



Toetsing van afspraken over coëxistentie van genetisch gemodificeerde (GG) en niet-GG maïsproductie in Nederland

Resultaten van metingen aan de mate van vermenging door uitkruising onder praktijkomstandigheden in 2006 en 2007

Clemens van de Wiel, Oene Dolstra, Roel Groeneveld, Esther Kok, Ingrid Scholtens, Jac Thissen, Bert Lotz en René Smulders





Toetsing van afspraken over coëxistentie van genetisch gemodificeerde (GG) en niet-GG maïsproductie in Nederland

Resultaten van metingen aan de mate van vermenging door uitkruising onder praktijkomstandigheden in 2006 en 2007

Clemens van de Wiel*, Oene Dolstra*, Roel Groeneveld*, Esther Kok#, Ingrid Scholtens#, Jac Thissen*, Bert Lotz* en René Smulders*

* Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA WAGENINGEN, The Netherlands

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, Postbus 230, 6700 AE WAGENINGEN, The Netherlands

© 2008 Wageningen, Plant Research International B.V.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
Summary	2
Achtergrond	3
Opzet van het onderzoek	4
Uitvoering van het onderzoek	6
Locaties van de praktijkproeven	6
Verloop van de praktijktoets	9
Bemonstering	11
Analyse van MON810 gehalten in maïskorrels uit de receptorpercelen	14
Berekening van het gemiddelde vermengingspercentage door uitkruising per perceel	15
Isolatieafstand van 25 m	15
Isolatieafstand van 250 m	17
Toelichting en conclusies	21
Vermengingspercentages door uitkruising	21
Kwantificeringsmethode	21
Perceelsbijzonderheden	22
Conclusies en verdere activiteiten	23
Referenties	24
Appendix I.	2 pp.
Overzicht verloop van de coëxistentie praktijktoetsen in 2006	
Overzicht verloop van de coëxistentie praktijktoetsen in 2007	
Appendix II.	2 pp.
Afwijkend monster uit Uithuizen Zuid	

Samenvatting

In 2004 heeft de Commissie Coëxistentie Primaire Sector onder voorzitterschap van J. van Dijk advies uitgebracht om coëxistentie van GG en niet-GG teelten mogelijk te maken. Voor maïs gaf de Commissie Coëxistentie Primaire Sector aan dat aanvullend onderzoek wenselijk was. In 2005 is budget vrijgemaakt door het Ministerie van LNV voor aanvullend onderzoek aan maïs. Dit aanvullend onderzoek is in de vorm van een praktijktoets naar uitkruising in 2006 en 2007 uitgevoerd. In dit verslag wordt een overzicht van de resultaten van de praktijktoets over beide jaren gegeven.

Zowel in 2006 als 2007 hebben drie praktijkproeven plaatsgevonden om de door de Commissie Coëxistentie Primaire Sector voorgestelde isolatieafstand van 25 m tussen transgene en conventionele maïs teelten te toetsen. Hierbij werd gebruik gemaakt van telkens één transgeen donorperceel van 1 ha (100 x 100 m) met aan alle vier de kanten een niet-transgeen ontvangerperceel van 1 ha op 25 m afstand om uitkruising met transgeen pollen te testen. Voor het toetsen van de voorgestelde isolatieafstand van 250 m tussen transgene en bewust niet-transgene (biologische) maïs teelten werden evenzo in beide jaren op drie locaties in vier windrichtingen niet-transgene ontvangerpercelen, in dit geval van elk 0,25 ha (50 x 50 m), aangelegd op 250 m van een 1 ha groot perceel met transgene maïs. Voor het transgene donorperceel werd bij beide afstanden het maïsras DKc3421YG met het MON810 event gebruikt. Voor de ontvangerpercelen werd een vrijwel isogeen ("near-isogenic") maïsras gebruikt om optimale bloeisynchronisatie en daarmee uitkruising met de transgene donor te verkrijgen. In alle ontvangerpercelen werden op systematische wijze monsters bestaande uit kolven genomen; in de korrels werd vervolgens uitkruising met het gebruikte transgen uit het donorperceel gemeten m.b.v. een gevalideerde kwantitatieve test op DNA-niveau (real-time PCR).

Analyses gaven aan dat het vermengingspercentage met het transgen door uitkruising per perceel op 25 m in 2006 tussen de 0,009% en 0,296% (gemiddeld 0,084%) lag en tussen 0,002% en 0,318% (gemiddeld 0,080%) in 2007. Op 250 m was het vermengingspercentage tussen 0 en 0,040% (gemiddeld 0,005%) in 2006 en tussen 0 en 0,037% (gemiddeld 0,007%) in 2007. De behoorlijk verschillende weersomstandigheden tussen 2006 met een bijzonder warme en droge zomer en 2007 met een zomer die aan de natte kant was hebben in deze praktijktoets dus geen noemenswaardige verschillen opgeleverd in de uitkruisingsresultaten tussen beide jaren.

Summary

Results of a study on pollen-mediated gene flow in maize under agronomical conditions representative for The Netherlands in 2006 and 2007

In 2004, the Dutch Coexistence Committee, chaired by J. van Dijk, produced a report on measures allowing coexistence between GM and non-GM cultivation in The Netherlands. For maize, additional research was deemed necessary by the Coexistence Committee. In 2005, the Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality made available a budget for this research. The research project addresses possible admixture as a consequence of pollen-mediated gene flow (PMGF) under agronomical conditions representative for The Netherlands. In this report, results from the field trials in 2006 and 2007 are presented.

The field trials tested the two isolation distances suggested by the Coexistence Committee, namely, 25 m between GM and conventional maize cultivation, and 250 m between GM and deliberately non-GM (e.g. organic) maize cultivation, respectively. Each isolation distance was tested at three different locations across The Netherlands in both years. For testing PMGF with the 25 m isolation distance, a GM source field of 100x100 m (1 ha) was surrounded at all four sides by equally sized non-GM receptor fields at a distance of 25 m. For testing PMGF with the 250 m isolation distance, a 1 ha GM source field was surrounded by 50x50 m (0.25) ha receptor fields in four different directions at 250 m. For the GM source field, the maize variety DKc3421YG containing the MON810 event was used with both distances. A maize cultivar near-isogenic to the GM cultivar was grown in the receptor fields to obtain good flowering synchronicity between GM and non-GM maize and thus optimal conditions for PMGF. All receptor fields were systematically sampled taking ears. Levels of transgene admixture in the grains were measured at the DNA level using a validated real-time PCR quantification method for the MON810 event.

Analyses showed the following levels of grain admixture as a consequence of PMGF, averaged across twelve fields for each isolation distance tested: at 25 m 0.084% (individual field averages ranged between 0.009% and 0.296%) in 2006 and 0.080% (0.002% to 0.318%) in 2007, resp., and at 250 m 0.005% (individual field averages ranged between 0 and 0.040%) in 2006 and 0.007% (0 to 0.037%) in 2007, resp. Although weather conditions were quite different between 2006 and 2007 (a hot and dry summer in 2006 vs. a relatively wet one in 2007), outcrossing rates did not differ significantly between years.

Achtergrond

In 2004 heeft de Commissie Coëxistentie Primaire Sector, dat alle van belang zijnde partijen in de primaire sector omvatte en dat onder voorzitterschap stond van de heer J. van Dijk, advies uitgebracht om coëxistentie van GG en niet-GG teelten voor drie gewassen, te weten aardappel, suikerbiet en maïs, mogelijk te maken (Rapport Commissie Coëxistentie Primaire Sector, te downloaden van website Hoofdproductschap Akkerbouw: <http://www.hpa.nl/> onder Actueel – Publicaties). Bij het advies werd gebruik gemaakt van een bijgevoegd overzichtsrapport over de stand van zaken in het wetenschappelijke onderzoek naar uitkruising door Van de Wiel & Lotz (2004, als review gepubliceerd door Van de Wiel & Lotz, 2006). Voor maïs gaf het CoëxistentieOverleg aan dat aanvullend onderzoek wenselijk was. In 2005 zijn de adviezen bekrachtigd door de minister van LNV na overleg met de Tweede Kamer en is er budget vrijgemaakt voor het gewenste aanvullend onderzoek aan maïs. Dit aanvullend onderzoek is in de vorm van een tweejarige praktijktoets aan uitkruising in 2006 gestart.

In dit verslag wordt een overzicht van de resultaten van de praktijktoets in 2006 en 2007 gegeven. De resultaten zullen nog verder geanalyseerd worden met modellen.

Opzet van het onderzoek

Het onderzoek aan maïs is opgezet in samenspraak met de opdrachtgever, LNV, VROM en het in de Stuurgroep Coëxistentie Afspraken (SCA) overgegangene Commissie Coëxistentie Primaire Sector. Bij de opzet van het onderzoek speelden de volgende overwegingen een rol:

- Het ondervangen van kennisleemten: internationaal zijn weinig proeven gedaan met “lege” isolatieafstanden tussen donor- en receptorpercelen van een omvang die representatief is voor de landbouw in Nederland. Met “lege” isolatieafstanden wordt bedoeld dat er geen hoog gewas staat dat als afvanger van stuifmeel kan fungeren, of in het geval van maïs zelf door eigen stuifmeelproductie binnenkomend stuifmeel vanuit een transgeen donorperceel nog extra belemmert door concurrentie om bestuiving in het ontvangerperceel.
- De wens om specifiek de door de Commissie Coëxistentie Primaire Sector voorgestelde afstanden van 25 en 250 m voor resp. conventionele en bewust GG-vrije teelt onder voor Nederland representatieve condities te testen.

