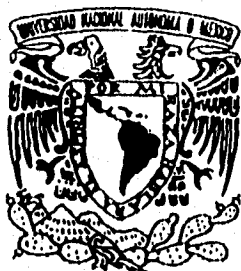


30
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Respuestas en consumo y oviposición de Sitophilus granarius (Coleoptera: Curculionidae) a mezclas de metabolitos secundarios vegetales de diferente complejidad.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

IGNACIO ESTEBAN CASTELLANOS STUREMARK



MÉXICO D.F. FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

AGOSTO DE 1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Respuestas en consumo y oviposición de *Sitophilus granarius*
(Coleoptera: Curculionidae) a mezclas de metabolitos secundarios
vegetales de diferente complejidad.

realizado por Ionacio Esteban Castellanos Sturemark

con número de cuenta 9052161-6, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis
 Propietario Dr. Francisco Javier Esminosa García
 Propietario Dra. Ana Luisa Anaya Lano
 Propietario Dr. Zenón Cano Santana
 Suplente Biol. Alejandro Morón Píos
 Suplente Biol. Leonor Valiente Banuet

FACULTAD DE CIENCIAS

Biol. Leonor Valiente Banuet

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

[Handwritten signatures and stamps]
Leonora Valiente Banuet

AGRADECIMIENTOS.

A Francisco Espinosa por su apoyo y amistad, a Ana Luisa Anaya por la revisión del escrito y a Alejandro Morón, Polo Valiente y Zenón Cano por todo el tiempo que dedicaron a que salieran mejor las cosas.

A la U.N.A.M. por muchas cosas.

A D.G.A.P.A. (proyecto IN205892) por la beca de tesista y a C.O.N.A.C.Y.T. (proyecto 1172-N9202) por parte del material que utilicé.

A todos los del Lab. por diversas razones.

A Oscar y a Carla por las idas a comer.

Al Pollo por las fotos.

A Horacio y Rosario por hacerme la vida más amena en el Lab.

Al Drink Team por todo su apoy-OH.

A Luis Ge y a Pablo por contarme los huevos en alguna ocasión.

A Esperanza por muchas cosas.

A mis papás por ayudarme.

A Bruno, Elsa, Willy y Luca por hacerme la vida más amena.

A mis hermanos y al Morton por llevarme frecuentemente a la central y por muchas cosas más.

Y a Iriana por todo.

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	
1.1. Las plantas y sus herbívoros	2
1.2. Los compuestos fenólicos	4
1.3. Los alcaloides	6
1.4. Los metabolitos secundarios en las interacciones ecológicas	8
1.5. Hipótesis de la defensa vegetal	9
1.6. Los herbívoros frente a los metabolitos secundarios	13
1.7. Variabilidad de los metabolitos secundarios	14
1.8. Objetivo e hipótesis	18
II. SISTEMA DE ESTUDIO	
2.1. Biología de <i>Sitophilus granarius</i>	19
2.2. Metabolitos secundarios de los hospederos de <i>Sitophilus granarius</i>	21
III. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Colecta y cultivo de <i>Sitophilus granarius</i>	23
3.2. Elaboración de las simulaciones de semillas	23
3.3. Montaje de las unidades experimentales	26
3.4. Experimento y toma de datos	26
3.5. Análisis de los datos	27
IV. RESULTADOS	
4.1. Metabolitos secundarios y oviposición	29
4.2. Metabolitos secundarios y consumo	38
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES	
5.1. Hipótesis de la diversidad y concentración de metabolitos secundarios	42
5.2. Hipótesis de la química extraña	46
REFERENCIAS	49

RESUMEN.

Se ha sugerido que la diversidad de metabolitos secundarios (MS) en las plantas es un rasgo importante de la resistencia vegetal contra los herbívoros y que un MS distinto a los encontrados en los hospederos habituales de un herbívoro, otorga mayor defensa que los MS habituales. El objetivo de este trabajo fue explorar estos dos puntos bajo las siguientes hipótesis: (1) la presencia de altas concentraciones y una alta diversidad de MS proveen una mejor defensa que tener bajas concentraciones y/o una baja diversidad de MS, y (2) un compuesto secundario extraño para un consumidor otorga mejor defensa que un compuesto común.

Las hipótesis se probaron analizando el efecto de la variación en el número, tipo (comunes o extraños) y concentración de MS en dietas artificiales sobre el consumo y oviposición del gorgojo de los graneros, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). Adultos de *S. granarius* fueron expuestos a cuatro compuestos fenólicos que se encuentran presentes en los granos que consumen estos insectos (los ácidos trans-ferúlico, para-cumárico, sinápico y vainílico), y a un compuesto fenólico y un alcaloide que no se encuentran presentes en los granos (umbeliferona y cafeína). Los compuestos fueron incorporados individualmente y como mezclas de dos, cuatro y seis MS en cinco diferentes concentraciones dentro de una dieta homogénea simulando semillas. Los compuestos y mezclas fueron ofrecidos a los insectos en un mismo ensayo.

