



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



INFORME FINAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“RECURSOS Y TECNOLOGÍAS AGRARIAS EN COORDINACIÓN CON LAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS”

(Actuales Proyectos de investigación Fundamental Orientada a los Retos de la Sociedad y Acciones Complementarias, y específicamente Reto de Seguridad y Calidad Alimentaria, Actividad Agraria Productiva y Sostenible, Sostenibilidad de los Recursos Naturales e Investigación Marina y Marítima)

CÓDIGO PROYECTO: RTA2017-00098

TÍTULO: Detección, distribución y monitoreo de poblaciones resistentes a herbicidas en malas hierbas de arroz en España: estudio de los mecanismos responsables de dicha resistencia e implicación de éstos en la prevención y el diseño de estrategias de control integrado

INVESTIGADOR PRINCIPAL: María Dolores Osuna Ruiz

ENTIDAD SOLICITANTE: CICYTEX

CENTRO: Finca La Orden-Valdesequera

FECHA INICIO DEL PROYECTO: 01/01/2019

FECHA FINALIZACIÓN DEL PROYECTO: 31/12/2021

FECHA INFORME: 30/03/2022

Fecha:
Firma del Investigador Principal:

Fecha:
Firma del representante legal y sello de la Entidad:



INSTRUCCIONES PARA CUMPLIMENTAR EL INFORME FINAL

De acuerdo con lo indicado en las Resoluciones por las que se hacen públicas las convocatorias de concesión de ayudas para la realización de proyectos y acciones complementarias, en el marco de los Subprogramas o actuaciones correspondientes, se cumplimentará un Informe Final Científico, que deberá presentarse en un plazo no superior a tres meses desde la finalización del proyecto, el que se informará sobre las actividades realizadas de acuerdo con la solicitud. Deberá firmarse por el investigador responsable y por el responsable de la entidad solicitante, y las firmas de los investigadores principales deberán quedar consignadas por parte de la entidad responsable. **No será necesario el envío en papel a INIA, al ser obligatorio el uso de la firma electrónica.**

ESTE INFORME, INCLUYENDO TODOS LOS SUBPROYECTOS EN CASO DE PROYECTOS COORDINADOS, DEBERÁ SER ENVIADO Y FIRMADO DIGITALMENTE POR PARTE DE LA ENTIDAD RESPONSABLE DEL GRUPO INVESTIGADOR. LA ENTIDAD RESPONSABLE DEL GRUPO INVESTIGADOR SE RESPONSABILIZA DEL CONTENIDO DEL INFORME VALIDÁNDOLO A TRAVÉS DE LA FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA. EN CASO DE PROYECTOS COORDINADOS DEBERÁ RELLENARSE UN SOLO INFORME, que incluirá por separado todos los subproyectos , y deberá ser adjuntado en un solo PDF. Las entidades responsables consignarán la firma de los investigadores principales.

EL INFORME DEBE TENER FORMATO PDF PARA PODER SER FIRMADO DIGITALMENTE. LAS ENTIDADES TIENEN OBLIGACIÓN DE MANTENER EN SU PODER LAS FIRMAS ORIGINALES DE LOS INVESTIGADORES.

Asimismo, para el correcto cumplimiento de las condiciones de la convocatoria correspondiente, se enviará, telemáticamente, copia de las publicaciones y otros resultados a los que el proyecto o acción complementaria hubiera dado lugar. En esta documentación deberá mencionarse que han sido financiadas por el INIA, así como el número de referencia de dicho proyecto o acción. Cuando el proyecto o acción haya sido cofinanciado con recursos procedentes de FEDER se deberá citar dicha fuente de financiación.

Este informe debe completarse con la JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA DE GASTOS, que se cumplimentará usando los medios TELEMÁTICOS correspondientes.

El informe final del proyecto consta de:

Informe normalizado

Se cumplimentará en los impresos que acompañan estas instrucciones. En el caso de proyectos coordinados, el informe será presentado por el coordinador del conjunto del equipo investigador, que adjuntará los informes de cada uno de los subproyectos elaborados por sus investigadores principales respectivos, con la conformidad de los representantes legales de las entidades participantes.

De cada uno de los trabajos publicados se remitirá una separata o ejemplar.

NOTA IMPORTANTE DE OBLIGADO CUMPLIMIENTO:

- Junto con el informe final se remitirá un certificado de la Gerencia o Servicio de Contabilidad de la entidad o entidades participantes en el que se especifiquen, detallados por conceptos, los gastos efectuados. Junto con el informe final se remitirá asimismo, si procede, fotocopia del reintegro al Tesoro Público de los fondos no utilizados.

El informe final del proyecto consta de:



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



Informe normalizado

Se cumplimentará en los impresos que acompañan estas instrucciones. En el caso de proyectos coordinados, el informe será presentado por el coordinador del equipo investigador, que adjuntará telemáticamente los informes de cada uno de los subproyectos elaborados por sus investigadores principales respectivos, con la conformidad de los representantes legales de las entidades participantes. El informe deberá estar firmado **DIGITALMENTE** por el representante legal de la entidad coordinadora de todos los subproyectos. Cada uno de los subproyectos, además, irán firmados en papel y serán consignados por la entidad coordinadora de los subproyectos.

De cada uno de los trabajos publicados se remitirá una separata o ejemplar.

NOTA IMPORTANTE DE OBLIGADO CUMPLIMIENTO:

- Junto con el informe final se remitirá asimismo, si procede, fotocopia del reintegro al INIA de los fondos no utilizados. Número de CTA INIA: 0182-2370-46-0200203535



EQUIPO INVESTIGADOR

Especificar los siguientes datos de los miembros del equipo investigador: **NOMBRE Y APELLIDOS, DNI, TITULACIÓN ACADÉMICA, CENTRO AL QUE PERTENECE Y DEDICACIÓN (ÚNICA / COMPARTIDA)**

Investigador principal del Proyecto: _____

MARIA DOLORES OSUNA RUIZ, 30806800W, Doctora en Bioquímica, CICYTEX, Dedicación única

Investigadores: _____

ANTONIO GARCÍA CALVO, 09170163V, Ingeniero agrónomo, CICYTEX, Dedicación compartida

VERÓNICA CRUZ SOBRADO, 44402946C, Ingeniero agrónomo, CICYTEX, Dedicación compartida

GABRIEL PARDO SANCLEMENTE, 18165357A, Doctor Ingeniero agrónomo, CITA, Dedicación compartida

JUAN ANTONIO LEZAUN SAN MARTIN, 18202888K, Ingeniero Técnico Agrícola, ITGA, Dedicación compartida

MARIA DEL MAR CATALA FORNER, 18953131G, Ingeniero Técnico Agrícola, IRTA, Dedicación compartida

DIEGO GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ, 22556171W, Doctor Ingeniero agrónomo, UPV, Dedicación compartida

JOSE MARIA OSCA LLUCH, 22671619J, Doctor Ingeniero agrónomo, UPV, Dedicación compartida

NURIA LÓPEZ MARTÍNEZ, 30523595L, Doctora en Ciencias Químicas, USevilla, Dedicación única

MÓNICA LÓPEZ MARTÍNEZ, 30798809S, Licenciada en Biología, Jardín Botánico de Córdoba, Dedicación compartida

SILVIA CONSOLA MARCO, 52601439W, Licenciada en Biología, Generalidad de Cataluña, Dedicación compartida

JOSEP MARIA LLENES ESPIGARES, 78093631Y, Ingeniero Agrónomo, Generalidad de Cataluña, Dedicación compartida

Becarios: _____

IGNACIO AMARO BLANCO, 80085714J, Ingeniero Agrónomo, CICYTEX, Dedicación única



OBJETIVOS, PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DEL PROYECTO

Las principales áreas productoras de arroz en España se identifican con dos modelos diferentes: 1) las áreas tradicionales constituidas sobre todo por la Comunidad Valenciana, Cataluña, Aragón y Murcia; en estas zonas predomina la variedad japónica y la estructura de producción es de menor dimensión y 2) las nuevas áreas productoras, constituidas por las zonas arroceras de Andalucía y Extremadura; aquí predomina la variedad índica y la estructura de la producción es mayor. Aparte existen áreas menores como son Navarra, Baleares y Castilla La Mancha.

