



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE BIOTIPOS DE
LOLIUM SPP. A FITOSANITARIOS ESPECÍFICOS EN
CULTIVOS CEREALISTAS DE LA COMARCA DE TIERRA
DE CAMPOS”**

Alumno: Víctor Romero Diez

Tutor y Director: Ángel Fombellida Villafruela

Junio de 2025

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE BIOTIPOS DE LOLIUM SPP. A FITOSANITARIOS ESPECÍFICOS EN CULTIVOS CEREALISTAS DE LA COMARCA DE TIERRA DE CAMPOS

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	Contexto y justificación del estudio	7
1.2	Objetivos de la investigación.....	8
2	MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1	Área de estudio	11
2.2	Diseño experimental.....	11
2.2.1	Muestreo de poblaciones y preparación del material vegetal.	11
2.2.2	Condiciones de cultivo.	11
2.2.3	Aplicación del tratamiento herbicida	12
2.2.4	Disposición experimental.....	13
2.2.5	Mediciones.	13
2.2.6	Análisis estadístico.....	14
2.3	Evaluación de la resistencia a herbicidas.	15
2.4	Identificación de biotipos de resistencia.....	17
3	RESULTADOS	20
3.1	Resultados de la evaluación de la resistencia a Pinoxaden.	20
3.1.1	Resultados obtenidos en la medición del peso seco de parte aérea.....	20
3.1.2	Resultados obtenidos en la medición del peso seco de raíces.....	23
3.1.3	Resultados del análisis de supervivencia.	26
3.2	Resultados de la identificación de biotipos de resistencia.....	32
4	DISCURSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES.	35
4.1	Discusion.	35
4.2	Consideraciones finales.	37
5	CONCLUSIONES	40
6	BIBLOGRAFIA.....	42

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE BIOTIPOS DE LOLIUM SPP. A FITOSANITARIOS ESPECÍFICOS EN CULTIVOS CEREALISTAS DE LA COMARCA DE TIERRA DE CAMPOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido a la realización del presente estudio titulado “Evaluación de la resistencia de biotipos de *Lolium spp.* a fitosanitarios específicos en cultivos cerealistas de la comarca de Tierra de Campos”.

Agradezco al Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario ITAGRA.CT, entidad a la que pertenezco, por su apoyo y por haberme permitido el uso de sus instalaciones, especialmente la cámara climática y el laboratorio, que resultaron esenciales para el desarrollo experimental de este trabajo.

Extiendo mi agradecimiento a los agricultores que colaboraron facilitando parcelas para el muestreo en distintas localidades de la comarca. Su disposición y colaboración desinteresada fueron fundamentales para la toma de muestras en campo.

Asimismo, agradezco a David Giraldo por su ayuda directa durante el trabajo de muestreo en campo, y a Inés Gómez por su apoyo en la revisión del trabajo, aportando sugerencias valiosas que contribuyeron a mejorar la calidad del documento final.

Finalmente, extiendo mi reconocimiento al profesor Jorge Martín García, de la Escuela de Ingenierías Agrarias, por su apoyo y orientación en la realización de los análisis estadísticos, contribuyendo de forma significativa al rigor técnico del estudio.

A todos ellos, mi más profundo agradecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto y justificación del estudio

En los cultivos cerealistas de la comarca Tierra de Campos, una de las principales malas hierbas que afecta a la producción es el *Lolium spp.*, conocido comúnmente como “vallico”. Esta planta presenta un serio problema en los cultivos de cereales debido a su alta capacidad de competencia por nutrientes, agua y luz.

Las especies invasoras de *Lolium spp.*, como *Lolium rigidum* y *Lolium multiflorum*, son especialmente problemáticas en la zona. Estas especies tienen una rápida capacidad de reproducción, lo que hace que su control sea aún más difícil para los agricultores.

Tradicionalmente, el control de malas hierbas se ha basado en prácticas culturales como la denominada “falsa siembra”. Esta técnica consiste en preparar el terreno durante el otoño, simulando las condiciones de siembra, pero sin sembrar el cereal. De este modo, las primeras lluvias otoñales favorecen la germinación de las semillas de malas hierbas presentes en el banco de semillas del suelo.

Una vez que las plántulas emergen, se procede a su eliminación antes de la siembra definitiva del cultivo, mediante labores superficiales o la aplicación de herbicidas no selectivos de amplio espectro. Esta práctica permite reducir significativamente la presión de malas hierbas en el momento de implantación del cultivo, mejorando así su establecimiento y desarrollo inicial.

Complementariamente, se emplean tratamientos químicos con herbicidas preemergencia, que actúan antes de la germinación de las malas hierbas, y postemergencia, aplicados una vez que las malas hierbas ya han emergido, con el objetivo de mantener el cultivo libre de competencia durante las fases críticas de su desarrollo.

Sin embargo, la tendencia actual en la agricultura se dirige hacia la reducción del laboreo, implementando prácticas de siembra directa o mínimo laboreo, lo cual obliga adelantar la época de siembra, especialmente en terrenos más arcillosos que son difíciles de trabajar cuando la época invernal es húmeda. Esta adaptación ha dificultado que, en algunos casos, el control de malas hierbas como el *Lolium spp.* no sea tan efectivo en sementera, lo que ha llevado a un aumento en los problemas relacionados con esta mala hierba.

Durante décadas, el uso de herbicidas postemergencia ha sido la estrategia más extendida para el control de malas hierbas en muchos sistemas agrícolas, especialmente en comarcas con suelos pesados y de textura arcillosa. Esta preferencia se ha debido tanto a criterios técnicos como económicos, ya que los tratamientos postemergencia permiten una intervención dirigida, y se aplican únicamente cuando se observa la presencia efectiva de malas hierbas, lo que facilita una toma de decisiones basada en umbrales de daño económico.

En las zonas cerealistas de Tierra de Campos, el control postemergencia de malas hierbas gramíneas, particularmente de especies como *Lolium spp.*, se ha basado tradicionalmente en el uso de herbicidas selectivos. Entre las materias activas más empleadas directamente para el control de vallico destacan clodinafop-propargil, un herbicida de la familia de los ariloxifenoxipropionatos (FOPs), y pinoxaden, un cetoenol que, aunque estructuralmente distinto, comparte el mismo modo de acción herbicida que los FOPs y los denominados “DIMs”

que son derivados del cicloxidim y similares (Hajjaj & El Oualkadi, 2019; Chauhan & Walsh, 2022).

Ambos compuestos actúan inhibiendo una enzima esencial para el crecimiento vegetal: la acetil-CoA carboxilasa (ACCCase), responsable de catalizar la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, lo que constituye la primera etapa comprometida en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (Sasaki & Nagano, 2004). Esta vía metabólica es crítica en las plantas, ya que estos lípidos son componentes fundamentales de las membranas celulares, además de precursores de diversas moléculas biológicamente activas. La inhibición de esta enzima impide la producción de lípidos esenciales para el desarrollo del meristemo apical, lo que conlleva la detención del crecimiento, necrosis de tejidos jóvenes, y en última instancia, la muerte de la planta.

El modo de acción de los inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCCase) ha sido ampliamente aprovechado en agricultura debido a su elevada selectividad hacia especies gramíneas. Esta característica ha permitido su uso eficaz en cultivos como el trigo y la cebada, que presentan isoformas de la enzima menos sensibles al herbicida, confiriéndoles una tolerancia natural (Busi et al., 2022). Sin embargo, la dependencia prolongada y repetitiva de herbicidas con el mismo mecanismo de acción ha generado una intensa presión de selección sobre las poblaciones de malas hierbas. Esta presión ha favorecido la aparición y propagación de biotipos resistentes, comprometiendo progresivamente la eficacia de estos compuestos en el control de especies como *Lolium spp.*, ampliamente extendidas en sistemas cerealistas (Torra et al., 2021).

Además del clodinafop y pinoxaden, también se han utilizado de forma puntual otras materias activas de postemergencia, como diclofop-metil y fenoxaprop-P-etil, si bien su uso ha sido más frecuente para el control de otras gramíneas y no tan eficaz con especies de *Lolium spp.* Todos estos herbicidas comparten, no obstante, el mismo punto de acción: la inhibición de la acetil coenzima A carboxilasa, lo que implica que pueden generarse resistencias cruzadas entre ellos cuando se aplican de forma reiterada o sin rotación de modos de acción (Frontiers, 2021; Torra et al., 2021).

En este contexto, el uso repetido y poco diversificado de estas materias activas en sistemas cerealistas ha favorecido el desarrollo de mecanismos de resistencia en poblaciones de *Lolium spp.* Por ello, resulta imprescindible no solo estudiar la magnitud del problema, sino también identificar los tipos de resistencia implicados, con el fin de establecer estrategias de manejo integradas, eficaces y sostenibles.

Desde 2016, se han reportado los primeros casos de resistencia en la zona norte de Tierra de Campos, afectando sobre todo a las especies de Vallico. El uso excesivo de productos fitosanitarios que actúan inhibiendo la enzima acetil-CoA carboxilasa, clave en la biosíntesis de ácidos grasos esenciales para el crecimiento celular, ha sido señalado como una posible causa de la resistencia en estas poblaciones, generando dudas sobre la eficacia de estos productos para el control de la mala hierba.

1.2 Objetivos de la investigación

El objetivo general de este estudio es cuantificar la magnitud del problema de la resistencia de *Lolium spp.* a herbicidas inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCCase), pertenecientes al

grupo A según la clasificación HRAC, en la comarca de Tierra de Campos. Se proporciona una explicación detallada sobre los factores agronómicos, genéticos y de manejo que dificultan su control. Además, se busca evaluar la mortalidad de individuos resistentes cuando son sometidos a tratamientos herbicidas en condiciones controladas, con el fin de caracterizar el nivel de resistencia y aportar información útil para la toma de decisiones en campo.

Objetivos específicos

- i. Confirmar la presencia de biotipos de *Lolium spp.* con resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa (grupo A, HRAC) en la región de Tierra de Campos.
- ii. Caracterizar el tipo de resistencia (mecanismos implicados y nivel de tolerancia) presente en al menos una de las poblaciones identificadas.
- iii. Proponer estrategias de manejo basadas en el control integrado para reducir la expansión y el impacto de las poblaciones resistentes de *Lolium spp.*

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Las muestras de material vegetal de la especie *Lolium spp.* para este estudio se recolectaron en múltiples parcelas distribuidas por la comarca de Tierra de Campos, abarcando los términos municipales de Paredes de Nava, Fuentes de Nava, Villamuera de la Cueva, Villaumbrales y Moral de la Reina, todos ellos situados en la provincia de Palencia (Castilla y León, España).

La participación activa de los agricultores fue fundamental, ya que su consentimiento permitió acceder a parcelas con distintos niveles de infestación de *Lolium spp.*, posibilitando la selección de lotes representativos, material necesario para la ejecución de ensayos en condiciones controladas. La experiencia local de los agricultores resultó clave para identificar zonas críticas y facilitar la logística del muestreo.

2.2 Diseño experimental

2.2.1 Muestreo de poblaciones y preparación del material vegetal.

La toma de muestras se realizó durante el mes de enero de 2025, coincidiendo con el periodo invernal y la etapa inicial de desarrollo de las malas hierbas en los cultivos cerealistas de la comarca de Tierra de Campos. El muestreo se efectuó en diferentes parcelas donde *Lolium spp.* se encontraba en el estado fenológico BBCH 12–13, correspondiente al desarrollo de 2 a 3 hojas verdaderas. Este estadio es idóneo para estudios de sensibilidad a herbicidas, ya que permite trabajar con individuos jóvenes en fase activa de crecimiento y sin interferencia competitiva con el cultivo principal.

Las plántulas fueron extraídas manualmente, asegurando la integridad del sistema radicular, y trasladadas de inmediato a las instalaciones de cultivo. El trasplante se realizó en campo en el momento de la recolección, insertando cada individuo en un alveolo individual previamente preparado con sustrato de características homogéneas. Además, se etiquetó cada muestra en el mismo instante, permitiendo una trazabilidad completa durante todo el proceso experimental.