Dit is vertaald in praktijktoetsen op zes locaties in 2006 en 2007. In beide jaren werden op drie locaties proeven gedaan met een afstand van 25 m tussen een centraal gelegen GG donorperceel van 1 ha en receptorpercelen van dezelfde omvang in vier windrichtingen, en op drie andere locaties werden proeven gedaan met een afstand van 250 m tussen een centraal gelegen GG donorperceel van 1 ha en vier receptorpercelen van een kwart ha in vier windrichtingen. In de 250 m proeven is daarmee gekozen voor een opzet die een compromis vormt tussen zoveel mogelijk de realiteit benaderen en een zo groot mogelijke kans op uitkruising te genereren (“worst case”). De kleinere receptorpercelen benaderen zoveel mogelijk een “worst case” situatie voor bijv. kleinschalige suikermaïsteelt. Kleinere percelen hebben namelijk een grotere kans op uitkruising, doordat ze minder stuifmeel produceren dat om bestuiving en bevruchting concurreert met inkomend pollen van het donorperceel. Nadeel van de toepassing van slechts vier receptorpercelen is dat niet alle mogelijke windrichtingen waar stuifmeel van het donorperceel langs zou kunnen komen, “afgedekt” worden. Als alternatief een gesloten ring van maïs om het donorperceel zetten zou echter weinig representatief voor de agrarische praktijk zijn en verleent door de grotere massa juist weer meer competitief voordeel aan de receptormaïs t.o.v. het donorperceel vanwege de grotere stuifmeelproductie. Het centrale doel was zo goed mogelijk de gemiddelde vermenging door uitkruising in elk van de receptorpercelen in zijn geheel te bepalen, met zo gedetailleerd mogelijke informatie over de verdeling van vermenging binnen percelen om via modellering ook schattingen voor grotere of kleinere percelen mogelijk te maken.

Er is gekozen voor het meten van uitkruising m.b.v. een transgen als merker. Daarvoor is gebruik gemaakt van het maïsras DKc3421YG met het MON810 event dat codeert voor een Bt toxine dat insectenresistentie verschaft. Deze benadering heeft de volgende voordelen:

- In principe is een opzet met een transgeen donorras het meest representatief voor een praktijksituatie met GG teelt.
- De kwantitatieve detectie van uitkruising kan uitgevoerd worden met een op Europese schaal gevalideerde methode op DNA niveau, die beschikbaar is bij RIKILT. Dit is de methode die in de toekomstige coëxistentiepraktijk toegepast zal worden. Resultaten

ervan betreffen relatieve gehalten van het transgen ten opzichte van het totale genomische DNA, gecalibreerd aan de hand van het Europese MON810-referentiemateriaal, en die verhouding is niet universeel vergelijkbaar met een percentage uitgekruiste korrels zoals dat bepaald wordt aan de hand van bijv. kleurmerkers. Daarom zal bij de resultaten van deze studie gesproken worden van vermengingspercentages en niet van uitkruisingspercentages, aangezien met uitkruisingspercentages doorgaans het percentage zaden in een monster dat een product van uitkruising is, aangeduid wordt. Een kwantitatieve methode op DNA niveau is ook de enige realistische mogelijkheid om snijmaïs te testen. In snijmaïs vindt immers verdunning plaats van het enige onderdeel dat het product van uitkruising met een transgen kan zijn, d.w.z. de korrel, met de niet-transgene rest van de plant. Het uiteindelijke resulterende gehalte aan transgen t.o.v. het totale product valt alleen op DNA niveau goed te kwantificeren. Daarvoor is echter nog geen uitontwikkelde en op EU-niveau gevalideerde methode voorhanden. Om die reden heeft deze studie zich beperkt tot de GG kwantificering in de korrel. Aan kwantificering in snijmaïs vindt nog verder onderzoek plaats, hier en ook elders in Europa.

- Door het gebruik van een vrijwel isogeen ("near-isogenic") ras zonder transgen (DKc3420) als receptor is een optimale bloeisynchronisatie met de transgene donor te verwachten, waarmee praktisch gezien een situatie met een hoogst mogelijke mate van uitkruising het best benaderd kan worden.

Na een toetsing aan de mening van externe wetenschappers is de gekozen opzet aanvaard door het SCA, met uitzondering van Biologica, die zich als ketenorganisatie voor Biologische landbouw en voeding principiële niet wil verbinden aan toetsen met transgene planten.

Uitvoering van het onderzoek

Locaties van de praktijkproeven

In beide jaren zijn op zes locaties (website VROM: <http://www.vrom.nl/ggoregister>) proeven neergelegd, alle met een centraal gelegen perceel GG maïs van 1 ha. Locaties werden zo geselecteerd dat er zich geen biologisch bedrijf (volgens SKAL-keurmerk) binnen 2 km van het transgene perceel zou bevinden. Verder werd er bij de proeven met 250 m isolatieafstand rekening mee gehouden dat er geen andere maïs teelt binnen 250 m van de ontvangerpercelen zou zijn om de mogelijkheid van competitie tussen het pollen van het transgene donorperceel en van buiten de proef komend pollen zoveel mogelijk uit te sluiten. Daarmee werd wederom een “worst case” scenario zoveel mogelijk benaderd. Bij de proeven met 25 m isolatieafstand is het te verwachten effect van pollencompetitie van buiten de proef geringer, zodat daar volstaan is met het aanhouden van een afstand van 250 m tussen maïs teelt van derden en het centraal gelegen transgene donorperceel. In dit laatste geval was dus het voldoen aan de strengste adviezen uit de coëxistentieafspraken het doorslaggevend criterium bij de keuze van de afstand tot overige maïs teelten. Op één locatie (de 25 m proef van Eerste Exloërmond in 2006) bleek in een laat stadium dat er op 170 m van het transgene donorperceel een perceel met maïs ingezaaid was. Dit illustreert een praktisch probleem met het realiseren van dit type proeven in Nederland. Er is namelijk veel en veelal versnipperde teelt van maïs. Daarbij blijkt het soms ook lastig om informatie met betrekking tot eigendoms- en pachtrechten snel te achterhalen. Ten aanzien van de teelt van maïs kunnen telers nog tot behoorlijk ver in het jaar het bouwplan wijzigen. Dit bemoeilijkt het traceren van alle mogelijke burens en het onderling afstemmen van plannen. In dit geval betrof het een langwerpige perceel met de smalle kant naar onze praktijkproef toegekeerd en een ras dat 8-10 dagen eerder bloeide dan ons transgeen ras. Omdat ons eigen niet-transgene receptorperceel er ook nog tussenin lag, werd geconcludeerd dat geen relevante uitkruising met transgeen stuifmeel kan hebben plaatsgevonden. Hierover is gecommuniceerd met de betreffende teler.

In beide jaren werden op drie locaties vier receptorpercelen van elk 1 ha in vier windrichtingen op 25 m afstand van een centraal gelegen transgeen donorperceel gelegd; op de drie overige plaatsen evenzo vier receptorpercelen maar dan van elk een kwart ha, in het laatste geval om een “worst case” situatie te creëren die vergelijkbaar is met kleinschalige suikermaïs teelt. Beide varianten zijn schematisch weergegeven in Fig. 1. Afhankelijk van lokale perceelsconfiguraties konden hierop kleine afwijkingen voorkomen. De proeven waren als volgt over locaties verdeeld:

In 2006:

- Eerste Exloërmond (gemeente Borger-Odoorn), Drenthe: 25 m
- Tweede Exloërmond (gemeente Borger-Odoorn), Drenthe: 250 m
- Lelystad (gemeente Lelystad), Flevoland: 250 m
- Lage Zwaluwe (gemeente Drimmelen), west Noord Brabant: 25 m
- Blitterswijk (gemeente Meerlo-Wanssum), noord Limburg: 25 m
- Wijnandsrade (gemeente Nuth): zuid Limburg: 250 m

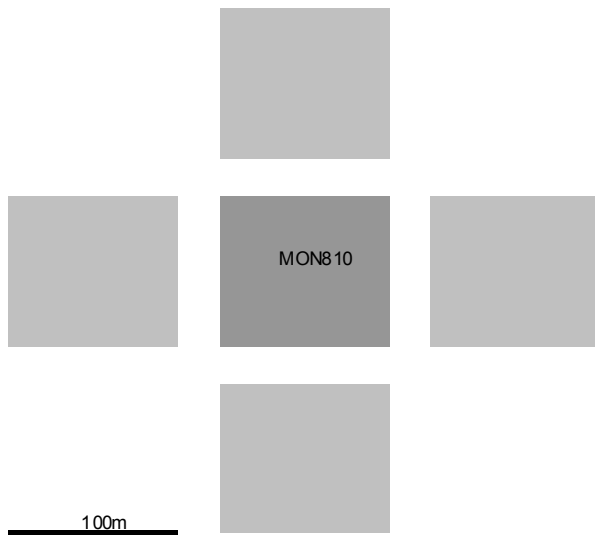
In 2007:

- Uithuizen (gemeente Eemshaven): noord Groningen: 250 m
- Eerste Exloërmond (gemeente Borger-Odoorn), Drenthe: 250 m
- Tweede Exloërmond (gemeente Borger-Odoorn), Drenthe: 25 m
- Lelystad (gemeente Lelystad), Flevoland: 250 m
- Schaarsbergen (gemeente Arnhem), Gelderland: 25 m
- Tholen (gemeente Tholen), Zeeland: 25 m

