratterizza il nostro caso di studio è stato correlato a tre aree d'interesse e codificato con lettere differenti:

1) AREA 1: Persistenza ed invasività della pianta GM, o dei suoi parentali compatibili, incluso trasferimento genico da pianta a pianta (Fig. 6)
   (a) cambiamenti inattesi nelle caratteristiche delle piante
   (b) persistenza ed invasività

AREA 1

Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation				Factors of Moderation			
		experimental data from local area or from literature	Damage	Exposure	Prevalence	Index of Risk	Index of Risk (Highest value)	Event	Reversibility	Index of Significance	Index of Significance (Highest value)
potential source: increase risk of plants with the genes											
(b) persistence and invasiveness	fitness of GM plant	Hüsken et al., 2007	1	2	1	2	2	2	2	4	4
	GMP (introgressed) wild relatives fitness										
potential source: gene flow											
(c) reducing the genetic diversity of wild population	assess the genetic assimilation	*B. napus* x *B. oleracea*	2	4	1	8	8	2	4	8	8
	wind direction and natural barriers	*B. napus* x *S. arvensis*	2	4	1	8		2	4	8	

Fig. 6. Foglio di lavoro AREA 1 per la Compilazione degli Indicatori di rischio per il caso di studio: Bt-B. napus.

2) AREA 3: Interazione della pianta GM con organismi target (TO) (Fig. 7)
   (n) processi ecologici che colpiscono la biodiversità degli organismi target
3) AREA 4: Interazione delle pianta GM con organismi non-target (NTO) (Fig. 7)
   (n2) processi ecologici che colpiscono la biodiversità degli organismi non-target.

AREA 3

Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation					Factors of Moderation			
		experimental data from local area or from scientific literature	Damage	Exposure	Prevalence	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Significa	Index of Significance (highest value)
potential source fed with high concentration of transgenic leaf protein											
p1)ecological processes that affect biodiversity	survival and growth rates of TO	Lecithin (Arnaiz et al., 2001)	4	4	1	16	16	1	4	4	4

AREA 4

Potential Hazards	Criteria for Assessment	Data/Information for Evaluation	Factors of Moderation					Factors of Moderation			
		experimental data from local area or from scientific literature	Damage	Exposure	Prevalence	Index of Risk	Index of Risk (highest value)	Extent	Reversibility	Index of Signifi	Index of Significance (highest value)
potential source fed with high concentration of transgenic leaf protein											
p2)ecological processes that affect biodiversity	survival and growth rates of non target species	Cotesta et al., 2003	1	1	1	1	1	1	2	2	2

Fig. 7. Fogli di lavoro 3 e 4, per la Compilazione degli Indicatori di Rischio per il caso di studio: Bt-B. napus.

I valori assegnati per i fattori di moderazione sono basati sui dati di letteratura. Inoltre, è stato osservato un evento di incrocio nell'area di studio (pericolo potenziale c) in AREA 1) tra *B. napus* e *Sinapis arvensis*. Come nel precedente caso di studio, considerando la distribuzione delle "lettere" all'interno della Matrice di Valutazione (Fig. 8), potrebbero essere suggerite diverse gestioni del rischio. In particolare, il pericolo potenziale codificato come "c" indica la possibile conseguenza del flusso genico, e richiede delle severe restrizioni.

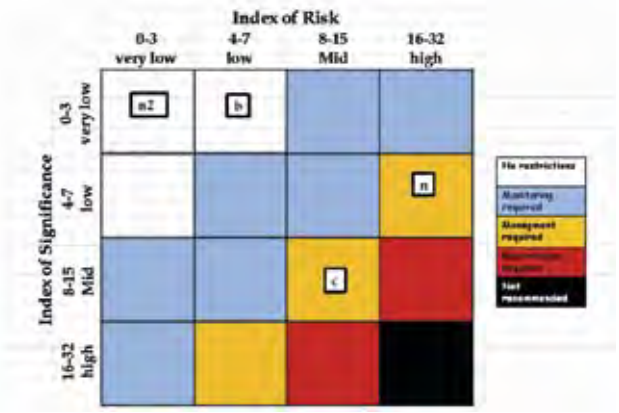


Fig. 8. Matrice di Valutazione del caso di studio: Bt-B. napus. La Matrice di Valutazione dà una vista d'insieme dei rischi potenziali e stabilisce a quale livello deve essere stabilita la gestione del rischio. Le lettere denotano i rischi potenziali (vedi Fig. 6 e 7).

Conclusioni

L'analisi del rischio deve essere intrapresa per predire il realizzarsi di impatti negativi sull'ambiente e sulla salute umana e/o animale. Queste valutazioni ci permettono di definire misure preventive per mitigare o evitare gli effetti avversi che potrebbero risultare da pericoli potenziali o identificati (de Jesus et al. 2006). La Matrice di valutazione per ogni coltura/gene può essere usata per effettuare una valutazione del rischio complessivo, in questo modo essa dovrebbe risultare in una guida qualitativa informativa e, se possibile, quantitativa, ai gestori del rischio. A ogni stadio dello sviluppo del modello, abbiamo tentato di rappresentare lo scenario del "caso peggiore", nel quale ogni ipotesi dovrebbe tendere alla sovrastima piuttosto che alla sottostima delle conseguenze. Questo nuovo strumento di valutazione del rischio sarà validato appena diversi utenti lo proveranno con differenti colture transgeniche o eseguano analisi comparative con altri metodi. Applicazioni di competenza e conoscenza ecologica è essenziale durante tutti gli stadi dello sviluppo di OGM che debbano essere rilasciati nell'ambiente, dalle primissima pianificazione al monitoraggio ed alla gestione post-rilascio. La base della conoscenza sulle piante GM, la stabilità dell'espressione e della performance fenotipica del transgene, e l'impatto potenziale delle piante GM sono in aumento (Nap et al., 2002). Il coinvolgimento attivo di esperti con una conoscenza della rilevanza ecologica e dei processi evolutivi può aiutare ad evitare problemi ambientali (Snow et al., 2005). Oltretutto, i rischi degli OGM sono certi o universali. Entrambi potrebbero variare spazialmente e temporalmente su una base caso-per-caso. Comparazioni tra pratiche transgeniche, convenzionali e di altra agricoltura, come la coltura biologica, chiariranno i relativi rischi e benefici dell'adozione di OGM. Misure che prevengano il trasferimento di geni che potrebbe influenzare negativamente sulle popolazioni naturali e che rallenta l'evoluzione di resistenza ai transgeni può ridurre alcuni dei possibili rischi ecologici.

Bibliografia

- Andow, D.A., and Zwahlen, C. 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. Ecology Letters. 9:196-214.
- Bergelson, J., Purrington, C.B. and. Wichmann G. 1998. Promiscuity in transgenic plants. Nature. 395:25-25.
- Bizily, S.P., C.L. Rugh, and R.B. Meagher. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. Nat Biotech. 18:213-217.
- Cannell, R.Q., and J.D. Hawes. 1994. Trends in tillage practices in relation to sustainable crop production with special reference to temperate climates. Soil and Tillage Research. 30:245-282.
- de Jesus K., Lanna A.C., Vieira F.D.,de Abreu A.L., and de Lima D.U. 2006. A Proposed Risk Assessment Method for Genetically Modified Plants. Journ al of the American Biological Safety Association 127-138.

- Deng, P., X. Zhou, P. Zhou, Z. Du, H. Hou, D. Yang, J. Tan, X. Wu, J. Zhang, Y. Yang, J. Liu, G. Liu, Y. Li, J. Liu, L. Yu, S. Fang, and X. Yang. 2008. Edible safety requirements and assessment standards for agricultural genetically modified organisms. Food and Chemical Toxicology. 46:1414-1436. Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities L, 27-36.
- Dutton, A., Romeis, J. and Bigler F. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cryl 1Ab as a case study. BioControl 48:611–636.
- EC, 2002. Council Decision of 3 October 2002 establishing guidance notes supplementing Annex VII to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council
- EFSA. 2010. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. EFSA Journal 8(11):1879
- Fitzpatrick, J., P. Keese, J. Romeis, A. Raybould, E. Romano, F. Grossi, A.C. Gianotto, J. Ferro, D. Lima, and E. Ullan. 2009. Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Crops: Workshop Report.
- Garcia-Alonso, M., E. Jacobs, A. Raybould, T.E. Nickson, P. Sowig, H. Willekens, P. Van Der Kouwe, R. Layton, F. Amijee, A.M. Fuentes, and F. Tencalla. 2006. A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. Environmental Biosafety Research. 5:57-65.
- Génissel, A., J.-C. Leplé, N. Millet, S. Augustin, L. Jouanin, and G. Pilate. 2003. High tolerance against Chrysomela tremulae of transgenic poplar plants expressing a synthetic cry3Aa gene from Bacillus thuringiensis ssp tenebrionis. Molecular Breeding. 11:103-110.
- Halfhill, M.D., R.J. Millwood, P.L. Raymer, and n. C. Neal Stewart Jr. 2002. Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, Brassica rapa. *Environmental Biosafety Research*. 1:19-28.
- Hill, R.A. and Sendashonga, C. 2003. General principles for risk assessment of living modified organisms: lessons from chemical risk assessment. Environ. Biosafety Res. 2, 81–88.
- Hjältén, J., E.P. Axelsson, T.G. Whitham, C.J. LeRoy, R. Julkunen-Tiitto, A. Wennström, and G. Pilate. 2012. Increased Resistance of Bt Aspens to Phratora vitellinae< (Coleoptera) Leads to Increased Plant Growth under Experimental Conditions. PLoS ONE. 7:e30640.
- Hokanson, S., J. Hancock, and R. Grumet. 1997. Direct comparison of pollen-mediated movement of native and engineered genes. Euphytica. 96:397-403.
- Hu, J.J., Tian, Y.C., Han,Y.F., Li, L. and Zhang, B.E. 2001. Field evaluation of insect resistant transgenic Populus nigra trees. Euphytica 121: 123–127.
- Hüsken, A., and A. Dietz-Pfeilstetter. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (Brassica napus L.). *Transgenic Research*. 16:557-