El género *Echinochloa* es una de las principales malas hierbas que afecta a las diferentes zonas de cultivo de arroz en España, mientras que *Leptochloa spp.* es un problema incipiente con difícil control químico, por lo que, con seguridad, las infestaciones serán cada vez más frecuentes. En ambos géneros, ya han sido **confirmadas resistencias en España** en un proyecto anterior. No obstante, las especies concretas de cada género y la problemática de su manejo pueden ser muy diferentes en las distintas zonas arroceras españolas. En ese sentido, como el equipo integrante del Proyecto está formado por participantes situados en las principales zonas de cultivo de España, se ha realizado una evaluación exhaustiva de la localización de los posibles

Como **hipótesis de partida de investigación aplicada** se ha realizado un monitoreo de la problemática de la resistencia de las malas hierbas *Echinochloa spp.* y *Leptochloa spp.*, principalmente en el cultivo de arroz en España en la actualidad. Además, se han incluido muestreos de otras malas hierbas que también están dando problemas de resistencias como el caso de *Cyperus difformis*. Para este monitoreo se han identificado las áreas críticas, en base a la información del proyecto anterior, la proveniente de los cuadernos de campo de las explotaciones en régimen de Producción Integrada, o bien información directa de observaciones de campo, por parte de agricultores/técnicos o miembros del equipo investigador.

Como **hipótesis de investigación básica** se ha realizado la confirmación de resistencias mediante ensayos de invernadero, así como un estudio, en los casos confirmados, del/los mecanismos/ implicado/s en la resistencia, principalmente a nivel de sitio de acción y de metabolismo del herbicida. Se ha complementado este apartado con la puesta a punto técnicas rápidas de confirmación de resistencias a nivel de sitio de acción, para hacer este proceso más rápido y eficaz. Una vez confirmados los mecanismos de resistencia presentes, se realizarán estudios de control alternativo con diferentes herbicidas, así como estudios de control no químico, todo ello necesario para prevenir o mitigar la resistencia a herbicidas, e intentar implantar un sistema de asesoramiento al agricultor/técnico de manera adecuada usando herramientas para desarrollar un sistema de control integrado.

Este Proyecto, aunque ha estado principalmente centrado en CICYTEX, ya que está principalmente basado en detección de mecanismos de resistencias, incluye en el equipo investigador miembros de todas las regiones arroceras: Andalucía, Valencia, Cataluña, Navarra y Aragón.

Los objetivos han sido comunes para las diferentes zonas, ya que el objetivo principal del proyecto era el diseño de estrategias de manejo integrado de dichas malas hierbas en las diferentes zonas arroceras, con condiciones ambientales y de cultivo diferentes entre ellas.

Los **objetivos específicos** que se han llevado a cabo se detallan a continuación, y en el siguiente apartado se relacionarán con los resultados obtenidos:

- O.1.- MONITOREO DE RESISTENCIAS
- O.2.- CONFIRMACION DE RESISTENCIA IN VIVO
- O.3.- ESTUDIOS DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA
 - O.3.1.- TS (ALS/ACCasa)
 - Actividad enzimática
 - Secuenciación de sitio de acción -> Técnicas de detección rápida de resistencias (dCAPS)
 - O.3.2.- NTS (Metabolismo)



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



O.4.- ESTUDIOS DE RESISTENCIA CRUZADA Y/O MULTIPLE

O.5.- MAPEO DE POBLACIONES RESISTENTES, CORRELACIÓN CON SISTEMAS DE CULTIVOS Y PORCENTAJE DE MECANISMO DE RESISTENCIA

Para la coordinación, la IP ha realizado el seguimiento y control del cumplimiento de los objetivos según las tareas propuestas. Así mismo la coordinación, al estar implicadas diferentes zonas ha conllevado la celebración de una reunión anual entre investigadores de las distintas zonas. La IP tiene la responsabilidad científica final del proyecto y será por tanto el responsable ante el INIA.



casos de resistencia encontrados en cada zona de *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.

RESULTADOS ALCANZADOS EN EL PROYECTO

En el caso de no haber sido alcanzados todos los resultados previstos, indíquese las causas.

Objetivo 1.- MONITOREO DE RESISTENCIAS

Se han realizado prospecciones en las distintas zonas arroceras (Extremadura, Valencia, Cataluña, Andalucía, Navarra y Aragón) tanto de *Echinochloa* spp. como de *Leptochloa* spp. Se han incluido tres tipos de prospecciones:

A.- Muestras en campos donde se hayan confirmado resistencias en el proyecto anterior. Se han realizado principalmente en *Extremadura, Valencia y Andalucía*, donde más resistencias se habían confirmado en el proyecto anterior.

B. Muestras provenientes de zonas donde se haya sospechado una falta de control; para este muestreo ha sido clave la colaboración de agricultores, técnicos y personal del Servicio de Sanidad Vegetal de las diferentes regiones. Este punto, tras la primera reunión de coordinación del equipo investigador se decidió ampliar con la inclusión de muestreos al azar de las distintas zonas arroceras, realizados de forma proporcional a la superficie arroceras presente en cada zona. Esto se decidió en base a poder tener de modo más real la distribución de poblaciones resistentes sin tener solo muestras de sitios problemáticos.

C.- Muestras de zonas con sistemas de cultivo alternativos al tradicional, y que en algunas regiones están siendo ampliamente usados en los últimos años: siembra en seco y sistema Clearfield. Esto se ha realizado principalmente en *Extremadura* donde estos sistemas están ampliamente distribuidos.

Las zonas donde se cogen muestras quedan georreferenciadas para un posterior seguimiento de dichas parcelas. Además, se han incluido muestras que han sido enviadas por diferentes empresas (EPOs) y agricultores/técnicos de las diferentes zonas arroceras; la mayoría de estas muestras provienen de zonas donde se ha detectado una falta de control por el herbicida. Todas las muestras de semillas se limpian y se conservan de forma adecuada para posterior uso; sus datos (localización, historial de parcela de la que vienen...) son incluidas en una base de datos que se está haciendo con todas las muestras recogidas y que quedan depositadas en el Banco de Semillas del Área de Protección vegetal de CICYTEX:

En total el número de muestras recogidas se resume en el siguiente cuadro:

Región	Especie	
	<i>Echinochloa</i> spp.	<i>Leptochloa</i> spp.
Extremadura	90	90
Cataluña	100	100
Aragón	40	30
Valencia	40	40
Sevilla	80	10

Aunque no era el objetivo principal del estudio, se cogieron muestras puntuales de *Cyperus difformis* en aquellas regiones donde se había detectado falta de control, principalmente por herbicidas inhibidores de la ALS.



Objetivo 2.- CONFIRMACION DE RESISTENCIA IN VIVO

De las distintas poblaciones recolectadas en campos problemáticos, se realizaron ensayos en invernadero de screening (con la dosis de campo recomendada para cada herbicida) para evaluar la eficacia de los principales herbicidas autorizados en arroz en la actualidad: herbicidas inhibidores de la ALS y herbicidas inhibidores de la ACCasa.

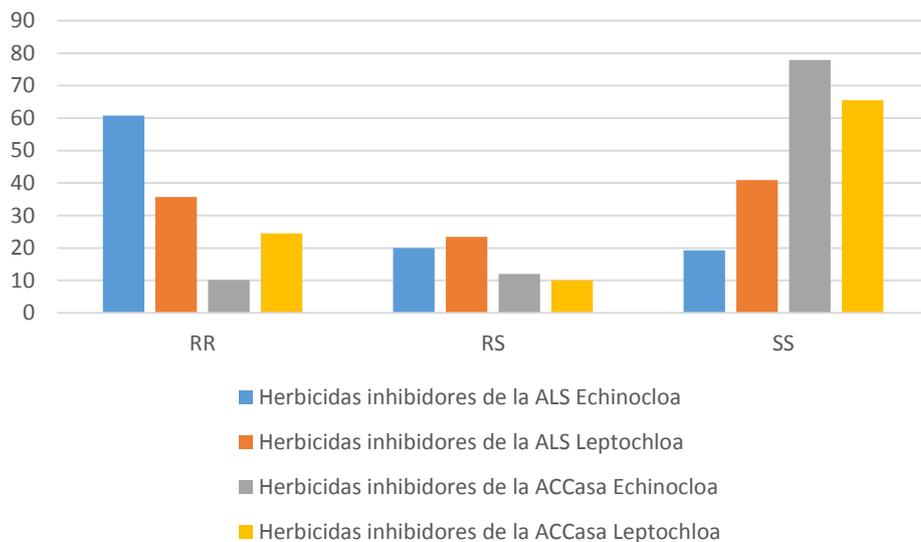
Para analizar los resultados se estableció una escala, basada en porcentaje de peso fresco de la parte área de la planta tratada con respecto al control sin tratar, la cual se detalla a continuación:

RR (resistente): 80-100%

RS: 30-80%

SS (sensible): 0-30%

En la siguiente figura, a modo de resumen, se representa el porcentaje de poblaciones (por especie y herbicida) perteneciente a cada uno de los grupos anteriormente expuestos en la escala:



Como se puede comprobar, tanto para *Leptochloa* como *Echinochloa* los controles más efectivos se obtienen con herbicidas inhibidores de la ACCasa en la actualidad.