Debido a las limitaciones de capacidad en la cámara climática, el muestreo y establecimiento de plantas se organizó de manera escalonada, en diferentes fechas, con el fin de evitar la sobresaturación del espacio y mantener condiciones ambientales constantes para cada lote. Esta estrategia metodológica permitió asegurar la uniformidad fisiológica entre réplicas y minimizó el efecto de factores ambientales no controlados.

2.2.2 Condiciones de cultivo.

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones de cultivo proporcionadas por ITAGRA.CT, en el campus de la Escuela de Ingenierías Agrarias de Palencia (Universidad de Valladolid). Se agradece expresamente su colaboración, ya que la cesión de estas infraestructuras permitió mantener condiciones controladas y homogéneas durante todo el desarrollo experimental.

Las plantas fueron mantenidas en una cámara climática con parámetros ambientales estrictamente controlados: temperatura constante de 20 °C, humedad relativa del 60 % y un

fotoperiodo de 15 horas de luz, con transiciones suaves de 30 minutos al inicio y final del ciclo lumínico. Estas condiciones aseguraron un crecimiento uniforme y libre de variaciones externas, fundamentales para evaluar la respuesta diferencial a los tratamientos herbicidas.

La disposición de las plantas se realizó en bandejas alveoladas con configuración 7×4 y un volumen individual de $5 \times 5 \times 7$ cm por alveolo, permitiendo un desarrollo radicular adecuado y evitando el entrelazado de raíces entre individuos. Las bandejas fueron ubicadas sobre mesas con sistema de riego por inundación, que proporcionó agua por capilaridad desde la base, evitando el contacto con la parte aérea de las plantas. Este sistema minimizó el riesgo de lavado del herbicida aplicado, conservando la eficacia y uniformidad del tratamiento fitosanitario.

La calidad de las condiciones de cultivo fue una prioridad a lo largo de todo el experimento: se llevó a cabo un control diario de la cámara y de la humedad del sustrato, corrigiendo de inmediato cualquier desviación que pudiera comprometer la uniformidad entre réplicas. De este modo, se aseguró que todas las plantas crecieran bajo idénticos parámetros ambientales.



Ilustración 1. Imagen de muestras de *Lolium rigidum* recopiladas en parcelas de Paredes de Nava, Fuentes de Nava, Moral de la Reina, Villamuera de La cueza y Villaumbrales en cámara de cultivo.

2.2.3 Aplicación del tratamiento herbicida

La aplicación del tratamiento fitosanitario se realizó utilizando una mochila pulverizadora motorizada equipada con una boquilla XR 110 02 Teejet, de abanico plano, replicando condiciones operativas habituales en campo. Los parámetros de trabajo establecidos fueron:

- Presión de trabajo: 3 bares
- Velocidad de avance: 5 km/h
- Volumen de aplicación: 200 L/ha

Previamente a la aplicación del herbicida, se llevó a cabo un ensayo de calibración sobre una superficie exterior, empleando únicamente agua, con el objetivo de ajustar con precisión la dosis y cobertura necesarias para bandejas de pequeño formato.

Para evitar errores por despresurización del equipo, se prepararon 2 litros de caldo por tratamiento, lo que garantizó que el volumen operativo no descendiera por debajo del umbral mínimo de 1 litro. Esta precaución evitó el descebado del sistema y posibles fluctuaciones en la presión durante la pulverización, asegurando así una aplicación uniforme y reproducible en todas las macetas.

2.2.4 Disposición experimental

Las macetas se alinearon longitudinalmente sobre el suelo, simulando pequeños lotes de campo, una disposición que permitió estabilizar el volumen de aplicación del herbicida y reducir los márgenes de error asociados al rociado en superficies reducidas.

Para garantizar la independencia experimental entre tratamientos, las muestras recolectadas de diferentes parcelas de la comarca de Tierra de Campos, así como aquellas destinadas a la evaluación del tipo de resistencia, se distribuyeron en bandejas separadas. De este modo, nunca coincidió más de una muestra del mismo tratamiento o de una misma procedencia en la misma bandeja, evitando sesgos por interferencias dentro de la unidad de aplicación.

Asimismo, la disposición de las bandejas dentro de la cámara climática se fue rotando de forma periódica. Esta rotación se llevó a cabo como medida de control para minimizar cualquier posible variación en la iluminación o microambientes, aunque la cámara está diseñada para proporcionar una distribución homogénea de luz y temperatura en todo su volumen. Esta estrategia contribuyó a mantener la equidad en las condiciones de crecimiento de todas las plantas a lo largo del ensayo.

2.2.5 Mediciones.

Para evaluar la eficacia del tratamiento herbicida, se analizaron dos variables fundamentales: el peso seco de la parte aérea y del sistema radicular, junto con el seguimiento continuo de la supervivencia de las plantas. Estas mediciones permiten detectar no solo la mortalidad directa causada por el herbicida, sino también alteraciones en el desarrollo vegetativo que, aunque no impliquen la muerte, sí reflejan una respuesta diferencial al tratamiento.

En muchos casos, los efectos de la resistencia no se traducen necesariamente en la supervivencia evidente, sino en una reducción del vigor vegetativo: plantas que permanecen vivas, pero presentan un crecimiento más lento, menor biomasa o desarrollo atrofiado. Este tipo de respuesta puede ser indicativo de mecanismos de resistencia parcial o de tolerancia al herbicida. Por ello, el análisis del peso seco, tanto en la parte aérea como en las raíces, constituye una herramienta eficaz para identificar diferencias fisiológicas entre biotipos susceptibles y resistentes, incluso cuando visualmente puedan parecer similares (Hatami et al., 2016).

Tras la recolección, la parte aérea fue cortada a ras del sustrato y el sistema radicular extraído cuidadosamente para evitar daños durante el lavado. Ambos tejidos se secaron en estufa a 60 °C

durante 48 horas en bolsas de papel debidamente etiquetadas, y posteriormente se pesaron por separado en balanza de precisión.



Ilustración 2. Imágenes de (izquierda) secado de las plantas en estufa y (derecha) pesado de parte aérea de las muestras de *Lolium spp.*

De forma paralela, se llevó a cabo una evaluación diaria de la supervivencia de cada planta durante todo el ciclo experimental. Se consideró que un individuo no sobrevivía cuando no presentaba ninguna porción verde visible (hojas, brotes o tejidos fotosintéticamente activos). Esta observación sistemática permitió registrar con precisión el momento de la muerte y complementó los datos de biomasa con un indicador directo de letalidad del tratamiento herbicida.

2.2.6 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos en las mediciones se procesaron utilizando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2025), ampliamente reconocido en el ámbito científico por su capacidad para aplicar técnicas estadísticas avanzadas y manejar datos biológicos con flexibilidad y precisión.

Para el análisis de los resultados se emplearon tanto métodos estadísticos paramétricos como no paramétricos, dependiendo del cumplimiento de los supuestos requeridos. Inicialmente, se verificó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett (Bartlett, 1937). Estas condiciones son necesarias para aplicar análisis de varianza (ANOVA) clásico (Welch, 1951), el cual permite evaluar si existen diferencias significativas entre medias de distintos grupos bajo el supuesto de distribución normal y varianzas homogéneas.

Cuando ambos supuestos se cumplieron, se aplicó un ANOVA unifactorial clásico, seguido del test HSD de Tukey para las comparaciones múltiples entre tratamientos (Tukey, 1949). Sin embargo, en aquellos casos donde no se alcanzaron estos supuestos, se optó por métodos estadísticos robustos, los cuales permiten mantener la validez del análisis frente a desviaciones de normalidad o varianzas desiguales. En concreto, se empleó un ANOVA de Welch (Welch, 1951), adaptado mediante una transformación robusta con recorte del 10 % en las colas, usando

el paquete WRS2 de R (Mair & Wilcox, 2020), según el enfoque propuesto por García-Pérez (2010).

El uso de métodos robustos se justifica especialmente en estudios biológicos con datos heterogéneos o tamaños muestrales desiguales, donde los métodos clásicos podrían inflar el error tipo I o perder potencia estadística. Esta aproximación permite obtener resultados fiables sin necesidad de forzar la transformación de los datos.

Adicionalmente, para el análisis de supervivencia, se utilizó el estimador no paramétrico Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958), implementado en el paquete survival (Therneau, 2024). Las curvas se generaron con la función `survfit()`, y las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante el test log-rank `survdif()` (Mantel, 1966), apropiado para comparar distribuciones de supervivencia sin asumir una forma específica de distribución.

En todos los casos, se estableció un nivel de significancia de $p < 0.05$, considerándose diferencias significativas aquellas con valores inferiores a este umbral.

2.3 Evaluación de la resistencia a herbicidas.

Para la evaluación de la resistencia a herbicidas en las poblaciones de *Lolium spp.* analizadas, se utilizó como referencia el herbicida pinoxaden, un principio activo perteneciente al grupo de los inhibidores de la enzima acetil-Coenzima A carboxilasa (ACCase). Esta enzima es fundamental en la biosíntesis de ácidos grasos, esenciales para la formación de membranas celulares y el desarrollo normal de tejidos vegetales. Pinoxaden interfiere específicamente en este proceso al bloquear la ACCase, lo que impide la producción de lípidos, provocando un colapso metabólico en las células meristemáticas de las gramíneas y, en consecuencia, la muerte de la planta.

Esta materia activa es altamente selectiva para gramíneas anuales y ha sido ampliamente utilizada en cereales de invierno como trigo y cebada. Su elección en este estudio se justifica por ser uno de los herbicidas más empleados en la comarca de Tierra de Campos para el control de *Lolium spp.*, y por tanto, el principal agente de selección de posibles biotipos resistentes en la región.

Con el objetivo de determinar la resistencia a este herbicida en diferentes poblaciones de *Lolium spp.*, se realizó un muestreo sistemático en 22 parcelas agrícolas de Tierra de Campos. En concreto, se recolectaron muestras en 11 parcelas de Paredes de Nava, 4 en Fuentes de Nava, 3 en Villamuera de la Cueva, 2 en Moral de la Reina y 2 en Villaumbrales. En cada parcela se recolectaron cuatro plántulas en el estado fenológico de dos hojas verdaderas (BBCH 12-13), seleccionadas de forma distribuida para capturar adecuadamente la variabilidad intrapoblacional.

A continuación, se presentan la denominación usada en las parcelas muestreadas, la zona de muestreo y la denominación corta asignada para facilitar la escritura en los análisis estadísticos, y no se indican recintos catastrales ni ubicación por respeto a la privacidad de los agricultores.

Tabla 1 Parcelas muestreadas en la zona de Tierra de Campos para la identificación de biotipos resistentes a Pinoxaden.

Parcela muestreada	Localización	Denominación corta
PA 17.24.1	Paredes de Nava	P1
PA 23.13	Paredes de Nava	P2
PA 17.24.2	Paredes de Nava	P3
PA 17.11.2	Paredes de Nava	P4
PA 40.8	Paredes de Nava	P5
PA 15.18	Paredes de Nava	P6
PA 39.14	Paredes de Nava	P7
PA 50.17	Paredes de Nava	P8
PA 49.15	Paredes de Nava	P9
PA 60.65	Paredes de Nava	P10
PA 60.64	Paredes de Nava	P11
MR 1.9	Moral de la Reina	P12
MR 1.68	Moral de la Reina	P13
FU 24.2	Fuentes de Nava	P14
FU 5.28	Fuentes de Nava	P15
FU 5.20027	Fuentes de Nava	P16
FU 57.2	Fuentes de Nava	P17
VM 9.14	Villamuera de la cueza	P18
VM 3.20	Villamuera de la cueza	P19
VM 1.50001	Villamuera de la cueza	P20
VI 501.36	Villaumbrales	P21
VI 501.83	Villaumbrales	P22

Las plántulas fueron mantenidas en condiciones de cultivo controlado hasta alcanzar el estadio BBCH 29 (fin del ahijado), etapa considerada óptima para la aplicación de herbicidas del grupo ACCase. En ese momento se aplicó pinoxaden a una dosis de 60 g/ha, correspondiente a la máxima autorizada en cebada en España, asegurando una distribución homogénea del tratamiento y un manejo uniforme de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, iluminación y riego).

