

Voorstel voor een co-existentie- monitoringsprogramma t.b.v. het naast elkaar bestaan van genetisch gemodificeerde (GG) en niet GG- teelten in toekomstige praktijksituaties

1. Maïs

C.C.M. van de Wiel¹, E.J. Kok³, I.M.J. Scholtens³, O. Dolstra¹, M.J.M. Smulders¹ en L.A.P. Lotz²

¹ Wageningen UR Plant Breeding
Postbus 386, 6700 AJ Wageningen

² Wageningen UR Agrosysteemkunde
Postbus 16, 6700 AA, Wageningen

³ RIKILT - Wageningen UR
Postbus 230, 6700 AE, Wageningen

Voorstel voor een co-existentiemonitoringsprogramma t.b.v. het naast elkaar bestaan van genetisch gemodificeerde (GG) en niet-GG teelten in toekomstige praktijksituaties. 1. Maïs

C.C.M. van de Wiel¹, E.J. Kok³, I.M.J. Scholtens³, O. Dolstra¹, M.J.M. Smulders¹ en L.A.P. Lotz²

¹ Wageningen UR Plant Breeding
Postbus 386, 6700 AJ Wageningen

² Wageningen UR Agrosysteemkunde
Postbus 16, 6700 AA, Wageningen

Tel. +31 317 480556
E-mail bert.lotz@wur.nl

³ RIKILT - Wageningen UR
Postbus 230, 6700 AE, Wageningen

Wageningen UR Plant Breeding

Juni 2015

© 2015 Wageningen UR. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without prior written permission.

Wageningen UR is not responsible for any damage caused by using the content of this report.

Plant Breeding, part of Wageningen UR

Address : P.O.Box 386, 6700 AJ Wageningen, the Netherlands
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen, the Netherlands
Tel. : +31 317 48 10 36
e-mail : plantbreeding@wur.nl
internet : www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Wageningen-UR-Plant-Breeding-1.htm

Achtergrond

Ten behoeve van co-existentie van genetisch gemodificeerde (GG) en (bewust) niet-genetisch gemodificeerde primaire productie zijn maatregelen aanbevolen door de Commissie Co-existentie Primaire Sector ("Commissie van Dijk") in 2004, waaronder isolatieafstanden ter voorkoming van vermenging van niet-transgene percelen met transgenen boven een bepaalde drempelwaarde. Deze isolatieafstanden zijn vastgelegd in de Regeling Teelt¹. De Commissie Co-existentie Primaire Sector heeft aanbevolen een monitoring te verrichten tijdens de daadwerkelijke introductie van GG teelt om te evalueren of de maatregelen ook in de agrarische praktijk effectief zijn. Daarbij gaat het concreet om vast te stellen of er geen bovendrempelige vermenging heeft plaatsgevonden. Het gaat niet om controle en handhaving bij het nagaan of de maatregelen effectief zijn uitgevoerd.

Het Ministerie van EZ heeft Wageningen UR opdracht gegeven monitoringsprotocollen voor de gewassen maïs, aardappel en suikerbiet voor te stellen op basis van wetenschappelijke kennis over vermengingsroutes. De protocollen worden voorgesteld op basis van de navolgende doelstelling en randvoorwaarden. Doelstelling is een zo optimaal mogelijk beeld te krijgen van het al dan niet optreden van vermenging boven afgesproken drempelwaarden over het totale areaal op een kostenefficiënte manier. De concrete aanpak is in die zin pragmatisch van aard en dient geen wetenschappelijk onderzoeksdoel. De partijen die betrokken waren bij de afspraken omtrent co-existentie hebben bepaald dat de kosten van deze monitoring (inclusief bemonstering en analyse) deel uitmaken van de apparaatskosten van het restschadefonds (Kamerbrief over Stand van zaken co-existentie restschadefonds, 10 september 2008, DL. 2008/2234). Er wordt zodoende gestreefd naar representativiteit van de beoogde resultaten voor het hele areaal, maar om de uitvoeringskosten van een monitoringsprotocol proportioneel te houden wordt gekozen voor een focus op percelen in gebieden met de hoogste kans op mogelijke vermenging. Daarbij dient er bijzondere aandacht te zijn voor bijzondere teelten, d.w.z. bedrijven die zijn aangemerkt als 'risicovol' betreffende vervolgschade in de keten.

In dit rapport wordt een opzet voor een co-existentiemonitoringprogramma (CMP) voorgesteld voor maïs. De elementen in dit CMP worden toegelicht en beredeneerd aan de hand van de recente stand van het onderzoek aan (trans)genverspreiding bij maïs: de keuze van de te bemonsteren percelen op basis van de vastgestelde risicofactoren voor vermenging, de veldinspectie en bemonsteringsstrategie, de meetmethode en de kosten. Bij maïs liggen de risico's van verspreiding gedurende de teelt vooral in uitkruising via windbestuiving.

¹ Staatscourant 2014 nr. 35163

Doel en opzet van het rapport

In dit rapport is in opdracht van het Ministerie EZ t.b.v. de bij de co-existentie betrokken partijen een voorstel gedaan voor een protocol voor het monitoren van co-existentie in maïs, inclusief een beschrijving van de opties en de wetenschappelijke kennis die ten grondslag liggen aan de gemaakte keuzen. **Doel** van het monitoren van co-existentie is een zo optimaal mogelijk beeld te krijgen van het al dan niet optreden van vermenging boven afgesproken drempelwaarden over het totale maïsareaal op een kostenefficiënte manier. Daarvoor dient te worden voldaan aan drie **randvoorwaarden**: 1) basisprincipe is het streven naar representativiteit van de beoogde resultaten voor het hele areaal, echter, 2) op basis van proportionaliteit t.a.v. de apparaatskosten van het Co-existentierestschadefonds dient de concrete aanpak zo pragmatisch mogelijk te zijn, en tenslotte, 3) dient er bijzondere aandacht te zijn voor bijzondere teelten (bedrijven aangemerkt als 'risicovol' betreffende vervolgschade in de keten in de Kamerbrief van 10 september 2008, DL. 2008/2234, en in de meest recente EC aanbeveling 2010/C 200/01), d.w.z. de als GGO-vrij gedefinieerde teelten (bijv. Biologisch).

Het rapport is als volgt opgezet. Eerst wordt een voorstel voor een concreet co-existentiemonitoringprogramma (CMP) voor maïs beschreven dat is aangepast aan de specifieke gewaseigenschappen van maïs. De gemaakte keuzen t.b.v. een pragmatische invulling van het voorgestelde CMP worden in de opvolgende hoofdstukken toegelicht op basis van de huidige stand van zaken in het wetenschappelijk onderzoek aan (trans)genverspreiding in maïs. Er is nog beperkte ervaring met een CMP in maïs, bijvoorbeeld in Portugal, Tsjechië en Slowakije waar Bt MON810 maïs op beperkte schaal verbouwd wordt. Er is ook geen (Europese) standaard voor een CMP, maar er is wel voor maïs als eerste een Best Practice Document door het European Co-existence Bureau (ECoB) van het JRC uitgebracht (Rizov & Rodríguez-Cerezo 2014).

Inhoudsopgave

Achtergrond.....	5
Doel en opzet van het rapport.....	6
1. Voorgesteld protocol voor co-existentie-monitoring van maïs	8
2 Inleiding.....	11
3 Vereisten aan een Co-existentie-Monitoringsprogramma (CMP).....	12
4 Opzet CMP	14
4.1 Tijdstip selectie van percelen.....	14
4.2 Keuze van percelen	14
4.3 Te toetsen randvoorwaarden.....	15
4.4 Tijdstip van monsternamen	16
4.5 Bemonsteringsmethode	16
5 Toelichting op de aanpak van het CMP	19
5.1 Ontwikkelingen in het wetenschappelijk onderzoek aan uitkruising bij maïs onder agronomische omstandigheden sinds het rapport van de CCPS.....	19
5.2 Snijmaïs.....	20
5.3 Bemonsteringsstrategie	21
5.4 Kosten.....	24
6 Referenties	25
Appendix	28
i Bemonstering van bulkproducten	28
ii Kwantitatieve metingen van transgenen door real-time PCR	30
ii-1 Algemeen.....	30
ii-2 Afhankelijkheid meetresultaten van eigenschappen van de maïskorrel.....	31
ii-3 Specificaties van de meetbetrouwbaarheid.....	32
ii-4 Procedure	33
ii-5 Kosten	33

1. Voorgesteld protocol voor co-existentie monitoring van maïs²

De belangrijkste mogelijke vermengingsroute voor maïs is uitkruising van het niet-GG perceel met een GG perceel/percelen via pollen dat bij maïs via wind verspreid wordt. Het optreden hiervan kan vastgesteld worden door bemonstering van niet-GG percelen rond het oogsttijdstip.

Concreet dienen de volgende stappen genomen te worden:

1. *Selecteren te bemonsteren percelen na introductie van GG teelt.*
 - a. GG percelen worden geselecteerd uit het 'Register GGO-teelt' bij DR (Dienst Regelingen) vanaf 1 juni.
 - b. Percelen binnen twee maal de maximale isolatieafstand (500 en 50 m voor respectievelijk als GG-vrij gedefinieerde en niet-GG teelten) komen in aanmerking voor monitoring. Om deze percelen te selecteren wordt gebruik gemaakt van perceelkaarten en adresgegevens van telers uit de Gecombineerde Opgave GDI ("metellingen") van DR, gecontroleerd door veldonderzoek ter plaatse (waarbij ook overige informatie verzameld wordt, zie onder 2).
 - c. Bij geleidelijke introductie is het totale aantal GG percelen waarschijnlijk laag, zodat binnen het beschikbare budget alle combinaties van een GG perceel met een geschikt GG-vrij/niet-GG perceel kunnen worden geselecteerd voor monitoring. Het voorstel is een maximum van 10 GG percelen aan te houden. Concreet worden dan per jaar alle combinaties van een GG en een als GG-vrij gedefinieerd/niet-GG perceel binnen 500/50 meter geselecteerd tot een maximum van tien t.b.v. monitoring. Zodra bij een meer grootschalige teelt van hogere aantallen combinaties GG en GG-vrij/niet-GG dan het geplande maximum van 10 sprake is (in principe vanaf ≥ 11 GG percelen), vindt een selectie van de perceelcombinaties plaats:
 - i. Alle GG percelen met GG-vrij gedefinieerde teelten binnen een afstand van 500 m. Bij aanwezigheid van zulke teelten binnen genoemde afstand van 500 m wordt voor elk GG perceel één bijhorend GG-vrij perceel meegenomen in de monitoring (tot een maximum van 10 zulke perceelcombinaties). Indien er binnen 500 m van een geselecteerd GG perceel meerdere GG-vrije percelen voorkomen, wordt voor monitoring één perceelcombinatie uitgekozen volgens de volgende criteria (tenzij alle combinaties meegenomen kunnen worden onder het bovenstaande criterium van maximaal 10 percelen):
 1. Het niet-GG perceel met de kortste afstand tot het GG perceel
 2. Indien meerdere percelen op gelijke afstand, de kleinste in oppervlak en/of het minst diepe perceel t.o.v. het GG perceel en/of degene die nog één of meerdere andere GG percelen binnen 500 m heeft liggen.
 - ii. Indien er minder dan 10 combinaties met als GG-vrij gedefinieerde teelten onder i) te vinden zijn, worden vervolgens combinaties van elk een GG perceel met een (gangbare) niet-GG teelt binnen een afstand van 50 m geselecteerd, tot in totaal het maximum van 10

² Het betreft hier een direct toepasbaar protocol op basis van de kennis over co-existentie bij maïs op het moment van opstellen (2014). Tot aan het moment van toepassing na daadwerkelijke introductie van GG maïsteelt kan tussentijdse aanpassing nodig zijn, indien specifiek van toepassing zijnde EU richtlijnen (zoals 2004/787/EG) of aanbevelingen (zoals 2010/C 200/01) veranderen of nieuwe verschijnen, of door nieuwe publicaties, bijv. best practice documenten vanuit ECoB (European Coexistence Bureau).

perceelcombinaties bereikt is. Indien er binnen 50 m van een GG perceel meerdere niet-GG percelen voorkomen, wordt voor monitoring een perceelcombinatie uitgekozen volgens de volgende criteria:

1. Het niet-GG perceel met de kortste afstand tot het GG perceel
2. Indien meerdere percelen op gelijke afstand, de kleinste in oppervlak en/of het minst diepe perceel t.o.v. het GG perceel en/of degene die nog één of meerdere andere GG percelen binnen 50 m heeft liggen.
- iii. Bij verdere keuze kan rekening gehouden worden met spreiding over verschillende teeltypen (bijv. snij- of korrelmaïs).