569.
- Hussein, H.M., O. Habuštová, and F. Sehnal. 2005. Beetle-specific Bacillus thuringiensis Cry3Aa toxin reduces larval growth and curbs reproduction in Spodoptera littoralis (Boisd.). Pest Management Science. 61:1186-1192.
- Johnson, K.L., A.F. Raybould, M.D. Hudson, and G.M. Poppy. 2007. How does scientific risk assessment of GM crops fit within the wider risk analysis? Trends in Plant Science. 12:1-5.
- Klinger, T., P. E. Arriola, and N. C. Ellstrand. 1992. Crop-weed hybridization in radish (Raphanus sativus): Effects of distance and population size. Am. J. Bot. 79:1431-1435.
- Lefol, E., V. Danielou, and H. Darmency. 1996. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. Field Crops Research. 45:153-161.
- Levin, S., and A. Kennedy. 1989. Operations improvement. Opportunities for group practices. Part II. Group practice journal. 38:39.
- Li, X., B. Liu, X. Wang, Z. Han, J. Cui, and J. Luo. 2012. Field trials to evaluate effects of continuously planted transgenic insect-resistant cottons on soil invertebrates. Journal of Environmental Monitoring. 14:1055-1063.
- Liu, I. and Agresti, A. 2005. The analysis of ordered categorical data: An overview and a survey of recent developments. Test 14, 1-30.
- Mason, P., L. Braun, S.I. Warwick, B. Zhu, and n. C. Neal Stewart Jr. 2003. Transgenic Bt-producing Brassica napus: Plutella xylostella selection pressure and fitness of weedy relatives. *Environmental Biosafety Research*. 2:263-276.
- Nap, J.-P., P.L.J. Metz, M. Escaler, and A.J. Conner. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. The Plant Journal. 33:1-18.
- Peña, L., and A. Séguin. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. Trends in Biotechnology. 19:500-506.
- Perry, J.N., Y. Devos, S. Arpaia, D. Bartsch, A. Gathmann, R.S. Hails, J. Kiss, K. Lheureux, B. Manachini, S. Mestdagh, G. Neemann, F. Ortego, J. Schiemann, and J.B. Sweet. 2010. A mathematical model of exposure of non-target Lepidoptera to Bt-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 277:1417-1425.
- Raybould, A. 2006. Problem formulation and hypothesis testing for environmental risk assessments of genetically modified crops. Environmental Biosafety Research. 5:119-125.
- Raybould, A. 2007. Ecological versus ecotoxicological methods for assessing the environmental risks of transgenic crops. Plant Sci. 173, 589–602.
- Romeis, J., D. Bartsch, F. Bigler, M.P. Candolfi, M.M.C. Gielkens, S.E. Hartley, R.L. Hellmich, J.E. Huesing, P.C. Jepson, R. Layton, H. Quemada, A. Raybould, R.I. Rose, J. Schiemann, M.K. Sears, A.M. Shelton, J. Sweet, Z. Vaituzis, and J.D. Wolt. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. Nat Biotech. 26:203-208.
- Romeis, J., N.C. Lawo, and A. Raybould. 2009. Making effective use of existing data

for case-by-case risk assessments of genetically engineered crops. Journal of Applied Entomology. 133:571-583.
- Schnepf, E. 1998. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775.
- Schuler, T.H., I. Denholm, L. Jouanin, S.J. Clark, A.J. Clark, and G.M. Poppy. 2001. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on nontarget insects. *Molecular Ecology*. 10:1845-1853.
- Schuler, T.H., I. Denholm, S.J. Clark, C.N. Stewart, and G.M. Poppy. 2004. Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid Cotesia plutellae (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Insect Physiology*. 50:435-443.
- Snow, A.A., D.A. Andow, P. Gepts, E.M. Hallerman, A. Power, J.M. Tiedje, and L.L. Wolfenbarger. 2005. Genetically engineered organisms and the environment: current status and raccommendations. Ecological Applications. 15:377-404.
- Suter Ii, G.W. 2000. Generic Assessment Endpoints Are Needed for Ecological Risk Assessment. Risk Analysis. 20:173-178.
- Tang, Guixiang, Wenjian Song, and Weijun Zhou. 2005. Gene flow and its ecological risks of transgenic oilseed rape *Brassica napu*. *Journal of applied ecology.* 16(12):2465-8.
- Wolfenbarger, L.L., and Phifer, R.P. 2000. The Ecological Risks and Benefits of Genetically Engineered Plants. Science. 290:2088-2093.
- Wolt, J., P. Keese, A. Raybould, J. Fitzpatrick, M. Burachik, A. Gray, S. Olin, J. Schiemann, M. Sears, and F. Wu. 2010. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. Transgenic Research. 19:425-436.
- Zhu, Y.L., E.A.H. Pilon-Smits, A.S. Tarun, S.U. Weber, L. Jouanin, and N. Terry. 1999. Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing γ-Glutamylcysteine Synthetase. Plant Physiology. 121:1169-1177.

Capitolo 5

Sistemi Informativi Geografici per la valutazione del rischio ambientale e il monitoraggio degli OGM

Francesca Bottalico[1], Francesca Donnarumma[2], Silvia Fiorentini[1], Donatella Paffetti[3], Cristina Vettori[2], Davide Travaglini[1]

[1]Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali, Università degli Studi di Firenze, Via San Bonaventura 13, 50145 Firenze (Italia), [2]Istituto di Genetica Vegetale, Sezione di Firenze, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), (Italia); [3]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze (Italia)

5.1 Introduzione

Un Sistema Informativo Geografico (Geographic Information System - GIS) è un software per la gestione e l'analisi di dati geografici rappresentativi dei fenomeni del mondo reale in termini di posizione spaziale (rispetto a un sistema di coordinate ufficiale) e di attributi descrittivi (informazioni). I dati spaziali e gli attributi associati possono essere sovrapposti l'uno sull'altro per effettuare rappresentazioni cartografiche e analisi territoriali, rendendo il GIS uno strumento efficace per il monitoraggio dell'ambiente, per la pianificazione del territorio e, più in generale, per assistere i processi decisionali (Aronoff 1989, Gomarasca 2009). Inoltre, il GIS è usato nelle valutazioni di impatto per localizzare i rischi ambientali (Schröder 2006).

Nell'Unione Europea (UE) la valutazione del rischio ambientale (Environmental Risk Assessment - ERA) degli organismi geneticamente modificati (OGM) è regolata dalla Direttiva UE 2001/18/CE (qui di seguito citata come Direttiva UE) sul rilascio deliberato nell'ambiente di OGM (EC 2001). Le linee guida per la valutazione degli effetti potenziali degli OGM sull'ambiente secondo la Direttiva UE sono state elaborate dal Comitato EFSA sugli Organismi Geneticamente Modificati (EFSA 2009, 2010). Una recensione del quadro normativo esistente e degli indirizzi sulla valutazione del rischio nella UE sono forniti da Aguilera et al. (2013).

L'obiettivo della ERA è identificare potenziali effetti avversi degli OGM sulla salute umana e tenere in considerazione gli effetti diretti, indiretti, immediati e differiti degli OGM sull'ambiente, così come gli effetti cumulativi a lungo termine. Secondo la Direttiva UE e le linee guida dell'EFSA, la ERA deve essere condotta caso per caso sulla base di un approccio step-by-step. A tal fine sono previsti i seguenti passaggi: i) identificazione del rischio

potenziale; ii) caratterizzazione del rischio potenziale; iii) valutazione dell'esposizione; iv) caratterizzazione del rischio effettivo; v) applicazione di strategie di gestione del rischio; vi) determinazione del rischio complessivo dell'OGM. Le linee guida dell'EFSA identificano sette aree specifiche d'interesse che devono essere esaminate secondo l'approccio step-by-step della ERA. Le aree specifiche di interesse sono le seguenti: i) persistenza ed invasività compreso il flusso genico da pianta a pianta; ii) trasferimento genico dalla pianta ai microrganismi; iii) interazioni delle piante GM (GMP) con organismi target (TO); iv) interazioni delle piante GM con organismi non-target (NTO); v) impatti con la coltivazione specifica, tecniche di gestione e raccolta; vi) effetti sui processi biogeochimici; vii) effetti sulla salute umana e sulla salute degli animali.

La Direttiva UE stabilisce anche che, una volta che un OGM è autorizzato per la commercializzazione, deve essere eseguito un monitoraggio ambientale su base annua. Il monitoraggio degli OGM deve essere capace di registrare gli effetti diretti, indiretti, immediati e a lungo termine così come quelli inattesi (Züghart et al. 2008).