Dado el alto número de poblaciones incluidas en el estudio, se escogió un número limitado de poblaciones para realizar ensayos de dosis respuesta a herbicidas de ambas familias. Se ponen a continuación casos estudiados para *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.:



Echinochloa spp. (tomado del artículo de Amaro-Blanco *et al.*, 2021):

Table 6. Parameter estimates from the logistic analysis of growth reduction (ED_{50}) of the selected resistant (R) (ALS and ACCase-inhibiting herbicides) and susceptible (S) biotypes under increasing ALS and ACCase-inhibiting herbicide rates.

Herbicide	Population	<i>d</i>	<i>b</i>	ED_{50} (g ai ha ⁻¹)	RF	<i>p</i> -Value
Profoxydim	ech114-10 (ACCCase) (R)	99.49	2.11	392.29 ± 13.20	643.09	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	100.05	0.57	0.57 ± 0.10	0.93	0.0001
	ech5-09 (S)	100.05	0.65	0.61 ± 0.10	-	-
Cyhalofop-butyl	ech114-10 (ACCCase) (R)	97.28	2.79	817.22 ± 28.85	1993.21	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	100.11	0.76	0.20 ± 0.04	0.48	0.0001
	ech5-09 (S)	100.23	1.07	0.41 ± 0.04	-	-
Penoxsulam	ech114-10 (ACCCase) (R)	100.17	1.78	19.00 ± 1.19	2.24	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	98.79	1.99	713.42 ± 37.99	84.22	0.0001
	ech5-09 (S)	102.06	3.24	8.47 ± 0.34	-	-
Imazamox'	ech114-10 (ACCCase) (R)	100.97	1.71	25.32 ± 1.11	1.10	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	98.25	1.73	1059.40 ± 42.95	46.22	0.0001
	ech5-09 (S)	101.43	1.42	22.92 ± 1.18	-	-
Azimsulfuron	ech114-10 (ACCCase) (R)	100.02	1.68	20.24 ± 1.02	0.69	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	97.46	2.75	7370.71 ± 209.04	254.33	0.0001
	ech5-09 (S)	101.60	1.53	28.98 ± 4	-	-
Byspiribac-sodium	ech114-10 (ACCCase) (R)	98.85	3.51	3.22 ± 0.10	0.66	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	99.80	2.13	59.98 ± 2.46	11.38	0.0001
	ech5-09 (S)	101.74	1.59	5.27 ± 0.27	-	-

Leptochloa spp (tomado de la Tesis Doctoral de Ignacio Amaro Blanco):

Tabla 35. Dosis efectiva que causa 50% de inhibición del crecimiento (GR_{50}) en *Leptochloa* spp. frente a Profoxydim, Cihalofof-butil, Penoxsulam e Imazamox

Población	Valores de GR_{50} (g.i.a. ha ⁻¹) ^a			
	Profoxydim	Cihalofof-Butil	Penoxsulam	Imazamox
<i>L. fascicularis</i>				
Lp6-13 (S)	0,73 ± 0,18	0,25 ± 0,04	3,41 ± 0,17	2,13 ± 0,11
Lp102-09 (ALS) (R)	1,08 ± 0,06	0,37 ± 0,09	442,43 ± 7,15	140,54 ± 1,32
Lp2-16 (ACCasa) (R)	893,15 ± 9,17	1017,32 ± 22,98	4,28 ± 0,21	8,04 ± 0,20
R/S ^b (ALS)	1,48	1,48	129,74	65,98
R/S (ACCasa)	1223,49	4069,28	1,26	3,77
<i>L. uninervia</i>				
Lp1-13 (S)	0,87 ± 0,61	0,65 ± 0,11	1,03 ± 0,15	3,13 ± 0,28
Lp5-14 (ALS) (R)	1,92 ± 0,09	0,99 ± 0,12	816,25 ± 37,99	732,54 ± 2,71
R/S	2,21	1,52	792,48	234,04

^aLos números entre paréntesis de los valores GR_{50} representan el error estándar

R/S es el índice de resistencia para cada herbicida calculado en base a los valores de GR_{50}

Objetivo 3.- ESTUDIOS DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA

0.3.1.- TS (ALS/ACCasa)

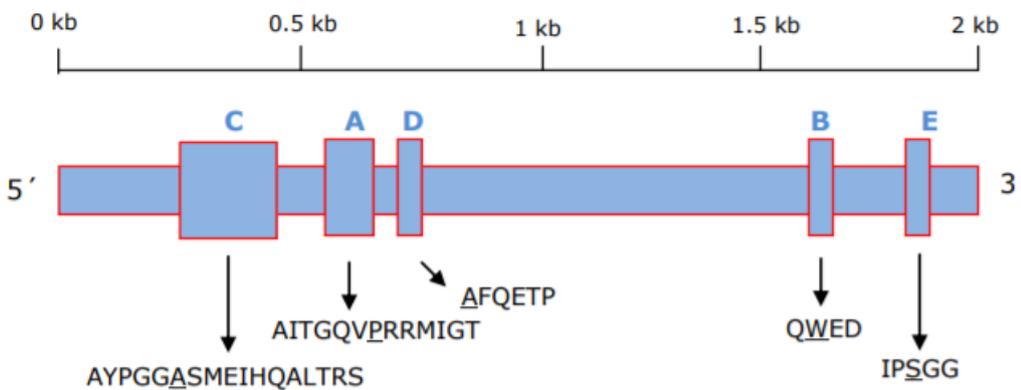
En las primeras anualidades del proyecto se llevaron a cabo estudios de actividades enzimáticas ALS. Como se planteó en memorias anteriores, no se pudo realizar los ensayos de actividad enzimática ACCasa, ya que conlleva la utilización de radiactividad y se planteó contratar laboratorio externo en la memoria inicial (Universidad de Córdoba) pero con la reducción de presupuesto no se pudo realizar dicha contratación.



Con lo cual en la última anualidad del proyecto se ha realizado este estudio centrado en la **secuencia de los genes ALS y ACCasa**, ensayos que si se pueden llevar a cabo en los laboratorios de CICYTEX. En las siguientes figuras se resume, de manera gráfica, los distintos dominios que han sido analizados dentro de cada gen:

Gen ALS

El gen de ALS tiene un tamaño aproximado de 2,1 kb y codifica a una proteína de entre 500-700 aminoácidos. Las mutaciones que proporcionan resistencia ocurren generalmente en 5 dominios conservados C,A,D,B y E.



Para la secuencia se hace en dos zonas: una contiene los dominios CAD y otra los dominios BE

Gen ACCasa

En la actualidad existen 7 codones donde se han descrito cambio de nucleótidos que dan lugar a resistencia: Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asn2078, Cys2088 y Gly2096.



Para la secuencia se hace en dos zonas: una contiene el sitio Ile1781 y otra con el resto de posiciones donde se han encontrado mutaciones.

Los resultados obtenidos se resumen, por genes/especies y regiones arroceras en la siguiente figura (tomado del artículo de Gomez de Barreda et al., 2021):



Figure 3. Different mutations in ALS and ACCase genes in individuals of *Echinochloa* spp., *Leptochloa* spp., and *Cyperus difformis* collected from different rice-growing areas of Spain.

En el caso de *Echinochloa* spp., se encontró un mayor número de mutaciones en el gen ALS. Las mutaciones Pro197 son el tipo de mutación más frecuente en las especies de malas hierbas especies de malas hierbas. Se ha descrito previamente una mutación Pro197Ser en *Echinochloa* spp, con la confirmación de que esta mutación redujo la afinidad por los inhibidores de ALS pertenecientes a las familias de las triazolopirimidinas, la sulfonilaminocarboniltriazolinonas y las sulfonilureas. Las sustituciones en Ala122, Ser653 y Trp574 encontradas en este trabajo, también se habían descrito previamente en poblaciones de otros lugares y confieren resistencia a los herbicidas inhibidores de ALS en varias especies de *Echinochloa*.