2. *Randvoorwaarden controleren:*

- a. Toestemming vragen aan telers voor monitoring.
- b. Vastleggen van geteelde rassen in de GG percelen en de geselecteerde niet-GG percelen. Controleren op het volgen van richtlijnen/verordening bij het zaaien van GG zaad (zaaimachinerie apart houden voor GG en niet-GG, dan wel controle op reiniging van de machinerie na zaaien van het GG perceel) is niet goed mogelijk aangezien perceelselectie pas goed mogelijk is na 1 juni, d.w.z. na inzaaien (zie ook c en sectie 3.3).
- c. Zaaizaad dient al te voldoen aan bepaalde ISTA richtlijnen voor zuiverheid, waarop ook controle plaatsvindt in het bestaande systeem voor conventionele teelten.

3. *Bemonsteren van de oogst op de geselecteerde niet-GG percelen in september/oktober.*

Een pragmatische bemonstering van oogsten is beschreven in de Europese aanbeveling 2004/787/EG, de praktische uitwerking van Verordening 1830/2003 (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?qid=1422363836814&uri=CELEX:32004H0787>). Hierbij worden volgens een aantal ISO-richtlijnen verspreid over een partij monsters genomen, waarbij het aantal afhangt van de omvang van de partij, voor de oogst van een perceel van 1 ha komt dit neer op tien monsters van elk een kilo. De helft van elk van deze monsters wordt samengevoegd tot één bulkmonster, zodat de laboratoriumanalyse in eerste instantie zo efficiënt mogelijk plaats kan vinden. Bij bijzondere uitkomsten of in de buurt van de drempelwaarde kan de andere helft van de monsters individueel getest worden. Afhankelijk van het totaal aantal te nemen monsters worden verspreid over zoveel mogelijk containers één of meerdere monsters genomen, voordat de containers naar verzamelbak, kuil of silo worden afgevoerd.

Deze bemonsteringsmethode is in principe op zowel korrel- als snijmaïs toe te passen en heeft als voordeel dat kostenefficiëntie geoptimaliseerd is. Voor snijmaïs is er nog enige discussie over de nauwkeurigheid waarmee transgenvermenging is vast te stellen vanwege de heterogeniteit van het mengsel van korrels en allerlei vegetatieve plantendelen waarop de analyse moet worden uitgevoerd.

Er is daarom een door de ECoB BPD gesuggereerd alternatief³, namelijk om vlak voor de oogst van de snijmaïs kolven te verzamelen om transgenvermenging direct in de korrel te bepalen, d.w.z. dat deel van de plant dat het product is van mogelijke uitkruising met een naburig GG perceel. Een pragmatische aanpak voor het kolven verzamelen is langs enkele transecten over een perceel kolven te verzamelen en deze samenvoegen tot een bulkmonster zoals in de bovengenoemde methode conform 2004/787/EG. Een nadeel hiervan is dat het arbeidsintensiever is en dat er nog geen

³ Het ECoB Best Practice Document (Rizov & Rodríguez-Cerezo 2014) adviseert voor nauwkeurigheid korrels te analyseren vanwege de nog bestaande wetenschappelijke onzekerheid over de precisie in snijmaïs. Dit aspect zou in aanmerking komen voor een update bij de start van dit CMP, zoals aangegeven in voetnoot 2.

duidelijke consensus in de vorm van richtlijnen of Best Practices voor is. Er zijn echter al wel voorbeelden van pragmatische transectbemonstering in EU Lidstaten met commerciële GG maïsteelt (zie sectie 3.5).

4. *Monsters verpakken en labelen voor overdracht aan analyselaboratorium.* RIKILT kwantificeert GG gehalte in monsters met een voor het transgene “event” van toepassing zijnde real-time PCR methode conform EU standaarden.
5. *Rapportage* aan de financier van het CMP en/of Ministerie van EZ.

2 Inleiding

In 2003 kwam de EU met een aanbeveling dat co-existentie van GG en niet-GG teelten geregeld zou moeten worden, zodanig dat keuzevrijheid voor telers zowel als voor consumenten gegarandeerd is (2003/557/EG). Het opstellen van maatregelen hiervoor is vervolgens aan de lidstaten overgelaten. Afhankelijk van plaatselijke omstandigheden dienen de lidstaten zorg te dragen dat alle teelten ook praktisch uitvoerbaar blijven onder de garantie van het in stand houden van een GG-vrije productieketen. Voor het definiëren van een GG-vrije productieketen wordt een drempelwaarde in acht genomen waarboven een product als GG-houdend gelabeld dient te worden. Op dit moment is de officieel door de EU gehanteerde drempelwaarde waarboven een product als GGO moet worden aangemerkt 0,9% (1829/2003/EG, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?qid=1422356807641&uri=CELEX:32003R1829>). In 2007 is door de Europese Raad van Ministers de 0,9% drempel waarde ook van toepassing verklaard op de bewust niet-GG teelten, zoals de Biologische teelt. Vervolgens heeft in 2010 de EC een nieuwe aanbeveling (2010/C 200/01, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=OJ:C:2010:200:TOC>) uitgebracht (waarmee 2003/556/EG herroepen werd), waarin de Lidstaten flexibiliteit wordt geboden m.b.t. aan te houden drempelwaardes in relatie tot te verwachten economische schade. Dit kan betekenen dat er geen reden voor extra maatregelen is voor het halen van een bepaalde drempelwaarde in het geval labeling als GG geen economische consequenties heeft. Voor als “GM-vrij” gedefinieerde teelten (bijv. Biologisch) kan het betekenen dat op economische gronden naar lagere drempelwaardes gestreefd wordt dan voor conventionele teelten, afhankelijk van lokale regelgeving en omstandigheden, en van consumentenverwachtingen, dit alles onder behoud van proportionaliteit t.a.v. lastenverhogingen voor andere telers.

Voor Nederland heeft de **Commissie Co-existentie Primaire Sector (CCPS)** onder voorzitterschap van de heer J. van Dijk, die de diverse belanghebbenden uit de primaire sector omvatte, in 2004 advies uitgebracht voor drie gewassen, te weten aardappel, suikerbiet en maïs (Rapport Commissie Co-existentie Primaire Sector, <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/kst-29404-6-b1>). Naast algemene aanbevelingen, zoals het tijdig aanmelden van GG teelten en het informeren van burens, is in het rapport van de CCPS specifiek voor maïs aanbevolen een isolatieafstand van 25 m tot gangbare teelten en 250 m tot bewust niet-GG teelten (bijv. Biologische) in acht te nemen. Bij het vaststellen van deze afstanden is mede gebruik gemaakt van een aan het rapport van de CCPS toegevoegd literatuuroverzicht over uitkruising door Van de Wiel & Lotz (2004).

Bij deze isolatieafstanden tekende de CCPS aan dat aanvullend onderzoek in de Nederlandse agrarische situatie geboden was in het licht van nog bestaande onzekerheden in de wetenschappelijke literatuur. Dit aanvullend onderzoek heeft in 2006 en 2007 zijn beslag gekregen en daarover is apart gerapporteerd (Van de Wiel *et al.* 2008, 2009). Om de co-existentieafspraken zeker te stellen heeft de CCPS ook aanbevolen om te gaan “*monitoren*” zodra door introductie van GG teelt reëel bestaande situaties van co-existentie zouden ontstaan. In dit rapport wordt een protocol voorgesteld voor een programma om de effectiviteit van de co-existentieafspraken in de toekomstige praktijk te volgen. Ter onderbouwing van het voorgestelde protocol voor maïs en voor het inzichtelijk maken van de gemaakte keuzen hierbij wordt hier informatie besproken over de in dit verband van belang zijnde bijzondere kenmerken van dit gewas. In het navolgende wordt doelbewust de kale term “monitoring” zoveel mogelijk vermeden, aangezien deze ook reeds gebruikt wordt i.v.m. het evalueren van biologische veiligheid van GG gewassen onder EU richtlijn 2001/18/EG. Als nauwkeuriger omschrijving zal daarom gesproken worden van **Co-existentie-MonitoringsProgramma (CMP)**.

3 Vereisten aan een Co-existentie-Monitoringsprogramma (CMP)

In dit rapport wordt een monitoringsprotocol voorgesteld dat zo goed mogelijk aansluit bij het oorspronkelijk door de CCPS (“Commissie Van Dijk”) geschetste kader voor de opzet van een CMP. Voor alle duidelijkheid wordt in het onderstaande kader de vereisten aan een dergelijk programma uit het Rapport van de CCPS geciteerd (Paragraaf 3.6). Bij het opstellen van het voorgestelde monitoringsprotocol is voor een pragmatische invalshoek gekozen. Doelstelling is namelijk een zo optimaal mogelijk beeld te krijgen van het al dan niet optreden van vermenging boven afgesproken drempelwaarden over het totale areaal op een kostenefficiënte manier. De concrete aanpak dient verder geen wetenschappelijk onderzoeksdoel. De partijen die betrokken waren bij de afspraken omtrent co-existentie hebben bepaald dat de kosten van deze monitoring (inclusief bemonstering en analyse) deel uitmaken van de apparaatskosten van het restschadefonds (Kamerbrief over Stand van zaken co-existentie restschadefonds, 10 september 2008, DL. 2008/2234). Het combineren van een wetenschappelijk verantwoorde onderzoeksaanpak met voldoende kosteneffectiviteit is leidend in dit rapport, waarbij ook de aanbevelingen van de CCPS specifiek besproken worden.

Coëxistentie monitoring (uit CCPS “Commissie Van Dijk” rapport, 3.6)

Monitoring van de coëxistentiemaatregelen heeft tot doel de effectiviteit van de maatregelen, te toetsen om deze indien nodig te kunnen bijstellen⁹.

3.6.1 Principe van monitoring

Monitoring van de coëxistentie maatregelen vereist

- Vaststellen zuiverheid uitgangsmateriaal (beginsituatie)
- Vaststellen welke coëxistentie maatregelen zijn uitgevoerd (controle naleving)
- Vaststellen wat het totaaleffect is van de maatregelen; eventuele vermenging in het geogoste product meten (eindsituatie)

Indien het gewenste resultaat is bereikt (geen extra vermenging) kunnen de maatregelen behouden worden of na verloop van tijd worden versoepeld.

Indien onbedoeld toch vermenging is opgetreden is het noodzakelijk na te gaan of de oorzaak kan worden vastgesteld. Bijvoorbeeld:

- via onzuiver uitgangsmateriaal
- via uitkruising; de isolatieafstanden en/of bufferzones zijn onvoldoende groot
- via versleping; tijdens teelt, oogst, transport of opslag van het product of door opslagplanten

Wanneer de oorzaak van vermenging is vastgesteld wordt(en) de betreffende maatregel(en) aangepast.