Gli effetti indesiderati degli OGM sull'ambiente dovrebbero essere studiati tenendo in considerazione le interazioni biotiche e abiotiche e il loro impatto potenziale a diverse scale di analisi, per esempio dalla scala locale alla scala di paesaggio, specialmente quando viene considerata la possibilità di coltivare gli OGM su ampie porzioni di territorio. Infatti, gli studi a scala locale, che sono correntemente condotti in laboratorio, in serra e su singoli appezzamenti coltivati, potrebbero essere non adeguati per esaminare gli effetti degli OGM su larga scala (per esempio, effetti dovuti alla dispersione a lunga distanza di seme e polline). Pertanto, se nella ERA è essenziale stimare i rischi potenziali correlati agli OGM ad una scala di analisi locale, è anche importante sviluppare e applicare metodologie appropriate che permettano di estrapolare le informazioni disponibili a scala locale per eseguire l'analisi del rischio ambientale su ampie porzioni di territorio. In questa prospettiva la tecnologia GIS e i dati rilevati da sensori montanti su piattaforme aeree e satellitari possono dare un contributo concreto allo sviluppo di una valutazione del rischio multi-scala degli OGM (Breckling et al. 2011a, b, Reuter et al. 2011).

Le potenzialità e vantaggi offerti dai sistemi GIS per eseguire la valutazione del rischio ambientale da GMP su larga scala sono state considerate per la prima volta negli Stati Uniti, dove i GIS sono stati utilizzati per stimare il rischio generato dal flusso genico di piantagioni di alberi GM (DiFazio 2002). Nel caso delle GMP il flusso genico è un aspetto rilevante nella ERA, perché può determinare effetti negativi sull'ambiente; infatti, se una coltura transgenica è introdotta in regioni dove crescono spontaneamente specie affini si potrebbero verificare delle ibridazioni, e i transgeni potrebbero essere trasferiti dalla specie GM alle specie spontanee affini. I modelli del flusso genico generati con i sistemi GIS possono essere confrontati con altri dati ambientali e possono essere impiegati per simulare diversi scenari di coltivazione delle specie OGM allo scopo di identificare i parametri principali che controllano il trasporto genico (DiFazio et al. 2004).

Da allora altri studi sono stati condotti per valutare le potenzialità dei GIS per la ERA e per il monitoraggio degli OGM. Per esempio, il GIS è stato usato per mappare la distribuzione

delle colture OGM, per costruire modelli del flusso genico tra coltivazioni geneticamente modificate e coltivazioni convenzionali, e per mettere in relazione questi dati con altre informazioni sul clima, il suolo, la distribuzione di habitat e specie protette (Craig et al. 2008, Aheto et al. 2011, Breckling et al. 2011, Kleppin et al. 2011, Reuter et al. 2011, Bialozyt 2012). Inoltre, il GIS è stato usato per selezionare i siti per il monitoraggio ambientale, per esaminare i problemi di coesistenza tra le coltivazioni GM e i sistemi agricoli convenzionali e di tipo biologico, e per analizzare le problematiche connesse alla conservazione della natura, a esempio contribuendo alla determinazione delle distanze di isolamento come richiesto dalle misure di coesistenza (Le Bail et al. 2010, Aheto et al. 2011, Kleppin et al. 2011, Moser et al. 2012). In alcuni casi il monitoraggio degli OGM è stato anche affiancato da sistemi WebGIS (Kleppin et al. 2011). Questi sistemi permettono la consultazione e la visualizzazione di informazioni ambientali di base, delle reti di monitoraggio esistenti, la distribuzione delle coltivazioni OGM e delle aree protette. Gli strumenti GIS implementati possono anche servire alla valutazione di possibili impatti degli OGM in un contesto spazialmente delimitato. Oltretutto, un WebGIS potrebbe essere usato per gestire la coesistenza di OGM con aree altamente sensibili (come quelle della rete Natura 2000 dove la conservazione di habitat e specie di interesse comunitario è l'obiettivo principale) tramite il riconoscimento di possibili conflitti già nelle fasi di pianificazione delle coltivazioni OGM. Tuttavia, la potenzialità di utilizzo dei GIS per supportare la ERA secondo la Direttiva UE e le linee guida dell'EFSA è un aspetto che deve essere ulteriormente investigato.

5.2 Obiettivi

L'obiettivo di questo Capitolo è testare l'utilizzo della modellistica GIS per l'elaborazione della valutazione del rischio ambientale degli OGM dalla scala locale alla scala di paesaggio secondo la procedura definita dalle linee guida dell'EFSA (EFSA 2009, 2010).
In particolare sono stati considerati due tipi di geni (*cry*1ab e *cry*1ac) e due tipi di piante GM (pioppo e colza (*Brassica napus*)). La valutazione del rischio è stata eseguita rispetto a quattro aree specifiche di interesse indicate nei documenti dell'EFSA: i) persistenza ed invasività delle piante GM o delle specie spontanee affini; ii) trasferimento genico dalle piante GM ai microrganismi; iii) interazione tra le piante GM e gli organismi target (TO); iv) interazione tra le piante GM e gli organismi non-target (NTO).

5.3 Materiali e metodi

5.3.1 Preparazione dei dati

Lo studio è stato condotto nel Parco Regionale di Migliarino – San Rossore – Massaciuccoli (MSRM) (Capitolo 1).
Sono state acquisite carte topografiche e carte tematiche per caratterizzare l'ambiente dell'area di studio e la sua biodiversità a livello di paesaggio. Le carte topografiche in scala 1:10000 state acquisite presso la Regione Toscana. La carta dell'uso del suolo (D.R.E.AM. 2002) in scala 1:15000 è stata fornita dal Parco Regionale. La carta dei tipi forestali in

scala 1:10000 è stata ottenuta per riclassificazione delle carte della vegetazione prodotte da Tomei et al. (2003) e Sani et al. (2010). La carta della distribuzione dei tipi di colture agrarie nell'area di studio (per esempio, mais, girasole, piantagioni di pioppo) in scala 1:10000 è stata gentilmente concessa dal Parco Regionale. Inoltre è stata acquisita la copertura delle immagini aeree (anno 2007) in scala nominale 1:10000 (dimensione del pixel = 1 m) (Fig. 1). I dati acquisiti sono stati proiettati in un sistema di coordinate comune e sono stati registrati in un database geografico.

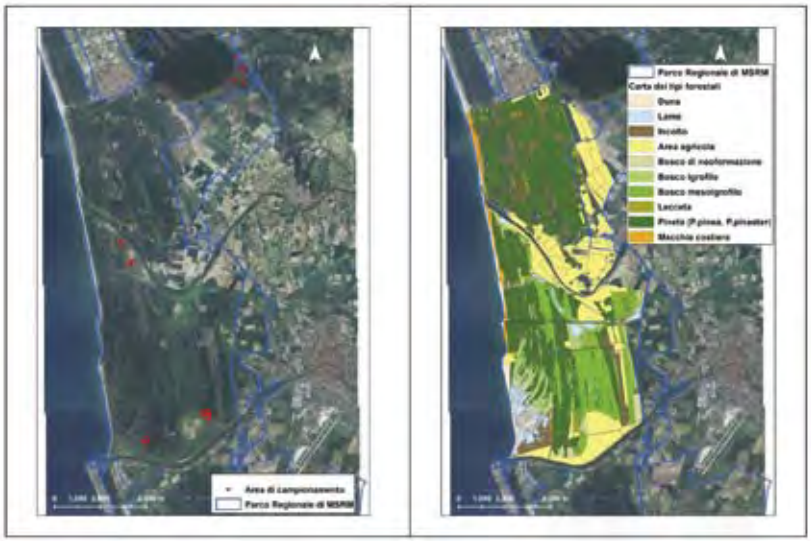


Fig. 1. Immagine aerea (a sinistra) e carta dei tipi forestali (a destra) dell'area di studio.

Per le piante GM considerate, pioppo e colza, i dati sulla dispersione pollinica veicolata dal vento sono stati ottenuti dalle trappole polliniche (Capitolo 2) e da informazioni estrapolate dalla letteratura.

I dati sulla direzione e la velocità del vento durante la stagione della fioritura sono stati determinati sulla base dei valori registrati dalle stazioni meteorologiche installate nell'area di studio (Capitolo 1). Per la colza è stata considerata anche la dispersione del polline operata dagli insetti impollinatori utilizzando i dati rilevati sulle coltivazioni di girasole (Capitolo 2).

Elementi naturali e artificiali (per esempio, boschi, piantagioni arboree, argini fluviali, autostrade) che possono agire come barriere per la dispersione del polline trasportato dal vento sono stati estratti dalle carte topografiche, dalla carta di uso del suolo e dalla carta dei tipi forestali.

La distribuzione di filari di alberi nel mosaico paesaggistico è stata ottenuta per fotointerpretazione delle immagini aeree.

I dati sulla biodiversità locale (piante, animali, e microrganismi del suolo) rilevati in un campione di aree a terra (Capitolo 3) sono stati utilizzati per selezionare i TO e i NTO dei

geni *cry*1ab e *cry*1ac. Le coordinate geografiche delle aree campione sono state registrate con un sistema di posizionamento globale (GPS). La distribuzione potenziale dei TO e dei NTO nell'area di studio è stata così ottenuta: sono stati utilizzati gli strumenti di analisi spaziale del GIS ("overlay" e "spatial joint") per confrontare la distribuzione delle aree di campionamento della biodiversità con la carta di uso del suolo e con la carta dei tipi forestali, allo scopo di ottenere una lista di habitat potenziali per i TO e i NTO; poi, gli habitat potenziali sono stati rivisti da esperti in botanica, entomologia e microbiologia; infine, la presenza dei TO e dei NTO rilevata nelle aree di campionamento è stata estesa all'intera area di studio sulla base della distribuzione dei rispettivi habitat potenziali.