Como se puede ver en la figura, se han encontrado menos casos de mutaciones en el gen ACCasa en *Echinochloa*, y sólo en dos zonas de cultivo de arroz, en ambos casos en los últimos años. El que haya más casos de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS puede deberse a un mayor uso de este grupo de en las diferentes zonas, principalmente penoxsulam y bispiribac-sodio.

En *Leptochloa* spp. se han encontrado resistencias principalmente en la zona de Extremadura y algunos casos aislados en la Comunidad Valenciana. La mayoría de las resistencias son a inhibidores de la ACCasa con varios



cambios de aminoácidos en este gen. Esta mala hierba fue descrita por primera vez en Extremadura, y es en esta región donde sigue siendo uno de los principales problemas. Los herbicidas inhibidores de la ACCasa (especialmente el profloridim) se han utilizado para controlar *Leptochloa chinensis* (L.) Ness, y han mostrado un importante efecto de control en los arrozales de China. Sin embargo, el uso persistente y extensivo de profloridim ha dado lugar a la evolución de poblaciones resistentes. Las tres mutaciones encontradas en estas poblaciones han sido descritas previamente en *L. chinensis* en el arroz. Esta especie también muestra resistencia a los inhibidores de ALS en Extremadura, encontrándose varios casos de resistencia múltiple a ambas familias de herbicidas, como detallamos anteriormente en la parte de ensayos in vivo.

Los inhibidores de ALS utilizados para el control de *C. difformis* en los arrozales en España son principalmente penoxsulam y bensulfuron-metil. Sin embargo, la eficacia de estos herbicidas ha disminuido significativamente en las últimas campañas. En las muestras de *C. difformis* analizadas para este estudio, el cambio Trp574Leu en el gen ALS se encontró en muestras de diferentes zonas de cultivo de arroz. Esta mutación ha dado lugar a una alta resistencia en las poblaciones de *C. difformis* contra todas las familias de inhibidores de ALS.

En este objetivo también se han **puesto a punto técnicas basadas en la PCR para una detección rápida de la resistencia** y que sirva para una toma rápida de decisiones, desarrollándose diferentes ensayos moleculares cada uno detectando cualquier mutación que causara una sustitución de aminoácidos en una de las posiciones donde se han descrito mutaciones en el gen de la ALS y en el gen de la ACCasa.

Se está utilizando la *técnica PASA (PRC Amplification Specific Allele)* para detectar mutaciones puntuales del ADN genómico utilizando para ello un primer capaz de distinguir ambos alelos debido al nucleótido presente en el extremo 3' del primer, siendo capaz de unirse específicamente sólo a uno de los alelos. Tiene gran precisión y se puede utilizar en sistemas rápidos para una mutación puntual causada por único cambio de base.

Tras la puesta a punto, se detalla el número de muestras utilizado utilizando esta técnica en distintas zonas arroceras:

NAVARRA: 18 (*Echinochloa* spp.)

CATALUÑA: 100 (50 *Echinochloa* spp. + 50 *Leptochloa* spp.)

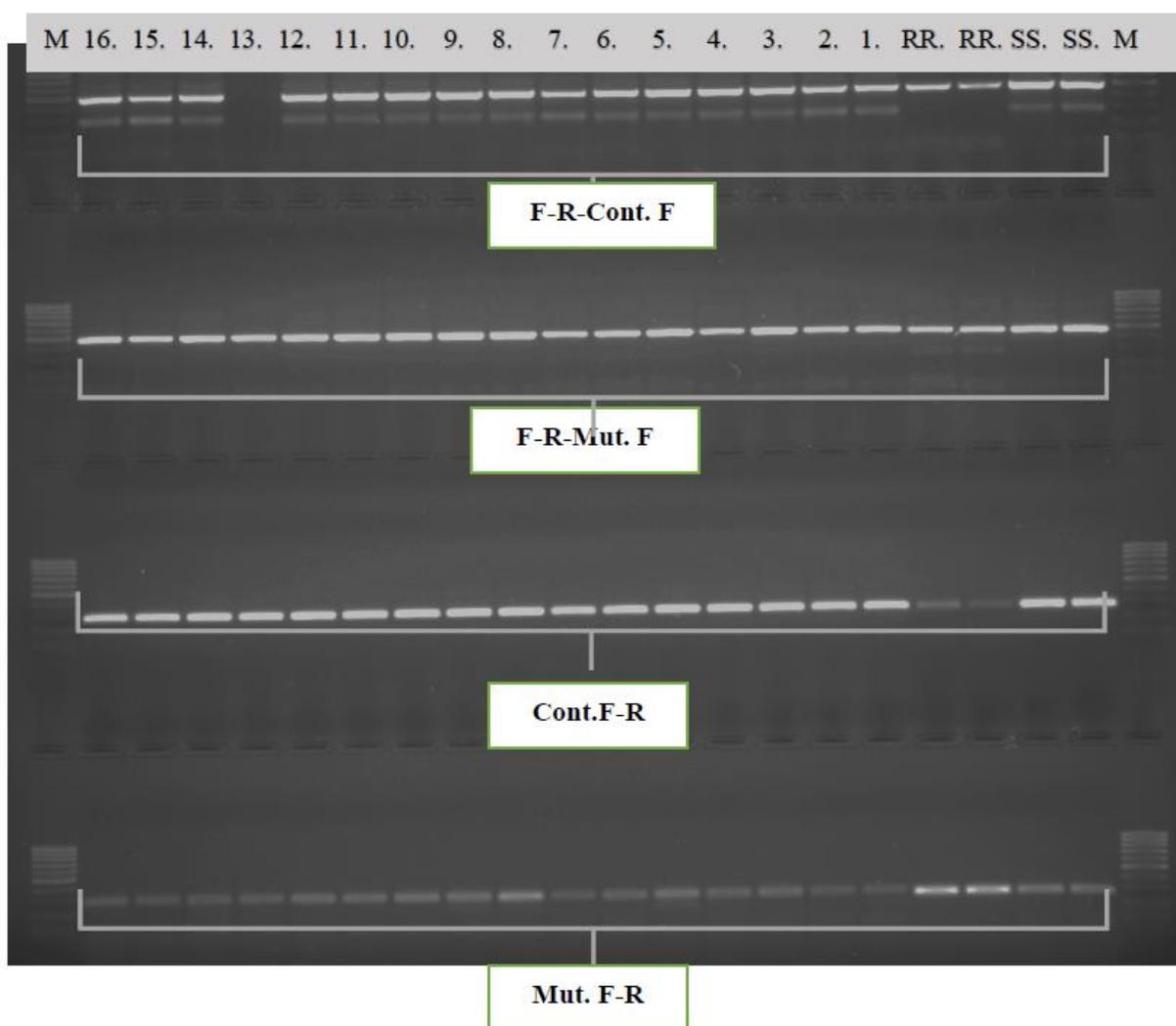
ARAGÓN: 40 (24 *Echinochloa* spp + 2 *Leptochloa* spp. + 14 *Cyperus difformis*)

EXTREMADURA: 46 (20 *Echinochloa* spp + 20 *Leptochloa* spp. + 6 *Cyperus difformis*)

Se han diseñado los siguientes primers, basados en las principales mutaciones descritas en la actualidad y que dan lugar a resistencias, para uso en dicha técnica:

Cambio aminoácido	Gen	Especie
Trp574Leu	ALS	<i>Echinochloa</i> spp./ <i>Cyperus difformis</i>
Pro197Leu	ALS	<i>Echinochloa</i> spp./ <i>Leptochloa</i> spp.
Pro197Ser	ALS	<i>Echinochloa</i> spp./ <i>Leptochloa</i> spp.
Ile1781Leu	ACCasa	<i>Echinochloa</i> spp./ <i>Leptochloa</i> spp.
Ile1781Thr	ACCasa	<i>Echinochloa</i> spp./ <i>Leptochloa</i> spp.
Trp2027Cys	ACCasa	<i>Echinochloa</i> spp./ <i>Leptochloa</i> spp.

Se han analizado las muestras anteriormente descritas y de ellas se han secuenciado algunas al azar para comprobar la efectividad de la técnica y se corroboran los resultados obtenidos con la técnica PASA. A continuación, se muestra un ejemplo de los resultados para Ile1781Leu (ACCasa), donde con el uso de esta técnica se puede detectar de forma sencilla y fiable la presencia de individuos resistentes (RR).