3.6.2 Protocol voor monitoring

Voor het protocol voor monitoring doet de commissie onderstaande aanbevelingen. Daarnaast verwijzen we naar het memo van VROM over monsternamen en detectie (bijlage 8).

a) Tijdstip monsternamen

Zowel vóór, tijdens, als na de teelt dienen monsters genomen te worden.

⁹ Dit is iets anders dan controle en handhaving waarbij wordt nagegaan of de maatregelen naar behoren zijn uitgevoerd.

Het tijdstip van monsternamen bouwt op dit moment genoeg waarborgen in dat monitoring op een juiste manier plaatsvindt. Ook kan beter worden nagegaan wat de mogelijke oorzaak is van vermenging.

b) Detectie/analyse

Om de kosten van de analyses zoveel mogelijk in te perken wordt geadviseerd om eerst het geogste product te analyseren. Indien uit analyse van het geogste product blijkt dat ongewenste vermenging is opgetreden, kunnen de overige monsters geanalyseerd worden om zo de oorzaak van de vermenging vast te stellen.

c) Frequentie

In de introductiefase (3 jaar) van de ggo teelt frequent monitoren en controleren (een representatieve steekproef). De frequentie kan afnemen als blijkt dat de maatregelen het gewenste effect hebben.

d) Rapportage

De resultaten van de monitoring worden jaarlijks gerapporteerd aan de betrokken partijen.

e) Consequenties van de uitkomst

Indien nodig worden de coëxistentiemaatregelen bijgesteld.

4 Opzet CMP

Hieronder worden de diverse mogelijke stappen voor een CMP protocol geïnterpreteerd aan de hand van (trans)genverspreidingsroutes in maïs en wordt bediscussieerd hoe of in welke mate ze aanbevolen worden in het uiteindelijk voorgestelde protocol dat hierboven beschreven is. Het gaat om de keuze van te bemonsteren percelen, de te testen randvoorwaarden zoals zaaizaadzuiverheid, en de bemonsteringsstrategie. Voor de precieze wetenschappelijke achtergronden bij de te maken keuzen wordt telkens verwezen naar latere hoofdstukken waarin deze meer gedetailleerd worden uitgewerkt.

4.1 Tijdstip selectie van percelen

GG percelen kunnen 30 dagen na aanvang van de teelt geselecteerd worden, aangezien vanaf dat moment de teler volgens de geldende regelgeving (artikel 12 van het Besluit GGO) alle GG percelen moet hebben aangemeld en deze GG percelen vervolgens openbaar worden gemaakt in een centraal register (http://www2.hetInVloket.nl/Kaarten_VROM/index.html). De meest uitgebreide inventarisatie van omliggende gewaspercelen die in aanmerking komen voor een CMP is mogelijk met de gegevens uit de Gecombineerde opgave aan de Dienst Regelingen (DR) die tussen 1 april en 15 mei plaatsvindt (de zogenaamde “meitellingen”). Op basis van deze databronnen zou in juni een GG perceelselectie inclusief de naburige maïsteelten kunnen worden uitgevoerd. Deze perceelselectie zou meteen ook gecontroleerd kunnen worden via een eigen veldinspectie, die dan tegelijk gecombineerd kan worden met vragen van toestemming voor perceelbezoek aan de betrokken telers en de overige te verrichten waarnemingen (zie hieronder). Veldinspectie zou ook eventueel het niet op tijd voor de uit te voeren waarnemingen beschikbaar komen van de perceelgegevens kunnen ondervangen. Een beperking van het gebruik van de “meitellingen” is het niet kunnen monitoren vanaf de start van de teelten (zie verder hieronder 3.3), d.w.z. de zaaifase.

Conclusie voor het protocol

In aanmerking komende combinaties van GG en niet-GG/GG-vrije percelen worden zo spoedig mogelijk na 1 juni geïnterpreteerd, zoveel mogelijk aan de hand van de “meitellingen”.

4.2 Keuze van percelen

Het aantal te bemonsteren percelen kan pragmatisch ingeperkt worden door zich primair te richten op die met de grootste kans op uitkruising met een GG perceel. Dat betekent dat de niet-GG percelen in de directe nabijheid van aangemelde GG percelen het eerst in aanmerking komen. Uit pragmatische overwegingen ziet men dan af van willekeurige (‘random’) bemonstering over het totale maïs areaal.

De voorgestelde keuze van percelen hangt van een aantal factoren af:

- Het introductiescenario van de desbetreffende GG teelt. Bij een bescheiden start is het voorstelbaar dat alle percelen in de directe nabijheid van een GG perceel eventueel bemonsterd kunnen worden. Bij een snelle opbouw zoals in Noord-Amerika bij bijv. de introductie van herbicide-tolerante (HT) GG gewassen heeft plaatsgevonden zou een keuze gemaakt moeten worden teneinde binnen reële budgetten te kunnen blijven.
- Of het een conventioneel dan wel een bewust niet-GG (biologisch) perceel betreft. Voor conventionele niet-GG percelen zou volstaan kunnen worden met het testen

van de naburige percelen, terwijl voor de bewust niet-GG teelten over aanzienlijk grotere afstanden gekeken zou moeten worden (vergelijk de vastgestelde isolatieafstanden van 25 en 250 m voor resp. de conventionele en bewust GG-vrije teelt).

- De kans op uitkruising tussen percelen. Van de volgende combinatie van perceelseigenschappen is beschreven dat hij de grootste kans op uitkruising vanuit naburige GG percelen geeft (zie voor een toelichting hieronder sectie 4.1):
 - Percelen die kleiner dan 1 ha zijn. Grotere percelen hebben meer compenserende massa niet-transgeen product.
 - Percelen die aanzienlijk kleiner zijn dan het GG buurperceel (de helft van de omvang of kleiner), waardoor pollencompetitie in het nadeel van het betreffende perceel uitvalt met een hogere kans op uitkruising met het buurperceel tot gevolg.
 - Percelen waar meerdere GG percelen direct omheen liggen, waardoor uitkruising in principe van meerdere kanten zou kunnen plaatsvinden, zodat het compenserende vermogen van het niet-transgene perceel vermindert.
 - Gelijktijdigheid van de bloei van de geteelde rassen, dus overeenkomstige rijpingstypen die ongeveer in dezelfde periode worden ingezaaid.
- Het soort maïsteelt. Voor snijmaïs is verondersteld dat de op DNA-niveau gemeten waarden aan uitkruising lager liggen dan voor korrels door de verdunning met het niet-transgene vegetatieve materiaal. Het beperkte onderzoek dat hiernaar verricht is, heeft echter aannemelijk gemaakt dat de mate van “verdunning” betrekkelijk klein is, zodat dit geen grote rol kan spelen in de keuze van percelen (zie voor een toelichting hieronder sectie 4.2). Suikermaïsteelt (met een relatief klein areaal in Nederland) neemt al een behoorlijke afstand tot andere maïstypen in acht, omdat kruisbestuiving met andere maïstypen korrels met een slechtere smaak tot gevolg heeft. De kans dat een suikermaïisperceel boven de EU drempelwaarde voor labeling van 0,9% uitkomt is dus gering. Daarom zou suikermaïs vooral in aanmerking komen voor een CMP in combinatie met bewust niet-GG teelt waarvoor een isolatieafstand in een vergelijkbare orde van grootte is afgesproken (d.w.z. 250 m).

Conclusies voor het protocol

Afhankelijk van het aantal voorkomende combinaties van naburige GG en niet-GG maïspancelen wordt een inperking gemaakt door te kiezen voor “worst case” situaties, met prioriteit voor GG-vrije teelten (d.w.z. voor een bewust niet-GG markt) tot op 500 m van een GG perceel. Het is aan te bevelen de geteelde rassen in zowel GG als niet-GG/GG-vrije percelen vast te leggen.

4.3 Te toetsen randvoorwaarden

Om oorzaken van ongewenste vermenging in praktijkpercelen vast te kunnen stellen heeft de CCPS al aangegeven dat aan de volgende randvoorwaarden moet worden voldaan:

- Het GG gehalte van het zaaigoed voor de te toetsen velden dient vastgesteld worden. Dit kan met standaard bemonsteringsmethoden voor zaaizaad conform ISTA (International Seed Testing Association) regels uitgevoerd worden. Zaaizaad dient al te voldoen aan bepaalde ISTA richtlijnen voor zuiverheid, waarop ook controle plaatsvindt in het bestaande certificeringssysteem voor conventionele teelten. Op dit moment zijn er nog geen door de EU vastgestelde GG drempelwaardes voor zaaizaad, maar zodra die er zijn, mag ervan uitgegaan worden dat ook daarop een vergelijkbare controle zal plaatsvinden. Een extra controle hierop zou dus in een pragmatische aanpak achterwegen gelaten kunnen worden.

- Er moet gecontroleerd worden op de mogelijkheid van vermenging tijdens het zaaien doordat de zaaimachinerie niet gescheiden is gehouden tussen GG en niet-GG velden, of tussendoor niet goed is schoongemaakt.

Deze randvoorwaarden kunnen niet direct getoetst worden doordat percelen pas na de “meitellingen” geselecteerd zijn, zoals hierboven onder 3.1 aangegeven. Om in een dergelijk geval vermenging die plaatsvond voor of tijdens het zaaien als oorzaak voor vermenging in de oogst te toetsen kan het al dan niet transgene karakter van de planten vastgesteld worden door een monster van de vegetatieve delen ervan te nemen. Dit zou echter praktisch gezien alleen goed uitvoerbaar zijn bij het bemonsteren van kolven. Men kan dan naast de korrels (die het enige product van uitkruising zijn) de vegetatieve onderdelen van de kolven bemonsteren (zie voor de bemonstering verder sectie 3.5). Om uitkruising met eventueel aanwezige niet-bemonsterde transgene planten uit het zelfde perceel te toetsen zouden echter veel meer planten bemonsterd moeten worden, wat behoorlijk kostenverhogend zou werken, met name doordat het bemonsteren dan erg arbeidsintensief wordt. Deze activiteiten zouden dus niet goed passen in een pragmatische aanpak van een CMP.

Conclusies voor het protocol:

Er bestaan al monitoringsystemen voor zuiverheid van gecertificeerd zaaizaad. Waar mogelijk kan het nuttig zijn om het gebruik van machinerie in de zaaifase te controleren op mogelijkheden voor vermenging via zaaizaad, maar dit zal in het algemeen moeilijk haalbaar zijn op basis van selectie van percelen via de aanmelding van GG teelten die tot 30 dagen na het zaaien kan plaatsvinden, en de “meitellingen”.

4.4 Tijdstip van monstername

Monstername in geselecteerde percelen kan het efficiëntst vlak na of tijdens de oogst plaatsvinden, eventueel vlak voor de oogst.

Als tijdstip voor monstername gaf de CCPS voor, *tijdens* en na de teelt aan om zo goed mogelijk oorzaken van vermenging te kunnen onderscheiden:

- *Voor* de teelt is hierboven besproken onder 3.3.
- Zowel *tijdens* als na de teelt bemonsteren moet als minder praktisch aangemerkt worden, aangezien het in beide gevallen zal gaan om het vaststellen van vermenging door uitkruising met een naburig GG perceel. Eén van beide zou in principe moeten voldoen en bovendien moet er rekening mee worden gehouden dat de uitkomsten met de binnen de EU afgesproken GG-kwantificeringsmethode op DNA niveau zullen variëren met het ontwikkelingsstadium van de kolf, en met dat van de plant in het geval van snijmaïs (zie voor meer details Appendix ii-2). Er kan dus het beste bemonsterd worden zo dicht mogelijk op het normale rijpingsstadium van de oogst om resultaten te verkrijgen die ook representatief zijn voor het uiteindelijke ge oogste product, d.w.z. gedurende of kort na de oogst.