5.3.2 Modellistica GIS

Il database geografico è stato utilizzato per sviluppare una modellistica GIS della ERA delle GMP. A tal fine è stata eseguita un'analisi spaziale "multi-criterio".
Sono stati considerati i transgeni *cry*1ab and *cry*1ac e due piante GM (pioppo e colza).
Per il pioppo sono stati investigati quattro scenari sulla base delle specifiche aree di interesse indicate nelle linee guida dell'EFSA: i) persistenza ed invasività della pianta GM e delle sue specie compatibili; ii) trasferimento genico dalla pianta GM ai microrganismi; iii) interazione tra le piante GM e i TO; iv) interazione tra le piante GM e i NTO. Per la colza sono stati considerati due scenari corrispondenti alle aree specifiche di interesse i) e iii).
Per ogni area di interesse EFSA, sono stati usati come riferimento i seguenti fattori definiti dal metodo di valutazione del rischio ambientale (Capitolo 4): rischio potenziale, criteri per la valutazione, indice di rischio (IoR), indice di significatività (IoS), valutazione del rischio (RA) e misure di gestione richieste per prevenire gli effetti avversi delle piante GM (Tabella 1 e Tabella 2).
Uno schema generale della modellistica GIS è riportato in Fig. 2.

Fig. 2. Schema generale dell'analisi GIS per la valutazione del rischio ambientale degli OGM.

5.3.2.1 Scenari del pioppo

La carta dei tipi di colture agrarie è stata utilizzata per estrarre la distribuzione delle piantagioni di pioppo nell'area di studio.

È stato poi ipotizzato che le piantagioni di pioppo fossero composte da alberi geneticamente modificati (*Populus x euramericana*) con i geni *cry*1ab o *cry*1ac.

Complessivamente sono state considerate 29 piantagioni di pioppo GM distribuite su una superficie di 291 ettari (Fig. 3a).

Nello scenario 1 del pioppo è stato esaminato il potenziale rischio di ibridazione ("breeding") tra coltivazioni GM e pioppi di origine naturale presenti negli ambienti circostanti (Area specifica 1 dell'EFSA), considerato che l'incrocio tra alberi GM e non GM può determinare una riduzione della diversità genetica nella popolazione spontanea di pioppo. Sono stati utilizzati come criteri per la valutazione del rischio la dispersione del polline e dei semi operata dal vento, la direzione del vento e la distribuzione delle barriere naturali. Nel Parco regionale MSRM i pioppi di origine naturale (*Populus alba* L. and *Populus x canescens* ((Aiton) Sm.)) crescono spontaneamente nei boschi misti di latifoglie a dominanza di specie igrofile e nelle zone umide del lago di Massaciuccoli (Capitolo 3). Per questo motivo la distribuzione potenziale di pioppi nell'area di studio è stata fatta coincidere con la distribuzione dei boschi igrofili e mesoigrofili e delle zone umide (Fig. 3a).

Il flusso genico dovuto al trasporto pollinico è stato simulato utilizzando i dati rilevati nelle trappole polliniche e le informazioni estratte dalla letteratura. I dati delle trappole polliniche indicano che una considerevole presenza di polline di pioppo può essere trovata fino a una distanza di 540 m dalle coltivazioni (Paragrafo 2.1).

Tuttavia, poiché non sono state posizionate trappole a una distanza superiore ai 540 m, si è deciso di considerare che, in assenza di barriere naturali, il polline di pioppo possa essere disperso dal vento fino ad una distanza di 2 km (Imbert and Lefèvre 2003, Slavov et al. 2010), come indicato dai dati genetici elaborati sulla base dei rilievi eseguiti nel lago di Massaciuccoli (Paragrafo 2.2). Per gli scenari del pioppo sono state considerate come barriere naturali le coperture boschive e i filari di alberi.

Le barriere di origine artificiale non sono state considerate. I dati delle stazioni meteorologiche indicano che nell'area di studio la direzione del vento può cambiare durante la stagione di fioritura. Per questo motivo la direzione principale del vento non è stata presa in considerazione sulla base di un principio di precauzione.

La dispersione pollinica è stata simulata generando un buffer di 2 km di ampiezza disegnato intorno ai confini delle piantagioni di pioppo GM, poi il buffer è stato ritagliato per tenere conto della presenza delle barriere naturali (Fig. 3b). Inoltre, si è considerato che il polline di pioppo possa penetrare la copertura boschiva fino ad una distanza di 50 m (Imbert and Lefèvre 2003, Slavov et al. 2010), come indicato dai dati genetici esaminati per la località Fortino Nuovo (Paragrafo 2.2).

La dispersione del polline è stata incrociata con la distribuzione potenziale dei pioppi di origine naturale per ottenere la carta delle aree dove potenzialmente si potrebbe avere l'ibridazione tra alberi GM e pioppi spontanei presenti nell'ambiente circostante. Inoltre,

per valutare la persistenza e l'invasività del pioppo GM nell'ecosistema e il rischio di ibridazione per la progenie, si è considerato che, in assenza di barriere, il pioppo possa disseminare fino a una distanza di 2 km, mentre, all'interno del bosco, si è considerato che la disseminazione del pioppo avvenga entro una distanza di 50 m. Infine, il rischio ambientale per lo scenario 1 del pioppo è stato valutato tenendo conto dello IoR, dello IoS e del RA stabiliti dal metodo di analisi ERA (Tabella 1).
Nello scenario 2 del pioppo sono stati considerati come potenziale fonte di esposizione del rischio gli essudati radicali rilasciati dai pioppi transgenici (Area specifica 2 dell'EFSA), i quali possono influenzare la rizosfera e le comunità di microorganismi presenti nel suolo. Per mappare questo tipo di rischio per l'ambiente, che è una conseguenza del rischio esaminato nello scenario 1 del pioppo, si è supposto che il trasferimento genico dai pioppi GM ai microrganismi del suolo (Fig. 3c) possa avvenire in corrispondenza delle aree a rischio di ibridazione (incluso il rischio per la progenie) tra i pioppi GM e i pioppi presenti spontaneamente negli ambienti circostanti. Come per lo scenario 1 del pioppo la valutazione del rischio ambientale è stata eseguita tenendo in considerazione lo IoR, lo IoS e il RA indicati dal metodo di analisi ERA (Tabella 1).
Nello scenario 3 del pioppo è stata investigata l'interazione tra pioppi GM e TO (Area specifica 3 dell'EFSA). In questo caso è stato considerato come rischio potenziale che le piante GM possono influenzare la biodiversità riducendo la sopravvivenza e il tasso di crescita dei TO che si cibano di materiale vegetale con alte concentrazioni di proteine fogliari transgeniche.
Il criterio utilizzato per valutare il rischio è la proporzione della popolazione dei TO esposta alle piante transgeniche. A tal fine è stata esaminata la distribuzione dei TO esposti ai pioppi GM.
Nel Parco Regionale MSRM le larve dei Ditteri Tabanidae e i lepidotteri Noctuidae sono state osservate durante le fasi di rilievo in campo (Paragrafo 3.2). Poiché le piantagioni di pioppo possono essere danneggiate da questi due insetti, le larve dei Tabanidae e i Noctuidae sono stati considerati come i TO.
La distribuzione dei TO nell'area di studio è stata mappata tenendo conto che i Ditteri Tabanidae e i lepidotteri Noctuidae si trovano nei boschi igrofili e mesoigrofili (Fig. 3d).
Quindi, la distribuzione dei TO esposti ai pioppi GM è stata ottenuta per mezzo di un incrocio tra la distribuzione dei TO e la distribuzione delle potenziali aree di ibridazione individuate nello scenario 1 del pioppo. Anche in questo caso per la valutazione del rischio ambientale sono stati presi in considerazione lo IoR, lo IoS e il RA definiti dal metodo di analisi ERA (Tabella 1).
Nello scenario 4 del pioppo è stata esaminata l'interazione dei pioppi GM con i NTO (Area specifica 4 dell'EFSA). In questo scenario è stato considerato come rischio potenziale che i pioppi GM influenzano la biodiversità riducendo la sopravvivenza e il tasso di crescita dei NTO. Il criterio utilizzato per valutare il rischio è la proporzione della popolazione dei NTO esposta alle piante transgeniche. In particolare, sono stati considerati come NTO i micro-artropodi nel suolo come Acarina, Collembola e Formicidae, perché queste specie

possono cibarsi di materiale vegetale (per esempio foglie) rilasciato dalle GMP, o con materiale vegetale coperto da granuli di polline GM trasportato dal vento. La distribuzione dei NTO nell'area di studio è stata ottenuta tenendo in considerazione che i micro-artropodi si trovano prevalentemente nei suoli forestali dei boschi misti di latifoglie (Fig. 3e). La distribuzione dei NTO esposti ai pioppi GM è stata ottenuta utilizzando il metodo descritto per lo scenario 3 del pioppo. Infine, il rischio ambientale per lo scenario 4 del pioppo è stato valutato usando lo IoR, lo IoS, e il RA stabilito dal metodo di analisi ERA (Tabella 1).