Se encontró que los resultados de este trabajo apoyan la primera de las hipótesis planteadas: (1) la oviposición por *Sitophilus granarius* fue significativamente menor sobre las tabletas con la mezcla de seis MS en la concentración alta que sobre las tabletas con uno, dos y cuatro MS en la misma concentración, mientras que no se encontraron diferencias al disminuir la concentración de los MS; (2) al aumentar la concentración de MS en las tabletas con la mezcla de seis compuestos disminuyó significativamente el número de huevos puestos por *S. granarius* con respecto a las tabletas sin compuestos; y parcialmente por (3) las tabletas con las mezclas de cuatro y seis MS no generaron un efecto estimulante sobre la respuesta alimenticia del insecto, mientras que las mezclas con uno y dos compuestos sí la generaron. Los resultados obtenidos con la química extraña muestran que los MS elegidos y/o las variables de respuesta utilizadas en este trabajo no apoyan la hipótesis. Estos fueron: (1) uno de los compuestos extraños (la umbeliferona) aparentemente actuó como un antagonista sobre la oviposición de *S. granarius*; (2) los MS comunes en los hospederos de *S. granarius* fueron más inhibitorios sobre el consumo de los insectos que los MS extraños.

Se concluye que con un aumento en la diversidad de MS dentro de una mezcla de compuestos, la capacidad defensiva contra un herbívoro aumenta, aunque también aumenta la probabilidad de que un compuesto de la mezcla sea antagónico. También se concluye que no cualquier MS extraño confiere resistencia contra un herbívoro.

I. INTRODUCCION.

1.1. Las plantas y sus herbívoros.

Si una planta es consumida, generalmente su desarrollo normal se ve deteriorado (Agrios, 1988), y la gravedad de las consecuencias en términos de su adecuación dependen del estado fenológico en que ocurra el daño, la estructura modular de la planta, la calidad y cantidad del tejido dañado (Dirzo, 1984). Se ha calculado que más del 10% de la producción vegetal anual en comunidades naturales terrestres es consumida por herbívoros (Coley *et al.*, 1985). El origen y evolución de los diversos mecanismos en que las plantas pueden evitar o tolerar el ataque de los herbívoros, no son claros y sobre esto se ha especulado bastante (Jeremy, 1984; Rausher, 1992). Existen tres posturas principales al respecto. Por un lado se cree que la actual diversidad en la resistencia de las plantas se debe al resultado de su coevolución con los herbívoros (Erich & Raven, 1964; Harborne, 1993). Otra postura es la creencia de que los herbívoros han intervenido fuertemente en la evolución de la resistencia de las plantas (Feeny, 1976; Bernays & Chapman, 1978; Spencer, 1984; Coley *et al.*, 1985; Berenbaum & Seigler, 1992). Por último, se cree que en la mayoría de los casos los herbívoros tienden a seguir únicamente la evolución de las plantas, ya que la presión de selección de los primeros sobre las segundas es débil o no ocurre (Jermy, 1984). Debido a esto, se ha llegado a distinguir entre dos tipos de caracteres en las plantas: caracteres de resistencia y caracteres de defensa (Rauscher, 1992). Los primeros incluyen cualquier caracter de la planta que influya en los

niveles de daño que ésta puede recibir. Los segundos incluyen cualquier carácter de resistencia que haya evolucionado o se mantenga dentro de una población de plantas debido a una presión de selección ejercida por los herbívoros (Rausher, 1992). Actualmente existen muy pocos experimentos en donde se haya demostrado una evidencia directa del efecto de la presión de los herbívoros sobre la evolución de los caracteres de defensa en las plantas (por ejemplo: Berenbaum *et al.*, 1986), sin embargo, mucha de la evidencia sí muestra que en la mayoría de los casos la herbivoría reduce la adecuación de las plantas en la naturaleza (Simms & Rausher, 1987).

Las interacciones entre los herbívoros y las plantas se encuentran mediadas por características morfológicas, físicas, químicas, nutricionales, fenológicas y asociativas de las plantas (Bernays & Chapman, 1994). Además, las interacciones entre las plantas y los herbívoros pueden estar mediadas por los enemigos naturales de estos (Price, 1981; Martin, 1987; Barbosa & Letorneau, 1988; Berenbaum, 1988) y por asociaciones de las plantas con otros organismos (Cushman *et al.*, 1994). Estos factores actúan conjuntamente y su importancia relativa varía según la planta, el consumidor y el ambiente. Los factores químicos (metabolitos secundarios) son los que en los últimos años han recibido la mayor atención por parte de los investigadores (Harborne, 1993) y se cree que posiblemente estos juegan el papel más importante en las interacciones entre las plantas y sus herbívoros (Erich & Raven, 1964; Feeny, 1976; Dethier, 1980; Schultz, 1988; Bernays & Chapman, 1994).