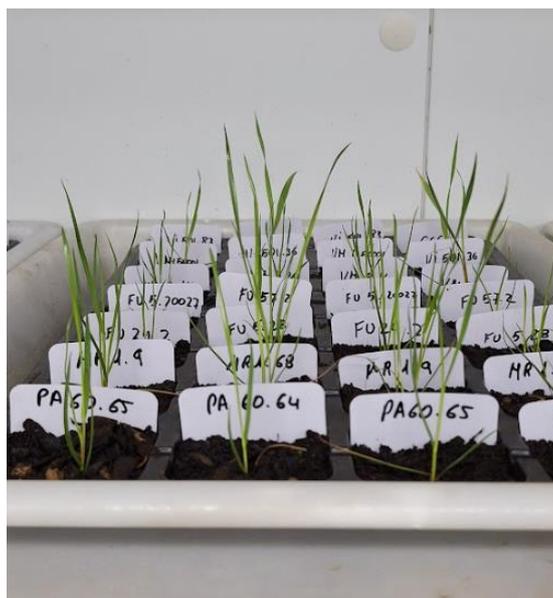


Ilustración 3. Imagen de las muestras de *Lolium spp.* en cámara climática tras 6 días de su recolección en campo.

Tras la aplicación, las plantas continuaron su desarrollo hasta el estadio BBCH 51 (inicio de espigado), punto en el cual se procedió a evaluar cuantitativamente los efectos del tratamiento sobre el crecimiento vegetal. Cada planta fue cosechada individualmente, cortando la parte aérea a ras del sustrato. El material fue secado y pesado para determinar el peso seco de la biomasa aérea y radicular, según lo detallado previamente.

La evaluación de la supervivencia se llevó a cabo según el protocolo descrito en el apartado de mediciones, con observaciones diarias desde la aplicación hasta el final del ciclo

2.4 Identificación de biotipos de resistencia

Una vez detectadas poblaciones de *Lolium spp.* (vallico) que no respondían a la aplicación del herbicida pinoxaden, se seleccionó una de ellas, la correspondiente a la parcela PA 23.13, para analizar en profundidad el mecanismo de resistencia presente. Esta decisión se basó en que dicha población mostró previamente un índice elevado de supervivencia y baja reducción de biomasa tras el tratamiento, lo que sugiere una alta probabilidad de resistencia efectiva.

El objetivo de este ensayo específico era determinar si la resistencia observada se debía a una modificación en el lugar de acción del herbicida (es decir, una mutación en la enzima diana) o a un mecanismo metabólico que permitiera a la planta detoxificar el producto antes de que ejerciera su efecto.

En agronomía, los dos principales mecanismos de resistencia a herbicidas son:

- **Resistencia por modificación del sitio de acción (TSR, target-site resistance):** en este caso, el herbicida pierde eficacia porque no puede unirse correctamente a su diana molecular. En el caso de pinoxaden, dicha diana es la enzima ACCase (acetil-CoA carboxilasa), esencial en la síntesis de ácidos grasos. Mutaciones puntuales en esta enzima, como Ile-1781-Leu o Asp-2078-Gly, reducen o anulan la afinidad del herbicida (Gaines et al., 2020).
- **Resistencia metabólica o no específica (NTSR, non-target-site resistance):** aquí, la planta no altera el sitio de acción, sino que produce enzimas detoxificadoras, como los citocromos P450, capaces de metabolizar el herbicida antes de que actúe. Este tipo de resistencia suele ser más difícil de detectar y puede conferir resistencia cruzada a varios herbicidas con modos de acción distintos (Gaines et al., 2020).

El PBO (butóxido de piperonilo) es un inhibidor de los citocromos P450. Si la combinación de PBO y pinoxaden restablece la efectividad del herbicida, se interpreta que la resistencia está mediada por mecanismos metabólicos. Si, por el contrario, la adición de PBO no modifica la respuesta, se considera que la resistencia se debe probablemente a mutaciones en el sitio de acción (TSR) (Cytochrome P450 Herbicide Metabolism..., 2020).

Para diferenciar ambos mecanismos, se cultivaron 70 plántulas de la población PA 23.13 bajo condiciones controladas y se dividieron en varios grupos (10 plantas por tratamiento), aplicando los siguientes tratamientos:

Tabla 2: Tratamientos aplicados en el estudio del tipo de resistencia que presenta el biotipo PA23.13

Tratamiento	Tipo de actuación
CONTROL	Testigo Sin actuación
PBO	Butoxido de piperonilo(PBO) 1%
T1	Pinoxaden 30 g/ha
T2	Pinoxaden 030g/ha + pbo1%
T3	Pinoxaden 60 g/ha
T4	Pinoxaden 60g/ha+ pbo1%
T5	Pinoxaden 120g/ha

La respuesta observada en cada grupo tratado permite inferir el tipo de resistencia presente en la población analizada. Si la combinación del herbicida pinoxaden con el inhibidor metabólico PBO (butóxido de piperonilo) provoca un incremento significativo de la mortalidad o una reducción acusada en la biomasa en comparación con la aplicación del herbicida solo, esto sugiere que el biotipo presenta un mecanismo de resistencia metabólica (NTSR). En este caso, el PBO bloquea las enzimas detoxificadoras, como los citocromos P450, impidiendo la degradación del herbicida y restableciendo su eficacia.

Por el contrario, si incluso al aplicar dosis muy elevadas de pinoxaden (como en el tratamiento T5, 120 g/ha), las plantas sobreviven sin una disminución clara de la biomasa, y la combinación con PBO tampoco mejora los resultados, esto indicaría la presencia de una resistencia por modificación del sitio de acción (TSR). En este escenario, el herbicida no logra unirse a su diana debido a mutaciones específicas en la enzima ACCase, lo que impide su acción incluso a dosis fuera de etiqueta.

Así, el diseño experimental basado en distintos niveles de dosis y la combinación con PBO permite discriminar de forma eficaz entre ambos mecanismos, proporcionando información clave para el diseño de estrategias de manejo y rotación de herbicidas adaptadas al tipo de resistencia presente en la población de estudio.

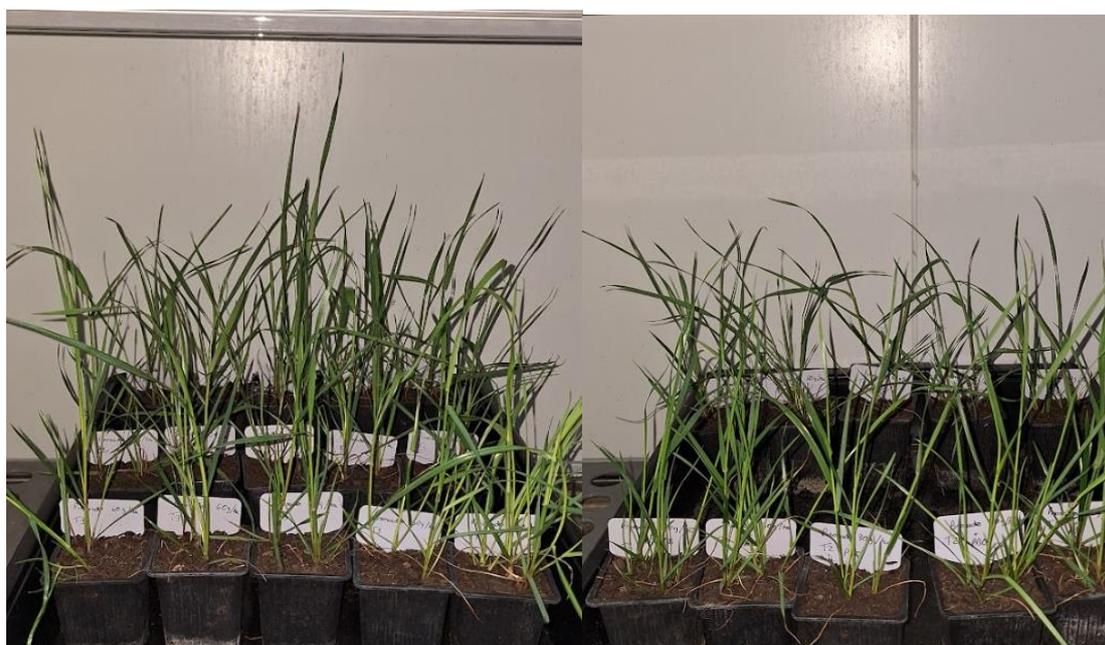


Ilustración 4. Imagen de tratamientos T1-T5 aplicados en el ensayo de biotipos de resistencia.

3 RESULTADOS

3 RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos a partir de los ensayos descritos previamente: la evaluación de la resistencia a herbicidas (apartado 2.3) y la identificación de biotipos con posibles mecanismos de resistencia (apartado 2.4). Los datos obtenidos permiten analizar el comportamiento de las poblaciones estudiadas frente a diferentes principios activos, así como caracterizar la posible presencia de resistencia en función de la respuesta observada en los tratamientos aplicados. A continuación, se detallan los principales hallazgos de ambos ensayos.

3.1 Resultados de la evaluación de la resistencia a Pinoxaden.

3.1.1 Resultados obtenidos en la medición del peso seco de parte aérea.

En primer lugar, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas sobre los datos de biomasa aérea para determinar el enfoque estadístico más adecuado. El test de normalidad de Shapiro-Wilk aplicado a cada tratamiento mostró que varias poblaciones presentaban distribuciones significativamente alejadas de la normalidad, como es el caso de P1 ($W = 0.6428$, $p = 0.0019$), P21 ($W = 0.6788$, $p = 0.0064$) y el testigo ($W = 0.8119$, $p = 0.0278$). No obstante, otras poblaciones como P11 ($W = 0.9937$, $p = 0.9755$), P19 ($W = 0.9966$, $p = 0.9884$) y P5 ($W = 0.9626$, $p = 0.7950$) sí mostraron un ajuste adecuado a la distribución normal.

A su vez, el test de homogeneidad de varianzas de Bartlett reveló una heterogeneidad significativa entre tratamientos ($\chi^2 = 139.03$; $gl = 22$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$), descartando la posibilidad de asumir varianzas iguales. En vista de estos resultados, se optó por emplear métodos estadísticos robustos, más adecuados para manejar datos con distribuciones no normales y varianzas desiguales.

Dado el incumplimiento simultáneo de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicó un análisis de varianza robusto basado en medias recortadas al 10 % mediante la función `t1way` del paquete `WRS2` en R. Este enfoque permite minimizar la influencia de valores atípicos y distribuciones asimétricas, proporcionando estimaciones más fiables bajo condiciones de heterogeneidad.

El análisis reveló diferencias estadísticamente significativas en el peso seco de la biomasa aérea entre los tratamientos ($F = 13.90$; $gl_1 = 22$; $gl_2 \approx 24.95$; $p < 0.001$), lo que indica que la respuesta al herbicida pinoxaden no fue uniforme entre las distintas poblaciones analizadas. El tamaño del efecto fue elevado ($\xi = 0.80$), con un intervalo de confianza por bootstrap del 95 % entre 0.71 y 1.13, lo que respalda la existencia de una variabilidad biológicamente relevante entre biotipos.

Con el objetivo de identificar posibles biotipos resistentes al herbicida pinoxaden, se realizó un análisis post-hoc robusto mediante el test de Lincon con recorte del 10 %, enfocado en la comparación entre cada población y el testigo no tratado. Este procedimiento permitió evaluar con precisión qué poblaciones mantuvieron un nivel de biomasa aérea similar al control, lo que se interpreta como indicio de resistencia funcional.

Los resultados mostraron que las parcelas P1 ($p = 0.9946$), P2 ($p = 0.9946$), P7 ($p = 0.6531$), P17 ($p = 0.9946$), P18 ($p = 0.9946$), P20 ($p = 0.9946$) y P21 ($p = 0.9946$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el testigo, indicando que las plantas de estas

poblaciones no sufrieron una reducción significativa de biomasa aérea tras el tratamiento. Esta similitud en la respuesta sugiere la posible presencia de biotipos resistentes al herbicida pinoxaden, al menos en una proporción de individuos dentro de dichas parcelas. Esta similitud en el crecimiento sugiere que estas poblaciones contienen individuos capaces de tolerar el efecto del herbicida, por lo que se consideran posibles biotipos resistentes.