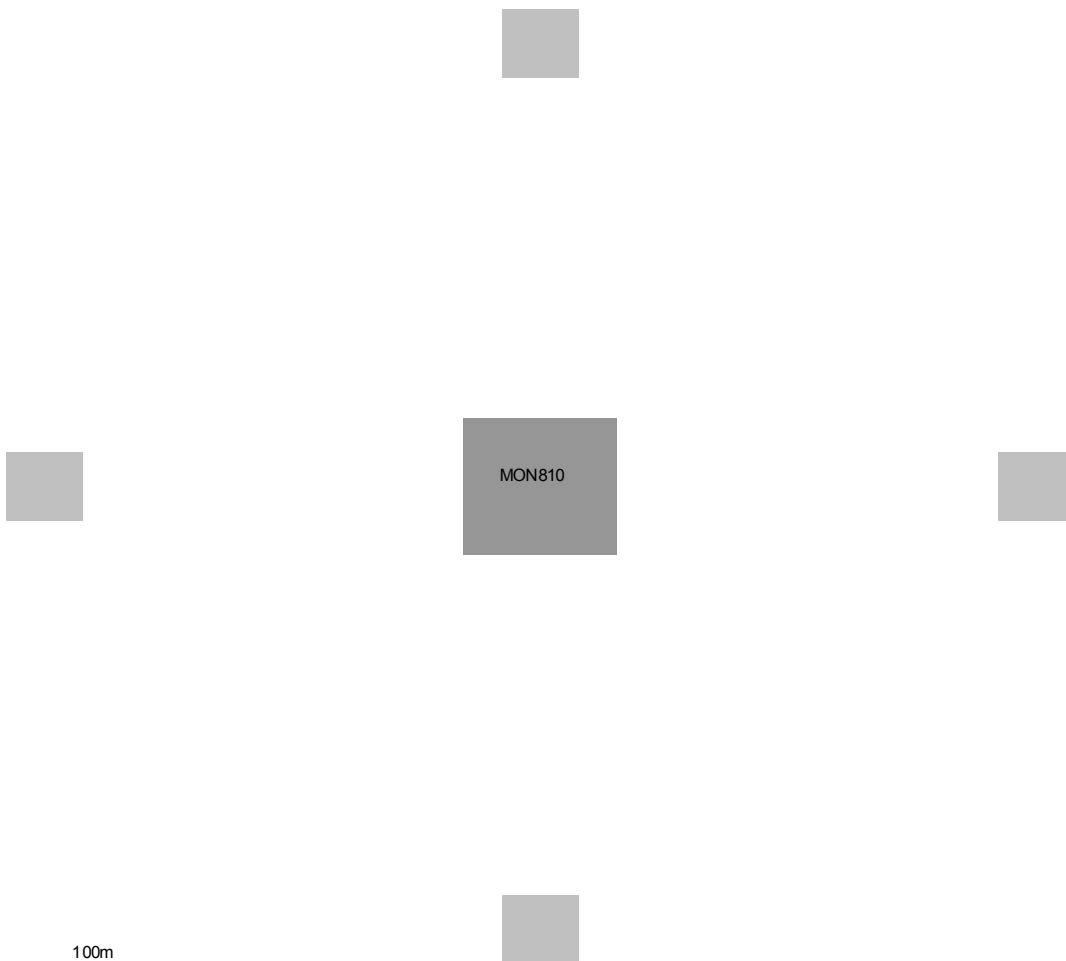
Binnen dertig dagen na inzaaien werden de locaties aangemeld bij de Dienst Regelingen en vervolgens gepubliceerd op de website van het Ministerie van VROM

(<http://www.vrom.nl/ggoregister>), conform de huidige regelgeving. De specifieke coëxistentieregels zijn namelijk nog niet geïmplementeerd in een HPA verordening.

Figuur 1a. Schematische opzet voor praktijkproef met 25 m isolatieafstand.



Figuur 1b. Schematische opzet voor praktijkproef met 250 m isolatieafstand.



Verloop van de praktijktoets

2006

Proefvelden werden tussen 25 april en 4 mei ingezaaid en volgens gangbare teeltmethoden (onkruidbestrijding etc.) uitgevoerd. Lage Zwaluwe vertoonde als bijzonderheid een zekere tweewassigheid (verschillen in opkomst) als gevolg van plaatselijke verschillen in bodemvochtigheid binnen het veld. Daardoor kon onkruidbestrijding pas later dan gebruikelijk en dus alleen “onderblads” plaatsvinden. Op deze manier konden alle planten uiteindelijk goed uitgroeien. Onder de droge omstandigheden tijdens de bloei in de uitzonderlijk warme julimaand van 2006 bleken de nu gunstige vochtomstandigheden in Lage Zwaluwe juist een voordeel voor een goede gewasontwikkeling.

Ten behoeve van verdere modellering van de uitkruisingsgegevens is de start van de mannelijke en vrouwelijke bloei geregistreerd in alle percelen (GG en niet-GG). De spreiding in de start van de bloei tussen planten, zowel binnen een perceel als tussen percelen op een locatie, was in de orde van een week en er was doorgaans een goede synchronisatie van de mannelijke en vrouwelijke bloei, met een gemiddeld startverschil tussen beide van maximaal twee dagen. Meestal viel de gemiddelde start van de vrouwelijke bloei eerder dan de mannelijke; bij de meeste hybride rassen is dit minder sterk of andersom. Zoals hierboven al aangestipt bij de bespreking van bijzonderheden van Lage Zwaluwe vond de bloei in een periode van behoorlijke droogte plaats. Alleen de locatie Blitterswijck onderging een dermate grote droogtestress dat het een slechte kolfvorming tot gevolg had, zodat een complete bemonstering daar uiteindelijk op één receptorperceel (zuid) niet mogelijk bleek. Deze droogtestress was een algemeen probleem op de hogere zandgronden in Noord-Limburg. Verder is met behulp van tijdens de bloei dagelijks inhullen van pluimen (mannelijke bloeiwijzen) het verloop van de stuifmeelproductie bepaald aan een aantal planten van het niet-transgene hybride ras op een proefveld in Wageningen. De stuifmeelproductie was in de te verwachten orde van grootte voor een modern hybride ras. Om te controleren of er veel kwantitatieve variatie was in de mannelijke bloei zijn van alle proefvelden mannelijke bloeiwijzen gemeten, d.w.z. de lengtes van de hoofdas en de zijassen. Hierbij werden geen grote verschillen gevonden, alleen vertoonden de pluimen van de planten uit de meest door droogte getroffen locatie, Blitterswijck, een gemiddeld wat langere hoofdas.

Naast meteorologische en bodeminvloeden werden gedurende de teelt beschadigingen aangetroffen in de GG velden van Lelystad, Lage Zwaluwe, Wijnandsrade en Blitterswijck. Het toebrengen van deze beschadigingen werd later langs verschillende elektronische wegen geclaimd door gentechbezwaarden. Details over de ontwikkeling van de velden staan vermeld in Appendix I.

2007

Proefvelden werden tussen 26 april en 2 mei ingezaaid en volgens gangbare teeltmethoden (onkruidbestrijding etc.) uitgevoerd. Uithuizen vertoonde als bijzonderheid een tragere ontwikkeling door een combinatie van de noordelijke (koelere) ligging en natte weersomstandigheden. Er was echter wel een goede, zij het wat latere bloei, wat resulteerde in kleine planten met relatief kleine kolven.

Evenals in 2006 is ten behoeve van verdere modellering van de uitkruisingsgegevens de start van de mannelijke en vrouwelijke bloei geregistreerd in alle percelen (GG en niet-GG). De spreiding van bloeitijdstippen tussen planten, zowel binnen een perceel als over percelen op een locatie heen, was in de orde van een week en doorgaans was er een goede synchronisatie van de mannelijke en vrouwelijke bloei, met een gemiddeld startverschil tussen beide van maximaal twee dagen. Net als in 2006 viel over het algemeen de gemiddelde start van de vrouwelijke bloei eerder dan de mannelijke. Bij de meeste hybride rassen is dit andersom, en in dit geval lijkt het dus een raseigenschap te zijn en geen gevolg van de bijzonder warme omstandigheden van 2006. Weliswaar was er in 2007 een droog voorjaar, wat het zaaien bemoeilijkte, maar de bloei viel in een periode met betrekkelijk normaal zomerweer, d.w.z. temperaturen zoals gebruikelijk, maar wel natter dan normaal. Ook in dit jaar is met behulp van het dagelijks inhullen van pluimen het verloop van de stuifmeelproductie bepaald op een proefveld met het niet-transgene ras in Wageningen. De totaalproductie was in dezelfde orde van grootte als in 2006, maar was over een langere periode uitgesmeerd, wat met de verschillende weersomstandigheden te maken zal hebben. Om te controleren of er veel kwantitatieve variatie was in de mannelijke bloei zijn van alle proefvelden mannelijke bloeiwijzen gemeten, d.w.z. de lengtes van de hoofdas en de zijassen. Hierin werden geen grote verschillen gevonden, behalve de al genoemde kleinere planten in Uithuizen.