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos que se encuentran en

todas las plantas y que parecen no tener un papel intrínseco en los procesos fisiológicos de éstas (Waterman & Mole, 1994; Bernays & Chapman, 1994). No existen dos especies de plantas con el mismo arreglo de compuestos secundarios y por lo tanto muchas especies pueden ser identificadas por su química secundaria (Bernays & Chapman, 1994). Consecuentemente, ésta es de fundamental importancia en las interacciones entre las plantas y sus herbívoros (Rosenthal & Janzen, 1979; Bernays & Chapman, 1994). Se reconocen básicamente tres principales clases de compuestos secundarios: los compuestos fenólicos, los compuestos nitrogenados y los terpenos (Harborne, 1993).

1.2. Los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos presentan como estructura común un anillo aromático con uno o más sustitutos hidroxilos (Fig. 1). Estos compuestos tienen propiedades ácidas ya que son propensos a que la ligadura entre el oxígeno y el hidrógeno del grupo hidroxilo se rompa, y debido a esto, pueden formar puentes de hidrógeno con otras moléculas (Incluyendo otros metabolitos secundarios) (Waterman & Mole, 1984). Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua, ya que comúnmente están ligados a azúcares y generalmente están localizados dentro las vacuolas celulares (Harborne, 1984). La mayoría de las moléculas fenólicas se originan de la eritrosa 4-fosfato, el fosfoenol piruvato y la acetil coenzima A (Waterman & Mole, 1994). Existen numerosos tipos de compuestos fenólicos, entre los que se encuentran

los fenoles simples, los flavonoides, las quinonas y los taninos (Bernays & Chapman, 1994).

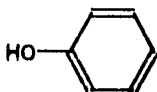


Figura 1. Estructura molecular de un fenol.

Los compuestos fenólicos se encuentran probablemente en todas las plantas (Herrmann, 1989). Dentro del grupo de los fenoles simples, se encuentran los ácidos fenólicos, los cuales son las sustancias fenólicas más comunes. Por ejemplo, en casi todas las angiospermas se encuentran los ácidos para-hidroxibenzoico, protocatéquico, cafeico y vainílico. Otros ácidos fenólicos comunes en las angiospermas son los ácidos para-cumárico, sinápico y vainílico (Bernays & Chapman, 1994). Algunos son más comunes en unas familias de plantas que en otras. Por ejemplo, el ácido ferúlico es relativamente abundante en las gramíneas.

Algunos autores dividen a los ácidos fenólicos en ácidos cinámicos y benzoicos. Dentro de los ácidos cinámicos se encuentran los ácidos hidroxicinámicos que usualmente no se encuentran de forma libre en las plantas, sino como ésteres simples unidos al ácido quínico o a una glucosa (Herrmann, 1989). Por ejemplo, los ácidos para-cumárico y ferúlico, en particular, comúnmente se encuentran esterificados a los grupos hidroxilos de los carbohidratos en las paredes celulares vegetales (Waterman & Mole,

1994). Los ácidos fenólicos varían mucho en concentración, incrementando principalmente en función de la cantidad de luz que recibe la planta que los sintetiza (Bernays & Chapman, 1994).

Las cumarinas son otro grupo dentro de los fenoles simples. Estos compuestos son dímeros de anillos aromáticos sencillos productos del ácido cinámico (Bernays & Chapman, 1994). Las cumarinas más sencillas como la cumarina o la umbeliferona son comunes en las plantas y se encuentran generalmente como ésteres o glucósidos (Waterman & Mole, 1994). Se han encontrado cumarinas en todas las partes de las plantas pero con mayores porcentajes en raíces y frutos (1 a 9 % del peso seco), mientras que en follaje comúnmente se encuentran en bajas concentraciones (0.1 a 1 % del peso seco) (Bernays & Chapman, 1994).

Los compuestos fenólicos desempeñan diferentes funciones (Waterman & Mole, 1994). Se ha encontrado que éstos son importantes en la resistencia de las plantas contra todo tipo de herbívoros y patógenos (Waterman & Mole, 1994). Por ejemplo, el ácido tánico inhibe la transmisión del virus del mosaico del tabaco en esta planta y las fitoalexinas (flavonoides) tienen un efecto antifúngico (Smith, 1976). En varios estudios se ha visto que los compuestos fenólicos son repelentes al consumo de insectos (Adams & Bernays, 1978; Serratos *et al.*, 1987; Sen *et al.*, 1994a).

1.3. Los alcaloides.

Los alcaloides son compuestos secundarios que contienen uno o más átomos

de nitrógeno, frecuentemente como parte de un sistema cíclico. Tienen propiedades básicas, generalmente son incoloros y la mayoría forman cristales a temperatura ambiente. Los precursores más comunes de los alcaloides son los aminoácidos (Harborne, 1984) y se encuentran comúnmente en las plantas en forma de sales dentro de las vacuolas (Smith, 1976). Los alcaloides son uno de los grupos más diversos de MS en las plantas, ya que se conocen más de 6500 estructuras (Bernays & Chapman, 1994). Se encuentran principalmente en las angiospermas y dentro de este grupo en las dicotiledóneas (Smith, 1976). Un gran número de alcaloides son particulares de una o pocas familias de plantas (Harborne, 1984).