Por el contrario, un grupo amplio de parcelas presentó diferencias significativas en biomasa aérea con respecto al testigo, reflejando un control eficaz del crecimiento por parte del herbicida y, por tanto, una respuesta susceptible. Las poblaciones que mostraron diferencias estadísticamente significativas con el testigo incluyeron P3 ($p = 0.0008$), P4 ($p = 0.0010$), P5 ($p = 0.0010$), P6 ($p = 0.0009$), P8 ($p = 0.0011$), P9 ($p = 0.0010$), P10 ($p = 0.0022$), P11 ($p = 0.0011$), P12 ($p = 0.0058$), P13 ($p = 0.0021$), P14 ($p = 0.0011$), P15 ($p = 0.0009$), P16 ($p = 0.0012$), P19 ($p = 0.0033$) y P22 ($p = 0.0006$). En todos estos casos, las diferencias se ubicaron por debajo del umbral de significación del 5 %, con valores en su mayoría inferiores al 1 %, lo que refuerza la evidencia de susceptibilidad al herbicida pinoxaden.

Estos resultados permiten establecer una clasificación preliminar de las poblaciones de *Lolium spp.* estudiadas en función de su respuesta al herbicida. La identificación de biotipos resistentes es clave para orientar futuras estrategias de manejo integrado de malas hierbas y prevenir la expansión de resistencia en la región.

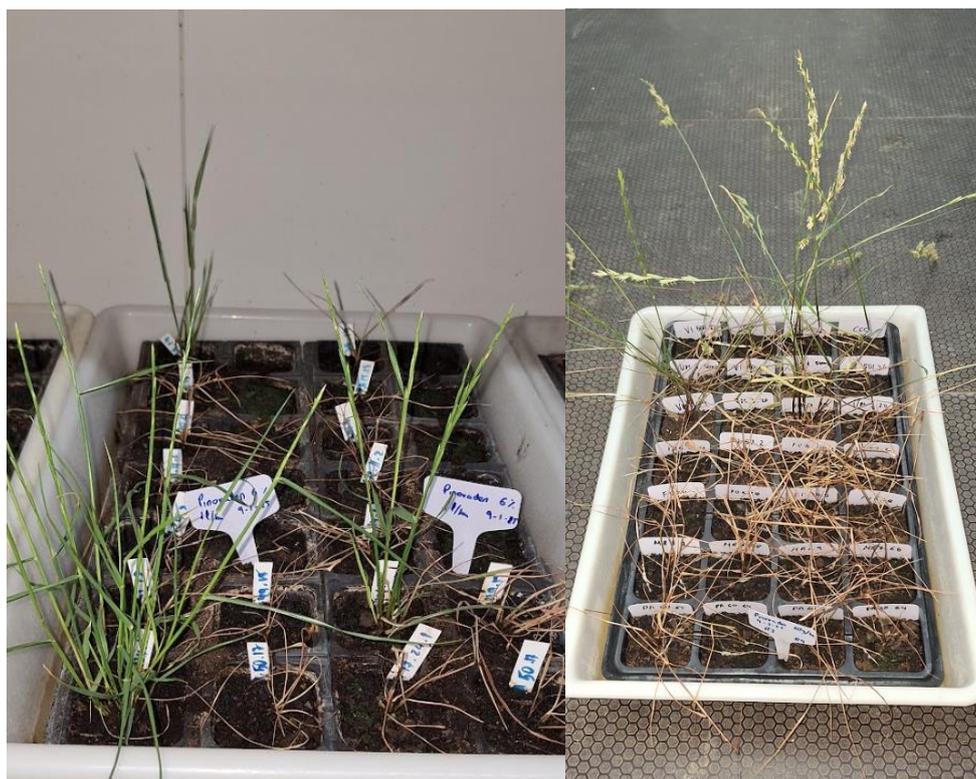


Ilustración 5. Imagen de la presencia de muestras de *Lolium spp.* resistentes a pinoxaden.

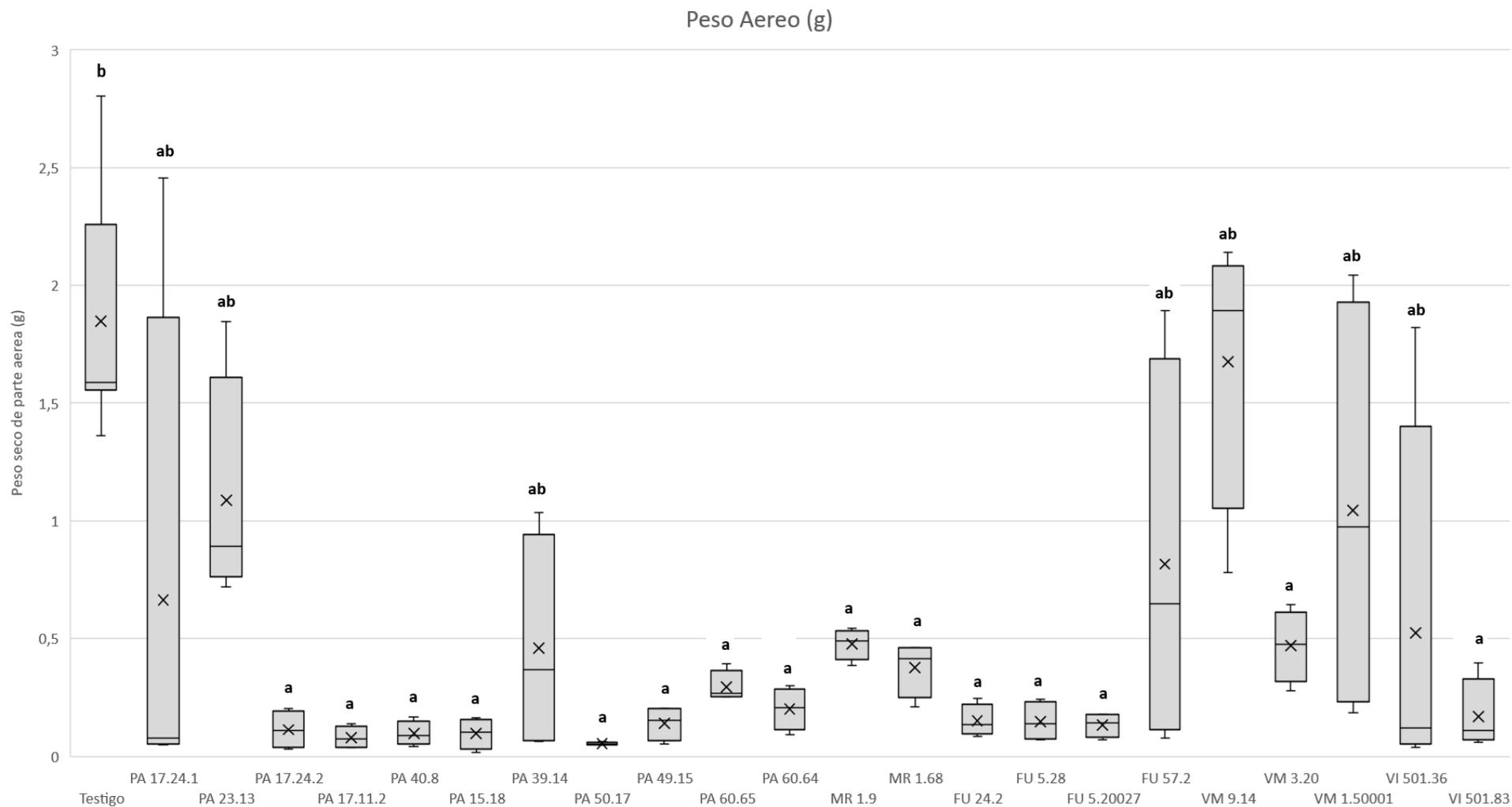


Ilustración 6: Diagrama de cajas y bigotes de los pesos secos de parte aérea de las muestras recogidas en los 22 parcelas en Tierra de Campos.

3.1.2 Resultados obtenidos en la medición del peso seco de raíces

En primer lugar, se evaluó la normalidad de los datos de biomasa radicular utilizando el test de Shapiro-Wilk aplicado individualmente a cada tratamiento. Este análisis permitió identificar aquellas poblaciones cuyas distribuciones diferían significativamente de una distribución normal. En concreto, se detectaron desviaciones estadísticamente significativas en las poblaciones P5 ($W = 0.7218$, $p = 0.0203$), P6 ($W = 0.7563$, $p = 0.0442$), P10 ($W = 0.7193$, $p = 0.0191$), P13 ($W = 0.7101$, $p = 0.0151$), P17 ($W = 0.7291$, $p = 0.0241$), así como en el testigo (T) ($W = 0.7957$, $p = 0.0182$). En todos estos casos, los valores de p fueron inferiores al umbral de 0.05, lo que indica que la biomasa radicular no sigue una distribución normal en esas poblaciones.

En contraste, el resto de las parcelas presentaron resultados no significativos ($p > 0.05$), lo que sugiere que, en esos casos, los datos se ajustan razonablemente a una distribución normal. No obstante, la presencia de no normalidad en varias poblaciones clave —incluyendo el testigo— desaconseja la aplicación de métodos paramétricos clásicos que requieren el cumplimiento estricto de este supuesto.

Para evaluar la igualdad de varianzas entre los tratamientos en la variable de biomasa radicular, se aplicó el test de homogeneidad de varianzas de Bartlett. El resultado obtenido fue altamente significativo ($\chi^2 = 129.05$; $gl = 22$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$), lo que indica una clara heterogeneidad de varianzas entre los grupos analizados. Este hallazgo refuerza la evidencia aportada por el test de normalidad y confirma que los datos no cumplen con los supuestos necesarios para aplicar un análisis de varianza clásico (ANOVA paramétrico).

Dada la falta de normalidad en varias poblaciones y la significativa heterogeneidad de varianzas entre tratamientos, se optó por aplicar un análisis estadístico robusto. Concretamente, se utilizó un ANOVA de medias recortadas al 10 % mediante la función `t1way` del paquete WRS2 en R. Este enfoque permite reducir la influencia de valores atípicos y distribuciones sesgadas, proporcionando estimaciones más fiables en contextos donde no se cumplen los supuestos clásicos.

El análisis reveló diferencias altamente significativas entre tratamientos en cuanto al peso seco de biomasa radicular ($F = 38.57$; $gl_1 = 22$; $gl_2 \approx 25.5$; $p < 0.001$), lo que indica una fuerte variabilidad en la respuesta de las raíces al tratamiento con pinoxaden. Además, el tamaño del efecto obtenido fue muy elevado ($\xi = 0.91$), con un intervalo de confianza por bootstrap del 95 % comprendido entre 0.83 y 1.05. Estos valores confirman la existencia de diferencias biológicamente relevantes entre las poblaciones analizadas y respaldan la utilidad del enfoque robusto en este contexto experimental.

El análisis de comparaciones múltiples mediante el procedimiento robusto de Lincon no identificó diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las 22 parcelas evaluadas y el testigo ($p > 0.05$ en todos los casos). Este hallazgo indica que, desde el punto de vista del peso radicular, ninguna de las poblaciones de *Lolium spp.* puede considerarse susceptible al herbicida pinoxaden, al menos según este criterio fisiológico. La ausencia de diferencias significativas sugiere que las raíces de las plantas tratadas en las distintas parcelas mantuvieron un desarrollo comparable al del grupo control, lo que podría reflejar una mayor tolerancia o una recuperación radicular eficaz tras la aplicación del herbicida.

No obstante, el análisis sí permitió identificar diferencias significativas entre ciertas parcelas, lo que indica una variabilidad significativa en el desarrollo radicular entre biotipos. Por ejemplo, se encontraron diferencias significativas entre la parcela **P18** y varias otras, como P11 ($p = 0.02165$), P15 ($p = 0.00307$), P16 ($p = 0.03315$), P5 ($p = 0.00222$), P6 ($p = 0.02565$), P8 ($p = 0.04943$) y P22 ($p = 0.00286$).