Conclusies voor het protocol

Monstername kan het beste plaatsvinden zo dicht mogelijk rondom het oogsttijdstip.

4.5 Bemonsteringsmethode

De meest pragmatische bemonsteringsmethode sluit aan bij de huidige routinepraktijk van bemonsteringen van partijen, scheepsladingen etc. en is in principe ook toe te passen op allerlei soorten oogsten. Deze wordt beschreven in de Europese aanbeveling 2004/787/EG over GG bemonstering, de praktische uitwerking van Verordening 1830/2003 (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?qid=1422363836814&uri=CELEX:32004H0787>). Hierbij worden

volgens een aantal ISO-richtlijnen verspreid over een partij monsters genomen, waarbij het aantal afhangt van de omvang van de partij, voor de oogst van een perceel van 1 ha komt dit neer op een aantal van tien monsters van elk een kilo (zie annex i). De helft van elk van deze monsters wordt samengevoegd tot één bulkmonster, zodat de laboratoriumanalyse in eerste instantie zo efficiënt mogelijk plaats kan vinden. Bij bijzondere uitkomsten of in de buurt van de drempelwaarde kan de andere helft van de monsters individueel getest worden. Een dergelijke methode is bijvoorbeeld toegepast in de GG teeltpraktijk in Slowakije (Horváth *et al.* 2012). Praktisch gesproken het meest efficiënt zal dan zijn om monsters te trekken uit containers met de oogst of op gezette tijden een monster te trekken uit de oogststroom op het veld naar analogie van bestaande richtlijnen voor monsternamen uit goederenstromen tijdens overladingen.

Deze methode is direct toepasbaar op korrels. Voor snijmaïs is deze methode alleen bruikbaar als transgenkwantificering op monsters van de hele plant wordt uitgevoerd zoals die in de praktijk in verhakselde vorm geoogst wordt. De kwantificering van transgenen is complexer in de meer heterogene mengsels van de hele plant in snijmaïs dan in alleen de korrels, waardoor de uitkomsten minder precies worden. Voorlopig onderzoek heeft aangegeven dat in snijmaïs het verwachte “verdunningseffect” van DNA uit de vegetatieve delen op gevonden transgenvermengingswaarden die afkomstig zijn vanuit het DNA van de korrels, beperkt is. Bovendien leidt de complexe matrix van allerlei verschillende plantonderdelen tot een grotere mate aan variabiliteit in de uitkomsten dan bij korrels alleen (zie sectie 4.2 voor meer details). Het BPD monitoring van de ECoB (Rizov & Rodríguez-Cerezo, 2014) adviseert daarom voor snijmaïs om de korrels te analyseren voor transgenkwantificering. De korrels zullen niet gemakkelijk uit een oogststroom van verhakselde planten gehaald kunnen worden; ze ondergaan ook normaal gesproken tijdens de oogst een kneuzingsbehandeling. Indien men bij snijmaïs de korrels wil bemonsteren, kan men het best apart voor de oogst kolven in het perceel verzamelen.

Het verzamelen van kolven om een uitspraak te doen over het gemiddelde vermengingspercentage van een perceel brengt een arbeidsintensievere bemonsteringsstrategie met zich mee. Een vermenging via uitkruising zal niet homogeen verdeeld zitten in een perceel. Bij naburige percelen vindt men in beginsel de hoogste waarden in de rand die toegekeerd is naar het GG perceel waar het transgene pollen vandaan komt en van daaruit dieper het perceel in nemen de waarden vrij snel af. Naar mate een perceel verder weg gelegen is van het GG perceel zal deze verdeling minder scherp en onregelmatiger worden, afhankelijk van luchtstromen e.d. (zie Van de Wiel & Lotz 2004, 2006). In EU projecten en binnen Lidstaten zijn verschillende bemonsteringsstrategieën bestudeerd en toegepast en er is nog geen duidelijke consensus over vastgelegd.

In grote lijnen zijn er twee soorten strategieën:

1. Een variant die van hetzelfde principe uitgaat als bovenstaande methode in 2004/787/EG, namelijk het vormen van een bulkmonster voor DNA analyse, in dit geval uit een representatieve verzameling kolven uit het perceel. Daar is een studie aan verricht door Allnutt *et al.* (2008). De statistisch beste resultaten werden hiermee bereikt met bemonsteren volgens een van tevoren gegenereerd random patroon door het perceel heen. Dat is echter nogal complex in de uitvoering van de bemonstering. Een pragmatischer invulling is een bemonstering langs enkele transecten door een perceel. Een dergelijke benadering is toegepast in de GG teeltpraktijk in Tsjechië en Portugal (Quedas & Cruz de Carvalho 2012) en zou gebruikt kunnen worden voor het bemonsteren van kolven in snijmaïspercelen.
2. Een tweede type methode speelt in meer of mindere mate in op het boven beschreven patroon van uitkruising in een perceel van de rand naar binnen toe. Hierbij worden kolven verzameld op verschillende punten langs transecten van de rand naar binnen het perceel in en dat zo optimaal mogelijk verspreid over het

perceel. Vervolgens worden aan de hand van het toepassen van een model de op de monsterpunten gemeten uitkruisingswaarden geëxtrapoleerd naar een gemiddelde waarde voor het hele perceel. Deze methode sluit aan bij strategieën zoals die gebruikt zijn in het wetenschappelijk onderzoek aan uitkruising bij maïs onder praktijkomstandigheden, bijv. ook in praktijktoetsen die in Nederland zijn uitgevoerd in 2006 en 2007 (Van de Wiel *et al.* 2008, 2009). Hier bestaan verschillende varianten van. Een interessant voorbeeld hiervan is het werk van Messeguer *et al.* (2006, 2009), die vermenging in reëel bestaande combinaties van GG en niet-GG teelten in Spanje onderzocht hebben. Hierbij worden verspreid over het hele te toetsen perceel op drie plaatsen aan de buitenkant (op 0, 3 en 10 m vanuit de rand) kolven gemonsterd, dus daar waar de hoogste kans op uitkruising vanuit naburige percelen is, plus controles in het midden van het perceel. Verder zijn er verschillende meer of minder precieze varianten op deze veldbemonsteringsmethoden beschreven. Met deze varianten wordt een preciezer inzicht verkregen in de oorzaak voor een eventueel aangetroffen vermenging, d.w.z. het ruimtelijke effect van afstand en vorm/grootte van GG zowel als niet-GG percelen op vermenging door uitkruising kan beter vastgesteld worden. Bovenstaande twee voordelen zullen echter minder goed opgaan voor verder van elkaar gelegen percelen (d.w.z. in de orde van de afstand voor bewust niet-GG teelten van 250 m). Bovendien hebben al deze varianten het nadeel dat ze behalve intensief veldwerk het analyseren van een groot aantal individuele monsters per perceel met zich meebrengen om een redelijke betrouwbaarheid te bereiken en daarmee al snel te duur worden voor een pragmatische bemonstering. Voor een gedetailleerde toelichting zie hieronder 4.3.

Conclusies voor het protocol:

Een pragmatische bemonstering van oogsten is beschreven in de Europese aanbeveling 2004/787/EG. Hierbij worden verspreid over een partij monsters genomen, waarbij het aantal afhangt van de omvang van de partij, en samengevoegd tot een bulkmonster, zodat op een beperkt aantal monsters een DNA analyse wordt uitgevoerd. Wegens nog bestaande wetenschappelijke onzekerheden over de precisie van bemonstering en analyse in snijmaïs zou een bemonstering van kolven door het hele perceel overwogen moeten worden. Hiervoor bestaat echter geen consensusmethode wat betreft de optimale afweging tussen precisie en kosteneffectiviteit. In principe zou een methode in aanmerking komen waarbij de DNA analyse ook via een bulkmonster gedaan wordt, op basis van een bemonstering via enkele transecten door het perceel. Het verdient aanbeveling bij de start van een CMP een update te doen betreffende ontwikkelingen in consensusdocumenten of BPDs van de ECoB.

5 Toelichting op de aanpak van het CMP

5.1 Ontwikkelingen in het wetenschappelijk onderzoek aan uitkruising bij maïs onder agronomische omstandigheden sinds het rapport van de CCPS

Sinds het uitkomen van het rapport van de CCPS ("Commissie van Dijk") in 2004 zijn er praktijktoetsen in Nederland uitgevoerd in 2006 en 2007 (gerapporteerd in Van de Wiel *et al.* 2008 en 2009) en is er ook het nodige in de wetenschappelijke literatuur gepubliceerd. Inmiddels is door het European Coexistence Bureau een Best Practice Document (BPD) over co-existentie van maïsteelten uitgebracht (Czarnak-Klos & Rodríguez-Cerezo 2010). Daarnaast is er een BPD over monitoring van co-existentie in maïs in de pijplijn (Rizov & Rodríguez-Cerezo 2014).

Naast vele deelstudies zijn er een aantal empirische modelleringsstudies aan grotere aantallen veldproeven verschenen (Gustafson *et al.* 2006, met een update door Marceau *et al.* 2013, Weekes *et al.* 2007 (UK Farm Scale Evaluations (FSE)), Riesgo *et al.* 2010). Ook is een Frans ruimtelijk model, MAPOD, gepubliceerd (Angevin *et al.* 2008). Deze hebben in grote lijnen het eerdere beeld bevestigd dat uitkruising in een niet-GG perceel doorgaans na 25 m beneden de 0,9% komt en na 250 m beneden de 0,1%. Dit komt ook overeen met de resultaten van Messeguer *et al.* (2006) die een twaalfstal velden hebben bekeken in een reële agrarische situatie met Bt maïsteelt in Spanje. Het BPD co-existentie van maïsteelten (Czarnak-Klos & Rodríguez-Cerezo 2010) geeft op basis van een evaluatie van door de leden van de ECoB Technische Werkgroep aangedragen studies 15-50 m aan voor een drempelwaarde van 0,9% en 105 tot 250-500 m voor een drempelwaarde van 0,1% (bij het laatste getal, 500 m zou naar schatting in geen enkel monster meer GM gedetecteerd moeten worden).

Uit het geheel aan studies komen de volgende typen percelen naar voren met een grotere kans op uitkruising:

- Percelen die kleiner dan 1 ha zijn. Grotere percelen hebben meer compenserende massa niet-transgeen product.
- Percelen waar een erg groot verschil in grootte bestaat met het buurperceel, d.w.z. meer dan twee maal zo klein als het (GG) donorperceel, waardoor pollencompetitie in het nadeel van het betreffende perceel uitvalt met een hogere kans op uitkruising met het buurperceel tot gevolg. Door Messéan *et al.* (2006) wordt op basis van modellering met het programma MAPOD (Angevin *et al.* 2008) van INRA in Frankrijk aangegeven dat in het specifieke geval van een 15 ha donorperceel gecombineerd met een kleiner dan 5 ha ontvangerperceel (dus drie of meer maal zo klein) benedenwinds een isolatieafstand van 20 m onvoldoende zou zijn voor het onder de 0,9% drempelwaarde blijven. In dit onvoordelige geval zou 50 m als isolatieafstand geboden zijn. Het betreft hier geen resultaten van empirische modellering van een behoorlijk aantal veldproeven, maar een deterministisch model waarin zoveel mogelijk bekende teeltparameters verwerkt zitten op grond waarvan een voorspelling voor specifiek situaties gedaan wordt.
- Percelen waar meerdere percelen van andere bedrijven direct omheen liggen, waardoor uitkruising in principe - maar uiteraard afhankelijk van de invulling van de percelen door de buurbedrijven - van meerdere kanten zou kunnen plaatsvinden, zodat het compenserend vermogen van het niet-transgene perceel vermindert.