La cafeína es un alcaloide que pertenece a un grupo de bases nitrogenadas que están relacionadas con las purinas conocidas como purinas metiladas. La cafeína se encuentra en altas concentraciones en plantas de té (*Thea sinensis* L.), café (*Coffea spp.*) y cocoa (*Theobroma spp.*), aunque también se encuentran en muy bajas concentraciones en otras plantas (Harborne, 1984).

Los alcaloides son considerados como los compuestos secundarios defensivos por excelencia (Bernays & Chapman, 1994). Sin embargo, las funciones de los alcaloides dentro de las plantas ha sido un tema de discusión por varios años (Harborne, 1984). Los alcaloides generalmente tienen un efecto contra diversos tipos de herbívoros y patógenos, aunque generalmente son más tóxicos para los vertebrados (Bernays & Chapman, 1994). En varios estudios se ha visto que la cafeína es repelente al consumo de insectos

(Glendinning & Slansky, 1994).

1.4. Los metabolitos secundarios en las interacciones ecológicas.

Los MS se han estudiado a través de tres líneas de investigación. La primera línea y la más antigua es aquella generada por los estudios fitoquímicos sobre alimentos y productos farmacéuticos (Timothy, 1990). La segunda línea proviene de la experiencia agrícola, la cual está basada en estudios relacionados con la cantidad de variación fenotípica y genotípica en los cultivos y su susceptibilidad a las plagas y enfermedades (Kennedy & Barbour, 1992). La tercera línea proviene de estudios que se han orientado a la búsqueda de una explicación de las interacciones entre las plantas y los herbívoros y patógenos en términos ecológicos y evolutivos (Kennedy & Barbour, 1992). Las últimas dos líneas han servido de base para crear el marco teórico de la defensa vegetal.

En los estudios agrícolas, las investigaciones han mostrado principalmente los resultados del aprovechamiento de la resistencia de las plantas cultivadas contra sus consumidores. Existen muchos estudios sobre los mecanismos genéticos y fisiológicos de los caracteres de resistencia (incluyendo algunos sobre compuestos secundarios). Algunos de estos trabajos han servido como base para el inicio de investigaciones sobre la ecología y evolución de los mecanismos de resistencia en comunidades naturales (Kennedy & Barbour, 1992).

Los MS pueden participar en interacciones mutualistas de las plantas con

otros organismos (Cushman *et al.*, 1984; Pierce & Elgar, 1987), en interacciones entre los herbívoros de las plantas y el tercer nivel trófico (Price, 1981; Barbosa, 1988; Berenbaum, 1988), en fenómenos alelopáticos (Harborne, 1993), en la resistencia de las plantas contra los consumidores (Fraenkel, 1951; Erlich & Raven, 1964; Feeny, 1976; Langenheim *et al.*, 1978; Rosenthal & Janzen, 1979; Dethier, 1980; Denno & McClure, 1983; Schultz, 1988; Berenbaum & Seigler, 1992; Bernays & Chapman, 1994) y contra los factores abióticos (Bernays & Chapman, 1994). Se ha planteado que los compuestos secundarios dentro de las plantas son resultado del balance adaptativo entre el crecimiento y la defensa de las plantas, impuestos tanto por el ambiente abiótico como por el biótico (Bryant *et al.*, 1983; Berenbaum & Seigler, 1992). El número y tipo de metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas están determinados por la disponibilidad de recursos, los elementos químicos adecuados para la elaboración de los MS, las restricciones filogenéticas en la capacidad de biosíntesis de los MS y los costos energéticos y toxicológicos para las plantas en la producción y almacenamiento de los MS (Herms & Mattson, 1992).

1.5. Hipótesis de la defensa vegetal.

Fraenkel (1951) sugirió que la razón de ser de los metabolitos secundarios de las plantas es la defensa contra patógenos y herbívoros. A partir de esto, se han realizado numerosos estudios que han evaluado los mecanismos de