De manera similar, la parcela **P19** presentó diferencias significativas con P11 ($p = 0.00025$), P16 ($p = 0.00046$), P3 ($p = 0.00025$), P4 ($p = 0.01875$), P6 ($p = 0.00030$), P8 ($p = 0.00248$) y P9 ($p = 0.01499$).

Las parcelas P18 y P19 se situaron estadísticamente en un grupo estadístico b, caracterizado por presentar la biomasa radicular más alta del ensayo. Además de sus valores promedio elevados, estas parcelas no mostraron diferencias significativas con el testigo, al igual que otras como P1, P2, P7, P10, P12, P13, P15, P17, P20 y P21, que también pueden considerarse dentro de un grupo intermedio (AB). Este conjunto comparte el hecho de no diferir estadísticamente del testigo, lo que sugiere una mayor uniformidad en la respuesta al tratamiento herbicida. Por el contrario, el resto de las parcelas, aunque tampoco se diferenciaron del testigo, sí mostraron diferencias significativas con las parcelas 18 y 19, agrupándose en un grupo A, estadísticamente inferior en cuanto a biomasa radicular.

Estas diferencias reflejan una heterogeneidad en la respuesta radicular entre poblaciones, aunque sin vinculación directa con la presencia o ausencia de resistencia al herbicida, ya que el testigo se encuentra estadísticamente relacionado tanto con poblaciones de baja como de alta biomasa. Por tanto, el peso radicular no se presenta como un indicador fiable por sí solo para discriminar entre poblaciones susceptibles y resistentes, y debe interpretarse conjuntamente con otras variables como la biomasa aérea y la supervivencia.

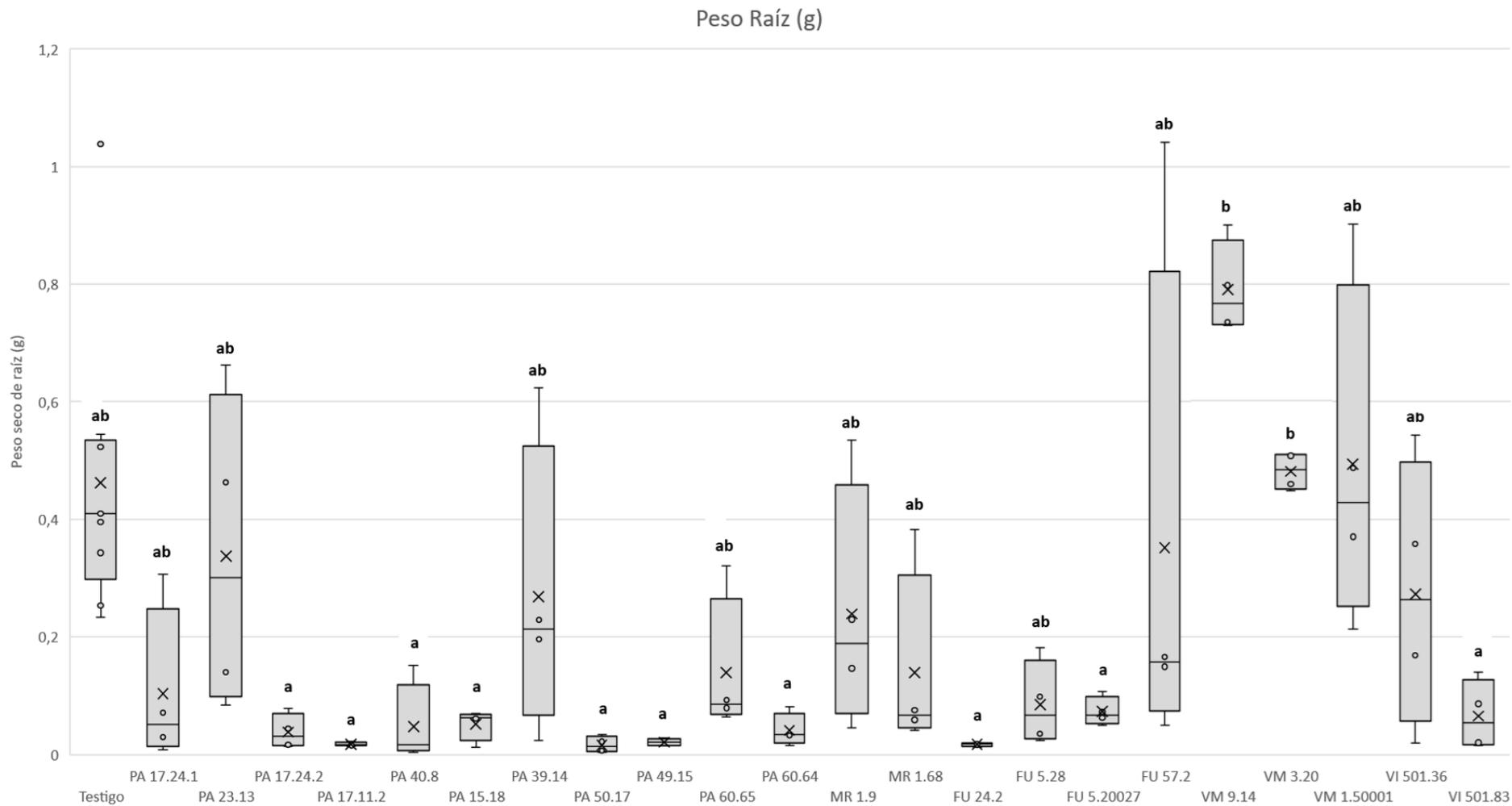


Ilustración 7. Diagrama de cajas y bigotes de los pesos secos de raíces de las muestras recogidas en las 22 parcelas en tierra de campos.

3.1.3 Resultados del análisis de supervivencia.

3.1.3.1 Análisis de supervivencia en parcelas de Paredes de Nava.

El análisis de supervivencia realizado mediante el modelo de Kaplan-Meier evidenció diferencias notables entre las poblaciones de *Lolium spp.* evaluadas en la localidad de Paredes. El testigo (sin aplicación de herbicida) mantuvo una supervivencia del 100 % a lo largo del periodo de evaluación, actuando como referencia para la comparación de resistencia.

Se observó que únicamente la población P2 no presentó diferencias estadísticamente significativas con el testigo ($\chi^2 = 2.2$; $p > 0.05$). Esta población alcanzó una supervivencia del 75 % al final del ensayo, lo que indica posibles indicios de resistencia al tratamiento con herbicida. En contraste, la población P7, a pesar de presentar una supervivencia del 50 %, mostró diferencias estadísticamente significativas frente al testigo ($\chi^2 = 5.2$; $p = 0.02$), por lo que no puede considerarse resistente con base en estos datos.

Por el contrario, el resto de las poblaciones analizadas (P1, P3, P4, P5, P6, P8, P9, P10 y P11) presentaron diferencias significativas frente al testigo ($p < 0.05$ en todos los casos), con supervivencias finales entre el 0 % y el 25 %. En particular, las poblaciones P3, P4, P5 y P6 mostraron mortalidad completa y valores de χ^2 superiores a 13 ($p < 0.001$), lo que indica una alta susceptibilidad. La población P1, aunque alcanzó un 25 % de supervivencia, también se comportó significativamente diferente del testigo ($\chi^2 = 9.3$; $p = 0.002$), descartando la presencia de resistencia.

Las poblaciones P10 y P11, a pesar de no haber presentado eventos de supervivencia (0 %), también mostraron diferencias estadísticamente significativas con el testigo ($p < 0.001$), lo cual confirma su susceptibilidad y descarta que la falta de eventos se deba a baja potencia estadística.

En resumen, solo P2 y P7 combinaron una elevada supervivencia con la ausencia de diferencias significativas frente al testigo, por lo que pueden considerarse como las únicas poblaciones con indicios sólidos de resistencia en esta localidad. Estas observaciones se ven respaldadas por el resultado global del test de log-rank (Mantel-Cox), que arrojó un valor de $\chi^2 = 48.8$ con 11 grados de libertad, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.0001$), lo que confirma la heterogeneidad en las curvas de supervivencia entre tratamientos.

Análisis de supervivencia Paredes de Nava

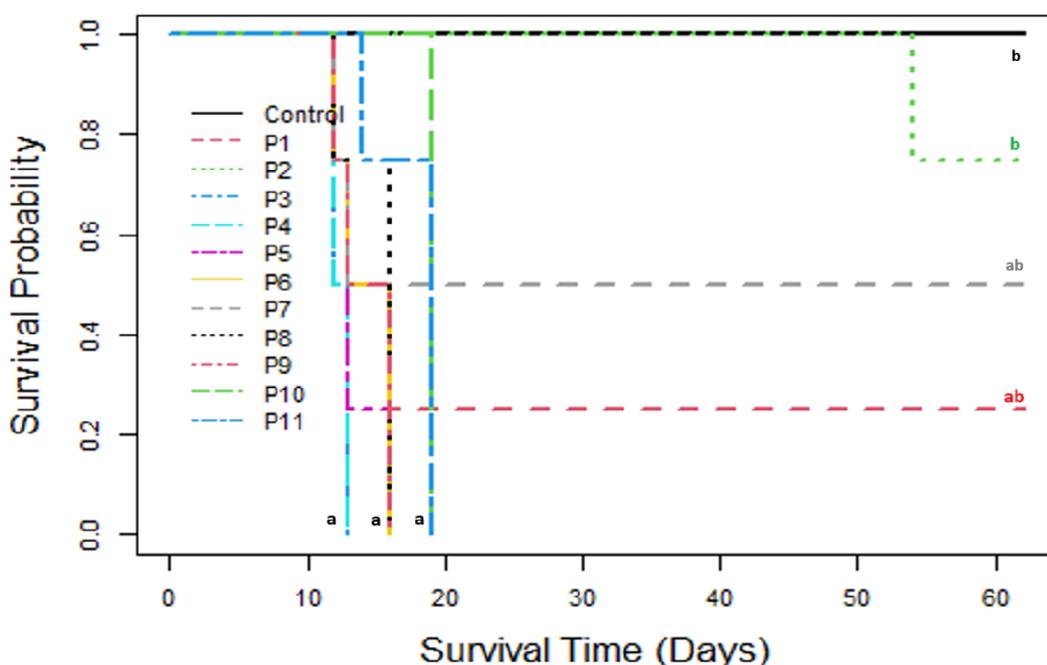


Ilustración 8. Diagrama de Kaplan-meier de supervivencia en las parcelas de Paredes de Nava.

3.1.3.2 Análisis de supervivencia en parcelas de Fuentes de Nava

El análisis de supervivencia realizado con las poblaciones de *Lolium spp.* procedentes de Fuentes de Nava reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($\chi^2 = 23.1$; $gl = 4$; $p = 0.0001$), evidenciando una respuesta diferencial al herbicida entre las parcelas evaluadas.

A partir de los resultados individuales del test de log-rank frente al testigo, se observó que todas las poblaciones presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado. Las parcelas P14 ($\chi^2 = 14.9$; $p = 0.0001$), P15 ($\chi^2 = 12.9$; $p = 0.0003$), P16 ($\chi^2 = 13.9$; $p = 0.0002$) y P17 ($\chi^2 = 9.3$; $p = 0.002$) mostraron tasas de supervivencia claramente reducidas frente al testigo, que mantuvo una supervivencia del 100 %.

En términos de supervivencia acumulada final, todas las parcelas de Fuentes de Nava alcanzaron valores bajos: P14, P15 y P16 terminaron con un 0 %, mientras que P17 conservó un 25 %. No obstante, este porcentaje no evitó que su comportamiento fuera significativamente distinto al del testigo, por lo que tampoco puede considerarse como indicio de resistencia.

El análisis de comparaciones por pares entre parcelas reveló que no existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de P14, P15, P16 y P17, lo que permite clasificarlas dentro del mismo grupo estadístico. Todas ellas mostraron un patrón homogéneo de susceptibilidad al tratamiento herbicida, diferenciándose del control.

En consecuencia, ninguna de las poblaciones de Fuentes de Nava puede ser considerada resistente, ya que todas mostraron mortalidad significativa frente al herbicida y una reducción clara en la probabilidad de supervivencia en comparación con el testigo.