Een interessante verdere ontwikkeling zijn de “Decision Support Tools” in het EU-project PRICE (<http://price-coexistence.com/>). De groep van Messéan en Angevin ontwikkelt een landschappelijk model waarin op basis van invoer van GG en niet-GG percelen en weersomstandigheden tijdens de bloei indicaties gegeven worden welke percelen de meeste kans op vermenging hebben. Indien dit betrouwbaar mogelijk blijkt te zijn, zouden op basis hiervan prioriteiten gesteld kunnen worden welke percelen met voorrang te bemonsteren.

5.2 Snijmaïs

Bij bijna alle uitkruisingsstudies aan maïs is alleen gekeken naar de maïskorrels. Het overgrote deel van de Nederlandse teelt betreft echter snijmaïs, waarin het daadwerkelijk uitkruisbare product, de korrel, ten hoogste de helft van het drooggewicht inneemt. Daardoor zou bij het toepassen van de kwantitatieve GM meetmethode op DNA niveau een “verdunding” van eventueel uitgekruist transgen in DNA van de korrel met DNA uit het niet-transgene vegetatieve materiaal in het eindresultaat verwacht mogen worden, m.a.w. een navenant lagere waarde van GG vermenging. Tot op heden hebben alleen agronomisch representatieve proeven in Duitsland (Weber *et al.* (2007) DNA kwantificering toegepast op de combinatie van korrels met de rest van de plant. De eerste resultaten hiervan waren dat de uiteindelijke meetwaarden nauwelijks verschilden van die aan de korrels alleen. Helaas werden de bepalingen aan korrels en snijmaïs in verschillende velden uitgevoerd. Toch zijn dergelijke resultaten niet onwaarschijnlijk: het DNA gehalte van de vegetatieve onderdelen van de plant zal aan het eind van het seizoen niet hoog zijn en omdat het afsterven ook reeds begonnen kan zijn, is het voorstelbaar dat de kwaliteit van het geëxtraheerde DNA verslechterd is. Het is zelfs mogelijk dat de kwaliteit van het uit de korrels geëxtraheerde DNA wordt aangetast door storende stoffen uit de vegetatieve delen. Onderzoek aan materiaal van complete planten uit de Nederlandse praktijkproef van 2007 heeft laten zien dat het vegetatieve deel van de plant inderdaad veel lagere opbrengsten in de qPCR kwantificeringstest gaf dan het korreldeel (naar schatting 10 keer zo laag, Dolstra *et al.* 2009). In snijmaïs zal ook de monsteranalyse gecompliceerder zijn dan bij korrels. Doordat het mengsel van korrels en vegetatieve delen een combinatie oplevert van onderdelen met een sterk verschillende dichtheid, is het moeilijk om een perfecte menging van alle componenten te bereiken om daar dan vervolgens een representatief monster uit te kunnen trekken. Ervaringen met Praktijktoetsen in Duitsland bevestigen dat en lieten veel variatie in de uitkomsten zien (G. Rühl in BPD on monitoring, Rizov & Rodríguez-Cerezo 2014). In Nederland heeft RIKILT praktijkervaring met gedroogde snijmaïsmonsters uit de voederhandel.

Daarnaast dient bedacht te worden dat snijmaïs in een vroeger stadium van afrijping geoogst wordt dan korrelmaïs teneinde ook de vegetatieve delen van de plant zo optimaal mogelijk te benutten. Het ontwikkelingsstadium van de korrel kan invloed hebben op de resultaten in de kwantitatieve PCR methode. De resultaten in de korrels hangen namelijk af van de verhouding tussen de hoeveelheid genoom die van de bestuiver (de potentiële bron van een eventueel uitgekruist transgen) afkomstig is en de hoeveelheid genoom van de moederplant. Deze verhoudingen verschillen per weefsel in de korrel en de onderlinge verhoudingen daarvan variëren gedurende de rijping van de korrel (voor een toelichting, zie appendix ii-2).

In theorie zouden meetresultaten aan de verse oogst representatief moeten zijn voor het product verderop in de keten, mits het materiaal fysiek onveranderd is. Snijmaïs wordt echter na de oogst ingekuuld. De pH van uitgerijpt kuilvoer bedraagt 3,5-4 en dat zal afbraak van DNA bevorderen. Proeven door Duggan *et al.* (2000) laten zien dat onbeschermd maïs-DNA binnen een minuut gedegradeerd raakt in kuileffluent, maar een specifieke Bt gensequentie bleek nog na minstens 30 min. amplificeerbaar via

PCR. Degradatie van DNA is aanzienlijk minder na hitte-inactivatie. Microben en/of DNA-afbrekende enzymen spelen dus een belangrijke rol naast de pH zelf. Het hangt ook af van afscherming in cellen van de korrels of er toch nog iets van DNA te isoleren valt. In de proeven van Dolstra *et al.* (2009) bleek enige kwantificering van ingekuuld materiaal mogelijk, maar de precisie was laag door de slechte DNA opbrengst. In digestaat van biogasproductie bleek kwantificering onmogelijk.

5.3 Bemonsteringsstrategie

In principe zijn er twee basale vormen van bemonsteren mogelijk:

1. het nemen van monsters uit de complete oogst, eventueel uit te voeren tijdens het oogsten zelf, zoals ook bij routinematige controles op partijen en scheepsladingen gebeurt,
2. en het volgens een meer of minder systematisch schema bemonsteren van kolven in het perceel vlak voor de oogst, zoals in allerlei wetenschappelijke studies gebeurd is, maar ook in de weinige monitoringsstudies die tot nu toe in Europese GG MON810 teelten uitgevoerd zijn.

Het nemen van steekproeven uit complete oogsten valt te vergelijken met wat reeds plaatsvindt bij de controle op scheepsladingen uit gebieden waar ook op commerciële schaal GG teelt plaatsvindt. Hiervoor publiceerde de Europese Commissie in 2004 een aanbeveling “betreffende technische richtsnoeren inzake bemonstering en opsporing van genetisch gemodificeerde organismen en materiaal geproduceerd met genetisch gemodificeerde organismen” als uitwerking van Verordening 1830/2003 waarin de traceerbaarheid van genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) in voedings- en diervoederketens is gereguleerd (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?qid=1422363836814&uri=CELEX:32004H0787>). Verdere details over deze procedures zijn te vinden in de appendix i.

De richtsnoeren voor bemonstering van complete oogsten vormen een pragmatisch compromis: Enerzijds kan er een noodzaak gesignaleerd worden tot vergaande detaillering in monsternames doordat vermengingen zeer inhomogeen verdeeld zullen zijn over partijen. Anderzijds zijn er vanzelfsprekend budgettaire limieten aan de mate waarin er bemonsterd en geanalyseerd kan worden. Daarbij moet bedacht worden dat de DNA kwantificeringsmethode via real-time PCR weliswaar de meest effectieve analysemethode over de hele keten heen is, maar dat deze ook relatief prijzig is. Ook om die reden al is het budgettair gezien niet realistisch op een uitputtende bemonstering te mikken.

Er heeft onderzoek plaatsgevonden naar verdergaande optimalisatie van bemonsteringsstrategieën. Paoletti *et al.* (2003) ontwikkelden een simulatiemodel waarin verschillende niveaus van stratificatie van GG vermengingen konden worden aangebracht, en toonden daarmee aan dat heterogeniteit een sterke invloed heeft op de mate van statistische onzekerheid van analyseresultaten. Bij een hoge mate van heterogeniteit zou met 100 monsters uit een partij van 10^7 korrels de CV (variatiecoëfficiënt) rond de 50% liggen. Door intensief bemonsteren van grote scheepsladingen soja in het EU project KeLDA (Kernel Lot Distribution Assessment) hebben Paoletti *et al.* (2006) vervolgens in de praktijk laten zien dat allerlei verschillende patronen van heterogeniteit in gecombineerde oogsten worden aangetroffen. Dit varieerde van een soort periodiciteit in GG gehalten door de lading heen tot volkomen willekeurige afwisseling van hele hoge en hele lage waarden.

Evenzo zal in de totale oogst van een maïsperceel niet overal hetzelfde gehalte aan uitkruising aangetroffen worden. In de praktijk is er de grootste kans op uitkruising aan de rand van een perceel waar dit naar een potentiële transgene bestuiver toe gericht is.

Omdat oogsten in een bepaalde systematische volgorde over een perceel heen plaatsvindt, valt niet te verwachten dat gedurende de verwerking van de oogst een randgedeelte met het relatief hoogste uitkruisingspercentage volledig homogeen door de hele partij heen gemengd wordt. Bij bemonstering op het veld kan worden ingespeeld op deze oorzaak voor de heterogeniteit van eventuele vermenging in complete oogsten, namelijk dat uitkruising vanuit een naburig veld gemiddeld genomen een specifiek patroon volgt: Uitkruising is het hoogst aan de rand van het perceel en neemt vervolgens steil af (in principe vaak nog sterker dan exponentieel) naar het midden tot een lage waarde die nog over veel grotere afstanden gevonden kan worden (de "staart" van deze zogenaamde leptokurtische pollencurve). Voor een efficiënte evaluatie zou men dus gericht daar kunnen bemonsteren waar de kans op vermenging het grootst is en de detectie relatief het gemakkelijkst, d.w.z. in de randrijen. Vervolgens dient dat te geschieden op een manier dat de genoemde pollencurve kan worden beschreven, dus door aanvullende monsters dieper in het veld, waarmee dan vervolgens de resultaten geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mate van vermenging over het hele veld. Het nemen van monsters kan fysiek bestaan uit het verzamelen van kolven van bepaalde, vooraf vastgestelde punten in het perceel. In theorie kan hetzelfde worden bereikt, zij het met een iets geringere precisie, door de oogstmachine te volgen en dan op bepaalde plekken een monster te trekken. Een aanpak met gerichte bemonstering van kolven is beschreven door Messeguer *et al.* (2006) in hun onderzoek aan reële veldsituaties in Spanje. Ze namen verdeeld over de hele omtrek van een perceel monsters op 0, 3 en 10 m vanaf de rand, plus een monster uit het midden van het perceel. Mede afhankelijk van de vorm van een perceel kwam dit in totaal neer op 24 monsters uit een perceel van één ha. Šuštar-Vozlič *et al.* 2010 hebben een vereenvoudigde variant voorgesteld waarbij langs twee lijnen parallel aan de veldrand en op 10 respectievelijk 25 m van de rand elk 20 monsters genomen worden. De resultaten hiervan zouden een goede schatting voor het hele perceel opleveren.

Aan de mate waarin een gerichte veldbemonstering ook daadwerkelijk tot statistisch betrouwbaardere resultaten leidt heeft onderzoek plaatsgevonden binnen het EU co-existentieproject "SIGMEA". Allnutt *et al.* (2008) hebben op grond van hun bevindingen een alternatieve strategie voorgesteld voor bemonstering van kolven in hele percelen, d.w.z. niet volgens het hierboven beschreven systeem van Messeguer *et al.* (2006), maar volledig random. Er wordt daarbij een kostenreductie bereikt door alle monsters eerst samen te voegen tot één bulkmonster en daaruit een analytisch monster te trekken ter grootte van 3.000 korrels. Deze aanpak is vergelijkbaar met die in grote partijen (methode 1), zoals beschreven in de Appendix i, maar streeft er daarbij ook naar zoveel mogelijk recht te doen aan de te verwachten heterogeniteit op het veld. Voor de kwantificering van het betreffende transgen worden uit het analytische monster vier aparte DNA extracties en kwantitatieve PCRs uitgevoerd. Het benodigde aantal monsters (kolven) hangt af van het verwachte werkelijke gehalte aan transgenuitkruising: hoe dichter de grenswaarde van 0,9% in zicht komt, hoe meer monsters er genomen dienen te worden, van 34 monsters bij 1,35% (50% boven 0,9%) tot bijv. 190 bij 1,06% (18% bandbreedte boven de 0,9%). Een hogere nauwkeurigheid dan de laatstgenoemde bandbreedte lijkt dus praktisch niet haalbaar. Dit is echter een normaal statistisch probleem bij het beslissen of een partij aan gestelde randvoorwaarden voldoet in de buurt van de beslissingsgrens (drempelwaarde), zie ook Appendix i.