resistencia en las plantas y las respuestas fisiológicas y conductuales de los herbívoros a los metabolitos secundarios de las plantas. Pero aún no es claro hasta qué punto esta función explica la evolución del metabolismo secundario en las plantas (Tuomi, 1992). Se ha intentado comprobar mediante la formulación de diferentes hipótesis en forma de modelos con el fin de explicar la presencia de los compuestos secundarios en las plantas en términos de defensa y otros factores tales como: balance carbono-nutrientes (Bryant *et al.*, 1983; Coley *et al.*, 1985), apariencia (Feeny, 1976; Rhoades & Cates, 1976), defensa óptima (McKey, 1977; Rhoades, 1979), crecimiento-diferenciación (Herms & Mattson, 1992), defensas neutras (Edwards, 1989) y diversidad química moderada (Jones & Fim, 1991). Estos modelos pretenden generalizar algunos patrones observados en las interacciones entre las plantas y sus herbívoros y patógenos. Con estas hipótesis se ha pretendido analizar básicamente de qué forma pueden contribuir algunos factores, como por ejemplo las funciones defensivas que presentan las plantas, los costos de la defensa y la disponibilidad de recursos en el ambiente, en las restricciones del metabolismo secundario, y por lo tanto en la respuesta defensiva de las plantas (Tuomi, 1992). Las hipótesis han englobado a la evolución de los MS fundamentalmente dentro de un contexto de optimización con base en los costos que la defensa implica. En teoría, las plantas crecen con un compromiso entre la defensa y la disponibilidad de recursos. La apariencia (Feeny, 1976; Rhoades & Cates, 1976), el valor adaptativo de los tejidos (McKey, 1977; Rhoades, 1979) y la presión de selección de los herbívoros y

patógenos (Edwards, 1989) determinan el tipo y concentración de los MS, dentro de las limitaciones que imponen los recursos e historia de vida de la planta (Bryant *et al.*, 1983; Coley *et al.*, 1985; Grubb, 1992; Herms & Mattson, 1992; Mole, 1994).

Jones & Firn (1991) plantean que solamente una parte de la diversidad de MS en las plantas tiene actividad efectiva contra los herbívoros y patógenos, a la que llaman "diversidad moderada", mientras que los MS restantes son inocuos. Proponen que aquellas plantas que pueden producir muchos compuestos estarán mejor defendidas por que tienen una mayor probabilidad de producir compuestos activos. Los compuestos inactivos pueden volverse activos o bien, las vías metabólicas que los originan mutar y producir nuevos compuestos activos. Además, los compuestos inactivos pueden conservarse ya que los costos de producción de MS diversos son bajos debido a que es muy común que en las plantas existan rutas biosintéticas compartidas por diversos MS (Mann, 1987 en Jones & Firn, 1991). Este sistema permite que de una sola ruta puedan producirse varios compuestos y que una mutación en un paso biosintético pueda añadir nuevos productos a una ruta existente, más que crear una nueva ruta metabólica. El punto débil de la propuesta de Jones & Firn (1991), es que basan la supuesta escasez de compuestos activos en estudios farmacéuticos y de pesticidas, en los cuales se busca compuestos de muy alta actividad biológica, además de que generalmente se prueban contra consumidores que no se encuentran interactuando con las plantas que se analizan (Espinosa-García, 1995).

Jones & Lawton (1991) formalizan cuatro hipótesis sobre posibles patrones entre los MS y las especies de insectos fitófagos. (1) Con la hipótesis de la defensa diversa predicen una correlación negativa entre la diversidad de especies de insectos y la diversidad de MS en las plantas. (2) La hipótesis de la barrera bioquímica predice una diversidad baja de especies de insectos en plantas con una química rara debido a que la adaptación de los insectos a MS no comunes toma mucho más tiempo. (3) La hipótesis de la química común predice una diversidad alta de insectos en plantas que no difieren mucho en su química, debido a que los MS en algunas plantas tienen mayor probabilidad de ser los mismos que en otras plantas, lo que facilita la colonización. Por último, (4) la hipótesis del escape de enemigos predice un mayor número de especies de insectos en plantas con una química rara ya que muchos enemigos naturales de los insectos utilizan claves químicas específicas, comunes en las plantas, para localizarlos. Jones & Lawton (1991) ofrecen ejemplos contrarios que apoyan las cuatro hipótesis y muestran las dificultades para probarlas así como para encontrar algún patrón. Ellos intentaron formalmente probar estas cuatro hipótesis utilizando los datos de especies de insectos en las umbelíferas inglesas y los datos sobre los MS en estas plantas. No encontraron una correlación entre una química rara en estas plantas y el número de especies de insectos asociados. Sí encontraron una correlación positiva débil entre la diversidad de clases de MS y el número de especies de insectos, apoyando la hipótesis de la química común. También encontraron una alta correlación positiva entre el número de nuevos MS

encontrados y el número de trabajos fitoquímicos realizados en el tiempo, lo cual les impide valorar la correlación. Además, aclaran que su fuente de datos tanto de insectos como de compuestos secundarios puede ser incompleta, y por otro lado también aclaran que no tomaron en cuenta la variabilidad de MS que existe dentro de cada clase de compuestos que utilizaron, la cual puede ser muy grande. Jones & Lawton (1991) no mencionan si el número de especies de insectos está relacionado con el daño en las plantas, sin embargo, sí mencionan que las características químicas que constituyen sus hipótesis están relacionadas con la resistencia vegetal.