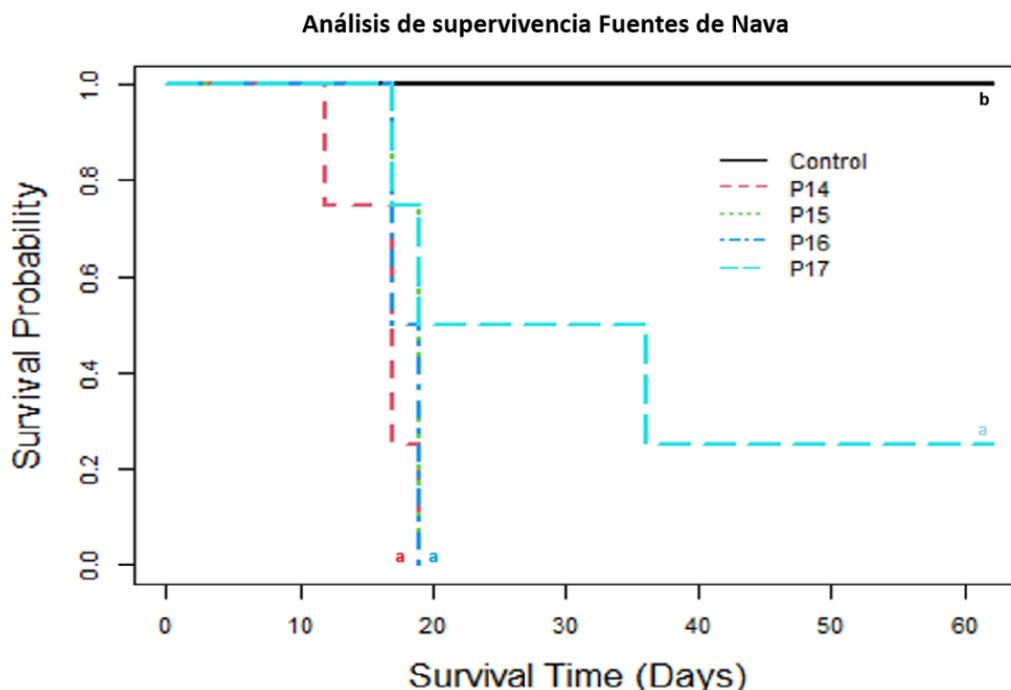


Ilustración 9. Diagrama de Kaplan-meier de supervivencia en las parcelas de Fuentes de Nava.

3.1.3.3 Análisis de supervivencia Villamuera de la Cueva.

El análisis de supervivencia para las poblaciones procedentes de Villamuera de la Cueva mostró diferencias globales significativas entre tratamientos ($\chi^2 = 11.3$; $gl = 3$; $p = 0.01$), evidenciando distintos niveles de respuesta al herbicida.

La población P18 se mantuvo sin mortalidad a lo largo del ensayo, con una supervivencia del 100 %. Esta respuesta fue estadísticamente indistinguible de la del testigo, sin diferencias detectables en la comparación directa ($\chi^2 = 0$; $p = NA$), lo que sugiere una alta tolerancia al tratamiento.

Por otro lado, la población P19 presentó una supervivencia final del 25 %, con mortalidad progresiva registrada hasta el día 41. Esta población mostró diferencias significativas respecto al control ($\chi^2 = 8.7$; $p = 0.003$), lo que indica una respuesta más susceptible al herbicida. Además, la comparación entre P18 y P19 también resultó significativa ($\chi^2 = 4.1$; $p = 0.04$), lo que refuerza la divergencia entre ambas en términos de supervivencia.

La población P20, con una supervivencia del 50 % al final del periodo de evaluación, también mostró una diferencia significativa respecto al testigo ($\chi^2 = 5.2$; $p = 0.02$), aunque no se observaron diferencias significativas ni con P18 ($\chi^2 = 2.3$; $p = 0.1$), ni con P19 ($\chi^2 = 0.1$; $p = 0.7$).

En conjunto, los datos indican que P18 mantiene un comportamiento resistente al no mostrar diferencias frente al control, mientras que P19 y P20 reflejan una mayor susceptibilidad al tratamiento herbicida.

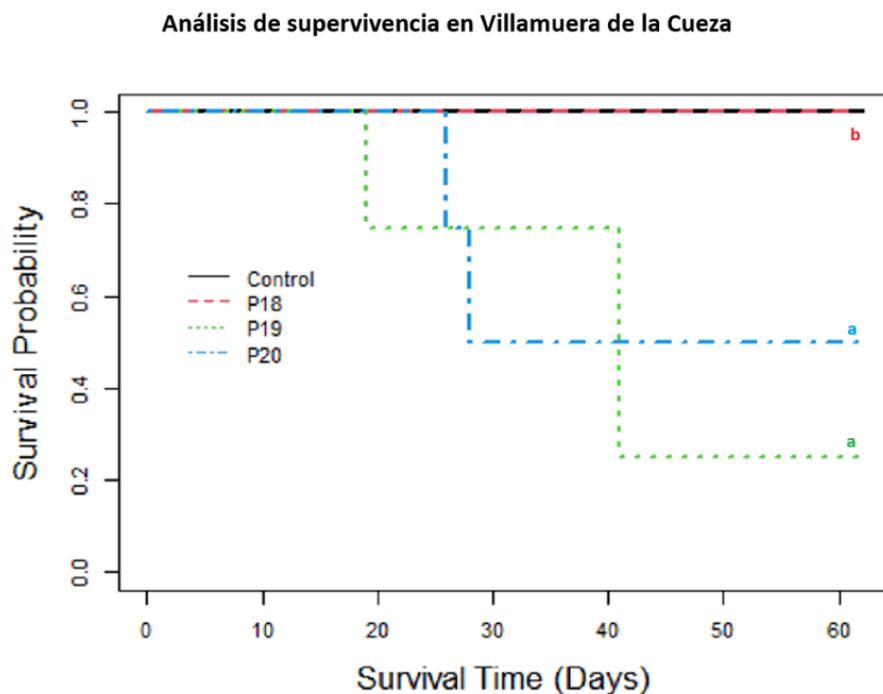


Ilustración 10. Diagrama de Kaplan-meier de supervivencia en las parcelas de Villamuera de la Cueva..

3.1.3.4 Análisis de supervivencia en Moral de La Reina.

El análisis de supervivencia para las poblaciones de Moral de la Reina reveló diferencias significativas entre tratamientos ($\chi^2 = 16.0$; $gl = 2$; $p = 0.0003$), indicando efectos diferenciados del tratamiento herbicida sobre las poblaciones evaluadas.

Ambas poblaciones, P12 y P13, mostraron una mortalidad completa al día 19 del experimento, alcanzando una supervivencia final del 0%. Las comparaciones individuales con el testigo evidenciaron diferencias altamente significativas tanto para P12 ($\chi^2 = 12.0$; $p = 0.0005$) como para P13 ($\chi^2 = 12.0$; $p = 0.0005$), lo que sugiere una fuerte sensibilidad al tratamiento en ambas poblaciones.

La comparación directa entre P12 y P13 no arrojó diferencias (p no calculado, supervivencia idéntica), indicando un comportamiento homogéneo frente al herbicida.

En conjunto, los resultados señalan que ninguna de las poblaciones de Moral de la Reina mostró tolerancia o resistencia al tratamiento aplicado.

Análisis de supervivencia en Moral de la Reina

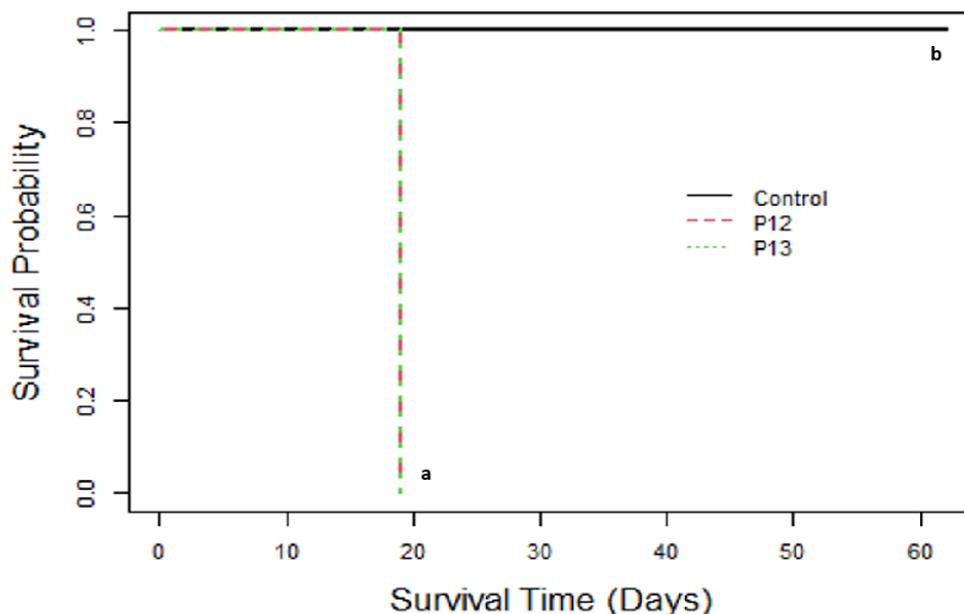


Ilustración 11. Diagrama de Kaplan-meier de supervivencia en las parcelas de Moral de la Reina..

3.1.3.5 Análisis de supervivencia en Villaumbrales.

El análisis de supervivencia en Villaumbrales reveló diferencias significativas entre las poblaciones evaluadas ($\chi^2 = 16.0$; $gl = 2$; $p = 0.0003$), indicando una respuesta diferencial al tratamiento herbicida.

La población P21 mostró una supervivencia final del 25 %, con diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo ($\chi^2 = 8.7$; $p = 0.003$). La población P22, por su parte, presentó un patrón de mortalidad más acusado, con una supervivencia del 25 % al día 17 y caída al 0 % en el día 28. Esta diferencia con el testigo fue también significativa ($\chi^2 = 14.2$; $p = 0.0002$), reflejando una alta sensibilidad al herbicida.

La comparación directa entre P21 y P22 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($\chi^2 = 0.9$; $p = 0.3$), lo que indica que ambas respondieron de manera similar, aunque en ambos casos la respuesta fue significativamente distinta a la del control.

Análisis de supervivencia en Villaumbrales

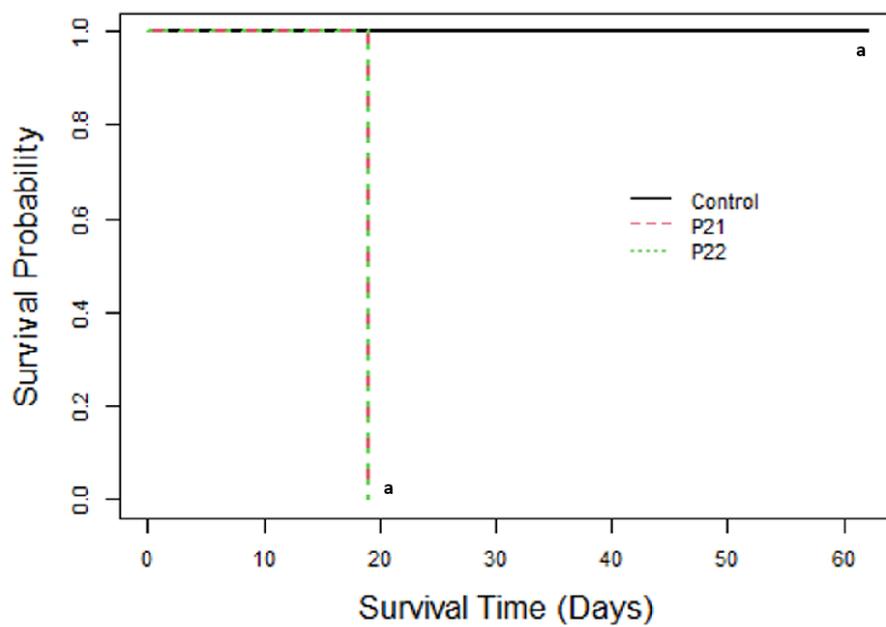


Ilustración 12. Diagrama de Kaplan-meier de supervivencia en las parcelas de Villaumbrales.