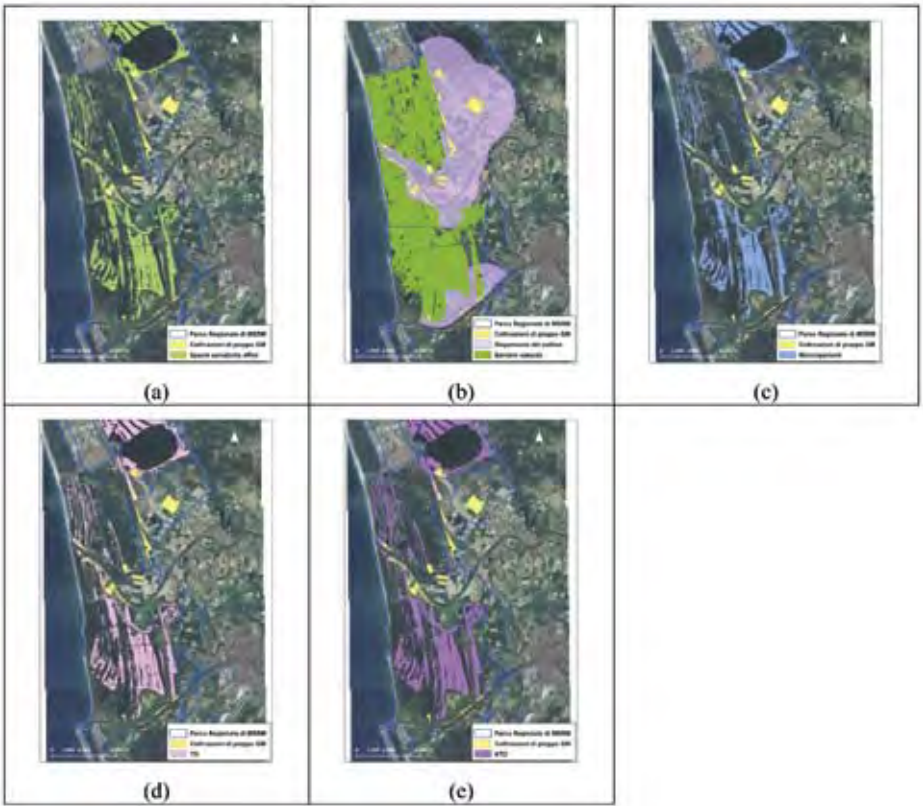


Fig. 3. Scenari per il pioppo: a) distribuzione delle coltivazioni di pioppo GM (Populus x euramericana) e dei pioppi di origine naturale (Populus alba L. and Populus x canescens ((Aiton) Sm.)); b) distribuzione della dispersione del polline e delle barriere naturali; c) distribuzione dei microrganismi; d) distribuzione degli organismi target (TO) (larve di Diptera Tabanidae e Lepidopteran Noctiduidae); e) distribuzione degli organismi non-target (NTO) (micro-artropodi nel suolo).

Tabella 1. Scenari del pioppo: aree di specifico interesse dell'EFSA, potenziali rischi, criteri di valutazione, informazioni per la valutazione, indice di rischio (IoR), indice di significatività (IoS), valutazione del rischio (RA) e misure necessarie per mitigare gli effetti negativi delle colture OGM (dal Capitolo 4, modificato per adattare la valutazione del rischio alla modellistica GIS).

Scenario del pioppo	Area di interesse EFSA	Potenziale fonte di esposizione e potenziale rischio	Criterio di valutazione	Dati/informazioni per la valutazione	IoR	IoS	RA
1	1	Flusso genico (c) Riduzione della diversità genetica nella popolazione selvatica	Barriere naturali Direzione del vento Dispersione del polline attraverso vettori naturali (vento) Dispersione del seme attraverso vettori naturali (vento) Distribuzione della popolazione selvatica delle specie affini	Carta topografica, carta forestale, dati telerilevati Stazioni meteorologiche Dati delle trappole polliniche e di letteratura (max 2 km senza barriere, max 50 m nel bosco) Dati di letteratura (max 2 km senza barriere, max 50 m nel bosco) Distribuzione potenziale da cartografie esistenti	8	8	Gestione necessaria
2	2	Essudati radicali delle piante transgeniche (m) Alterazione della rizosfera e delle comunità del suolo	Persistenza nel suolo Proporzione della popolazione dei microrganismi esposti alle piante transgeniche nell'ambiente ricevente	Dati di letteratura Distribuzione potenziale delle piante transgeniche dallo scenario 1 del pioppo Distribuzione potenziale dei microrganismi da cartografie esistenti	2	2	Nessuna restrizione
3	3	TO alimentati con alta concentrazione di proteina nella foglia transgenica (n) Processi ecologici che interessano la biodiversità	Proporzione della popolazione dei TO esposti alle piante transgeniche nell'ambiente ricevente	Distribuzione potenziale delle piante transgeniche dallo scenario 1 del pioppo Distribuzione potenziale dei TO da cartografie esistenti	16	4	Gestione necessaria
4	4	NTO alimentati con alta concentrazione di proteina nella foglia transgenica (n2) Processi ecologici che interessano la biodiversità	Proporzione della popolazione dei NTO esposti alle piante transgeniche nell'ambiente ricevente	Distribuzione potenziale delle piante transgeniche dallo scenario 1 del pioppo Distribuzione potenziale dei NTO da cartografie esistenti	1	2	Nessuna restrizione

5.3.2.2 Scenari per la colza

La carta dei tipi di colture agrarie è stata utilizzata per estrarre la distribuzione delle coltivazioni di colza nell'area di studio. Complessivamente sono risultate 13 coltivazioni distribuite su una superficie totale di 179,8 ettari. Poi è stato ipotizzato che le coltivazioni

di colza fossero geneticamente modificate con geni di tipo *cry*1ab o *cry*1ac (Fig. 4a). Nel caso della colza sono stati investigati due scenari (Tabella 2).
Nello scenario 1 è stata esaminata la persistenza e l'invasività della pianta GM e delle sue specie compatibili (Area specifica 1 dell'EFSA), considerando il flusso genico la potenziale fonte di rischio che potrebbe determinare la riduzione della diversità genetica della popolazione naturale delle specie affini. I criteri presi in considerazione per valutare il rischio sono stati la dispersione pollinica veicolata da vettori naturali (vento ed animali), e le barriere naturali ed artificiali che ostacolano la dispersione del polline. La direzione del vento non è stata considerata perché la direzione registrata dalle stazioni meteorologiche nel periodo di fioritura è risultata disforme. I dati sulla biodiversità locale rilevati nell'area di studio (Paragrafo 3.1) indicano che nel Parco di MSRM *Sinapis arvensis* (famiglia delle Brassicaceae) è la specie compatibile della colza. Nel Parco *S. arvensis* è stata osservata negli incolti e sui margini delle coltivazioni di colza. Per questo motivo la distribuzione potenziale di *S arvensis* è stata fatta coincidere con la distribuzione delle terre non coltivate ottenuta dalle carte della vegetazione e dei tipi di colture agrarie (Fig. 4a). Inoltre si è ipotizzata la presenza di *S. arvensis* sui margini delle coltivazioni di colza all'interno di una fascia ampia 5 m. Essendo la colza una specie ad impollinazione anemofila ed entomofila, la dispersione pollinica è stata simulata utilizzando i dati delle trappole polliniche e i dati sugli insetti impollinatori (*Apis mellifera*) registrati nell'area di studio (Paragrafo 2.1). I dati delle trappole polliniche rilevati nel 2011 sono stati utilizzati per costruire un modello predittivo del numero di granuli pollinici / cm² in funzione della distanza dall'area coltivata. Il modello ottenuto, riportato di seguito (r = 0,82), è stato poi utilizzato per stimare la massima distanza raggiunta dal polline della colza:

$$y = 247{,}4\, x^{-0{,}54}$$

dove, *y* è il numero di granuli pollinici / cm², e *x* è la distanza in metri dalla coltura di colza. Per quanto riguarda il trasporto pollinico degli insetti impollinatori è stata considerata una distanza massima di 1 km. Inoltre è stata considerata la presenza di barriere naturali e artificiali quali boschi (incluso le piantagioni arboree), filari alberati, argini fluviali e autostrade. Le barriere sono state incrociate con la dispersione pollinica veicolata da vettori naturali (Fig. 4b), e lo strato informativo risultante è stato incrociato con la distribuzione potenziale di *S. arvensis* per individuare le aree dove potenzialmente può avvenire l'ibridazione tra colza GM e il suo parentale naturale. Infine, la valutazione del rischio è stata effettuata utilizzando lo IoR, lo IoS e il RA stabiliti dal metodo di analisi ERA (Tabella 2).
Nello scenario 2 della colza è stata studiata l'interazione tra colza GM e i TO (Area specifica 3 dell'EFSA). Sulla base dei dati di biodiversità raccolti nelle aree di studio i Lepidoptera sono stati identificati come possibili TO della colza (Paragrafo 3.2). La distribuzione dei TO è stata fatta coincidere con la distribuzione dei suoi potenziali habitat: boschi igrofili e mesoigrofili, e seminativi I (Fig. 4c). La distribuzione dei TO è stata poi incrociata con la distribuzione delle aree di potenziale ibridazione tra colza GM e il suo parentale naturale.

Infine, la valutazione del rischio è stata effettuata utilizzando lo IoR, lo IoS e il RA stabiliti dal metodi di analisi ERA (Tabella 2).