1.6. Los herbívoros frente a los metabolitos secundarios.

Se ha sugerido que todos los herbívoros tienen algún tipo de adaptación (morfológica, metabólica y conductual) a la resistencia química de las plantas (Visser, 1994). Los mecanismos conductuales reducen la exposición a los MS a través de los cambios en la conducta alimenticia. Los mecanismos fisiológicos reducen la asimilación y el transporte de los compuestos a los sitios activos a través del secuestro de los MS e incrementando las tasas de excreción. El tercer mecanismo (bioquímico) es a través de la desintoxicación enzimática y la disminución en la sensibilidad de los sitios atacados por las toxinas (Lindroth, 1991). Existen varios estudios sobre el aprovechamiento de los MS por los consumidores en la defensa contra sus enemigos naturales (Bernays *et al.*, 1992). El aprovechamiento de los MS por los consumidores puede generar consecuencias negativas para las plantas,

ya que los consumidores pueden evitar a los enemigos naturales (Smiley *et al.*, 1985). Inclusive, en algunos casos, los MS pueden formar parte esencial de la dieta de los insectos (Sen *et al.*, 1994a).

1.7. Variabilidad de los metabolitos secundarios.

A diferencia de los metabolitos primarios, los cuales son más o menos constantes en las plantas, los metabolitos secundarios son extremadamente variables (Cates & Redak, 1988). La variación se presenta entre especies, poblaciones, individuos y partes de una planta, con la ontogenia y la fenología de las plantas y como respuesta a los factores bióticos y abióticos (Denno & McClure, 1983; Langenheim, 1994). El número de compuestos secundarios identificados actualmente excede los 100,000 (Buckinham, 1993, en Waterman & Mole, 1994). Las condiciones genéticas, bioquímicas y ecológicas son las que contribuyen principalmente a la diversidad de los MS (Langenheim, 1994).

La gran diversidad de compuestos secundarios en las plantas ha tenido diversas interpretaciones (Langenheim *et al.*, 1978; Bergström, 1991; Harborne, 1993; Langenheim, 1994). Una de ellas es que pueden estar funcionando en la resistencia de las plantas contra sus herbívoros y patógenos. Se ha visto que esta diversidad de MS puede reducir el consumo de las plantas por los herbívoros y patógenos (Adams & Bernays, 1978; Bernard *et al.*, 1990; Snyder, 1992; Boufalís & Pellisier, 1994). Los MS pueden interactuar y generar efectos de resistencia aditivos o sinérgicos contra los

consumidores (Berenbaum, 1985; Rodman & Chew, 1980; Espinosa-García & Langenheim, 1991; Jones & Firn, 1991; Berenbaum & Zangerl, 1993; Langenheim, 1994) y se ha propuesto que la diversidad de MS puede prolongar el tiempo de adaptación de los herbívoros a los compuestos en las mezclas (Pimentel & Bellotti, 1976; Berenbaum *et al.*, 1989; Berenbaum & Zangerl, 1993; Langenheim, 1994).

La variación espacial y temporal de las plantas hospederas y el efecto de esta variación sobre los herbívoros, han recibido considerable atención por parte de ecólogos, entomólogos y fitopatólogos (Denno & McClure, 1983). Actualmente hay un consenso más o menos general de que la heterogeneidad de las plantas hospederas, vista a varios niveles (variación entre especies, entre individuos y dentro de una planta), puede ser una clave para entender el éxito de las plantas contra la aparente desventaja de los consumidores hablando en tiempos generacionales (Pimentel & Bellotti, 1976; Whitham, 1983; Denno & McClure, 1983; Namkoong, 1991; Karban, 1992; Kennedy & Barbour, 1992). Sin embargo existen pocos estudios sobre el papel de la diversidad de los metabolitos secundarios en la resistencia de las plantas y varios muestran contradicciones. Una de las principales explicaciones a estas contradicciones estriba en las dificultades metodológicas, como de diseño que presenta el manejo de la diversidad química (Berenbaum, 1985; Cates & Redak, 1988).

En muy pocos casos se ha probado si un compuesto o una mezcla funciona contra uno o varios herbívoros o patógenos, o si es un compuesto

o una mezcla lo que determina la resistencia en las plantas contra un herbívoro o patógeno con cierto grado de especialización (Berenbaum & Zangerl, 1993; Espinosa-García, 1995). Jones & Firn (1991) plantean que solamente una parte de la diversidad de MS en las plantas tiene actividad efectiva contra los herbívoros y patógenos, mientras que los MS restantes son inocuos.

Al añadir la diversidad de MS a la defensa vegetal, se puede incluir una dimensión más. La diversidad de los MS seguramente está limitada por los recursos, ya que el tipo y concentración de los MS dependen de éstos (Langeinheim, 1994), sin embargo, existe una ventaja para las plantas ya que mediante efectos aditivos o sinérgicos, con concentraciones bajas de cada compuesto, se puede generar un efecto negativo sobre los herbívoros (Adams & Bernays, 1978). Además, los costos pueden disminuir al considerarse los efectos aditivos y sinérgicos de las mezclas en la defensa de las plantas, así como el tipo de arreglos que tienen las vías enzimáticas que producen MS dentro de las plantas (Jones & Firn, 1991). Sin embargo, interacciones antagonistas entre MS podrían aumentar los costos.