3.2 Resultados de la identificación de biotipos de resistencia

Para verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad, se aplicó el test de Shapiro-Wilk a los residuos de cada tratamiento. En todos los casos, los valores de significación fueron superiores a 0.05, lo que indicó que no se rechazaba la hipótesis nula de normalidad. Por ejemplo, los tratamientos T2 y T3 presentaron estadísticos de Shapiro-Wilk de 0.993 ($p = 0.990$) y 0.926 ($p = 0.567$), respectivamente. De forma similar, el tratamiento T5 obtuvo un valor de 0.780 ($p = 0.055$), cercano al umbral, pero aún dentro del rango aceptable.

Estos resultados respaldaron la validez del análisis de varianza posterior, al cumplirse el supuesto de normalidad en los datos analizados.

La prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene no mostró diferencias significativas entre los grupos ($F = 1,895$; $gl = 6, 28$; $p = 0,117$), lo que indica que se cumple el supuesto de homocedasticidad necesario para aplicar el análisis de varianza (ANOVA).

El análisis de varianza (ANOVA) reveló diferencias marginalmente no significativas entre los tratamientos ($F = 2,158$; $gl = 6, 28$; $p = 0,078$). Aunque el valor de p no alcanzó el umbral tradicional de significación estadística ($p < 0,05$), se observó una tendencia que sugiere posibles diferencias en la respuesta de los tratamientos aplicados. Este resultado, junto con los datos descriptivos y observaciones complementarias, puede ser útil para orientar futuras investigaciones sobre el mecanismo de resistencia.

El análisis post hoc mediante la prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0,05$) reveló una diferencia estadísticamente significativa únicamente entre los tratamientos T2 (pinoxaden 30 g/ha + PBO) y T5 (pinoxaden 120 g/ha), con un valor de $p < 0,05$. El tratamiento T5 presentó la media de biomasa más baja (1,19), mientras que T2 mostró la más alta (3,06), lo que indica una clara reducción de biomasa en T5 frente a T2.

No se encontraron diferencias significativas entre el resto de tratamientos, aunque se observó una tendencia general de reducción de biomasa con el incremento de la dosis de pinoxaden, especialmente en ausencia del inhibidor metabólico.

Aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T2 (pinoxaden 30 g/ha + PBO) y T5 (pinoxaden 120 g/ha), los resultados obtenidos en este ensayo no permiten establecer conclusiones firmes sobre el mecanismo de resistencia presente en la población analizada.

Por un lado, el hecho de que T2 no consiga revertir la resistencia en comparación con T1 podría apuntar a un mecanismo de resistencia por modificación del sitio de acción (TSR). Sin embargo, esta hipótesis se debilita al considerar que el tratamiento T4 (pinoxaden 60 g/ha + PBO) mostró una reducción de biomasa superior a la del tratamiento T3 (misma dosis sin PBO) en varias réplicas, lo cual sí sugiere una cierta implicación de mecanismos metabólicos (NTSR) en la población.

Por otro lado, la supervivencia observada en varias plántulas incluso bajo el tratamiento T5, con el doble de la dosis autorizada de pinoxaden, indica una elevada tolerancia al herbicida, compatible con un posible mecanismo de resistencia cruzada. Este tipo de resistencia suele

asociarse a procesos de detoxificación no específicos, como la sobreexpresión de citocromos P450, que podrían actuar frente a varios herbicidas con modos de acción diferentes.

En conjunto, los resultados muestran una respuesta compleja que podría implicar la coexistencia de varios mecanismos de resistencia, y ponen de manifiesto la necesidad de estudios adicionales, como análisis moleculares o ensayos con otros inhibidores metabólicos, para identificar con mayor precisión el tipo de resistencia presente en esta población.

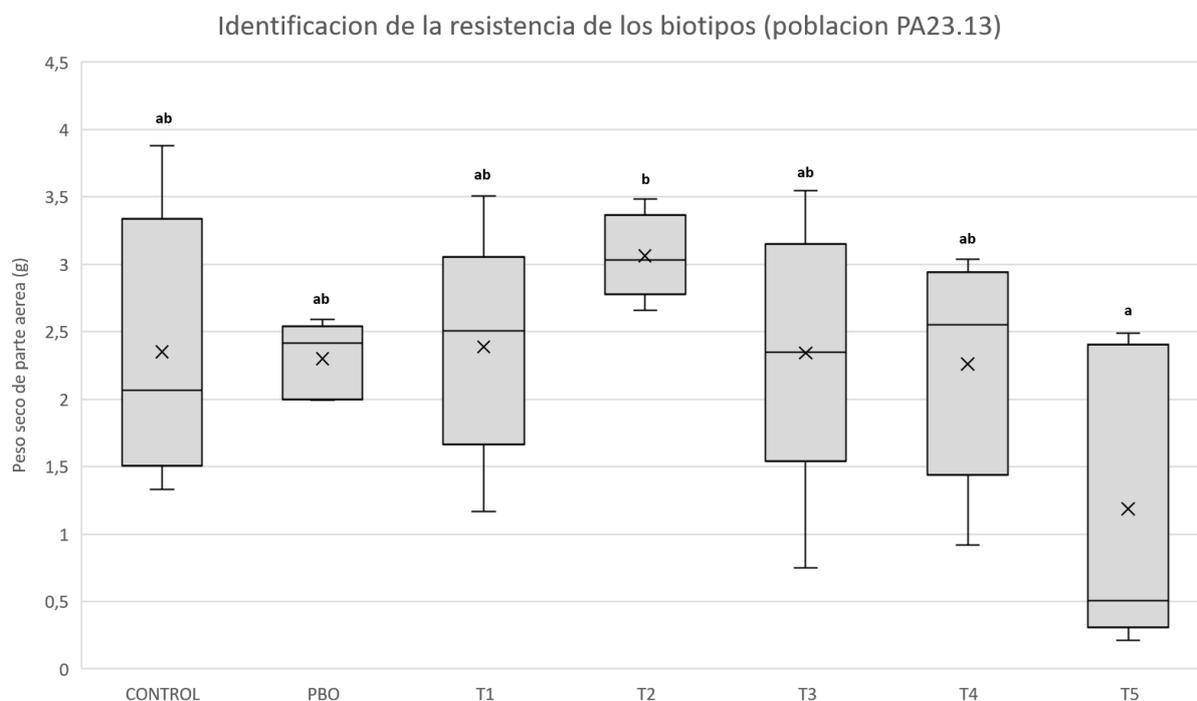


Ilustración 13. Diagrama de cajas y bigotes de los resultados en la identificación del tipo de resistencia que presenta el biotipo PA23.13.



Ilustración 14. Comparativa entre Tratamiento2 (izquierda) y tratamiento 5 (derecha).

4 DISCUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES.

4 DISCURSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES.

4.1 Discusion.

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan la presencia de poblaciones de *Lolium spp.* con distintos niveles de respuesta al herbicida pinoxaden, incluyendo biotipos presumiblemente resistentes, como los observados en las parcelas P2, P7 y P18. Estos hallazgos se alinean con investigaciones previas realizadas en otras regiones cerealistas del área mediterránea y austral, donde se ha documentado la evolución de resistencia en poblaciones de *Lolium* tanto a herbicidas ACCasa como ALS (Torra et al., 2021; Chauhan & Walsh, 2022).

La supervivencia observada en parcelas como P2 y P18, comparable a la del testigo, y su elevada biomasa aérea tras el tratamiento son indicativos consistentes de resistencia funcional. Estas respuestas coinciden con lo descrito por Hajjaj y El Oualkadi (2019), quienes encontraron en Marruecos poblaciones de *L. rigidum* capaces de sobrevivir a dosis etiquetadas de clodinafop-propargyl (otro inhibidor de ACCasa) con mínimas reducciones en biomasa aérea. De manera análoga, Chauhan y Walsh (2022) observaron que ciertos biotipos australianos de *Lolium* emergentes en invierno mantenían su desarrollo post-aplicación, mostrando curvas de supervivencia similares al control, como ha ocurrido en este estudio con P18.

El análisis de biomasa radicular mostró diferencias entre biotipos, pero no aportó una discriminación clara frente al testigo. Este comportamiento coincide con lo reportado por Hatami et al. (2016), quienes señalaron que el crecimiento radicular puede no reflejar directamente el grado de resistencia en presencia de inhibidores de ACCasa, debido a la capacidad de algunas plantas para redirigir recursos tras un estrés inicial.

Respecto al posible mecanismo de resistencia, los resultados del ensayo de inhibición metabólica (PBO + pinoxaden) sugieren una combinación de mecanismos TSR (resistencia por mutaciones en el sitio de acción) y NTSR (resistencia metabólica). La falta de reversión en el tratamiento T2 (pinoxaden 30 g/ha + PBO) indicaría que el PBO no logra restaurar la sensibilidad, compatible con una mutación en el gen de la ACCasa (Sasaki & Nagano, 2004; Torra et al., 2021). No obstante, la mejor eficacia observada en T4 frente a su control sin PBO (T3) podría implicar un cierto grado de detoxificación mediada por enzimas P450, lo cual coincide con los hallazgos de Gaines et al. (2020) y el estudio argentino citado sobre metabolismo cruzado mediante citocromos P450, donde se identificó este tipo de resistencia frente a múltiples modos de acción.

Por tanto, los datos de este estudio apuntan a la posible presencia de una resistencia múltiple y cruzada, con coexistencia de TSR y NTSR en ciertas poblaciones, especialmente en la PA 23.13. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito en España y otras regiones, donde biotipos de *Lolium spp.* han mostrado mutaciones en ACCase junto a mecanismos metabólicos (Torra et al., 2021), complicando el manejo agronómico y acelerando la selección de resistencias.

En este sentido, la importancia de estudios fisiológicos y estadísticos robustos como los aplicados aquí queda reforzada, dado que el conocimiento preciso de la respuesta de cada población permitirá diseñar estrategias de control adaptadas. Las observaciones coinciden con las recomendaciones de SARE (2021) sobre la necesidad de integrar tácticas culturales y no químicas en sistemas donde la evolución de resistencia es acelerada por el monocultivo y la dependencia excesiva de ACCasa inhibidores.

En resumen, los datos generados concuerdan ampliamente con la bibliografía especializada y refuerzan la evidencia de que *Lolium spp.* posee una notable capacidad para desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, lo que subraya la urgencia de implementar medidas de gestión más sostenibles.

En el contexto actual de incremento de resistencias a herbicidas del grupo ACCasa, como es el caso del pinoxaden, se hace imprescindible diversificar los modos de acción empleados para el control de *Lolium spp.* Una estrategia eficaz consiste en la rotación o combinación con herbicidas que actúen sobre rutas metabólicas distintas, minimizando así la presión de selección sobre un único mecanismo bioquímico. En este sentido, los herbicidas autorizados actualmente en España como clortolurón (inhibidor de la fotosíntesis a nivel del fotosistema II) y prosulfocarb (inhibidor de la síntesis de lípidos de cadena muy larga, o VLCFA) se presentan como opciones viables para diversificar el control (HRAC, 2024).

El clortolurón interfiere en la transferencia de electrones del fotosistema II, provocando un colapso del proceso fotosintético y la muerte celular en plántulas susceptibles. Por su parte, el prosulfocarb impide la síntesis de lípidos esenciales para la formación de membranas, alterando la integridad celular en etapas tempranas del desarrollo (Gaines et al., 2020; HRAC, 2024). Ambas materias activas tienen un modo de acción radicalmente distinto al del pinoxaden, lo que las convierte en herramientas clave para frenar la expansión de biotipos resistentes que han evolucionado mediante mecanismos como mutaciones del sitio de acción (TSR) o metabolismo acelerado (NTSR) (Torra et al., 2021).