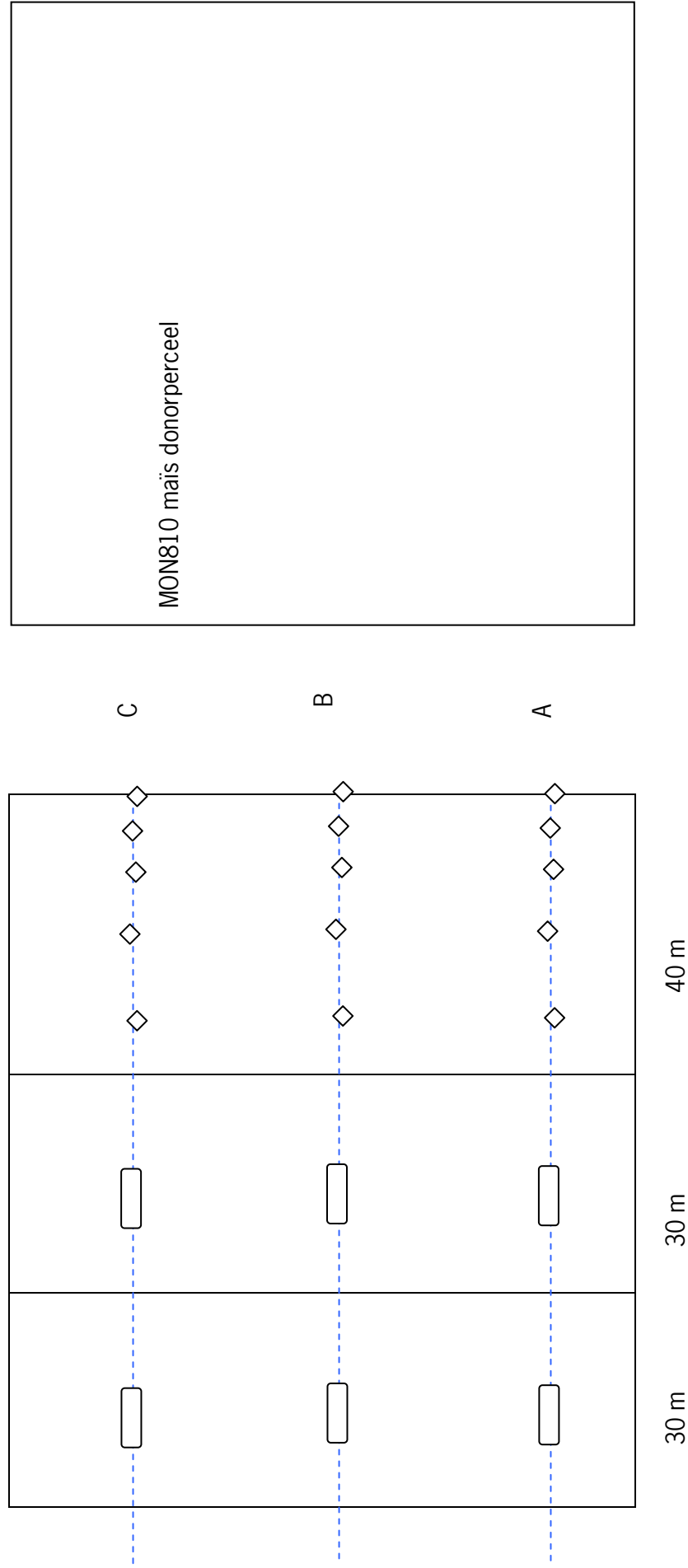
In 2007 werden naast meteorologische en bodeminvloeden geen door mensen veroorzaakte beschadigingen aangetroffen in de GG velden. Er was alleen een actie van Greenpeace vlak voor de start van de bloei in Schaarsbergen, waarbij van ongeveer een kwart van het aantal planten de mannelijke bloeiwijzen met plastic zakken omhuld werd teneinde verspreiding van transgeen stuifmeel tegen te gaan. Deze plastic zakken zijn zo snel mogelijk, d.w.z. binnen een dag, weer verwijderd en zorgvuldig afgevoerd. Aangezien de stuifmeelproductie nog niet was begonnen, is het aannemelijk dat de actie geen invloed op de stuifmeelverspreiding gehad heeft. Details over de ontwikkeling van de velden staan vermeld in Appendix I.

Bemonstering

De bemonstering van kolven werd uitgevoerd zoals weergegeven in Fig. 2. In de 25 m receptorpercelen is de bemonstering langs drie transecten per perceel uitgevoerd. De transecten liepen vanaf de rand van het ontvangende perceel dat het dichtst bij het donorperceel lag, loodrecht op diezelfde rand het veld in (vergelijk Fig. 2a). Vanwege de te verwachten snelle afname van uitkruising vanaf de rand is in het eerste stuk van elk transect gedetailleerder bemonsterd dan verderop. In de 250 m percelen was het minder waarschijnlijk dat een duidelijk patroon van uitkruising vanaf de rand te vinden zou zijn, aangezien naar verwachting vermengingspercentages op deze afstand overal heel laag zijn. Daarom is hier gekozen voor een uitgebreide bemonstering van de randen, waar naar verwachting de grootste kans op uitkruising is, en een meer globale binnenin de percelen (Fig. 2b).

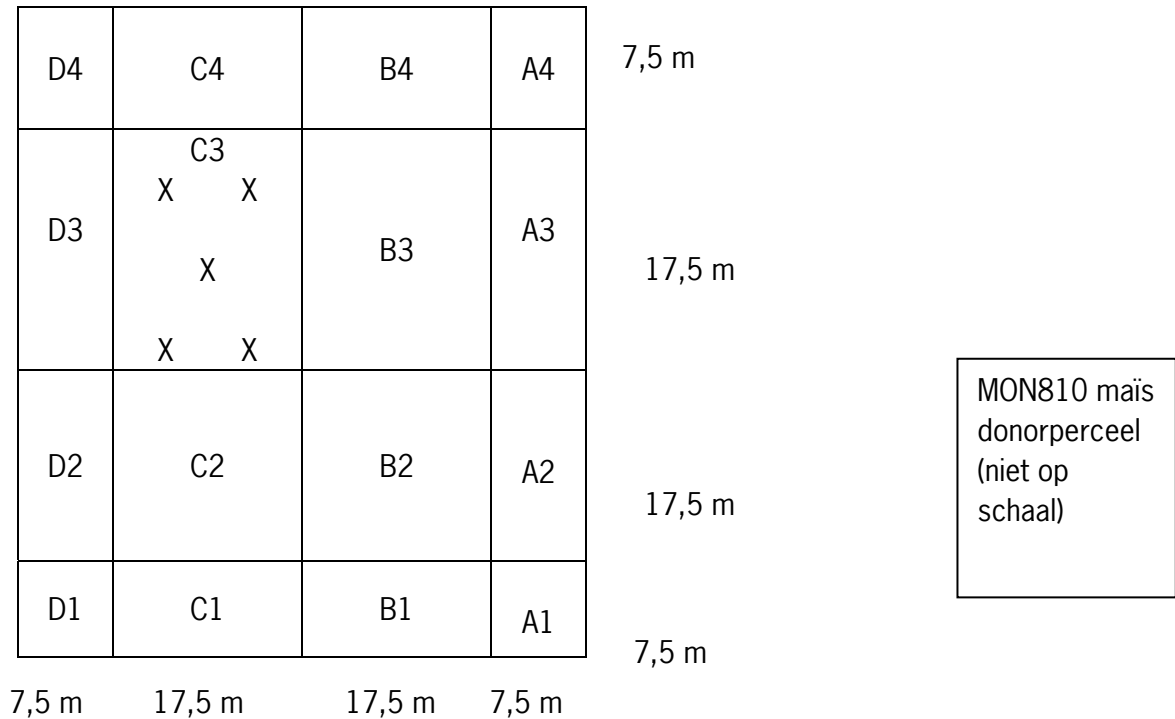
De monsters telden elk 5 kolven. De gemonsterde kolven werden gedroogd en vervolgens gedorst. Van elk monster werd 500 gram korrels afgewogen voor verdere analyse door RIKILT. Vrij veel monsters uit Blitterswijck in 2006 en de noordelijke proeven (Uithuizen en Eerste Exloërmond) in 2007 vielen echter wat kleiner uit vanwege plaatselijk slechte zaadzetting of door de vorming van kleinere kolven; deze konden verder wel normaal in de analyse meegenomen worden.

Figuur 2a. Ontvangerperceel op 25 m.



Drie transecten per perceel, met de klok mee rond het donorperceel gaand A, B en C genoemd, 5 kolven elk geoogst in rij 1, rij 4, rij 8, rij 16, rij 32, dan de laatste 2 monsters sectoraal gecombineerd, dus elk monster bestaat uit telkens één kolf uit rij 53, 61, 69, 77 en 85, resp. rij 93, 101, 109, 117 en 125 (of laatste). Rijen werden gerekend vanaf de eerste rij evenwijdig aan en het dichtstbij het donorperceel gelegen (in de figuur rechts) en de afstand tussen rijen bedroeg 0,75 m.

Figuur 2b. Ontvangerperceel op 250 m.



5 kolven als volgt geoogst per sector:

Elk van de vier hoekranden A1, A4, D1, D4 uit eerste plant van buiten: één uit de hoek, op 2,75 m en 7.5 m vanuit de hoek langs de eerste rij, en in rij 5 en rij 11 vanuit de hoek buitenste plant

Elk van de vier keer twee middenranden (A2, A3, B1, C1, B4, C4, D2, D3): uit eerste plant van buiten: vanaf de reeds bemonsterde 7,5 m vanaf hoekpunt om de 3 m een kolf tot totaal van 5, of vanaf hoekpunt rij 15, 19, 23, 27, 31.