De statistische argumenten voor de aanpak van Allnutt *et al.* (2008) zijn als volgt: In de praktijk komen afwijkingen voor van het gebruikelijke uitkruisingspatroon in percelen: 1) Bijzondere randeffecten zijn mogelijk, d.w.z. de buitenste rijen kunnen nogal eens afwijkende groei en daarmee ook afwijkende niveau's van uitkruising vertonen. Zo noemen Messeguer *et al.* (2006) een geval waarin de randrij lagere waarden liet zien dan wat dieper in het veld, wat toegeschreven kon worden aan een afwijkend

groeipatroon van de planten aan de rand van het veld. 2) Bij beperkte bemonstering midden in het veld kunnen zogenaamde “hotspots” gemist worden, plaatselijke verhogingen van uitkruising in afwijking van de gebruikelijke pollencurve. Deze kunnen optreden doordat lokale wind/thermiek situaties pollen bij uitzondering verder brengen en/of op specifieke plaatsen concentreren. Eventueel kan daarbij een rol spelen dat op deze plekken de vrouwelijke bloei (maar juist niet de eigen mannelijke bloei) toevallig sterk samenvalt met een piek aan inwaaiend pollen. De uitkruisingsniveaus in “hotspots” liggen overigens in het algemeen beneden de 0,9% EU drempelwaarde (vgl. Henry *et al.* 2003). Ze zijn dus vooral van betekenis indien uitkruising aan de randen dermate hoog was dat de bijdrage van de rest van het perceel van belang wordt voor het uiteindelijke gemiddelde of voor eventuele aangescherpte drempelwaarden. 3) Het exacte verloop binnen het normale patroon van uitkruising in een perceel zal variëren, afhankelijk van windkracht, perceelsgrootte etc. Een relatief beperkte bemonstering per transect van perceelsrand naar het midden zoals in het Spaanse onderzoek (Messeguer *et al.* 2006) draagt in principe het risico in zich van het introduceren van een “bias” in de reconstructie van het verloop van de pollencurve in het individuele perceel. Bij een sterke beperking van het aantal monsters zal het verloop van de gefitte curve, vooral in het steile gedeelte, erg afhangen van de daar gevonden waarden, die relevant anders hadden kunnen liggen indien de monsterpunten op net weer andere afstanden gelegd zouden zijn. Met andere woorden, de geplande bemonsteringsstrategie zou een te groot effect kunnen hebben op de mogelijke uitkomst, en dezelfde bemonsteringsstrategie zou een correct resultaat kunnen geven in het ene perceel maar niet in het andere, of het ene jaar wel en het andere jaar niet. In dit verband lieten Allnutt *et al.* (2008) m.b.v. additioneel verzameld materiaal in de Spaanse proeven zien dat de bemonsteringsstrategie uit de FSE (Henry *et al.* 2003) meestal een lichte overschatting en de strategie van Messeguer *et al.* (2006) meestal een lichte onderschatting van de gehalten aan transgen in een niet-GG perceel vertoonde.

Vanuit een praktisch oogpunt dient bij de aanpak van Allnutt *et al.* (2008) te worden aangetekend dat het aantal real-time PCR analyses per perceel in hun strategie inderdaad beperkt blijft, maar dat de bemonstering in het veld om een aantal redenen aanzienlijk arbeidsintensiever wordt. Er moeten in dit geval namelijk volgens een van tevoren gegenereerd random patroon kolven uit het perceel gehaald worden en dit zal altijd complexer zijn dan een meer systematische bemonstering langs één of meerdere transecten door het veld of volgens een perceel-dekkend grid. Vervolgens is de homogenisering van zulke grote bulkmonsters die nodig is om er betrouwbaar het genoemde analytische monster uit te kunnen trekken niet eenvoudig.

Samenvattend komt het erop neer dat er een basale bemonsteringsmethode ligt vanuit EU aanbeveling 2004/787/EG. Mede afhankelijk van de precieze doelstelling van het CMP kan er gekozen worden voor een meer toegespitst bemonsteringssysteem of eventuele nieuw ontwikkelde protocollen, indien ze bewezen verbetering in precisie en kosteneffectiviteit met zich meebrengen. Meer in het bijzonder is dit van belang voor de snijmaïs, indien men opteert voor het bemonsteren van kolven vanwege de verwachte lagere precisie van bepalingen in de snijmaïs zelf. In dat geval zal een methode waarbij gebruik gemaakt wordt van een bulkmonster voor DNA analyse zoals in 2004/787/EG in principe het meest kostenefficiënt zijn (zie volgende sectie 4.4). Binnen bijv. het EU project PRICE (<http://price-coexistence.com>) vindt nog verder onderzoek aan bemonsteringsstrategieën plaats, via verdere ontwikkeling van Decision Support Tools. Zo wordt in het onder 4.1 al genoemde model in ontwikkeling van de groep van Messéan en Angevin behalve een indicatie van de percelen met de grootste kans op uitkruising ook een indicatie gegeven welke stroken in een perceel (“strata”) de hoogste niveaus van vermenging en/of variatie in vermenging zullen vertonen. Indien dit betrouwbaar blijkt, zou dit behulpzaam zijn bij het kiezen van bemonsteringspunten in dat perceel. Het verdient aanbeveling de wetenschappelijke ontwikkelingen te blijven

volgen, zodat eventuele aanpassingen gedaan kunnen worden, zodra een CMP van start zou gaan bij een geplande introductie van GG maïsteelt. Een ander voor de afweging belangrijk aspect betreft de kosten. Deze worden besproken onder sectie 5.4.

5.4 Kosten

De voorgestelde bemonsteringsstrategie 1) in lijn met richtsnoer 2004/787/EC komt neer op 10 basismonsters per ha, uitgaande van een oogst van in de orde van 10 ton aan korrels (zie Appendix i). Met een voorgesteld aantal van 10 percelen zou dit neerkomen op 10 keer 10 monsters, een totaal van 100 monsters, met een uitloop naar een hoger aantal in de gevallen dat waarden in de buurt van de drempelwaarde gevonden worden. Met de huidige maximale analysekosten van 430 Euro per monster zou het totaal op een bedrag van 43 kEuro komen, exclusief monsternamekosten. Het is echter waarschijnlijk dat deze kosten per analyse lager zullen liggen wanneer routinematige analyses kunnen worden uitgevoerd met betrekking tot vooraf geïdentificeerde GG gewassen. Het uiteindelijke bedrag hangt echter in hoge mate af van hoe frequent vermengingen in de buurt van de drempelwaarde komen (d.w.z. met een marge van 50%, waarbij alle tien monsters geanalyseerd dienen te worden). Voor alle andere gevallen kan volstaan worden met één analysemonster uit het bulkmonster dat in dit geval een omvang van 5 kilo heeft (zie Appendix i).

De voorgestelde gerichte bemonsteringsstrategie 2) conform Messeguer *et al.* (2006) komt neer op een totaal van ongeveer 24 monsters uit een perceel van één ha. Dit zou neerkomen op 10 keer 24 monsters, een totaal van 240 monsters. Met de huidige maximale analysekosten van 430 Euro per monster zou het totaal op een bedrag van 103 kEuro komen, exclusief monsternamekosten. Allnutt *et al.* (2008) hebben door modellering laten zien dat voor de gerichte bemonsteringsstrategie minstens 30 monsters per perceel geboden zouden zijn. In dat geval worden de kosten hoger: 129 kEuro.

Tot slot zijn er nog de alternatieven van random bemonstering (Allnutt *et al.* 2008) of systematische bemonstering van kolven gevolgd door een beperkt aantal analyses op het door het samenvoegen van alle monsters tot stand gekomen bulkmonster. Dit beperkt de analysekosten per veld naar schatting tot ongeveer 1.000 Euro. Het bemonsteren zelf zal echter aanzienlijk arbeidsintensiever zijn en er kunnen zich problemen voordoen bij de homogenisering van de grotere bulkmonsters. Zoals hierboven aangegeven vinden er in ieder geval nog ontwikkelingen in het onderzoek plaats die in een toekomstig programma alsnog geïncorporeerd zouden kunnen worden.

6 Referenties

- Allnutt TR, Dwyer M, McMillan J, Henry C, Langrell S (2008) Sampling and modeling for the quantification of adventitious genetically modified presence in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3232-3237.
- Angevin F, Klein EK, Choimet C, Gauffreteau A, Lavigne C, Messéan A, Meynard JM (2008) Modelling impacts of cropping systems and climate on maize cross-pollination in agricultural landscapes: The MAPOD model. *European Journal of Agronomy* 28:471-484
- Begg GS, Cullen DW, Iannetta PPM, Squire GR (2007) Sources of uncertainty in the quantification of genetically modified oilseed rape contamination in seed lots. *Transgenic Research* 16:51-63
- Charels D, Broeders S, Corbisier P, Gioria S, Vincent S, Schimmel H, Trapmann S, Emons H (2007) Certification of a MON 810 maize reference material for its DNA copy number ratio. Certified reference material ERM[®]-BF413d. Certification report. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel, Belgium & Ispra, Italy, EUR 23028 EN, 18 pp.
- Community Reference Laboratory for GM Food and Feed (2006) CRL assessment on the validation of an event specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR as carried out by Federal Institute for Risk Assessment (BfR). European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Biotechnology and GMOs Unit, Ispra, Italy, CRL-VL-25/04VR, 9 pp.
- Czarnak-Klos M, Rodríguez-Cerezo E (2010) European Coexistence Bureau (ECoB). Best Practice Documents for coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming. 1. Maize crop production. European Commission JRC European Coexistence Bureau (ECoB) report EUR 24509 EN, IPTS-JRC, Sevilla, 70 pp.
- Dolstra O, Van de Wiel CCM, Vincent A, Groeneveld RMW, Franke AC, Boleij PA, Scholtens IMJ, Kok EJ, Smulders MJM, Lotz LAP (2009) GM quantification in various maize products for managing coexistence between GM and non-GM production. Proceedings of the fourth international conference on coexistence between genetically modified (GM) and non-GM based agricultural supply chains GMCC09, Melbourne, Australia
- Duggan PS, Chambers PA, Heritage J, Forbes JM (2000) Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiology Letters* 191:71-77.
- ENGL European Network of GMO Laboratories (2007) ENGL explanatory document on the use of "percentage of GM-DNA copy numbers in relation to target taxon specific DNA copy numbers calculated in terms of haploid genomes" as a general unit to express the percentage of GMOs. European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Biotechnology and GMOs Unit, 13 pp
- Gustafson DI, Brants IO, Horak MJ, Remund KM, Rosenbaum EW, Soteres JK (2006) Empirical modeling of genetically modified maize grain production practices to achieve European Union labeling thresholds. *Crop Science* 46:2133-2140.
- Henry C, Morgan D, Weekes R, Daniels R, 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.
- Horváth L, Horecká T, Feketová M (2012) Cultivation of biotech-crops, control of coexistence and environmental monitoring of GM plants in Slovakia. *Plant Protection Science* 48:S3-S10