Su eficacia depende tanto del momento de aplicación como de las condiciones agronómicas del cultivo. Para asegurar su efectividad, estos tratamientos deben integrarse en un marco de manejo racional, incluyendo laboreo adecuado, rotación de cultivos y ajuste de las fechas de siembra. La exclusión progresiva de materias activas como el flufenacet, ampliamente utilizado hasta hace poco, reduce significativamente las herramientas disponibles, lo que refuerza la necesidad urgente de conservar los pocos modos de acción restantes mediante estrategias sostenibles (HRAC, 2024).

Además del uso de alternativas químicas, el manejo integrado de malas hierbas debe fundamentarse en estrategias agronómicas que reduzcan la presión de selección y dificulten la persistencia de biotipos resistentes. Una de las medidas más eficaces en este sentido es la rotación de cultivos, especialmente con especies que difieren en su época de siembra y fenología respecto a los cereales de invierno. La inclusión de cultivos de primavera como girasol o leguminosas grano no solo rompe el ciclo biológico de *Lolium spp.*, sino que permite la aplicación de herbicidas con modos de acción distintos o la realización de labores mecánicas en momentos críticos para la emergencia del vallico (SARE, 2021; Torra et al., 2021).

Esta estrategia limita la exposición continua de las poblaciones de *Lolium* a los mismos herbicidas, dificultando la selección y proliferación de biotipos resistentes. Además, cultivos como el girasol permiten un control más flexible mediante el uso de herbicidas preemergentes específicos y el laboreo antes de la siembra, mientras que las leguminosas de primavera contribuyen a mejorar la estructura del suelo y la fijación de nitrógeno, generando efectos indirectos beneficiosos sobre el manejo global del sistema (Torra et al., 2021; SARE, 2021).

En sistemas cerealistas intensivos, donde el monocultivo ha sido históricamente dominante, este tipo de diversificación temporal representa una herramienta fundamental para restablecer el equilibrio ecológico y reducir la dependencia de los herbicidas ACCasa, cuya eficacia está cada vez más comprometida.

El uso de herbicidas que comparten el modo de acción, como los inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCCase), en cultivos alternativos tales como leguminosas y girasol puede contribuir inadvertidamente al desarrollo y selección de resistencia cruzada en poblaciones de *Lolium spp.* Este fenómeno se explica por la similitud en la ruta metabólica afectada, ya que los herbicidas de la familia FOP (fenoxifenoxi herbicidas), como el quizalofop, actúan inhibiendo la ACCCase, mecanismo común también a otros herbicidas usados en cereales (Gaines et al., 2020; Torra et al., 2021).

El empleo repetido de estos productos en diferentes cultivos y ciclos agronómicos puede facilitar la presión selectiva que favorece la supervivencia de biotipos resistentes con mutaciones en el sitio de acción o mecanismos metabólicos de detoxificación cruzada (Gaines et al., 2020). Esto hace que la rotación de cultivos, aunque recomendable para diversificar el sistema productivo, no sea por sí sola suficiente para prevenir la resistencia, si los herbicidas empleados mantienen el mismo blanco molecular (Torra et al., 2021). Por ello, la selección adecuada de herbicidas con modos de acción diferentes es clave para evitar la evolución acelerada de resistencia.

En consecuencia, las estrategias para manejar el vallico en sistemas que incluyen cultivos como legumbres y girasol deben contemplar el uso responsable de herbicidas con diferentes modos de acción, evitando la dependencia exclusiva de inhibidores ACCCase y fomentando la integración con prácticas culturales y mecánicas para maximizar la eficacia y sostenibilidad del control (SARE, 2021).

Como alternativa al uso de herbicidas con modos de acción ACCasa, especialmente en cultivos como leguminosas, girasol y colza, se recomienda la aplicación de propizamida. Este herbicida, registrado para estos cultivos, presenta un mecanismo de acción diferente al de los inhibidores de ACCCase, lo que contribuye a reducir la presión selectiva sobre las poblaciones de *Lolium* resistentes (European Food Safety Authority, 2014).

Su utilización puede ser estratégica para diversificar las herramientas químicas disponibles y mitigar el desarrollo de resistencias cruzadas que se observan con el uso reiterado de herbicidas del grupo FOP y DIM. Esta recomendación se basa en evaluaciones oficiales que garantizan la eficacia y seguridad de la propizamida, respaldando su incorporación en programas integrados de manejo de malezas.

4.2 Consideraciones finales.

La creciente aparición de biotipos resistentes de malas hierbas compromete la viabilidad de las herramientas disponibles en las explotaciones agrícolas. Es esencial adoptar medidas proactivas para preservar la eficacia de los pocos herbicidas funcionales que quedan. En este contexto, los agricultores se ven obligados a asumir las consecuencias técnicas y económicas de aplicar productos que ya no ofrecen resultados satisfactorios.

La utilización reiterada de pinoxaden sobre biotipos resistentes, como los aquí identificados, no solo incrementa los costes por hectárea sin retorno agronómico, sino que también favorece la perpetuación y diseminación de las poblaciones resistentes en el entorno. La falta de alternativas eficaces en el mercado convierte este escenario en una trampa sin salida: el agricultor aplica lo que está legalmente autorizado, pero el resultado es, en muchas ocasiones, ineficaz o incluso nulo.

Mientras tanto, la Unión Europea continúa eliminando principios activos del registro sin que entren nuevas materias activas con modos de acción diferentes. Esta política restrictiva, desprovista de una estrategia paralela de innovación e incentivo a la investigación, está desmantelando el arsenal fitosanitario sin ofrecer alternativas reales ni viables. Lejos de resolver el problema, esta dinámica está dejando al agricultor sin margen de maniobra, sometido a un marco normativo que le exige resultados productivos sin proporcionarle las herramientas para alcanzarlos.

Es imprescindible que las casas comerciales asuman su parte de responsabilidad cuando los productos que ofrecen dejan de cumplir su función, especialmente en casos como el de pinoxaden, donde la pérdida de eficacia es evidente y cuantificable. La carga económica y operativa de estas resistencias no puede recaer exclusivamente sobre el agricultor, que ya trabaja en un contexto de costes crecientes y rentabilidad decreciente. Las empresas deben implicarse activamente en la revaluación de sus estrategias y en la búsqueda de soluciones técnicas que respondan a la nueva realidad de campo.

En definitiva, el control químico de *Lolium spp.* con herbicidas como el pinoxaden está entrando en una etapa de obsolescencia en determinadas áreas agrícolas, como se ha comprobado en Paredes y Villamuera. Sin un cambio en el modelo de gestión, que incluya la introducción de nuevas materias activas, programas reales de monitoreo de resistencias, y responsabilidad compartida entre administraciones, empresas y productores, la sostenibilidad del cultivo de cereal estará en entredicho en un futuro inmediato.

5 CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Se ha confirmado la presencia de poblaciones de *Lolium spp.* con resistencia al herbicida pinoxaden, particularmente en las parcelas P2, P7 y P18, evidenciada por altas tasas de supervivencia y biomasa aérea tras la aplicación.

La respuesta de estas poblaciones sugiere la existencia de resistencia funcional, comparable a la de los testigos no tratados, lo cual constituye una señal clara de pérdida de eficacia del modo de acción ACCasa en determinadas condiciones agronómicas.

El análisis del ensayo con inhibidor metabólico (PBO) apunta a la coexistencia de mecanismos de resistencia por mutación en el sitio de acción (TSR) y mecanismos de resistencia metabólica (NTSR), lo que complica el control exclusivo mediante herbicidas.

La mejor eficacia observada en tratamientos combinados con PBO sugiere una posible implicación de enzimas detoxificantes, como los citocromos P450, en la resistencia observada, en línea con otros estudios recientes en Europa y Oceanía.

La biomasa radicular, aunque variable entre biotipos, no permitió discriminar de manera clara entre plantas resistentes y susceptibles, lo que limita su utilidad como indicador directo de resistencia en el caso de inhibidores ACCasa.

La evolución de resistencias cruzadas y múltiples obliga a diversificar los modos de acción empleados en el control de *Lolium spp.*. En este sentido, el uso de herbicidas como clortolurón, proflurocarb o propizamida representarían una alternativa efectiva y complementaria.

La rotación de cultivos con especies de distinta fenología (como leguminosas o girasol) constituye una herramienta agronómica clave, al interrumpir el ciclo de *Lolium spp.* y permitir el empleo de herbicidas distintos o estrategias mecánicas.

Sin embargo, esta rotación debe ir acompañada de una adecuada selección de herbicidas, evitando repetir el mismo sitio de acción en distintos cultivos, ya que esto podría mantener la presión de selección y favorecer la resistencia cruzada.

Resulta imprescindible aplicar un enfoque de manejo integrado de malas hierbas, combinando medidas químicas, culturales y mecánicas, para prolongar la vida útil de los herbicidas disponibles y mitigar la expansión de biotipos resistentes.

La orientación actual de la política agrícola europea, con la continua retirada de productos fitosanitarios y sin alternativas eficaces, no conduce hacia una sostenibilidad real. Resulta irónico que se promueva la reducción del laboreo para fijar carbono y reducir las pérdidas de materia orgánica, mientras se priva al agricultor de herramientas eficaces para controlar las malas hierbas. Esta incoherencia pone en riesgo la viabilidad de los sistemas cerealistas intensivos.

6 BIBLIOGRAFIA

6 BIBLOGRAFIA.

- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 160(901), 268–282. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Busi, R., Gaines, T. A., Walsh, M. J., & Powles, S. B. (2022). Non-target-site resistance to herbicides: Current knowledge and future directions. *Crop Protection*, 152, 105848.
- Chauhan, B. S., & Walsh, M. (2022). Differential response of winter- and summer-emerging accessions of rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) to postemergence herbicides in Australia. *Weed Technology*, 36(5), 663–670.
- Cytochrome P450 Herbicide Metabolism as the Main Mechanism of Cross-Resistance to ACCase- and ALS-Inhibitors in *Lolium* spp. Populations from Argentina: A Molecular Approach in Characterization and Detection. (2020).
- European Food Safety Authority. (2014). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propizamide. *EFSA Journal*, 12(6), 3737.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A. G., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). *Mechanisms of evolved herbicide resistance. Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10307–10330.
- García-Pérez, A. (2010). Métodos avanzados de estadística aplicada: Métodos robustos y de remuestreo. UNED.
- García-Pérez, M. A. (2010). Análisis de datos: Fundamentos y técnicas. Prentice Hall.
- Hajjaj, B., & El Oualkadi, A. (2019). *Lolium rigidum* Gaudin (annual ryegrass) response to different doses of clodinafop-propargyl in wheat crops. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(6), 1833–1835.
- Hatami, Z. M., Gherekhloo, J., Rojano-Delgado, A. M., Osuna, M. D., Alcántara, R., Fernández, P., Sadeghipour, H. R., & De Prado, R. (2016). Multiple mechanisms increase levels of resistance in *Rapistrum rugosum* to ALS herbicides. *Frontiers in Plant Science*, 7, 169.
- HRAC. (2024). *Herbicide mode of action classification*. Herbicide Resistance Action Committee.
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457–481. <https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452>
- Mair, P., & Wilcox, R. R. (2020). Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behavior Research Methods*, 52(2), 464–488.

- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, 50(3), 163–170.
- Meier, U. (2001). *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph* (2^a ed.). Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA).
- R Core Team. (2025). R: A language and environment for statistical computing (Version 4.5.1). R Foundation for Statistical Computing.
- Sasaki, Y., & Nagano, Y. (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(6), 1175–1184. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1175>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Sustainable Agriculture Research & Education (SARE). (2021). Perennial ryegrass (*Lolium perenne*) cover crop overview.
- Therneau, T. (2024). A package for survival analysis in R (Version 3.8-3) [R package].
- Therneau, T. M. (2023). A Package for Survival Analysis in R (Version 3.5-7) [Computer software].
- Torra, J., Montull, J. M., Taberner, A., Onkokesung, N., Boonham, N., & Edwards, R. (2021). Target-Site and Non-target-Site Resistance Mechanisms Confer Multiple and Cross-Resistance to ALS and ACCase Inhibiting Herbicides in *Lolium rigidum* From Spain. *Frontiers in Plant Science*, 12, 625138.
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5(2), 99–114.
- Welch, B. L. (1951). On the comparison of several mean values: An alternative approach. *Biometrika*, 38(3/4), 330–336.