Elk van de vier centrale blokken (B2, B3, C2, C3): rij 13 op 10 en 20 m uit kant, rij 20 op 15 m uit kant, rij 27 op 10 en 20 m uit kant (voortgezet naar volgende blok: rij 40 op 10 en 20 m uit kant, rij 47 op 15 m uit kant, rij 53 op 10 en 20 m uit kant; evenzo andere twee blokken op 30 en 40 m, resp. 35 m uit kant).

Analyse van MON810 gehalten in maïskorrels uit de receptorpercelen

De aangeleverde monsters (ongeveer 500g maïskorrels) zijn gemalen, waarbij het monster zoveel mogelijk is gehomogeniseerd. Daarna is van elk monster DNA geïsoleerd uit 100 mg (range: +/- 10 mg) gemalen (gehomogeniseerd) materiaal. Hiermee zijn 3 kwantitatieve PCRs (polymerase chain reactions) uitgevoerd. Per PCR is 50 ng DNA gebruikt. In de gestandaardiseerde procedure voor op zichzelf staande, aan RIKILT aangeboden monsters worden analyses gedaan over twee aparte DNA-extracties uit het gemalen korrelmonster om de analyse-uitkomst per monster zo nauwkeurig mogelijk te maken. Aangezien we voor het bepalen van de gemiddelde vermenging door uitkruising over een perceel zoveel mogelijk van de verdeling van de variatie over een perceel dienen te weten, hebben we in 2006 ervoor gekozen met slechts één extractie per monster te werken, waardoor we twee keer zoveel monsters per perceel hebben kunnen testen binnen hetzelfde budget. In 2007 is om redenen van grotere efficiëntie ook eerst een test gedaan op aanwezigheid van MON810 en vervolgens zijn alleen de positieve monsters gekwantificeerd. Dit is evenzeer een gebruikelijke en gevalideerde methode in routine-analyses door RIKILT van voor controle aangeleverde monsters.

Voor de bepaling van het percentage MON810 maïs in het monster is gebruik gemaakt van de in Europees verband gevalideerde event-specifieke real-time PCR MON810 test. De gebruikte test is gevalideerd in een ringtest in 15 laboratoria, georganiseerd door het Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in samenwerking met de American Association of Cereal Chemists (AACC), het Joint Research Centre (JRC) van de EU en het Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) en Genescan (http://gmo-crl.jrc.it/summaries/Mon810_validation_report.pdf). De test is ook intern op het RIKILT gevalideerd. Het RIKILT is sinds 2006 geaccrediteerd voor het uitvoeren van (kwantitatieve) GGO-bepalingen. De interne validatiestudie voor de toegepaste MON810-methode is in 2006 afgerond (voorafgaand aan de hier beschreven bepalingen) en werd in het accreditatiedossier van 13 december 2007 aangemeld bij de Raad voor de Accreditatie. Uit de validatiegegevens kan afgeleid worden dat bij een standaardanalyse (in verschillende typen monsters, verschillende matrices) de kwantificeringslimiet 0.07% MON810 maïs is. Bij onze monsternamen van vijf kolven, d.w.z. ongeveer 1500 korrels, blijkt het resultaat echter in de praktijk op 0 te liggen doordat de monsters bestonden uit discrete korrels: bij een aanvullende test bleek één transgene korrel op 1500 niet-transgene goed te detecteren te zijn.

In de event-specifieke MON810 maïstest wordt een 92 bp -fragment van de 5'-overgang tussen het plantgenoom en de CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S- promotor, afkomstig van het ingebrachte genetische construct, geamplificeerd. Als referenties wordt een 79 bp -fragment van het endogene maïsgen HMG (High Mobility Group Protein Gene) geamplificeerd. Detectie vindt plaats op basis van de Taqman probe technologie. De real-time PCRs worden uitgevoerd in een Bio-Rad i-Cycler iQ. Voor kwantitatieve toepassing worden twee calibratielijnen van 5% (w/w) MON810 genomisch DNA gebruikt (referentiemateriaal ERM BF413f van het IRMM). Een calibratielijne wordt gebruikt voor de bepaling van het aantal kopieën van het endogene gen in de reactie en één calibratielijne wordt gebruikt voor het bepalen van het aantal kopieën MON810-sequentie in de reactie. De ratio van beide waarden is, conform Europese afspraken, het percentage MON810 in de reactie. Het resultaat per monster is bepaald op basis van de gemiddelde waarden voor de 3 PCRs.

Berekening van het gemiddelde vermengingspercentage door uitkruising per perceel

Isolatieafstand van 25 m

Bij de 25 m percelen werd eerst een aantal mathematische curves “gefit” op alle waarnemingen van vermengingspercentages uitgezet tegen de afstand vanaf de buitenrand van het ontvangende perceel. Daarbij kwamen verschillende acceptabele curves naar voren. Om aan de veilige kant te gaan zitten is gekozen voor de curve die over het geheel wat hoger uitviel (dus meest “reasonable worst case”), een reciproke functie ($1/\text{uitkruisingspercentage} = A + B \cdot \text{afstand}$) met gammadistributie van variatie. De gevonden verschillen met andere curves waren overigens niet groot. De “reciproke” curve is ook toegepast door Henry et al. (2003) op de resultaten uit de Britse Farm Scale Evaluations. Vervolgens werden voor alle receptorpercelen afzonderlijk de “reciproke” curve door de gemeten waarden gefit (vergelijk Fig. 3). Op basis van deze curves kon vervolgens voor elke perceel het gemiddelde vermengingspercentage berekend worden (Tabel 1).

De gemiddelde vermengingspercentages per perceel in 2006 varieerden tussen 0,009% (Lage Zwaluwe Noord) en 0,296% (Lage Zwaluwe Zuid). Het gemiddelde over alle twaalf 25 m receptorpercelen was 0,084% met een 95% betrouwbaarheidsinterval tussen -0,002% en 0,169%, gebaseerd op locatiegemiddelden. De kans dat het gemiddelde van een perceel boven de EU drempelwaarde van 0,9% voor onbedoelde en/of vermijdbare vermenging uitkwam was kleiner dan 0,001.

De gemiddelde vermengingspercentages per perceel in 2007 varieerden tussen 0,002% (Tholen West) en 0,318% (Schaarsbergen Oost). Het gemiddelde over alle twaalf 25 m receptorpercelen was 0,080% (95% betrouwbaarheidsinterval tussen 0,014% en 0,147%, gebaseerd op locatiegemiddelden), wat niet statistisch significant afwijkt van dat in 2006. De kans dat het gemiddelde van een perceel boven de EU drempelwaarde van 0,9% voor onbedoelde en/of vermijdbare vermenging uitkwam was ook in 2007 kleiner dan 0,001.

Tabel 1. Gemiddeld vermengingspercentage door uitkruising in de korrels per receptorperceel met 25 m isolatieafstand. Voor de bijbehorende op de gemiddelde vermengingpercentages per afstand gefitte curves vergelijk Fig. 3.

2006

Receptor-perceel	Locatie			Totaal gemiddelde
	Blitterswijk	1e Exloërmond	Lage Zwaluwe	
Noord	0,060%	0,017%	0,009%	
Oost	0,045%	0,075%	0,089%	
West	0,073%	0,031%	0,096%	
Zuid	0,102%*	0,110%	0,296%	
Gemiddelde	0,070%	0,058%	0,123%	0,084%
95% betrouwbaarheidsinterval				(-0,002%, 0,169%)

* Blitterswijk Zuid kon wegens slechte kolfzetting als gevolg van de droogteperiode slechts beperkt bemonsterd worden. Het resultaat hoeft dus niet representatief voor een heel perceel te zijn, maar wordt hier vermeld als een mogelijk "reasonable worst" case resultaat.

2007

Receptor-perceel	Locatie			Totaal gemiddelde
	Tholen	2e Exloërmond	Schaarsbergen	
Noord	0,022%	0,075%	0,039%	
Oost	0,131%	0,029%	0,318%	
West	0,002%	0,002%	0,011%	
Zuid	0,236%	0,092%	0,008%	
Gemiddelde	0,098%	0,049%	0,093%	0,080%
95% betrouwbaarheidsinterval				(0,014%, 0,147%)

Isolatieafstand van 250 m

Bij de 250 m percelen waren de te verwachten vermengingspercentages dermate laag dat niet uitgegaan kon worden van monstertransecten waarop curves gefit konden worden. Daarom zijn de gemiddelde vermengingspercentages voor het hele perceel berekend door de waardes van individuele monsterkwadranten te middelen, waarbij gebruik gemaakt werd van wegingsfactoren ter compensatie van de verschillende oppervlakten van de monsterkwadranten (voor het patroon van de kwadranten in de ontvangervelden zie Fig. 2b op pag. 13). Bij deze berekening vindt naar alle waarschijnlijkheid een overschatting van het vermengingspercentage plaats doordat de waarden gemeten aan monsters uit de randen van het veld als representatief voor de buitenkwadranten genomen worden, terwijl de buitenste rijen een hogere kans op uitkruising hebben dan de daaropvolgende rijen in de buitenkwadranten.

Resultaten per 250 m perceel in 2006 varieerden van 0% tot 0,04%, met een gemiddelde van 0,005%. In 2007 varieerden de resultaten per perceel eveneens van 0% tot 0,04%, met een gemiddelde van 0,008%. Er werd één monster met een uitzonderlijk hoog gehalte van 13% aan MON810 aangetroffen in Uithuizen Zuid. Een dergelijk gehalte kan niet meer reëel verklaard worden door uitkruising met een transgeen donorperceel op een afstand van 250 m. De mogelijke oorzaak voor deze uitzonderlijke waarde wordt verder in de Toelichting en Appendix II besproken.