- Macarthur R, Murray AWA, Allnut TR, Deppe C, Hird HJ, Kerins GM, Blackburn J, Brown J, Stones R, Hugo S (2007) Model for tuning GMO detection in seed and grain. *Nature Biotechnology* 25:169-170.
- Marceau A, Gustafson DI, Brants IO, Leprince F, Foueillassar X, Riesgo L, Areal FJ, Sowa S, Kraic J, Badea EM (2013) Updated empirical model of genetically modified maize grain production practices to achieve European Union labeling thresholds. *Crop Science* 53:1712-1721
- Messéan A, Angevin F, Gómez-Barbero M, Menrad K, Rodríguez-Cerezo E (2006) New case studies on the coexistence of GM and non-GM crops in European agriculture. European Commission, Joint Research Centre report EUR 22102 EN. IPTS-JRC, Sevilla, 114 pp.
- Messeguer J, Peñas G, Ballester J, Bas M, Serra J, Salvia J, Palau delmàs M, Melé E (2006) Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal* 4:633-645
- Miraglia M, Santis Bd, Minardi V, Debegnach F, Brera C (2005) The role of sampling in mycotoxin contamination: an holistic view. *Food Additives and Contaminants* 22:31-36
- Paoletti C, Donatelli M, Kay S, Van den Eede G (2003) Simulating kernel lot sampling: the effect of heterogeneity on the detection of GMO contaminations. *Seed Science and Technology* 31:629-638
- Paoletti C, Heissenberger A, Mazzara M, Larcher S, Grazioli E, Corbisier P, Hess N, Berben G, Lubeck PS, De Loose M, Moran G, Henry C, Brera C, Folch I, Ovesna J, Van den Eede G (2006) Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *European Food Research and Technology* 224:129-139
- Papazova N, Malef A, Degrieck I, Van Bockstaele E, De Loose M (2005) DNA extractability from the maize embryo and endosperm - relevance to GMO assessment in seed samples. *Seed Science and Technology* 33:533-542
- Pla M, Paz JLI, Penas G, Garcia N, Palau delmàs M, Esteve T, Messeguer J, Melé E (2006) Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study. *Transgenic Research* 15:219-228
- Quedas MdF, Cruz de Carvalho P (2012) A quinquennium of coexistence in Portugal. *AgBioForum* 15:1-9
- Riesgo L, Areal FJ, Sanvido O, Rodríguez-Cerezo E (2010) Distances needed to limit cross-fertilization between GM and conventional maize in Europe. *Nature Biotechnology* 28:780-782
- Rizov I, Rodríguez-Cerezo E (2014) European Coexistence Bureau. Best Practice Documents for coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming. 2. Monitoring efficiency of coexistence measures in maize crop production. European Commission JRC European Coexistence Bureau (ECoB) report EUR26261EN, IPTS-JRC, Sevilla, 32 pp.
- Šuštar-Vozlič J, Rostohar K, Blejec A, Kozjak P, Čergan Z, Meglič V (2010) Development of sampling approaches for the determination of the presence of genetically modified organisms at the field level. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:2031-2041
- Trifa Y, Zhang D (2004) DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1044-1048.
- Van de Wiel CCM, Dolstra O, Groeneveld RMW, Kok EJ, Scholtens IMJ, Thissen JTNM, Lotz LAP, Smulders MJM (2008) 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. Rapport 184, Plant Research International, Wageningen, 24 + 4 pp.

- Van de Wiel CCM, Groeneveld RMW, Dolstra O, Kok EJ, Scholtens IMJ, Thissen JTNM, Smulders MJM, Lotz LAP (2009) Pollen-mediated gene flow in maize tested for coexistence of GM and non-GM crops in the Netherlands: effect of isolation distances between fields. *NJAS-Wageningen Journal of the Life Sciences* 56:405-423
- Van de Wiel CCM, Lotz LAP 2004. Inventarisatie van de wetenschappelijke kennis over uitkruising in maïs, koolzaad, aardappel en suikerbiet voor het coëxistentieoverleg 2004 Nota 322. *Plant Research International - Wageningen UR, Wageningen*, 36 + X pp.
- Weber WE, Bringezu T, Broer I, Eder J, Holz F (2007) Coexistence between GM and non-GM maize crops - Tested in 2004 at the field scale level (Erprobungsanbau 2004). *Journal of Agronomy and Crop Science* 193:79-92
- Weekes R, Allnutt T, Boffey C, Morgan S, Bilton M, Daniels R, Henry C (2007) A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (*Zea mays* L.) in the UK. *Transgenic Research* 16:203-211

Appendix

i Bemonstering van bulkproducten

Verordening 1830/2003 waarin de traceerbaarheid van genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) in voedings- en diervoederketens is gereguleerd (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?qid=1422363836814&uri=CELEX:32004H0787>) bepaalt onder meer dat lidstaten er op toe moeten zien dat passende inspecties en controlemaatregelen, met inbegrip van steekproeven en (kwalitatieve en kwantitatieve) tests, worden uitgevoerd om de naleving van de verordening te garanderen. Officiële controles moeten worden uitgevoerd in alle fasen van productie of invoer, verwerking, opslag en distributie van GGO's of afgeleide producten. De bepalingen hebben betrekking op partijen zaad en ander plantaardig teeltmateriaal, levensmiddelen, diervoeders en basisproducten afkomstig uit de landbouw.

Voor zaadpartijen en ander plantaardig teeltmateriaal moeten de bemonsteringsstrategieën voldoen aan gangbare internationale methoden, aan Europese voorschriften die op partijen van bepaalde omvang van toepassing zijn en in overeenstemming zijn met de ISTA-regels (International Seed Testing Association) voor bemonstering.

Voor basisproducten 'in bulk' afkomstig uit de landbouw is het voorgestelde bemonsteringsprotocol gebaseerd op een tweestapsprocedure die het mogelijk maakt om een schatting te maken van het percentage GGO's in een partij met het bijbehorende onzekerheidsniveau (standaardafwijking), zonder dat aannames hoeven te worden gemaakt ten aanzien van de heterogeniteit van de bulk. De eerste stap hierbij is dat er een bulkmonster wordt samengesteld. Het daarvan afgeleide analysemonster wordt gebruikt voor een kwantitatieve GGO-bepaling. Wanneer het resultaat van de analyse in de buurt ligt van, i.e. 50% boven of beneden, de vastgestelde drempelwaarde (=0.9%), dan wordt aanbevolen om de gearchiveerde basismonsters afzonderlijk te analyseren om een schatting van de desbetreffende onzekerheid te kunnen maken.

Het aantal benodigde basismonsters, die opgedeeld worden in te archiveren basismonsters en het monster dat meegenomen wordt in het bulkmonster, wordt vastgesteld overeenkomstig de omvang van de partij. Hiervoor is een tabel opgenomen in de aanbeveling (EU recommendation 2004/787/EC):

Omvang van de partij (in t)	Omvang van het bulkmonster (in kg)	Aantal basismonsters
≤ 50	5	10
100	10	20
250	25	50
≥ 500	50	100

Verdere bepalingen zijn dat het bulkmonster 0.01% van de totale omvang van de partij moet bedragen bij partijen tussen de 50 en 500 ton. Bij kleinere partijen dient het bulkmonster 5 kg te zijn en bij grotere partijen is het bulkmonster 50 kg. Er kan gekozen worden voor systematische bemonstering (periodieke bemonstering waarbij het tijdsinterval gelijk is aan totale lostijd/totaal aantal basismonsters) of statische bemonstering (specifieke bemonsteringspunten). Bij iedere monstername wordt een monster van 1 kg genomen, dat wordt gesplitst in twee delen van 0.5 kg: één deel wordt gebruikt als basismonster voor het samenstellen van het bulkmonster en het andere deel als gearchiveerd basismonster.

ii Kwantitatieve metingen van transgenen door real-time PCR

ii-1 Algemeen

Voor de bepaling van het percentage GG maïs in een monster wordt gebruik gemaakt van een event-specifieke real-time (TaqMan) PCR test. Dit wil zeggen dat een DNA sequentie geamplificeerd wordt die uniek is voor het transgene event, bijv. voor MON810 maïs een 92 bp (basenparen) fragment van de single copy DNA integratie border regio waar de genomische sequentie van maïs grenst aan de geïntegreerde 35S promoter van het gebruikte construct. Voor relatieve kwantificering wordt ook een 79 bp fragment van het universeel in het normale maïsgenoom voorkomende “single copy” gen HMG (high mobility group protein) geamplificeerd.

Met behulp van twee kalibratielijnen, één voor het endogene gen en één voor de unieke transgensequentie, worden de hoeveelheid kopieën van het endogene gen en de transgensequentie in het monster bepaald. De hoeveelheid transgen wordt gedeeld door de hoeveelheid endogeen gen en dit getal wordt vermenigvuldigd met 100, om het percentage te berekenen. De uitslag is een percentage transgen op gewichtsbasis (w/w), omdat de ratio wordt gerelateerd aan kalibratielijnen van referentiemonsters op gewichtsbasis. Dit is binnen Europa nu de standaardprocedure in afwachting van nieuwe referentiematerialen (plasmiden met transgeen “event” en standaardfragment) waarmee daadwerkelijk het haploïd genoomgehalte kan worden bepaald. Het is de verwachting dat de percentages hierdoor lager zullen worden. In bovengenoemde studie van Weekes *et al.* (2007) werd in de analyse van de FSE data al een correctie naar beneden toegepast met een factor 0,58 om de resultaten uit te drukken als aantal transgenen t.o.v. het aantal haploïde genomen, dus als een percentage conform de EU aanbeveling 2004/787/EC. Hier kleeft echter het bezwaar aan dat dit kan verschillen per maïsras (zie hieronder ii-2).

De reproduceerbaarheid en de juistheid van de methode zijn gevalideerd in een internationale ringtest georganiseerd door het Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in samenwerking met de American Society of Cereal Chemists (AACC), het Joint Research Centre (JRC) van de Europese Commissie, het Institute for Reference Material and Measurement (IRMM, Geel, België), het Institute for Health and Consumer Protection (IHCP) en GeneScan, Berlijn (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed 2006: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/Mon810_validation_report.pdf). Aan de ringtest hebben 15 laboratoria meegedaan. Het belang van ringtesten kan geïllustreerd worden met observaties in het Duitse onderzoek door Weber *et al.* (2007). Voor het uitvoeren van hun analyses lieten ze eerst vier verschillende laboratoria materiaal met bekende vermengingsgehalten testen en kozen vervolgens op basis daarvan de twee beste laboratoria uit voor de analyses van hun veldmonsters. Bij latere statistische analyse van de resultaten bleken er ook tussen deze twee laboratoria systematische verschillen in uitkomsten aantoonbaar.