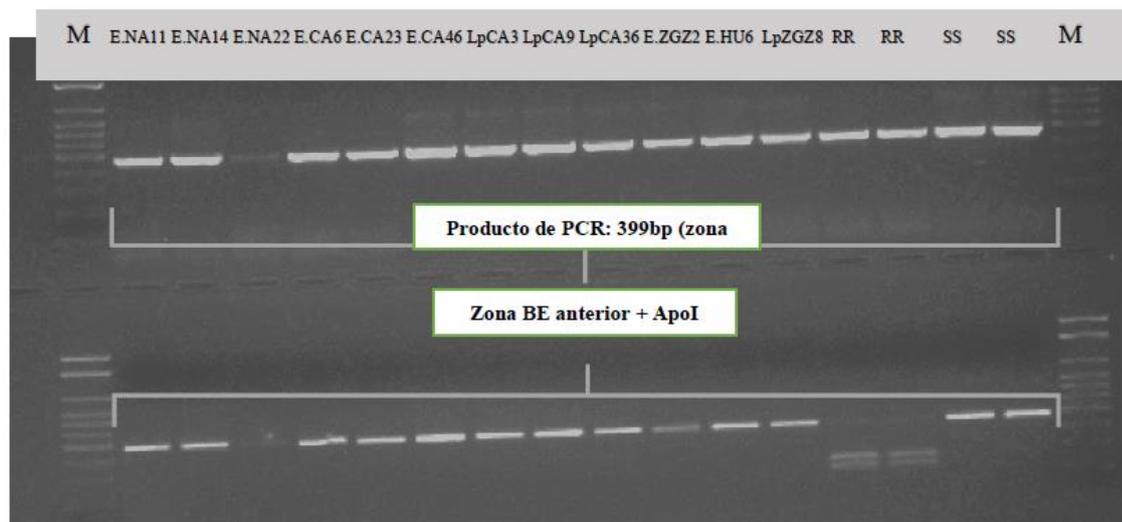
Además del uso de la técnica PASA, y aunque no estaba previsto en la memoria inicial, se han utilizado técnicas de PCR combinadas con enzimas de restricción para aquellos casos donde la técnica PASA no ha funcionado adecuadamente. En la siguiente tabla se detallan las enzimas de restricción utilizadas:

Cambio aminoácido	Gen	Especie	Enzima de restricción
Trp574Leu	ALS	<i>Echinochloa spp./ Cyperus difformis</i>	BtsI-TspRI/MfeI
Pro197Leu	ALS	<i>Echinochloa spp./ Leptochloa spp.</i>	FauI
Pro197Ser	ALS	<i>Echinochloa spp./ Leptochloa spp.</i>	SduI
Ile1781Leu	ACCasa	<i>Echinochloa spp./ Leptochloa spp.</i>	ApoI
Ile1781Thr	ACCasa	<i>Echinochloa spp./ Leptochloa spp.</i>	---
Trp2027Cys	ACCasa	<i>Echinochloa spp./ Leptochloa spp.</i>	BrsI

A continuación, se muestra un ejemplo de los resultados para Ile1781Leu (ACCasa), donde con el uso de esta técnica se puede detectar de forma sencilla y fiable la presencia de individuos resistentes (RR), realizando la digestión con la enzima de restricción ApoI:



Tamaño del producto de PCR: 475bp
Tamaños esperados tras digestión: SS: 475bp
RR: 261bp + 214bp
RS: 475bp + 261 + 214bp



Los mejores resultados obtenidos con la utilización de estas técnicas, han sido para las posiciones Pro197, Trp574 (ALS) e Ile1781 (ACCasa). En un futuro habría que seguir trabajando en estas técnicas de detección rápida de mutaciones, para poder dar cabida a todas las que hay descritas hasta ahora.

0.3.2.- NTS (Metabolismo)

Se han realizado estudios para confirmar, de **manera indirecta**, el metabolismo del herbicida como mecanismo responsable de la resistencia, en concreto del citocromo P450. Para ello se aplicó malation (inhibidor del citocromo P450), previamente a la aplicación de los herbicidas en los ensayos in vivo.

En la siguiente tabla se detallan algunas de las poblaciones (Na29, Nach23, Nav21, Se24) donde se ha podido confirmar, de manera indirecta usando malation, que el metabolismo es el mecanismo responsable de las resistencias presentes. En ellas se puede observar donde una aplicación previa al tratamiento (en especial en el caso de penoxsulam), aumenta el control con respecto al tratamiento con herbicida solo, lo cual indica la implicación del metabolismo como causante de la resistencia a este herbicida en dichas poblaciones de *Echinochloa* spp.

ID	Tratamiento	% peso respecto al control
Ech 16-134	Control	100
Ech 16-134	Penoxsulam	107,76
Ech 16-134	Penoxsulam + malation	106,53
Ech 16-134	Cihalofop	12,24
Ech 16-134	Cihalofop - malation	13,47
Nav 29	Control	100,00



Nav 29	Penoxsulam	89,13
Nav 29	Penoxsulam + malation	31,30
Nav 29	Cihalofof	9,56
Nav 29	Cihalofof - malation	16,80
Nach 23	Control	100,00
Nach 23	Penoxsulam	63,50
Nach 23	Penoxsulam + malation	31,94
Nach 23	Cihalofof	35,93
Nach 23	Cihalofof - malation	37,45
Nav21	Control	100,00
Nav21	Penoxsulam	73,90
Nav21	Penoxsulam + malation	34,88
Nav21	Cihalofof	23,00
Nav21	Cihalofof - malation	17,05
Nach9	Control	100,00
Nach9	Penoxsulam	75,82
Nach9	Penoxsulam + malation	57,51
Nach9	Cihalofof	4,21
Nach9	Cihalofof - malation	10,99
Se24	Control	100,00
Se24	Penoxsulam	51,73
Se24	Penoxsulam + malation	12,03
Se24	Cihalofof	24,05
Se24	Cihalofof - malation	12,03

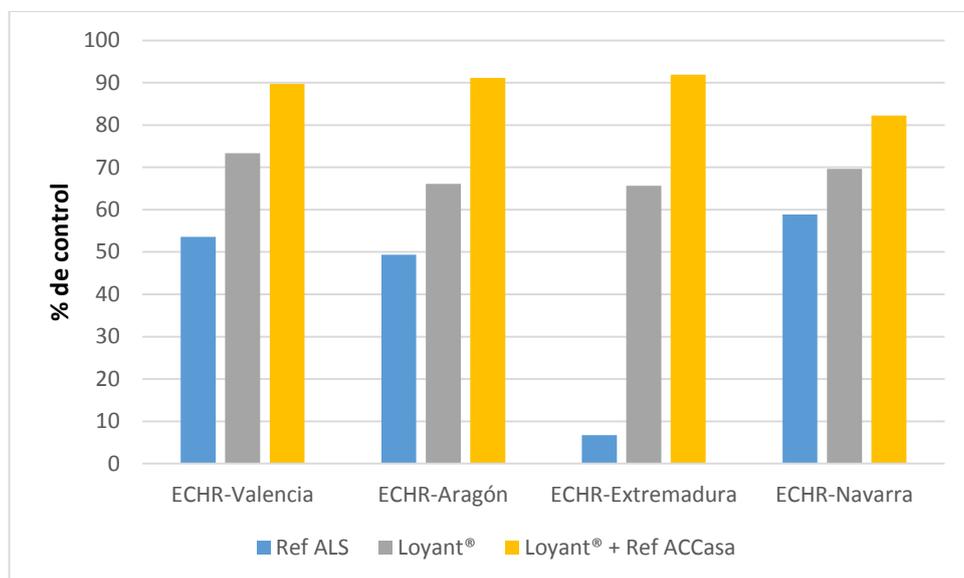
Los casos de metabolismo como mecanismo implicado a la resistencia a herbicidas se han detectado principalmente en poblaciones de *Echinochloa* spp. provenientes de Extremadura, Navarra y Sevilla.

Objetivo 4.- ESTUDIOS DE RESISTENCIA CRUZADA Y/O MULTIPLE

Dentro de este apartado, una vez caracterizadas las poblaciones resistentes y el mecanismo responsable de la resistencia se hacen tratamientos (a dosis recomendadas de campo) con herbicidas alternativos que hay autorizados en la actualidad en el cultivo. Estos datos quedan reflejados en los apartados anteriores.