Tabel 2. Gemiddeld vermengingspercentage door uitkruising in de korrels per receptorperceel met 250 m isolatieafstand.

2006

Receptor-perceel	Locatie			Totaal gemiddelde
	Lelystad	2e Exloërmond	Wijnandsrade	
Noord	0,0037%	0,0000%	0,0000%	
Oost	0,0087%	0,0000%	0,0017%	
West	0,0023%	0,0000%	0,0000%	
Zuid	0,0037%	0,0037%	0,0401%	
Gemiddelde	0,0046%	0,0009%	0,0104%	0,0053%
95% betrouwbaarheidsinterval				(-0,0018%, 0,0125%)

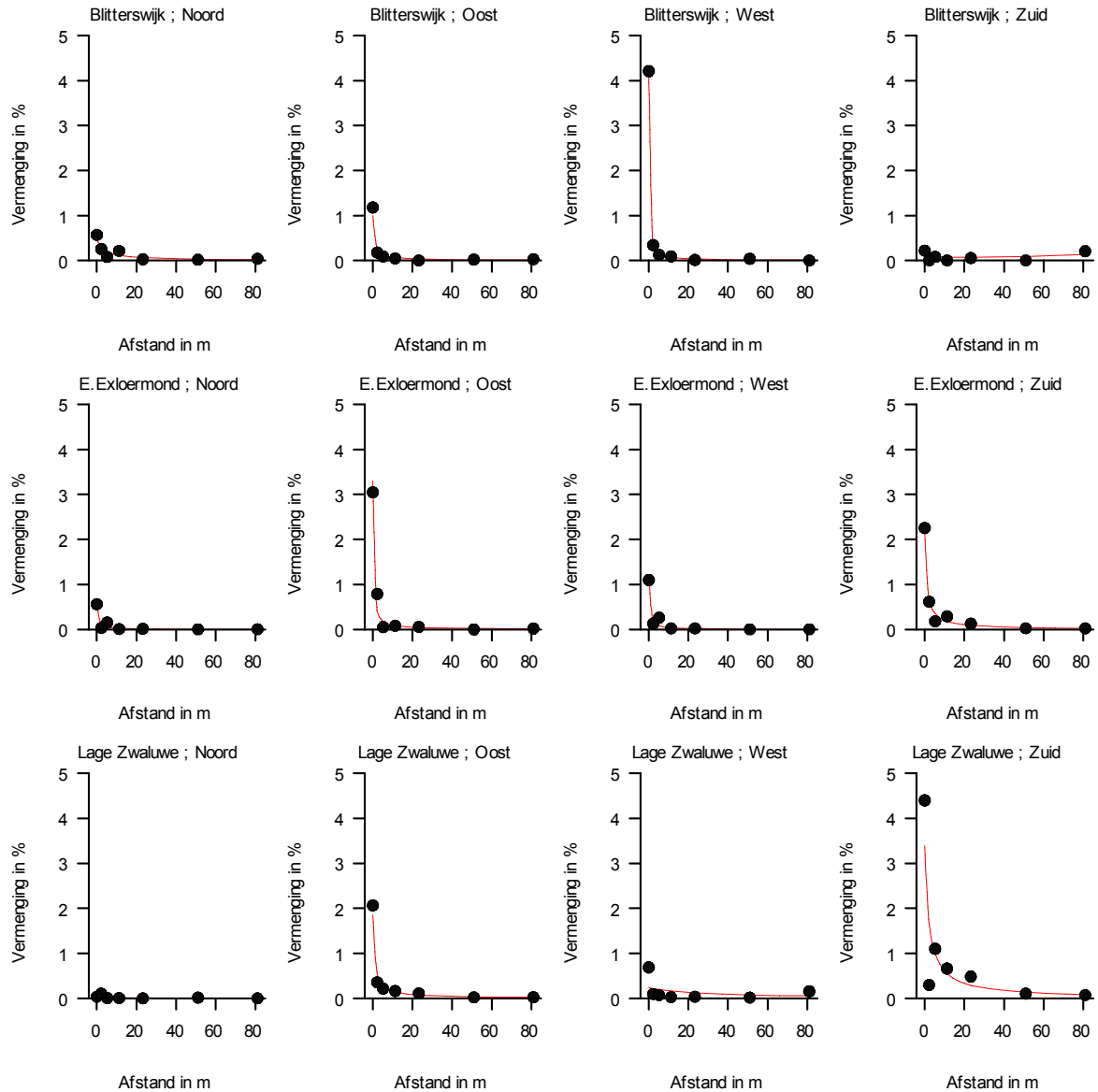
2007

Receptor-perceel	Locatie			Totaal gemiddelde
	Lelystad	1e Exloërmond	Uithuizen	
Noord	0,0030%	0,0044%	0,0098%	
Oost	0,0066%	0,0000%	0,0020%	
West	0,0000%	0,0003%	0,0375%	
Zuid	0,0055%	0,0124%	0,0004%*	
Gemiddelde	0,0038%	0,0043%	0,0124%*	0,0068*
95% betrouwbaarheidsinterval				(-0,0053%, 0,0189%)

* In Uithuizen Zuid werd één hoekmonster aangetroffen met een uitzonderlijk hoog gehalte van 13%. Een dergelijk gehalte kan niet meer reëel verklaard worden door uitkruising met stuifmeel vanuit een transgeen donorperceel op een afstand van 250 m, maar is wel consistent met de aanwezigheid van een kolf in het monster afkomstig van een transgene plant, die dan ontsproten moet zijn uit een onbedoeld in het receptorperceel terechtgekomen transgeen zaad (zie verder Toelichting en Appendix II). Eén randmonster direct naast dit hoekmonster vertoonde een laag percentage MON810 en in de rest van het perceel werden geen MON810-positieve monsters aangetroffen. Het hoekmonster met hoog MON810 gehalte is bij de berekening van het gemiddelde vermengingspercentage door uitkruising uitgesloten, maar alle overige 15 monsters zijn er wel in verwerkt. Dit leidt dus tot de meest conservatieve schatting aangezien het enige andere positieve randmonster beïnvloed kan zijn door de aanwezigheid van een transgene plant in het naastgelegen hoekmonster (zie verder onder Toelichting en Appendix II). Met het hoekmonster erbij zou het gewogen gemiddelde over alle monsters uit het Uithuizen Zuid perceel uitkomen op 0,3012% en het gemiddelde over alle percelen van Uithuizen op 0,0876%.

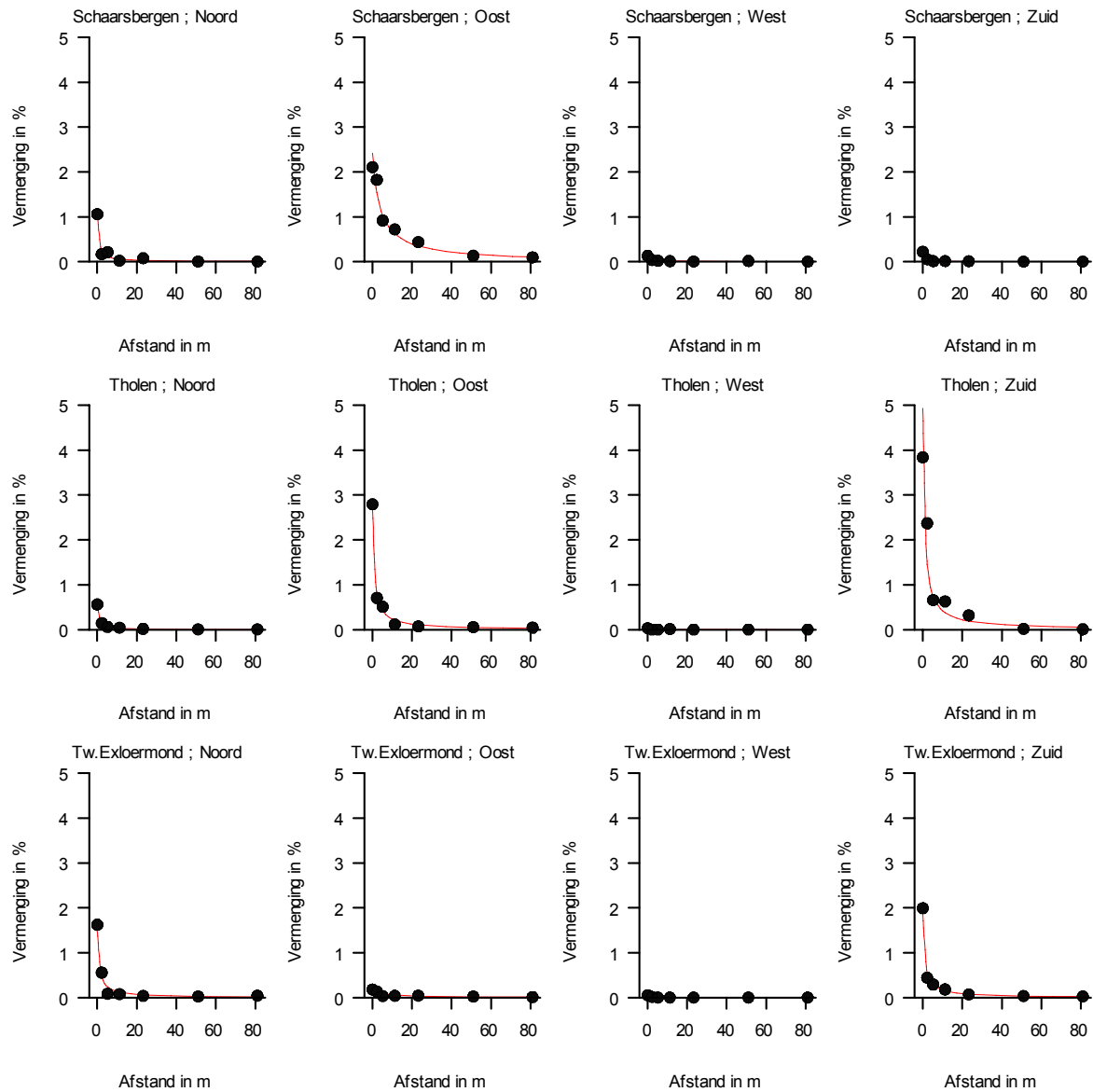
Figuur 3. Reciproke functie gefit op gemeten vermengingspercentages uitgezet tegen de afstand tot de buitenrand (= 0 m) van elk 25 m ontvangerveld afzonderlijk. Blitterswijk Zuid kon wegens slechte kolfzetting als gevolg van de droogteperiode slechts beperkt bemonsterd worden.