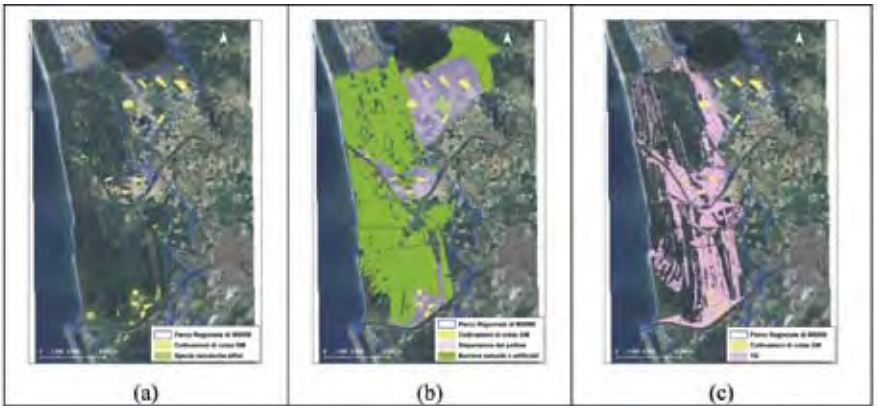


Fig. 4. Scenari della colza: a) distribuzione delle coltivazione di colza GM e della specie naturale affine (Sinapis arvensis); b) distribuzione della dispersione del polline e delle barriere naturali ed artificiali; c) distribuzione degli organismi target (TO) (Lepidoptera).

Tabella 2. Scenari della colza: aree di specifico interesse dell'EFSA, potenziali rischi, criteri di valutazione, informazioni per la valutazione, indice di rischio (IoR), indice di significatività (IoS), valutazione del rischio (RA) e misure necessarie per mitigare gli effetti negativi delle colture OGM (dal Capitolo 4, modificato per adattare la valutazione del rischio alla modellistica GIS).

Scenario della colza	Area di interesse EFSA	Potenziale fonte di esposizione e potenziale rischio	Criterio di valutazione	Dati/informazioni per la valutazione	IoR	IoS	RA
1	1	Flusso genico (c) Riduzione della diversità genetica nella popolazione selvatica	Barriere naturali Direzione del vento Dispersione del polline attraverso vettori naturali (vento e animali) Distribuzione della popolazione selvatica delle specie affini	Carta topografica, carta forestale, dati telerilevati Stazioni meteorologiche Dati delle trappole polliniche; dati degli insetti impollinatori registrati nell'area di studio Distribuzione potenziale da cartografie esistenti	8	8	Gestione necessaria
2	3	TO alimentati con alta concentrazione di proteine nella figlia transgenica (i) Processi ecologici che interessano la biodiversità	Proporzione della popolazione dei TO esposti alle piante transgeniche nell'ambiente ricevente	Distribuzione potenziale delle piante transgeniche dallo scenario 1 della colza Distribuzione potenziale dei TO da cartografie esistenti	16	4	Gestione necessaria

5.4 Risultati

5.4.1 ERA per gli scenari del pioppo

Nello scenario 1 del pioppo è stato studiato il rischio potenziale per l'ambiente dovuto all'ibridazione tra coltivazioni di pioppo GM e pioppi naturalmente presenti negli ambienti circostanti. Sulla basa delle informazioni riportate in Tabella 1, e utilizzando i dati geografici disponibili per l'area di studio, è risultato che il polline GM può influenzare habitat importanti che nel Parco ospitano popolazioni di pioppo di origine naturale.

La valutazione di questo rischio potenziale indica che sono necessarie delle misure di gestione per mitigare gli effetti indesiderati degli OGM.

Il risultato della ERA sviluppata in ambiente GIS indica che la superficie degli habitat del pioppo esposta al rischio di ibridazione è pari a 187,9 ettari.

Tale superficie si estende fino a 822,5 ettari quando si considera anche il rischio per la progenie, rappresentando il 23,5% della superficie totale degli habitat del pioppo (Tabella 3).

Negli habitat forestali il rischio si concentra sui margini della copertura boschiva perché le chiome degli alberi agiscono come barriere contro la dispersione del polline. Invece, nelle zone umide del lago di Massaciuccoli, il rischio è maggiore perché le barriere naturali sono scarsamente rappresentate (Fig. 5a).

Nello scenario 2 del pioppo è stato esaminato il rischio potenziale per i microrganismi del suolo causato degli essudati radicali rilasciati dai pioppi transgenici.

I risultati dell'analisi spaziale indicano che le aree esposte a questo rischio corrispondono alle aree esposte al rischio di ibridazione studiate nello scenario 1 del pioppo (Tabella 3). Tuttavia, applicando i criteri di valutazione del rischio stabiliti dal metodo di analisi ERA, sembra che questo problema non ponga rischi significativi nell'area di studio e pertanto non si richiedono azioni aggiuntive (Fig. 5b). Si segnala che l'analisi GIS è stata estesa all'area del lago di Massaciuccoli dove non stati eseguiti campionamenti sui microrganismi del suolo.

Nel caso dello scenario 3 sono state esaminate le interazioni tra le coltivazioni di pioppo GM e i TO (larve di Diptera Tabanidae e lepidopteran Noctuidae).

Il livello di mitigazione di questo potenziale rischio per l'ambiente richiede delle misure di gestione. Queste dovrebbero essere pianificate insieme alle misure richieste per mitigare il rischio di incrocio considerando che questi due rischi potenziali hanno la stessa distribuzione spaziale (Tabella 3 e Fig. 5c).

Nello scenario 4 del pioppo sono state considerate le interazioni delle coltivazioni di pioppo GM con i NTO (micro-artropodi del suolo).

La distribuzione spaziale delle aree potenzialmente a rischio e la loro superficie sono riportati rispettivamente in Fig. 5d e in Tabella 3. La valutazione di questo problema indica che nell'area di studio non è richiesta alcuna prescrizione per mitigare i potenziali effetti avversi delle coltivazioni di pioppo GM sui NTO.

Tabella 3. Scenari del pioppo: superficie esposta a rischio per ciascuna area EFSA. La superficie esposta a rischio (in %) per le specie selvatiche (scenario 1), i microrganismi (scenario 2), i TO (scenario 3) e i NTO (scenario 4) rispetto alla loro superficie potenziale di distribuzione è indicata tra parentesi.

Scenario del pioppo	Area di interesse EFSA	Superficie delle coltivazioni di pioppo GM	Superficie esposta a rischio
		Ha	Ha (%)
1	1	291	822,5 (23,5)
2	2	291	822,5 (23,5)
3	3	291	822,5 (23,5)
4	4	291	822,5 (23,5)

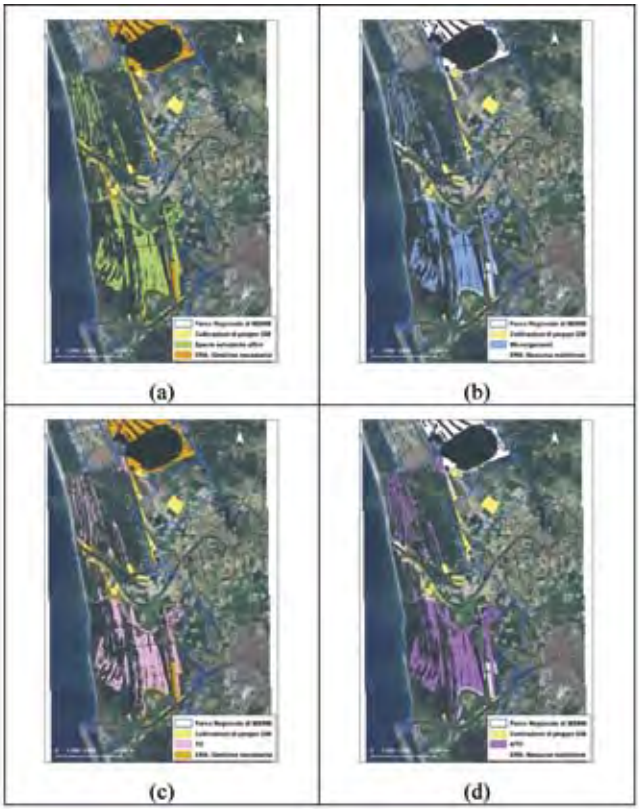


Fig. 5. ERA e misure necessarie per mitigare gli effetti delle coltivazioni transgeniche di pioppo (Populus x euramericana) nell'area di studio: a) rischio di breeding (incluso il rischio per la progenie) tra pioppi GM e le specie selvatiche affini (Populus alba L. and Populus x canescens ((Aiton) Sm.)); b) rischio per i micro-organismi presenti nel suolo; c) rischio per gli organismi target (TO) (larve di ditteri e lepidotteri Tabanidae Noctuidae), d) rischio per gli organismi non target (NTO) (micro-artropodi del suolo).

5.4.2 ERA per gli scenari della colza

Nel caso della colza sono stati studiati due scenari. Nello scenario 1 è stato esaminato il rischio potenziale che il flusso genico possa ridurre la diversità genetica della *S. arvensis* presente spontaneamente nel Parco. Sulla base dei criteri definiti dal metodo di analisi ERA, questo problema richiede delle misure di gestione per mitigare il rischio. La ERA

sviluppata in ambiente GIS indica che il polline GM può essere disperso da vettori naturali (vento e insetti) sulla maggior parte dei terreni incolti dove cresce la *S. arvensis* (Fig. 6a). In totale, la superficie esposta a rischio di incrocio è di 58,7 ettari, che corrispondono al 64,1% della superficie occupata da *S. arvensis* (Tabella 4). È importante osservare che la mancanza (o la scarsa presenza) di barriere naturali ed artificiali negli ecosistemi agrari presenti nell'area di studio espone le coltivazioni convenzionali e le piante spontanee affini a un alto rischio d'incrocio con le coltivazioni GM di colza.
Nello scenario 2 è stato analizzato il rischio potenziale dovuto all'interazione delle coltivazioni di colza GM con i TO (*Lepidoptera*). Il livello di mitigazione di questo problema determinato dal metodo di analisi ERA richiede delle azioni di gestione per mitigare il rischio. Nell'area di studio i *Lepidoptera* possono essere trovati in numerosi habitat e la loro distribuzione potenziale copre una superficie di circa 3.391 ettari. Il risultato fornito dall'analisi spaziale mostra che il rischio potenziale interessa il 33% dell'area di distribuzione potenziale dei TO (Tabella 4), comprendendo sia ecosistemi forestali che agrari (Fig. 6b).