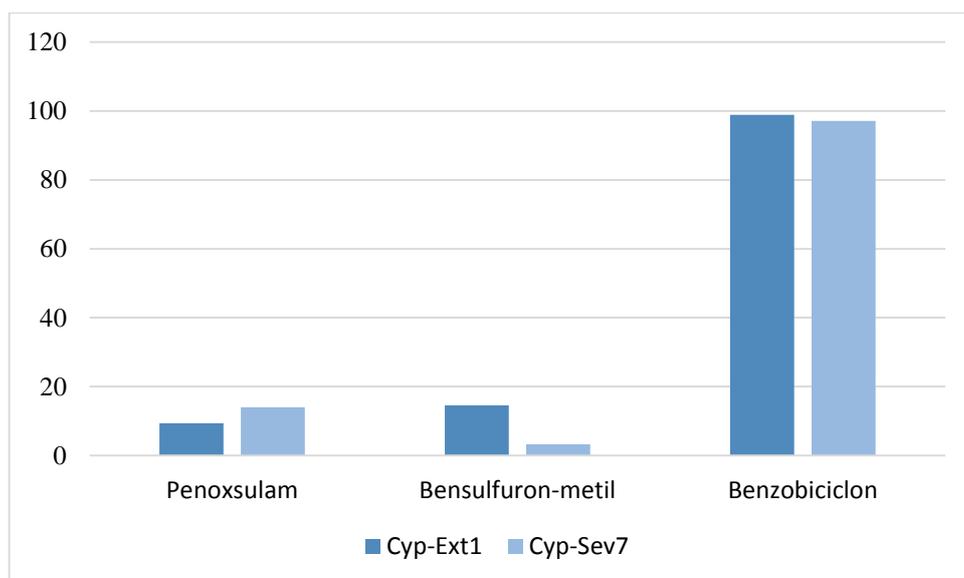
Durante el periodo en el que se ha desarrollado el trabajo, dos herbicidas con modo de acción alternativo han sido autorizados en el cultivo del arroz en España: florpyrauxifen-benzyl (autorizado desde 2021) y benzobicyclon (autorización excepcional 2021). Con las empresas propietarias de estos herbicidas, Corteva Agriscience y GOWAN Crop Protection, respectivamente se llegó a acuerdo para evaluar la eficacia de estas materias activas en poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS y/o ACCasa de *Leptochloa* spp., *Echinochloa* spp. y *Cyperus difformis*.

En las siguientes gráficas se resumen los principales resultados obtenidos. En la primera grafica se puede observar el efecto de florpyrauxifen-benzyl (comercializado en España como Loyant®), así como su mezcla con otro herbicida (se prevé una nueva formulación con esta mezcla) frente a poblaciones de *Echinochloa* spp. de diferentes regiones arroceras:



Tal y como se observa en la figura, florpyrauxifen-benzyl proporcionó un control significativamente mayor que la referencia ALS en *Echinochloa* spp. resistente a ALS procedente de cualquiera de las cuatro zonas arroceras indicadas. Esta eficacia se incrementa cuando este herbicida se mezcla con un herbicida inhibidor de la ALS.

A continuación, se muestran los resultados (como porcentaje de control) obtenidos para dos poblaciones de *Cyperus difformis* (procedentes de Sevilla y Extremadura) con resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS tratados con benzobiciclón (comercializado en España como Avanza®) a la dosis de campo:

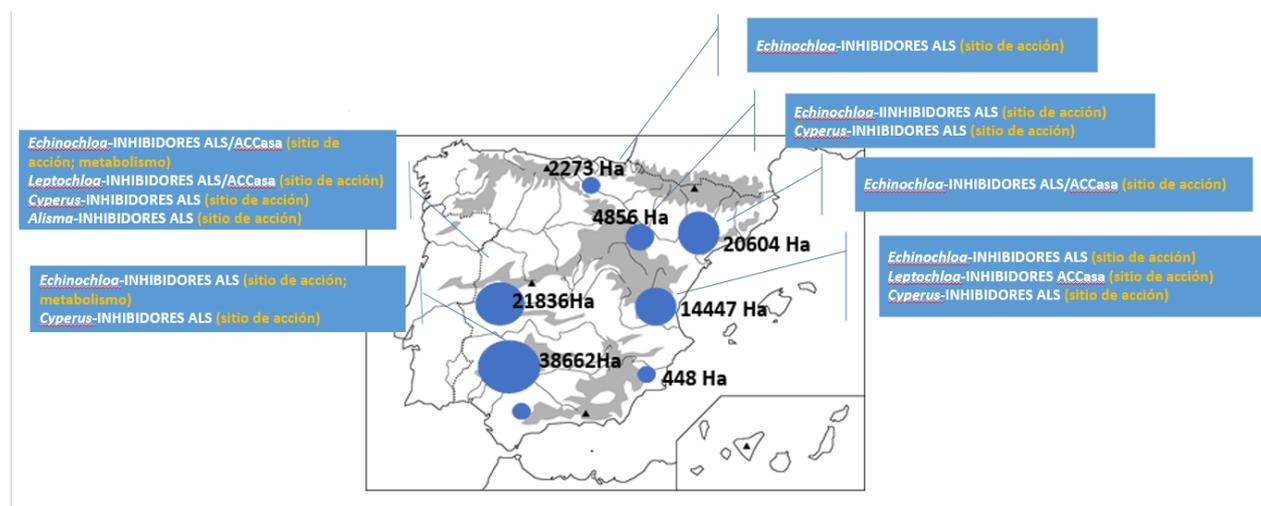


Como se puede observar en la gráfica, las eficacias de los herbicidas penoxsulam y bensulfurón-metil fueron menores del 15% en las dos poblaciones estudiadas. Utilizando benzobiciclón la eficacia fue superior al 98% en ambos casos.



Objetivo 5.- MAPEO DE POBLACIONES RESISTENTES EN LAS DIFERENTES REGIONES ARROCERAS, MECANISMOS DE RESISTENCIA Y SU RELACIÓN CON POSIBLES RESISTENCIAS CRUZADAS/MÚLTIPLES.

Como resultado final de este proyecto, se ha podido confirmar la presencia de resistencias en las distintas zonas arroceras a los herbicidas mayoritariamente utilizados en arroz (inhibidores de la ALS y de la ACCasa). Se está haciendo un mapa más completo incluyendo todas las coordenadas de los muestreos donde se ha confirmado resistencia. A modo de resumen se ha hecho esta figura, que indica las principales resistencias encontradas por especie incluida en el proyecto, así como los principales mecanismos implicados.





MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN





INFORMACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA PROPORCIONADA POR EL PROYECTO. POSIBLES APLICACIONES

Los resultados de este proyecto corroboran la presencia de resistencia a los herbicidas más utilizados en el cultivo del arroz en España (inhibidores de ALS y ACCasa), en muchos casos por resistencia tipo TSR (Target Site Resistance), aunque ya se han confirmado casos en *Echinochloa* spp. de resistencia debidas a NTSR (Non target Site Resistance), en concreto por metabolismo, principalmente en las zonas de Extremadura, Navarra y Sevilla. Extremadura es actualmente la región arrocera española con mayores problemas en cuanto a presencia de malas hierbas y casos confirmados de resistencia. El uso de alternativas cuando el problema está muy avanzado puede provocar cambios drásticos en los sistemas tradicionales. El ejemplo de Extremadura es destacable ya que, debido principalmente a los graves problemas causados por las malas hierbas, la superficie de cultivo de arroz de secano de siembra directa se acercó al 80% del total en la última campaña de arroz. Sin embargo, también hemos comprobado que estos cambios en los métodos de cultivo no deben ser definitivos ya que, a largo plazo, la repetición en los mismos sistemas de cultivo acabará causando problemas similares. Los esfuerzos concertados de concienciación sobre la resistencia a los herbicidas, y la aplicación de un programa eficaz de gestión integrada de las malas hierbas, son necesarios

Tanto la confirmación de resistencias, como los mecanismos responsables de la resistencia (en este proyecto se ha desarrollado técnicas de detección rápida que facilitarán el proceso) podrán ser aplicados para el desarrollo de técnicas de manejo integrado, así como para la toma de decisiones en organismos oficiales (por ej. esta información se ha aportado a diferentes Servicios de Sanidad Vegetal como apoyo a la toma de decisiones sobre posibles autorizaciones excepcionales de materias activas herbicidas).