2006



Figuur 3. Vervolg.

2007



Toelichting en conclusies

Vermengingspercentages door uitkruising

In de proeven met een isolatieafstand van 250 m werden per perceel vermengingspercentages met het transgen door uitkruising gevonden variërend van 0% tot 0,040% in 2006 en van 0% tot 0,037% in 2007, met gemiddelden over twaalf ontvangerpercelen van 0,005% (2006) en 0,007% (2007). In de proeven met een isolatieafstand van 25 m werden percentages gevonden variërend tussen 0,009% en 0,296% in 2006 en tussen 0,002% en 0,318% in 2007. De gemiddelden over de twaalf ontvangerpercelen verschilden niet statistisch significant tussen de beide jaren: 0,084% in 2006 en 0,080% in 2007. Conform het te verwachten patroon bij de ontvangervelden met 25 m isolatieafstand vertoonde de buitenste rij die zich het dichtst bij de transgene donor bevond duidelijk hogere vermengingswaarden, maar deze namen verderop in het perceel snel af, waardoor de gemiddelden over een perceel laag blijven (zie de curves in Fig. 3). De behoorlijk verschillende weersomstandigheden tussen 2006 met een bijzonder warme en droge zomer en 2007 met een zomer die aan de natte kant was hebben in de praktijktoets niet geleid tot relevante verschillen in de mate van uitkruising tussen beide jaren.

Kwantificeringsmethode

De berekende vermengingspercentages betreffen waarden die aangetroffen werden in de korrels; in snijmaïs zou men verdunning verwachten door de bijmenging met het vegetatieve deel van de plant dat per definitie niet door uitkruising beïnvloed wordt*.

De vermengingspercentages betreffen het percentage haploïde genomen met een ingekruist transgen in de korrels, gecalibreerd aan de hand van het Europese MON810-referentiemateriaal. Op dit moment is dit MON810-referentiemateriaal (5%) nog op gewichtsbasis samengesteld. Dit is binnen Europa nu de standaardprocedure in afwachting van nieuwe referentiematerialen waarmee daadwerkelijk rechtstreeks het haploïd genoomgehalte kan worden bepaald. Het is de verwachting dat de percentages hierdoor lager zullen worden. De verhouding tussen de hoeveelheid genomen afkomstig van de moederplant en die van de bestuiver (dus de enige bron van een transgen door uitkruising) kan variëren in een maïskorrel, waardoor de analyseresultaten van de vermenging eveneens kunnen variëren. De reden voor deze variatie is dat de relatieve verhouding van de verschillende onderdelen van de korrel (endosperm, embryo, en zaadhuid), die elk een eigen verhouding van vaderlijke en moederlijke genomen hebben, kan variëren tussen rassen. Een uitgebreidere toelichting op de achtergronden van deze kwestie is te vinden in het bij het advies van de Commissie Coëxistentie Primaire Sector gevoegde rapport (Van de Wiel & Lotz 2004) over uitkruising (Rapport Commissie Coëxistentie Primaire Sector, te downloaden van website Hoofdproductschap Akkerbouw: <http://www.hpa.nl/> onder Actueel – Publicaties).

* Pilotexperimenten gaven aanwijzingen voor het optreden van een verdunningseffect, maar analyse ten aanzien van de kwantificering van uitkruising op basis van snijmaïsmonsters is nog gaande.

Perceelsbijzonderheden

In 2006 diende er gerekend te worden met de in principe kwantificeerbare effecten die de beschadigingen in de transgene donorvelden gehad kunnen hebben op de hoeveelheid transgeen pollen dat beschikbaar kwam voor bestuiving van de receptorvelden. De verliezen betroffen maximaal een kwart à een derde van de planten, zodat rekening moet worden gehouden met een evenredig lagere stuifmeelproductie. Een compensatie van de vermengingspercentages met een factor $4/3$ zou bij de hoogste waarde in Lage Zwaluwe van 0,3% leiden tot een waarde van 0,4%. Dit wordt nog nader uitgewerkt m.b.v. modellering.

In 2007 zijn geen beschadigingen geconstateerd. Eén monster in het zuidelijke ontvangerperceel van Uithuizen vertoonde een MON810 gehalte dat buitengewoon ver afweek van alle overige variatie op de 250 m locaties. Hoewel het een éénmalige waarneming betreft, wordt deze waarneming hier vanwege de uitzonderlijk hoge waarde kort besproken. Met alles dat ons uit de literatuur bekend is en dat we verder zelf hebben waargenomen in de praktijktoetsen over beide jaren (van de overige waarden per monster was de hoogste op 250 m 0,2% in het zuidperceel in Wijnandsrade 2006) kan het betreffende vermengingspercentage van 13% redelijkerwijs niet verklaard worden door uitkruising met pollen van het transgene donorveld. Een nadere toelichting over de mogelijke oorzaken voor deze vermenging staat in Appendix II.

Conclusies en verdere activiteiten

- Gemiddelde en maximale vermengingspercentages per perceel door uitkruising verschillen weinig tussen de klimatologisch behoorlijk verschillende jaren 2006 en 2007: rond de 0,08% voor de 25 m isolatieafstand met een maximum van 0,3% en tussen de 0,005 en 0,008% voor de 250 m afstand met een maximum van 0,04%. In beide gevallen liggen de gevonden waarden beneden de 0,9% drempel die door de EU is ingesteld.
- Verdere analyse en modellering van resultaten: De resultaten worden ingezet voor valideren van modellen in Europees verband. Verbetering van modellen maakt het mogelijk deze optimaal te gebruiken voor adviezen over een breder scala van mogelijke agrarische situaties dan experimenteel getest kan worden. Ook kunnen adviezen met hulp van modellen verbeterd worden omdat ze gestructureerd gebruik maken van uitkomsten uit zoveel mogelijk onderzoeken. Concreet betekent dit dat de resultaten van 2006 gedeeld zijn met INRA (Institut National de Recherche Agronomique) in Frankrijk voor validering met het maïsuitkruisingsmodel MAPOD en met BBA (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft) in Duitsland voor een meta-analyse met een hele serie gegevens uit uitkruisingsproeven van een aantal andere Europese partners die deelgenomen hebben aan het Europese coëxistentieonderzoeksproject SIGMEA (<http://sigmea.group.shef.ac.uk/>). Ook de resultaten van 2007 zullen zoveel mogelijk gedeeld worden.
- Wetenschappelijke publicatie van de resultaten (Van de Wiel et al. in prep.).
- Verdere analyses van de mogelijkheden van meting van vermenging in snijmaïs en van de haalbaarheid van metingen aan ingekuild materiaal vinden nog plaats.

Referenties

- Henry, C., Morgan, D., Weekes, R., Daniels, R. and Boffey, C., 2003.
Farm scale evaluations of GM crops: monitoring gene flow from GM crops to non-GM equivalent crops in the vicinity Final report EPG 1/5/138. Part I: Forage maize. DEFRA, London.
- Messeguer, J., Peñas, G., Ballester, J., Bas, M., Serra, J., Salvia, J., Palaudelmàs, M. and Melé, E., 2006.
Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal* 4: 633-645.
- Van de Wiel, C & Lotz, B. 2004.
Inventarisatie van de wetenschappelijke kennis over uitkruising in maïs, koolzaad, aardappel en suikerbiet voor het Coëxistentieoverleg 2004. *Plant Research International*, Wageningen, Nota 322.
- Van de Wiel, C.C.M. and Lotz, L.A.P., 2006.
Outcrossing and coexistence of genetically modified with (genetically) unmodified crops: a case study of the situation in the Netherlands. *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences* 54: 17-35.
- Weber, W.E. and Bringezu, T., 2005.
Test of coexistence under German field conditions - results from the “Erprobungsanbau” 2004 with Bt-maize. In: Messean, A. ed. *Proceedings of the second international conference on co-existence between GM and non-GM based agricultural supply chains*. Agropolis Productions, Montpellier, France, 327-330.

Appendix I.