De kwantificeringsmethode is op dit moment ook intern bij RIKILT gevalideerd en werd aangemeld voor (aanvullende) accreditatie. De RIKILT herhaalbaarheid RSD_r (16%) voor de hier beschreven methode kwam overeen met die in de internationale ringtest. De RIKILT reproduceerbaarheid RSD_R (58%) was iets groter dan die uit de ringtest, maar RIKILT heeft behalve IRMM standaarden ook praktijkmonsters met verschillende matrices getest en bovendien per monster op elke testdag een nieuwe DNA isolatie uitgevoerd. De benedengrens tot waar kwantificering nog mogelijk is ligt op 0.07% (voor een standaardanalyse met 2 DNA isolaties en 2 PCRs per monster). Uit de interne validatiestudie is verder berekend dat de beslissingslimiet, d.w.z. de waarde

waarbij met 95% betrouwbaarheid vastgesteld kan worden dat de echte waarde van het monster boven de drempel van 0.9% is, voor deze methode op 2.2% ligt. Deze waarde is in het algemeen voor de real time PCR-analyses relatief hoog in vergelijking met chemische analyses. Dit komt doordat het kwantitatief PCR-resultaat de verhouding betreft van twee waarden die beide op exponentieel verlopende reacties zijn gebaseerd. Deze waarde is echter alleen bedoeld om een partij maïs op basis van één monster te keuren. Voor het uitvoeren van monitoring zullen echter meer monsters geanalyseerd worden om een oogst te typeren en de biologische variatie tussen deze monsters zal relatief groter zijn dan de meetonzekerheid voor elk individueel monster (vgl. Begg *et al.* 2007). Volgens Miraglia *et al.* (2005) kan de aan de monsternamen toe te schrijven variatie in de orde van 75% van de totale variatie beslaan. Daarbij moet ook bedacht worden dat in de te verwachten situatie met een hoge mate van heterogeniteit binnen een oogst het zo betrouwbaar mogelijk vaststellen van lagere drempelwaarden dan de wettelijke EU norm van 0,9% al snel tot omvangrijkere monsternamen zal leiden (dit loopt in principe exponentieel op). De eerder genoemde onderzoekers van het CSL (UK) (Allnutt *et al.* 2008) hebben in hun modellering van GG bemonstering een optimale balans gezocht tussen meetonzekerheden en biologische variatie in uitkruising door een partij heen die in het algemeen veel hoger zal liggen dan de meetvariatie (cf. Macarthur *et al.* 2007).

ii-2 Afhankelijkheid meetresultaten van eigenschappen van de maïskorrel

Vermenging wordt volgens EU verordening 1830/2003 in het geoogste product gemeten als de hoeveelheid van het transgen DNA (aantal kopieën) t.o.v. de hoeveelheid haploïde genomen van het gewas d.m.v. een zogenaamde real time PCR kwantificeringsmethode. Deze verhouding kan variëren afhankelijk van het aantal kopiën van het transgen dat in het GG gewas aanwezig is. In het zaad hangt het onder meer ook af van de verhouding tussen embryo, endosperm en moederlijk weefsel, en in hybride zaad maakt het ook verschil of het transgen afkomstig is van de moederlijke of de vaderlijke ouderlijn.

Concreet betekent dat onder meer het volgende. Omdat alle moderne maïsrassen F1-hybriden zijn, zal het transgen in GG maïs meestal in heterozygote staat aanwezig zijn. Daardoor draagt gemiddeld slechts de helft van het door de GG maïs geproduceerde pollen daadwerkelijk het transgen met zich mee. Als niet-GG planten hiermee worden bestoven, bevatten de zaden verschillende onderdelen met elk verschillende ratio's van vaderlijke (transgeen) en moederlijke (niet-transgeen) genomen. Het embryo als product van een gewone bevruchting is heterozygoot en bevat één haploïd genoom met het transgen en één haploïd genoom zonder. Het endosperm als product van een versmelting van twee moederlijke kernen en één kern uit het pollen, bevat één haploïd genoom met het transgen tegenover twee haploïde genomen zonder. Tenslotte bestaat de buitenkant van het zaad uit weefsel van de niet-GG moederplant dat in dit geval dus per definitie transgeenvrij is. In een dergelijk voorbeeld kan gesteld worden dat aanzienlijk minder dan de helft van de haploïde genomen in het zaaizaad het transgen zal bevatten. Papazova *et al.* (2005) rekenen op basis van hun DNA kwantificeringsproeven aan maïs voor dat de verhouding in de korrel tussen het aantal van het pollen afkomstige genomen en die afkomstig van de moederplant alles bij elkaar genomen ongeveer 1 op 2 is (1 vadergenoom op twee moedergenomen). Dit zou m.a.w. betekenen dat het maximale percentage GG in een volledig 'vermengde' partij zaad $0.5 \text{ (heterozygoot)} \times 1/3 \text{ (aandeel vader)} = 1/6$ of maximaal 17% is. Daaruit kan worden afgeleid dat zolang, over het hele veld genomen, minder dan 5% van de zaden van de receptorplanten bestoven zijn door transgeen pollen, de gemeten uitkruising altijd minder dan 0,9% is (mits nergens anders vermengingsbronnen zitten, wat een niet-realistische veronderstelling is). Overigens kunnen de exacte verhoudingen van weefsels in zaden nogal variëren, bijv. tussen verschillende maïsrassen (vgl. Trifa &

Zhang 2004), en om die reden zijn de hierboven genoemde percentages slechts gemiddelden.

Pla *et al.* (2006) hebben laten zien dat resultaten uit de real-time PCR methode goed correleren met percentages uitgekruiste korrels, maar aanzienlijk minder in vergelijkingen op gewichtsbasis. Op dit moment vindt de gevalideerde bepaling van de verhouding tussen aantal kopieën van het transgen en aantal haploïde genomen nog plaats op basis van het momenteel bij IRMM beschikbare 5% MON810 referentiemateriaal dat samengesteld is op gewichtsbasis (w/w). Dit referentiemateriaal is heterozygoot, waarbij de moeder transgeen is, en de 5% MON810 is daarom eigenlijk maar ongeveer $0,66 \times 5 = 3,3\%$ MON810 (zie ENGL 2007 Explanatory Document on the use of "percentage of GM-DNA copy numbers in relation to target taxon specific DNA copy numbers calculated in terms of haploid genomes" as a general unit to express the percentage of GMOs). Hierbij wordt bij het uitvoeren van de test, volgens het EU-gevalideerd protocol, geen rekening gehouden. Een preciezere omrekeningsfactor is recent bepaald door het vergelijken van plasmidenkalibratielijnen met event-specifieke GG sequentie met de genomische kalibratielijnen van 5% MON810 referentiemateriaal en kwam uit op een omrekeningsfactor van 0,57 voor het IRMM referentiemateriaal (Charels *et al.* 2007: http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/attachements/ER-M-BF413d_report.pdf). Het in de Nederlandse proeven van 2006 en 2007 gebruikte zaaizaad was ook heterozygoot, maar met de vader als transgene lijn, zodat 5% hier ongeveer $0,33 \times 5 = 1,7\%$ MON810 is. 100% van dit zaad zal dus een uitslag geven van ongeveer 50% MON810 (w/w); in de praktijk werd bij gebruik van het IRMM referentiemateriaal in de kalibratielijnen ongeveer 43% gevonden in het gebruikte zaaizaad.

ii-3 Specificaties van de meetbetrouwbaarheid

De internationale ringtest op MON810 kwantificering is uitgevoerd met verschillende percentages IRMM gecertificeerd referentiemateriaal. De kalibratielijnen werden gemaakt met behulp van 5% MON810 (w/w) gecertificeerd referentiemateriaal van het IRMM. Voor het bepalen van de betrouwbaarheid zijn de volgende parameters bepaald: 1) De Reproducibility Relative Standard Deviation RSD_R is de standaardafwijking van testresultaten verkregen onder reproduceerbaarheidsomstandigheden. Reproduceerbaarheidsomstandigheden zijn condities waarbij de testresultaten verkregen zijn met dezelfde methode, door verschillende personen op verschillende tijdstippen, eventueel met verschillende merken chemicaliën en apparatuur. De reproduceerbaarheidsstandaardafwijking beschrijft dus de inter-laboratorium variatie. Deze was 45% voor 0.1% MON810 maïs, 44% voor 0.5% MON810 maïs, 32% voor 1% en 2% MON810 maïs en 37% voor 5% MON810 maïs. 2) De bias is het percentage afwijking ten opzichte van de referentiewaarde. Deze was voor 0.1% MON810 2.3%, voor 0.5% MON810 -7.7%, voor 1% MON810 -16.7%, voor 2% -10.9% en voor 5% -10%. Let wel: de IRMM standaarden werden als monster gebruikt en de kalibratielijnen werden gemaakt van 5% IRMM standaard (zowel in de Europese validatiestudie als in de in-house RIKILT validatiestudie), zodat er eigenlijk geen geldige informatie over de juistheid beschikbaar is. Dit geldt overigens voor alle tot dusver uitgevoerde Europese validatiestudies. Ten aanzien van de specificiteit: de test toont geen kruisreactie met Event176 maïs, Bt11 maïs, T25 maïs, GA21 maïs en Roundup Ready soja. Volgens Monsanto (ontwikkelaar van de methode) is de absolute Limit Of Detection (LOD) 5 kopieën van de target sequentie en de relatieve LOD 0.1% (w/w). De absolute Limit Of Quantification LOQ is 10 kopieën van de target sequentie, de relatieve LOQ 0.1% (w/w), gelijk aan het laagste punt van de gebruikte kalibratiecurve. Deze test is intern bij RIKILT gevalideerd. Hierbij werden ook twee praktijkmonsters getest en niet alleen IRMM referentiemateriaal. Op basis van de door RIKILT uitgevoerde validatiestudie komt de detectie- en kwantificeringsgrens van de Mon810 PCR uit op 0.07% (gebaseerd op 8 isolaten op 8 dagen met elk 2 PCRs).

ii-4 Procedure

De gedroogde monsters worden geregistreerd in LIMS (Laboratorium Informatie en Management Systeem) en krijgen een uniek RIKILT-nummer. Vervolgens worden de monsters gemalen en gehomogeniseerd (ongeveer 500g) en worden twee potjes met een inhoud van 200 ml gevuld. De rest van het gemalen monster wordt weggegooid. Eén potje wordt gebruikt voor DNA-extractie en PCR-testen, het andere wordt verzegeld bewaard in de monsterkamer als contra-monster. Voor het malen van het volgende monster worden machine en maalkabinet geheel schoongemaakt om versleping te voorkomen.

DNA-isolatie wordt uitgevoerd op 100 mg van het monster en er wordt DNA geïsoleerd met een gecombineerde CTAB/Qiagen Plant Mini Kit methode. Per 20 monsters wordt water als een (negatieve) extractie controle meegenomen bij de DNA isolatie.

De real-time PCR-test wordt uitgevoerd volgens het door de EU gevalideerde protocol (RIKILT Standard Operating Protocol A1033). Per geïsoleerd DNA worden voor kwantificering drie endogene PCR reacties en 3 GGO PCRs uitgevoerd. Er worden in elke run duplo controles meegenomen voor de gevoeligheid (0.1% MON810 referentiemateriaal, IRMM), juistheid (1% MON810 referentiemateriaal, IRMM), en negatieve controle (0% MON810 referentiemateriaal, IRMM) en negatieve PCR controle (water). Bovendien wordt per 20 DNA isolaties een extractiecontrole meegenomen in de kwantitatieve PCR.

ii-5 Kosten

Op grond van de meest recente berekeningen door RIKILT zijn de kosten 430 Euro per monster bij directe kwantificering. RIKILT doet daarvoor voorbereiding, DNA-isolatie en -kwantificering met behulp van een gevalideerde event-specifieke (bijv. MON810) methode. Bij meer dan 10% positieve monsters is dit het goedkoopst. Is het percentage van positieve monsters lager dan 10% dan is het goedkoper om na de DNA-isolatie eerst een screening uit te voeren voor positieve monsters (kosten 255 Euro per monster) en de gevonden positieve monsters te kwantificeren op basis van de MON810-methode (kosten 370 Euro per analyse).

In de toekomst zullen er zeker ontwikkelingen zijn waardoor een verder efficiëntieslag mogelijk wordt. De Nederlandse praktijktoets aan maïs (zie Van de Wiel *et al.*, 2009) heeft laten zien dat er een aanzienlijke efficiëntiewinst geboekt kon worden door routinematige uitvoering van de test, met als gevolg lagere kosten per monster.