La posibilidad de que aparezcan nuevos herbicidas con modos de acción alternativos en un corto espacio de tiempo parece muy limitada. Para evitar un aumento desproporcionado de las resistencias, que podría poner en peligro la viabilidad del cultivo, es necesario llevar a cabo una serie de medidas para la correcta gestión de este importante problema. Esta situación requiere un uso más adecuado de las estrategias alternativas disponibles, incluyendo diferentes estrategias para cada escenario arrocero (escala de campo), ya que la interacción entre el cultivo de arroz y el manejo de las malas hierbas dicta la evolución de la resistencia a los herbicidas. Además, la diversificación de los cultivos y de las prácticas de gestión de las malas hierbas, haciendo hincapié en las tácticas de control de las malas hierbas no químicas (son herramientas importantes para el manejo proactivo de las malezas resistentes a los herbicidas

En este proyecto, además de la realización de ensayos con las dos únicas nuevas materias activas alternativas que hay a día de hoy para el cultivo de arroz, cuyos datos han sido presentados el grupo que coordina uno de los investigadores (Gabriel Pardo, CITA) ha realizado ensayos de estrategias alternativas a herbicidas, como puede ser la realización de rotación de cultivos dentro de un sistema de manejo integrado (incluido en artículo Pardo et al., 2021).

Los resultados obtenidos aquí son la base para la continuación de futuras investigaciones. No hay que olvidar que el cambio climático global inducirá temperaturas más altas y una disponibilidad limitada de agua, lo que generalmente favorecerá a los C4 (por ejemplo, *Echinochloa* spp.) frente a las plantas C3 (por ejemplo, el arroz). Además, una de las consecuencias negativas del aumento de la temperatura y de los niveles de CO₂ podría ser la aceleración de la evolución de la resistencia de las malas hierbas a los herbicidas, y más concretamente de la resistencia tipo NTSR, por lo cual habrá que seguir profundizando en este tipo de resistencia, especialmente el metabolismo.

En resumen, es de gran importancia conocer la situación de la resistencia que encontramos en nuestros arrozales, y un seguimiento de su evolución nos ayudará a decidir qué métodos fitosanitarios, culturales o de cultivo debemos



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



adoptar. Cada zona arroceras zona de cultivo de arroz en España tiene unas características diferentes, en función del tipo de clima, suelo, disponibilidad de agua disponibilidad de agua, etc., y puede requerir estrategias diferentes. Sin embargo, también se han encontrado medidas que pueden ser aplicables a todas o a la mayoría de las regiones arroceras de España.

Este estudio fue reflejado en un artículo (Gomez de Barreda et al., 2021) donde se presenta una revisión de las principales características del cultivo del arroz en España, haciendo hincapié en los problemas actuales de este cultivo y en el manejo de las malas hierbas resistentes a los herbicidas.



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO

Describir brevemente las actividades de formación relacionadas con el proyecto. En caso de tesis doctorales indicar para cada una de ellas: título, nombre del doctorando, director de tesis, universidad y facultad o escuela, fechas de comienzo y de lectura, y calificación obtenida.

TESIS DOCTORAL:

Resistencia de malas hierbas a herbicidas en el cultivo del arroz y en cultivos leñosos: estudios de mecanismos de resistencia.

Doctorando: Ignacio Amaro Blanco

Directores de Tesis: Maria Dolores Osuna Ruiz (CICYTEX)-Julio Menéndez Calle (Universidad de Huelva).

Universidad de Extremadura

Fecha: 12 septiembre 2019.

Sobresaliente Cum Laude (Doctorado Europeo)

Además de este trabajo, información procedente de este proyecto ha sido incluida en diferentes **trabajos fin de master** realizados en la Universidad de Sevilla, Universidad de Valencia y CICYTEX.

Por otra parte, han sido numerosos los alumnos que han formado parte de los ensayos dentro de su **formación en prácticas**.



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



PATENTES, OBTENCIONES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

Especificar para cada patente, obtención u otro título de propiedad industrial los siguientes datos: número, autor(es), denominación, entidad titular de la patente, obtención o título, país de registro, fecha y situación actual.



PUBLICACIONES: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Especificar para cada artículo científico los siguientes datos: autor(es), año, título, nombre de la revista, idioma, volumen, número, y páginas.

En el caso de aquellas publicaciones que estén en tramitación y aún no hayan sido publicadas, indicar únicamente la situación en la que se encuentra la publicación.

Adjuntar separata o ejemplar de cada artículo científico descrito (o enviar escaneado en PDF a través del sistema telemático)

1.- Amaro-Blanco, I.; Romano, Y.; Palmerin, J.A.; Gordo, R.; Palma-Bautista, C.; De Prado, R.; Osuna, M.D. Different Mutations Providing Target Site Resistance to ALS- and ACCase-Inhibiting Herbicides in *Echinochloa* spp. from Rice Fields. *Agriculture* **2021**, 11, 382. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050382>

2.- Gómez de Barreda, D.; Pardo, G.; Oisca, J.M.; Catala-Forner, M.; Consola, S.; Garnica, I.; López-Martínez, N.; Palmerín, J.A.; Osuna, M.D. An Overview of Rice Cultivation in Spain and the Management of Herbicide-Resistant Weeds. *Agronomy* **2021**, 11, 1095. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061095>

3.- Pardo, G.; Marí, A.I.; Aibar J.; Cirujeda, A. Do Crop Rotations in Rice Reduce Weed and *Echinochloa* spp. Infestations? Recommendations for Integrated Weed Control. *Agronomy* **2021**, 11, 454. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030454>



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



PUBLICACIONES: ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN

Especificar para cada artículo de divulgación los siguientes datos: autor(es), año, título, nombre de la revista, volumen, número, y páginas.

En el caso de aquellas publicaciones que estén en tramitación y aún no hayan sido publicadas, indicar únicamente la situación en la que se encuentra la publicación.

Adjuntar separata o ejemplar de cada artículo de divulgación descrito (o enviar escaneado en PDF a través del sistema telemático)

MD Osuna, Y Romano, R Gordo, T Cabanillas, A de Santiago JA Palmerín, JM Quiles Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura. 2020. Agricultura 60-64

MD. Osuna, A De Santiago, JM Quiles, JA Palmerín. Situación actual de las resistencias a herbicidas en el cultivo de arroz en España. 2021. Phytoma 328, 26-30.

JA Palmerín, JM Quiles , A De Santiago, y MD Osuna Estrategias de control de malas hierbas en el cultivo de arroz en Extremadura. 2021. 328, 34-37.



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



PUBLICACIONES: LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS

Especificar para cada libro, capítulo de libro o monografía los siguientes datos: autor(es), título, editorial, país de edición, idioma, año y páginas.

En el caso de aquellas publicaciones que estén en tramitación y aún no hayan sido publicadas, indicar únicamente la situación en la que se encuentra la publicación.

Adjuntar separata o ejemplar de cada libro, capítulo de libro o monografía descrita (o enviar escaneado en PDF a través del sistema telemático)



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS, REUNIONES, SIMPOSIOS, RELACIONADOS CON EL PROYECTO

Especificar para cada trabajo: autor(es), año, título, denominación, lugar de celebración, fecha, editor, volumen y páginas.

Adjuntar separata o ejemplar de cada artículo científico descrito (o enviar escaneado en PDF a través del sistema telemático)

4.Febrero.2021: Comité Prevención Resistencia a Herbicidas (online)

Comunicación oral: Actualización sobre el estado de las resistencias en Extremadura

11.Febrero.2021: Resistencias en arroz y perspectivas futuras (Phytoma Meets, online)

Jornadas organizadas en conjunto con Phytoma

Enlaces:

<https://www.youtube.com/watch?v=1JVEJCmvpcg>

<http://cicytex.juntaex.es/es/eventos/661/phytoma-meets-resistencias-en-arroz-y-perspectivas-futuras-11-de-febrero-de-2021>



OTROS TRABAJOS DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS (No incluidos en epígrafes anteriores)

Han existido reuniones o participación en jornadas donde se ha realizado la presentación de resultados obtenidos en este proyecto. Se consideran dentro del epígrafe “otros trabajos de difusión” ya que no existe trabajos publicados de los trabajos presentados. A continuación, se realiza un resumen de las principales actividades organizadas:

05.03.2019. Control de malas hierbas en arroz. Casos confirmados de resistencia en España. Jornada Técnica del cultivo del arroz. Sueca (Valencia)

29.03.2019. RESISTENCIA DE MALAS HIERBAS EN EL ARROZ. II Jornadas del arroz y las aves en el arrozal. *Palazuelo (Badajoz)*

5.04.2019. Mecanismos de resistencia de malas hierbas a herbicidas. Clase impartida a alumnos Master Ingeniería Agraria, UNEX. *Badajoz.*

21. 11. 2019. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A LA MALHERBOLOGÍA. Clase impartida a alumnos Master de Biotecnología, UNEX. *Badajoz.*

03.12.2019. Resistencia a herbicidas en malas hierbas de arroz. Alternativas de Control. Jornada Arroz Empresa CORTEVA. *La Rinconada, Sevilla.*

15.01.2020. Situación actual de las malas hierbas resistentes en el cultivo del arroz. Jornadas dirigidas a técnicos empresa BASF. Sevilla.