Tabella 4. Scenari della colza: superficie esposta a rischio per ciascuna area EFSA. La superficie esposta a rischio (in %) per le specie selvatiche (scenario 1) e i TO (scenario 2) rispetto alla loro superficie potenziale di distribuzione è indicata tra parentesi.

Scenario della colza	Area di interesse EFSA	Superficie delle coltivazioni di piante GM	Superficie esposta a rischio
		ha	ha (%)
1	1	179,8	58,7 (64,1)
2	3	179,8	1120,9 (33,1)

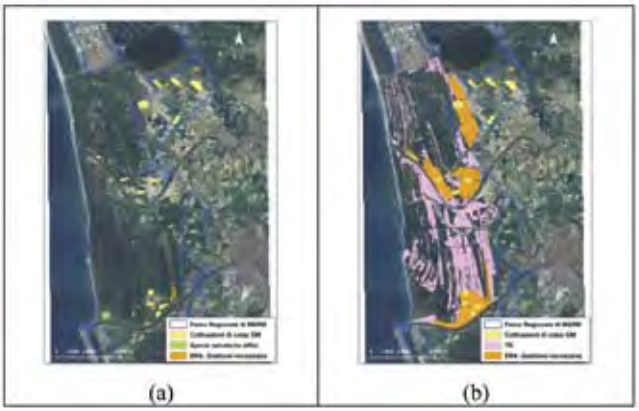


Fig. 6. ERA e misure di gestione richieste per prevenire gli effetti avversi delle colture di colza GM nell'area di studio: a) rischio di ibridazione tra colza GM e i suoi parenti naturali (Sinapis arvensis); b) rischio per gli organismi target (TO) (Lepidoptera).

5.5 Conclusioni

La valutazione del rischio è necessaria per prevenire gli effetti avversi degli OGM sulla salute umana ed animale e sull'ambiente ricevente. Nell'Unione Europea l'analisi di rischio ambientale degli OGM è regolata dalla Direttiva UE 2001/18/CE.

In questo capitolo sono state esplorate le potenzialità di applicazione della tecnologia GIS per supportare l'analisi del rischio ambientale delle piante GM per quattro aree specifiche d'interesse indicate nelle linee guida dell'EFSA. I rischi potenziali, i criteri per la valutazione, la valutazione del rischio e le misure necessarie per mitigare gli effetti indesiderati delle piante GM definiti dal metodo di stima del rischio ambientale (Capitolo 4) sono stati utilizzati come riferimento per lo sviluppo della modellistica GIS.

In particolare, il GIS è stato utilizzato per raccogliere le cartografie disponibili per l'area di studio e per caratterizzare l'ambiente del Parco in termini di uso del suolo, tipi di colture agrarie e habitat. Questi dati geografici sono stati utilizzati anche per estendere all'intera aera di studio i dati sulla biodiversità raccolti localmente in un campione di aree di rilevamento.

I dati rilevati a terra, le informazioni reperite dalla letteratura e le analisi spaziali sono stati di particolare importanza per simulare la dispersione del polline e dei semi allo scopo di predire i potenziali impatti negativi sulle specie affini e sugli organismi target e non target.

I risultati ottenuti indicano che le barriere naturali e artificiali sono importanti per mitigare il rischio dell'incrocio tra piante GM e le specie affini compatibili. A esempio, nell'area di studio il rischio di incrocio è risultato superiore negli ecosistemi agrari e nelle zone umide del lago di Massaciuccoli per la mancanza di barriere. Questo risultato dovrebbe essere tenuto in considerazione come possibile misura di mitigazione, suggerendo, per esempio, l'importanza di conservazione i filari alberati (per esempio i frangivento) e le siepi lungo i fiumi e nei paesaggi agrari.

I risultati attesi da una valutazione del rischio ambientale degli OGM sono una serie di informazioni di carattere qualitativo e possibilmente quantitativo utili per gli enti predisposti alla gestione del rischio.

Il metodo utilizzato per sviluppare la valutazione del rischio ambientale con tecnologia GIS è fondato su un'analisi spaziale multi-criterio.

I risultati ottenuti con il GIS (mappe e statistiche), per ogni rischio potenziale considerato per quattro delle aree specifiche d'interesse indicate nelle linee guida dell'EFSA, hanno prodotto informazioni qualitative e quantitative, indicando la distribuzione spaziale degli ambienti esposti al rischio, le misure richieste per mitigare il rischio e l'estensione delle superfici esposte al rischio. Queste informazioni sono utili anche ai fini del monitoraggio degli OGM, per esempio per individuare le zone dove eseguire il monitoraggio e per selezionare la posizione e la distribuzione dei siti di monitoraggio.

In conclusione, i risultati del progetto DEMETRA sono importanti per sviluppare ulteriormente le linee guida sulla valutazione del rischio ambientale ed il monitoraggio delle piante GM secondo la Direttiva UE 2001/18/CE sul rilascio deliberato nell'ambiente di organismi geneticamente modificati. In quest'ottica, i Sistemi Informativi Geografici rappresentano uno strumento utile per gli enti preposti alla valutazione e alla gestione del rischio.

Bibliografia

- Aronoff, S. 1989. Geographic information systems: a management perspective. WDL Publications.
- Aguilera, J., K.M. Nielsen, and J. Sweet. 2013. Risk assessment of GM trees in the EU: current regulatory framework and guidance. iForest (early view): e1-e5.
- Aheto, D.W., H. Reuter, and B. Breckling. 2011. A modeling assessment of geneflow in smallholder agriculture in West Africa. Environmental Sciences Europe 23: 9.
- Breckling, B., H. Reuter, U. Middelhoff, M. Glemnitz, A. Wurbs, G. Schmidt, W. Schröder, and W. Windhorst. 2011a. Risk indication of genetically modified organisms (GMO): Modelling environmental exposure and dispersal across different scales Oilseed rape in Northern Germany as an integrated case study. Ecological Indicators 11: 936-941.
- Breckling, B., H. Laue, and H. Pehlke. 2011b. Remote sensing as a data source to analyse regional implications of genetically modified plants in agriculture-Oilseed rape (Brassica napus) in Northern Germany. Ecological Indicators 11: 942–950.
- Bialozyt, R. 2012. Gene flow in poplar - experiments, analysis and modeling to prevent transgene outcrossing. iForest 5: 147-152.
- Craig, W., M. Tepfer, G. Degrassi, and D. Ripandelli. 2008. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. Euphytica 164: 853-880.
- DiFazio, S.P. 2002. Measuring and modeling gene flow from hybrid poplar plantations: implications for transgenic risk assessment. M.S. PhD thesis. Oregon State University, Corvallis, OR, USA.
- DiFazio, S.P., G.T. Slavov, J. Burczyk, S. Leonardi, and S.H. Strauss. 2004. Gene flow from tree plantations and implications for transgenic risk assessment. *In:* C. Walter and M. Carson (eds.). Plantation forest biotechnology for the 21st Century. Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum - 695 023, Kerala, India.
- D.R.E.AM. 2002. Carta dell'uso del suolo. Piano Generale di Gestione dei boschi della ex Tenuta Presidenziale di S. Rossore.
- EC. 2001. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Union, L106, pp. 1-39.
- EFSA. 2009. Scientific opinion on guidance for the risk assessment of genetically modified plants used for non-food or non-feed purposes. EFSA Journal 1164: 1-42.
- EFSA. 2010. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. EFSA Journal 8 (11): 1879.
- Gomarasca, M.A. 2009. Basics of Geomatics. Springer-Verlag.
- Imbert, E., and F. Lefèvre. 2003. Dispersal and gene flow of Populus nigra (Salicaceae) along a dynamic river system. Journal of Ecology 91: 447–456.
- Kleppin, L., G. Schmidt, and W. Schöder. 2011. Cultivation of GMO in Germany: support of monitoring and coexistence issues by WebGIS technology. Environmental

Sciences Europe 23, 4: 1-11.
- Le Bail, M., B. Lecroart, A. Gauffreteau, F. Angevin, and A. Messean. 2010. Effect of the structural variables of landscapes on the risks of spatial dissemination between GM and non-GM maize. European Journal of Agronomy 33: 12-23.
- Moser, D., M. Eckerstorfer, K. Pascher, F. Essl, and K.P. Zulka. 2013. Potential of genetically modified oilseed rape for biofuels in Austria: Land use patterns and coexistence constraints could decrease domestic feedstock production. Biomass and Bioenergy. In press.
- Reuter, H., G. Schmidt, W. Schröder, U. Middelhoff, H. Pehlke, and B. Breckling. 2011. Regional distribution of genetically modified organisms (GMOs) - Up-scaling the dispersal and persistence potential of herbicide resistant oilseed rape (Brassisca napus). Ecological Indicators 11: 989-999.
- Sani, A., F. Monacci, S. Trimarchi, and P.E. Tomei. 2010. La vegetazione della Tenuta di Migliarino. Edizioni ETS, Pisa.
- Schröder, W. 2006. GIS, geostatistics, metadata banking, and tree-based models for data analysis and mapping in environmental monitoring and epidemiology. International Journal of Medical Microbiology 296, S1: 23-36.
- Slavov, GT, S. Leonardi, W.T. Adams, S.H. Strauss, and S.P. DiFazio. 2010. Population substructure in continuous and fragmented stands of Populus trichocarpa. Heredity 105: 348-357.
- Tomei, P.E., A. Bertacchi, A. Sani, and M.O. Consiglio. 2003. Carta della vegetazione della tenuta di San Rossore. Scala 1:10000. Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema, Sezione di Botanica e Geobotanica Applicata, Università di Pisa. S.E.L,C.A., Firenze.
- Züghart, W., A. Benzler, F. Berhorn, U. Sukopp, and F. Graef. 2008. Determining indicators, methods and sites for monitoring potential adverse effects of genetically modified plants to the environment: the legal and conceptional framework for implementation. Euphytica 164: 845-852.