En muy pocos casos se ha probado si un compuesto o una mezcla funciona contra uno o varios herbívoros o patógenos, o si es un compuesto o una mezcla lo que determina la resistencia en las plantas contra un herbívoro o patógeno con cierto grado de especialización (Berenbaum & Zangerl, 1993; Espinosa-García, 1995). Jones & Firn (1991) plantean que solamente una parte de la diversidad de MS en las plantas tiene actividad contra los

consumidores y que el resto no tienen actividad. Proponen que aquellas plantas que pueden producir muchos compuestos estarán mejor defendidas porque tienen una mayor probabilidad de producir compuestos activos. Rodman & Chew (1980) plantean que la producción de compuestos distintos a los encontrados en los hospederos funciona como repelente o tóxica para un herbívoro y de esta forma las plantas evitan o disminuyen el consumo por los herbívoros.

1.8. Objetivo e hipótesis.

Este trabajo pretende explorar la función de la diversidad de metabolitos secundarios en la defensa de las plantas contra los herbívoros y patógenos. En éste trabajo se pretendió probar dos hipótesis: (1) una alta diversidad y/o concentración de MS proveen una mejor defensa que una diversidad y/o concentración baja y (2) un MS distinto a los encontrados en los hospederos de un herbívoro, otorga mayor defensa que los MS habituales. Las hipótesis se probaron analizando el efecto de la variación en el número, la concentración y el grado de cercanía química de los MS con los habitualmente encontrados en los hospederos de un herbívoro. El efecto de estas variables se estudió sobre las respuestas de consumo y oviposición de una especie consumidora de semillas: el gorgojo de los graneros, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae) dentro de dietas artificiales. Este sistema se presta para poner a prueba las hipótesis, ya que se conoce el efecto negativo de varios compuestos secundarios sobre este insecto. Además varios de los compuestos son fáciles de conseguir y los insectos son de fácil cultivo en el laboratorio.

II. SISTEMA DE ESTUDIO.

2.1. Biología de *Sitophilus granarius*.

Los adultos del género *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) poseen un rostro cilíndrico, con el margen del rostro recto, las antenas insertadas en la base del rostro, el funículo contiene seis segmentos y el pigidio está expuesto. Una de las características distintivas de *Sitophilus granarius* (L.) son los orificios separados en el pronoto, los cuales son generalmente planos y anchos (Fig. 2) (Whitehead, 1987). Los adultos de esta especie miden entre 3 y 6 mm de largo y viven aproximadamente de siete a ocho meses. Cada hembra oviposita de 50 a 400 huevos durante su vida. Los huevos son ovipositados dentro de los granos, mediante la perforación de un orificio que realiza la hembra, en donde es colocado un huevo y después depositada una sustancia cerosa que funciona como sellador. En climas calientes la larva completa su desarrollo en un mes y el desarrollo se prolonga con el descenso de la temperatura. Su distribución es cosmopolita, aunque se les encuentra con mayor abundancia en climas templados. Los adultos y larvas de esta especie consumen generalmente granos de trigo, arroz, maíz, cebada, sorgo y avena (Sifuentes, 1977). Por lo cual se le puede considerar como un herbívoro oligófago ya que utiliza hospederos dentro de una misma familia de plantas (Bernays & Chapman, 1994).

Sitophilus granarius, también conocido como gorgojo de los graneros, es considerado como una de las principales plagas de granos almacenadas en

México debido al gran daño que les ocasiona y a que facilita la entrada a las plagas secundarias (Sifuentes, 1977). *Sitophilus granarius*, a diferencia de los demás miembros de su género, ha perdido la capacidad de vuelo por lo que ha dependido del hombre para su dispersión (Cotton, 1963).

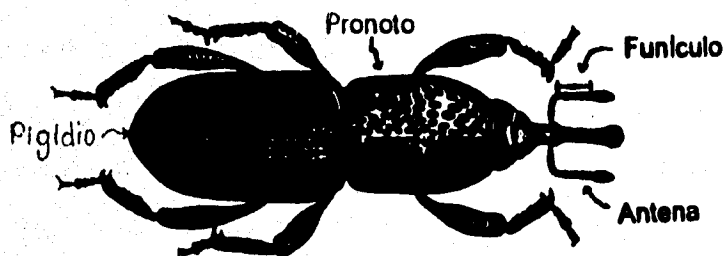


Figura 2. Morfología externa de *Sitophilus granarius*.