21. 07.2020. Situación actual de las malas hierbas resistentes en el cultivo del arroz. Jornadas organizadas por empresa Gowan.

25.11.2021. Detección de biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas. El caso de las malas hierbas de arroz. Master PIC Universitat de Lleida. Online.

Durante 2020-2021. Curso para identificación de malas hierbas en cultivos. 6 ediciones (teórico y practico) Empresa CORTEVA.

Se han realizado reuniones periódicas con personal de Sanidad Vegetal y de los diferentes entes que actuaron como EPOs en este proyecto.



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



**PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DEL PROGRAMA DE I+D DE LA UE
Y/O EN OTROS PROGRAMAS INTERNACIONALES EN TEMAS
RELACIONADOS CON ESTE PROYECTO**

Indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto.



PROYECTOS COORDINADOS (a rellenar sólo por el investigador principal del proyecto)

Describe el nivel de la coordinación entre subproyectos, y los resultados de dicha coordinación en relación a los objetivos globales del proyecto.

A pesar de que no es un proyecto coordinado, el equipo investigador está compuesto por investigadores de distintas zonas, por lo cual se ha realizado diferentes reuniones de coordinación donde han estado presentes los investigadores que componen el equipo investigador:

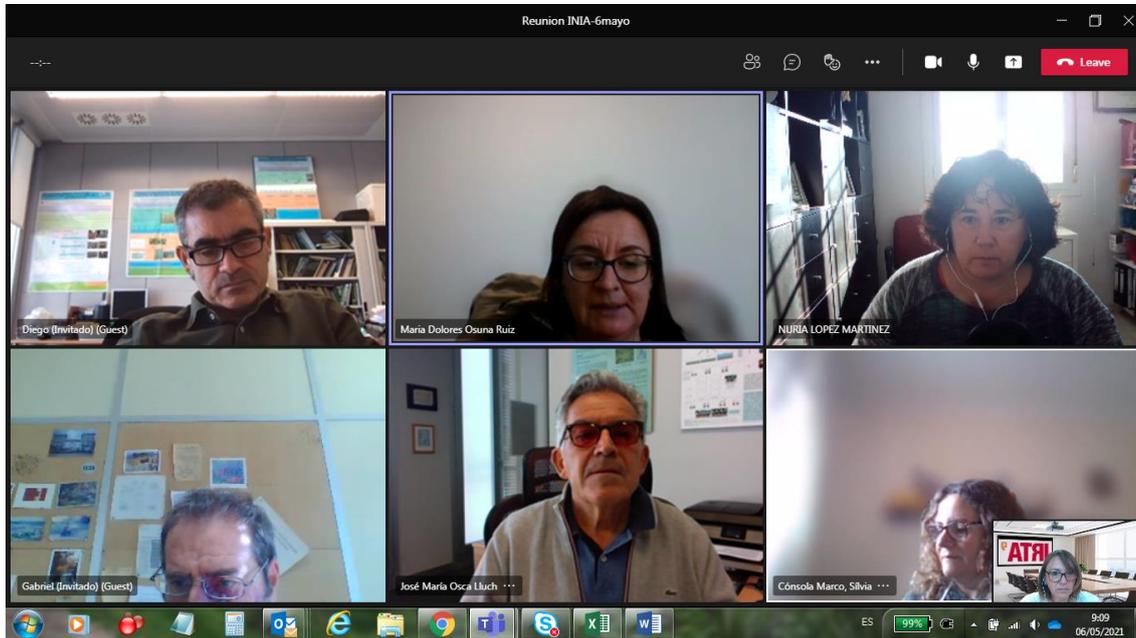
26.07.2019. Reunión en Valencia (ETSIA), donde estuvimos presentes los siguientes investigadores participantes del proyecto:

- José Maria Osca (Universidad de Valencia)
- Nuria López (Universidad de Sevilla)
- Mar Catalá (IRTA)
- Gabriel Pardo (CITA)
- Diego Gómez (Universidad de Valencia)
- Dolores Osuna (CICYTEX, IP)

03.07.20. Reunión vía Zoom, donde estuvimos presentes los siguientes investigadores participantes del proyecto:

- José Maria Osca (Universidad de Valencia)
- Nuria López (Universidad de Sevilla)
- Mar Catalá (IRTA)
- Gabriel Pardo (CITA)
- Diego Gómez (Universidad de Valencia)
- Dolores Osuna (CICYTEX, IP)

06.05.2021. Reunión vía Zoom, se adjunta pantallazo.



En esta reunión se concretaron los ensayos a realizar en cada zona, se establecieron los protocolos comunes a seguir en las distintas zonas, y como se coordinarían los ensayos que están centralizados en uno de los Centros participantes (por ej. Análisis de ADN en el CICYTEX).

Además, ha existido un contacto constante vía correo electrónico entre todos los componentes de los diferentes grupos de investigación que componen el equipo investigador del Proyecto.



**FINANCIACIÓN RECIBIDA DE OTRAS ENTIDADES U ORGANISMOS
PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO**

En caso de recibir **FINANCIACIÓN DE OTRAS ENTIDADES U ORGANISMOS** para el desarrollo del proyecto, rellenar el siguiente cuadro:

ENTIDAD U ORGANISMO	AÑO	CONCEPTO	Euros
TOTAL.....			



CIRCUNSTANCIAS QUE HAN LIMITADO EL DESARROLLO DEL PROYECTO

1. De carácter científico

Debido al confinamiento por el COVID, de marzo a junio del 2020, no se pudo ejecutar parte de los trabajos correspondientes a dicho periodo de esta anualidad, porque la campaña ya estaba avanzada cuando pudimos retomar las actividades laborales, una vez finalizado el estado de alarma. Por ello se solicitó una prórroga en la ejecución del proyecto hasta el 31/12/21, la cual fue concedida.

2. De gestión

En las primeras anualidades, ha sido difícil la gestión de gastos ejecutados por personal pertenecientes a otros Centros de Investigación-Universidad, ya que era la primera vez que se ejecutaba un proyecto coordinado por CICYTEX y donde la mayoría del personal del equipo investigador perteneciera a otras entidades de fuera de la Comunidad Autónoma.

3. Desviaciones con respecto a lo aprobado

- En el equipo investigador

Aunque no se procedió a dar de baja al no pertenecer al equipo investigador, la técnica Yolanda Romano dejó de ejercer actividades en este proyecto desde septiembre del 2020 debido a que dejó de formar parte del grupo de investigación de la doctora María Dolores Osuna Ruiz.

- De asignación presupuestaria

Con fecha del 13/12/2017 se realizó la siguiente petición:

Debido a que en el informe de evaluación se ha dado el visto bueno al proyecto, destacando que es una propuesta viable y factible, dándose el visto bueno a la metodología propuesta de trabajo y ya que el presupuesto se ajustó lo máximo posible (es un solo proyecto, pero hay muchas zonas geográficas implicadas) y que no se ha comentado nada en el informe sobre dicho presupuesto, se considera que debería realizarse un ajuste en el plan de ejecución para que los resultados sean lo más adecuados al objetivo general inicialmente planteado en el proyecto. Para ello, se plantean 2 posibles opciones:

- Una reducción en el número de muestreos por zona que hagan posible disminuir costes en los diferentes apartados del plan de trabajo propuesto en la memoria original.
- Un incremento del presupuesto, donde al menos haya dinero para cubrir de forma correcta aquellos servicios que deben ser contratados de forma externa y que son básicos para la correcta ejecución del proyecto (ensayos de campo, secuenciación y ensayos de radiactividad). Ello conllevaría un incremento en el presupuesto de 15.600 euros en total (7500 euros destinados a secuenciación, 4500 a contratación de fincas externas y 3600 a ensayos de metabolismo con radiactividad)



MINISTERIO
DE CIENCIA,
E INNOVACIÓN



Dado que no se recibió respuesta, pero no hubo incremento en la partida presupuestaria solicitada en el apartado b, consideramos que para el plan de ejecución se seguirá lo argumentado en el apartado a).

- **En el Plan de trabajo**