Overzicht verloop van de coëxistentie praktijktoetsen in 2006

Lokatie	Agronomisch	Vernielingen	Opmerkingen
Wijnandsrade (250 m)	Opkomst en onkruidbestrijding goed, mate van droogte stress en gewasheterogeniteit representatief voor Zuid-Limburg	Op 2-3 augustus: 30 rijen à 90 meter (om de 3 rijen één laten staan). In totaal ca. 20% mannelijke pluimen verwijderd. Er is aangifte gedaan.	Geen
Blitterswijk (25 m)	Opkomst en onkruidbestrijding goed. Stress door droogte, met name in zuidelijk ontvangend perceel. Herstel na regen. Enige heterogeniteit, echter representatief voor hogere zandgronden Noord Limburg/ Brabant	Op 22 juli bezoek van gentechbezwaarden. Één gemerkte plant beschadigd. Verder geen beschadiging. Door droogte bleef schutblad langer om mannelijke aar, ook slechte kolfvorming. Op 12-13 augustus vernieling door omduwen of ontpluimen (ca 15% van de planten). Er is aangifte gedaan.	Dichtstbijzijnde perceel maïs op ca 270 meter.
Lage Zwaluwe (25 m)	Door slechte bodemstructuur twee-wassig bij opkomst. Onkruidbestrijding hierdoor verlaagt: gangbare bestrijding + aanvullende onderblad bespuiting heeft echter goed uitgekapt. Opdrachtige grond waardoor geen droogteschade.	Vernieling op 27 juli aan noordkant GM-veld. Ca. 20-25% mannelijke pluimen verwijderd. Er is aangifte gedaan.	Dichtstbijzijnde maïs op ca 500 m.
Lelystad (250 m)	Uitstekend, geen droogte stress	Op 3 mei heeft Greenpeace spinazie ingezaaid. Is met normale onkruidbestrijding weggenomen. Laatste week juni en eerste week augustus totaal ca 30% van de planten vernield (verspreid over GM-veld). Er is aangifte gedaan.	Geen
Eerste Exloërmond (25 m)	Door winderige periode gerstopslag te laat bestreden (enige concurrentieschade). Relatief veel zwaluwtong en melganzevoet. Door droogtestress enige heterogeniteit (representatief voor zandgronden Noord Nederland).	Geen vernielingen.	Op ca 170 m van donorveld, aan de andere kant van een watergang met hoog riet lag een smal langwerpig maïs-perceel met een vroeg maïsras dat 8-10 dagen eerder heeft gebloeid dan de maïs in de praktijktoets.
Tweede Exloërmond (250 m)	Door winderige periode wintertarweopslag te laat bestreden (enige concurrentieschade). Relatief veel zwaluwtong en melganzevoet. Door droogtestress enige heterogeniteit (representatief voor zandgronden Noord Nederland).	Geen vernielingen	Geen

Overzicht verloop van de coëxistentie praktijktoetsen in 2007

Lokatie	Agronomisch	Beschadiging	Opmerkingen
Lelystad (250 m)	Bouwvoor erg droog, zodat zaaibed maken veel tijd kostte. Vrij diep gezaaid en gerold (26/4). Kort na zaaien beregend. Er stond een prima gewas.	De storm op 24 juli knikte diverse planten, vooral in GG perceel	Mais is verhakseld en direct ingewerkt.
Tholen (25 m)	Er is gezaaid op 27 april onder prima omstandigheden, nl goed zaaibed en vochtige ondergrond. Op 4 mei lichte kieming van de maïs. Er stond een prima gewas	Geen	Verhakselde maïs is naar een vergister gegaan. Op de 25m strook is gerst gezaaid.
2e Exloërmond (25 m)	Op 28 april is de grond gespit en hierin is direct gezaaid. Het gewas had een prima start en de onkruidbestrijding was goed. Er stond uiteindelijk ook een goed gewas	Geen	Verhakselde maïs is naar een vergister gegaan. In het midden van het GG perceel liep een smalle sloot. De 25 m strook was zwarte braak, met een eenmalige onkruidbehandeling, waarbij de rand van het N perceel licht beschadigd werd door verwaaiing van het middel.
1e Exloërmond (250 m)	Begin april is de locatie zaaiklaargemaakt. Maïs is 28 april gezaaid (vrij diep). Stuifdek van rogge was niet goed bestreden en is in de maïs niet meer aangepakt. Door droogte was gewas verlaat en onregelmatig opgekomen.	De spuitsporen van de locatie liepen door het gewas heen.	Verhakselde maïs is naar een vergister gegaan.
Uithuizen (250 m)	De droge grond is op 1 mei bewerkt; er stond eerst zomergerst. Er is dezelfde dag direct vrij diep gezaaid en gerold. De opkomst was traag en onregelmatig. Er was echter een goede onkruidbestrijding	Geen	Mais is verhakseld en direct ingewerkt. Op diverse natte plekken was de maïs klein gebleven.
Schaarsbergen (25 m)	De erg droge zandgrond is kort voor het zaaien (2 mei) beregend. Door de natte zomer is er uiteindelijk een goede groei vastgesteld.	Op 26 juli werden in het GG veld de pluimen met plastic zakken ingehuld door gentechbezaarden.	Deze plastic zakken werden op de 26 ^{ste} zelf, aan het einde van de middag en op 27 juli verwijderd. Op de 25 m strook was gras gezaaid. Verhakselde maïs is naar een vergister gebracht.

Appendix II.

Afwijkend monster uit Uithuizen Zuid

In het Uithuizen Zuid perceel werd één hoekmonster van vijf kolven aangetroffen met een uitzonderlijk hoog gehalte van 13%. Een dergelijk hoog gehalte kan redelijkerwijs niet verklaard worden door uitkruising met het transgene donorperceel op 250 m afstand. Hoewel het een éénmalige waarneming betreft, worden mogelijke oorzaken voor deze waarneming hier vanwege de uitzonderlijk hoge waarde kort besproken.

In principe zijn er drie mogelijkheden waardoor dit hoge vermengingspercentage veroorzaakt kan worden:

1. Het kan als vermenging in het niet-transgene zaaizaad gezeten hebben (zaaizaadonzuiverheid).
2. Tijdens het zaaien van de praktijkproef is er onbedoelde vermenging opgetreden tussen zaaizaad voor het transgene donorperceel en het niet-transgene ontvangerveld.
3. Het monster is tijdens of na de oogst verwisseld of vermengd geraakt.

In verband met mogelijkheid 1 en 2 geldt dat het gehalte van 13% in overeenstemming is met een aanwezigheid tussen de vijf kolven van één kolf van een geheel (heterozygoot) transgene moederplant, die dan uit een transgeen zaaizaad ontsproten zou moeten zijn.

Mogelijkheid 1 kan niet helemaal worden uitgesloten. Het zaaizaad kwam uit een partij die op grond van de gebruikelijke test en controleprocedures van de leverancier geen aanwezigheid van Mon810 aangaf op een representatief monster. Ook bij aanverwante partijen werd geen MON810 aangetroffen. Een extrapolatie om de partij "Mon810-vrij" te noemen is echter statistisch gezien niet mogelijk. De correcte interpretatie voor de partij als geheel is dat deze MON810 gehaltes van ten hoogste 0.1% kan hebben bevat met een waarschijnlijkheid van 95%. Onze eigen bemonstering in de praktijktoets betrof in totaal over 2 jaar met elk 3 locaties maal 4 ontvangerpercelen maal 16 monsters maal 5 planten elk = 1920 planten. Een transgeen zaad tussen deze 1920 planten valt dus binnen de specificaties van de leverancier.

Mogelijkheid 2 valt juist voor de locatie Uithuizen niet geheel uit te sluiten. Op deze noordelijke locatie is namelijk door omstandigheden afgeweken van de op alle overige locaties toegepaste zaaivolgorde. In verband met het primaire doel van de praktijktoets was de zaaivolgorde erop gericht om andere vermengingsbronnen dan uitkruising uit te kunnen sluiten. Daartoe werden normaliter eerst de niet-transgene percelen gezaaid en dan als laatste het transgene perceel. In Uithuizen is het perceel waar het uitzonderlijke monster vandaan kwam (Zuid) meteen ook het eerste perceel geweest dat na het transgene perceel is ingezaaid. De zaaimachine is echter na het zaaien van het transgene perceel en voor het inzaaien van de percelen met niet-transgeen zaad, open gemaakt en zeer zorgvuldig gereinigd alvorens de niet-transgene percelen te zaaien, omdat dit een bekende bron van vermenging is. Zo hebben Messeguer et al. (2006) in reëel bestaande situaties van coëxistentie in maïsteelten in Spanje ook naar alle waarschijnlijkheid deze vorm van vermenging aangetroffen. Verder komt het probleem bijv. ook voor in een publicatie over praktijkproeven in Duitsland door Weber & Bringezu (2005).

Mogelijkheid 3, een ongewenste vermenging ergens in het traject tussen veldbemonstering en de uiteindelijke DNA-analyse, kan uitgesloten worden geacht. Kolven uit de transgene bronvelden zijn namelijk niet meebemonsterd, en in de monsters uit de 25 m velden is nergens een dergelijk hoog gehalte aangetroffen. Tijdens de verdere verwerking bij PRI en RIKILT zijn evenmin monsters met zulke hoge gehalten MON810 behandeld. Dus zelfs afgezien van de strikte, gecertificeerde procedures van RIKILT ter vermijding van vermenging tussen monsters, is er eigenlijk ook geen gelegenheid geweest voor vermenging na-oogst met MON810 korrels.

Op grond van deze ene waarneming kan niet met zekerheid worden aangegeven of mogelijkheid 1 dan wel mogelijkheid 2 aan de waarneming ten grondslag lag. Beide behoren echter tot de bekende andere mogelijke bronnen van vermenging, naast uitkruising, zoals hierboven beschreven.