Capitolo 6

La presenza della Regione Toscana nel Progetto Demetra

Carla Lazzarotto

Regione Toscana, Via di Novoli, 26, 50127 Firenze (Italia)

1. Le principali novità sugli OGM in ambito comunitario

Nel luglio 2010 lo scenario normativo a livello comunitario ha subito una svolta importante con l'emanazione della Proposta della Commissione Europea del Regolamento di modifica della Direttiva 2001/18/CE. Tale proposta rappresentava un'opportunità molto importante per consentire agli Stati Membri di dichiararsi OGM free perchè prevedeva la possibilità per questi ultimi di limitare o vietare la coltivazione di OGM nel loro territorio, adducendo motivazioni diverse da quelle connesse con eventuali rischi ambientali e sanitari, quali ad esempio motivi socio-economici. Il 5 luglio 2011 il Parlamento Europeo ha adottato una risoluzione legislativa sulla proposta di regolamento, alla quale è seguita una lunga fase di discussione che purtroppo non ha portato ad un accordo e il provvedimento è attualmente in fase di stasi.

Alla luce di questa situazione, nel gennaio 2013 la CE ha deciso di congelare il processo d'autorizzazione della messa in coltura di nuove varietà GM nell'Unione Europea fino a quando non ci sarà una decisione del Consiglio UE sulla proposta avanzata dall'esecutivo per regolamentare la coltivazione di OGM in Europa e, comunque, fino alla fine del suo mandato nel 2014. Nell'UE in 14 anni sono state concesse solo due autorizzazioni: la patata Amflora, non destinata all'alimentazione e il mais Mon 810; la superficie impegnata in colture GM non supera i 100mila ettari in tutta Europa.

Ad oggi in Europa solo la Spagna, il Portogallo e alcuni paesi dell'Est, fra cui la Polonia, coltivano mais GM su larga scala. Ben diversa la situazione mondiale dove le coltivazioni superano i 160 milioni di ettari con gli Stati Uniti in prima linea.

Si apre dunque un nuovo capitolo della questione sugli OGM che ha visto in questi anni i diversi Stati Membri dirigersi in ordine sparso.

Otto paesi, infatti, (Francia, Lussemburgo, Austria, Germania, Polonia, Bulgaria, Grecia e Ungheria) hanno adottato la clausola di salvaguardia, prevista dall'art. 23 della Dir. 2001/18 sull'emissione deliberata nell'ambiente di OGM. La clausola di salvaguardia consente di vietare la coltivazione di OGM sul proprio territorio dietro la presentazione alla CE di un dossier contenente dati scientifici in grado di dimostrare la possibile esistenza di un danno sulla salute o sull'ambiente.

2. La situazione a livello nazionale

Le Regioni hanno da sempre espresso la loro assoluta contrarietà all'autorizzazione della coltivazione di OGM sul territorio nazionale e dal 2010 si sono dichiarate contrarie anche all'attivazione delle misure di coesistenza, chiedendo a più riprese al Governo, in linea con quanto hanno fatto altri paesi europei, l'attivazione della clausola di salvaguardia che attualmente è l'unico strumento percorribile per raggiungere l'obiettivo di mantenere il proprio territorio libero da coltivazioni transgeniche. Per molti anni il governo nazionale non ha dato seguito a questa richiesta e quindi la situazione italiana è rimasta in bilico perché in assenza sia delle misure di coesistenza, sia della clausola di salvaguardia. Nonostante questa situazione di incertezza a livello italiano, il D.lgs 212/01 "*Attuazione delle direttive 98/95/CE concernenti la commercializzazione dei prodotti sementieri, il catalogo comune delle varietà delle specie di piante agricole e relativi controlli*", ha permesso, fino ad oggi, di mantenere il territorio libero da OGM. All'art. 1, comma 2 il decreto prevede infatti che, al fine di garantire che le colture derivanti da prodotti sementieri di varietà GM non entrino in contatto con le colture derivanti da prodotti sementieri tradizionali e non arrechino danno biologico, la messa a coltura dei prodotti sementieri debba essere soggetta ad autorizzazione del Ministero dell'agricoltura di concerto con ambiente e sanità.
Lo scorso settembre 2012 tuttavia, è stata emanata una sentenza della Corte di Giustizia la quale sancisce che uno Stato Membro dell'Unione Europea non può bloccare la coltivazione di OGM in attesa dell'adozione da parte delle Regioni di norme che garantiscano la coesistenza tra le colture convenzionali e quelle GM e tantomeno può favorire processi interni di autorizzazione. Con questa sentenza viene dunque meno la moratoria de facto prevista dalla nostra normativa nazionale. Questo apre così due strade percorribili contemporaneamente: dare il via all'attivazione della clausola di salvaguardia e riprendere il lavoro sulle linee guida per la coesistenza (con l'obiettivo però di avere regole molto restrittive che di fatto impediscano la coltivazioni di OGM).

3. La Regione Toscana e gli OGM

Come la maggior parte delle altre regioni italiane anche la Regione Toscana si è da sempre dichiarata contraria alla presenza di OGM nel proprio territorio. La coltivazione di OGM in Toscana sarebbe in contraddizione con la strategia di sviluppo delle aziende agricole toscane e dell'intero sistema agroalimentare, basata sulla qualità, la tipicità, il legame con il territorio e la differenziazione rispetto ai prodotti "omologati" già presenti sul mercato.
Ne verrebbe colpita l'immagine della Regione, basata su risorse territoriali, culturali, artistiche che trovano un'armonia unica nel panorama internazionale e che quindi non ha bisogno di coltivazioni geneticamente modificate che non aggiungono nessuna opportunità agli agricoltori toscani, mentre striderebbero con la loro vocazione produttiva. Questa posizione è confortata dalla contrarietà della maggioranza dei cittadini e degli agricoltori alle coltivazioni GM e anche dall'evidente insostenibilità economica della

coesistenza fra coltivazioni GM e non GM, viste le caratteristiche socio-economiche delle aziende toscane e le caratteristiche geomorfologiche del territorio.
Proprio per questa posizione la Regione Toscana nel 2000 ha adottato la L.R. 53 "Disciplina regionale in materia di OGM", che recepisce i principi di precauzione e di salvaguardia della salute umana e dell'ambiente attraverso:

- il divieto di coltivazione e di produzione di specie con OGM;
- l'obbligo di indicare in etichetta l'eventuale presenza di OGM in tutti i prodotti alimentari messi in commercio in Toscana.

Sono previsti controlli sull'osservanza del divieto di coltivazione e di produzione di specie che contengono organismi geneticamente modificati. Il Servizio fitosanitario regionale attua i controlli sulle coltivazioni e sulle sementi all'importazione, mentre i controlli sugli alimenti vengono effettuati dalla Direzione Generale diritti di cittadinanza e coesione sociale, Servizio di prevenzione in sanità pubblica e veterinaria, tramite le Az. AA.SS.LL.
Molte altre regioni italiane (es. Lazio, Friuli Venezia Giulia), negli anni, hanno emanato provvedimenti regionali di divieto alla coltivazione sul proprio territorio di organismi geneticamente modificati. Questi provvedimenti regionali non sono mai stati notificati alla Commissione Europea, così come la L.R. 53/00. Per tale motivo e per le evoluzioni normative che si sono susseguite, la nostra Legge Regionale è oggi a rischio di legittimità.

4. La Regione Toscana e il progetto Life + DEMETRA

Il progetto Life + Demetra si colloca proprio per questa situazione di incertezza normativa. La Regione Toscana nel 2008 ha aderito al progetto Demetra al fine di rispondere alle esigenze di tutela del proprio territorio dai rischi delle potenziali coltivazioni transgeniche e per supportare il crescente dibattito con dati scientificamente provati.
L'indice sintetico di monitoraggio, il Quick Monitor Index (QMI), è capace di determinare in modo previsionale l'impatto potenziale delle colture transgeniche sulle componenti ecosistemiche e, quindi, di dare indicazioni preziose per definire le modalità operative di monitoraggio ambientale. Si tratta di una metodologia innovativa di valutazione del rischio ambientale delle colture transgeniche e come tale fornisce indicazioni utili alla Regione per poter tutelare il proprio territorio. L'indice di monitoraggio infatti, opportunamente modulato a seconda delle diverse realtà geografiche, potrà essere utilizzato come modello previsionale per supportare i decisori istituzionali che, con dati alla mano, potranno così motivare l'eventuale divieto della coltivazione di OGM in un particolare territorio.

Note

Note

Stampa: Tipografia Francesconi, Lucca