2.2. Metabolitos secundarios de los hospederos de *Sitophilus granarius* y sus efectos.

Los compuestos fenólicos en los hospederos que consume *Sitophilus granarius* son similares. Los principales compuestos fenólicos que se encuentran en los granos de maíz, trigo, cebada, arroz y avena son los ácidos trans-ferúlico, para-cumárico, sinápico, vainílico y caféico (Herrmann, 1989). Estos compuestos se encuentran en mayores concentraciones en el pericarpo y en la capa aleurónica de los granos, después en el embrión y por último en el endospermo (Herrmann, 1989; Sen *et al.*, 1991, 1994b). Estos ácidos fenólicos se encuentran principalmente ligados a carbohidratos, y de forma libre solamente en bajas concentraciones (Herrman, 1989).

Serratos *et al.* (1987) encontraron una correlación positiva entre la concentración total de compuestos fenólicos en los granos de diferentes variedades de maíz y la resistencia contra el consumo de adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Vieron que en el grano de maíz un 80% de los compuestos fenólicos corresponden al ácido ferúlico, casi 20% al ácido p-cumárico y el resto son ácidos siríngico, caféico, protocaté quico y vainílico. También encontraron que el ácido ferúlico contribuye enormemente a la dureza de los granos debido a la formación de complejos con los carbohidratos de las paredes celulares. Arnason *et al.* (1992) encontraron que el consumo por adultos del barrenador de los granos *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae) también se ve disminuido por la concentración total de

compuestos fenólicos. Así mismo, encontraron que la distribución de los ácidos fenólicos dentro de los granos de maíz es distinta en cada región siendo mayor en el pericarpio y la capa aleurónica, intermedia en el embrión y baja en el endospermo, con concentraciones de 5.8, 0.31 y 0.07 mg/g, respectivamente. Vieron también que las proporciones de los ácidos fenólicos en las tres regiones se mantienen en distintas variedades de maíz.

Sen *et al.* (1994a) encontraron que el ácido trans-ferúlico y el ácido trans-para-cumárico afectan la sobrevivencia, el peso y el tiempo de desarrollo de las larvas de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) y *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae) y que al mezclar ambos ácidos fenólicos en proporciones de 2 mg/g de ácido trans-ferúlico por 1 mg/g ácido trans-para-cumárico el efecto negativo sobre las larvas de ambas especies aumenta considerablemente. Así mismo, encontraron que del 10 al 15% del total de los compuestos fenólicos está formado por amidas ácidas fenólicas (las cuales se encuentran libremente en los granos de maíz) y que éstas tienen fuertes efectos negativos sobre el desempeño de larvas.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Colecta y cultivo de *Sitophilus granarius*.

Los insectos utilizados en el experimento fueron producto de un cultivo que se inició con la colecta de individuos de dos bodegas de granos ubicadas en Xochimilco, D.F. Se colectaron aproximadamente 2000 individuos de los dos sitios, los cuales se mantuvieron en maíz cacahuacintle dentro de frascos de vidrio de un litro por cinco generaciones a 24-27 °C, 60-70 % de humedad relativa y completa obscuridad antes de iniciar el experimento.

3.2. Elaboración de las simulaciones de semillas.

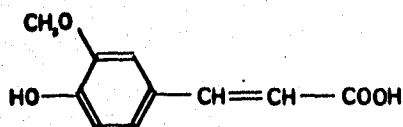
Las respuestas de oviposición y de consumo de los individuos adultos de *Sitophilus granarius* a seis metabolitos secundarios individuales o en mezclas se estudiaron utilizando simulaciones de semillas que se denominarán "tabletas", fabricadas con una dieta homogénea a la que fueron incorporados los diferentes compuestos. Ambas respuestas se estudiaron en un mismo ensayo.

La dieta se elaboró con almidón comercial de maíz marca Maizena, extracto de levadura marca Beckton Dickinson de México S.A. de C.V. y ácido sórbico como antifúngico. Las proporciones de almidón y extracto de levadura fueron de 20:1 (Urrelo y Wright, 1989) y el ácido sórbico se añadió en 5 mg/g de almidón (Serratos *et al.*, 1987).

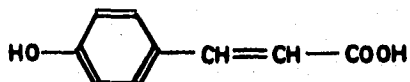
Los compuestos fenólicos utilizados fueron:

ácido trans-ferúlico (F; trans-4-hidroxi-3-metoxi-cinámico, pureza: 99%, Fig. 3a), ácido para-cumárico (C; 4-hidroxicinámico, pureza: 98%, Fig. 3b), ácido sinápico (S; 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico, pureza: 98%, Fig. 3c), ácido vainílico (V; 4-hidroxi-3-metoxibenzóico, pureza: 97%, Fig. 3d) y umbeliferona (UM; 7-hidroxicumarina, pureza: 99% Fig. 3e), el compuesto alcaloide utilizado fue: cafeína (CA): (1,3,7-trimetilxantina, pureza: 99%, Fig. 3f).

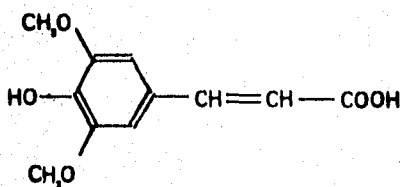
Los seis compuestos fueron adquiridos de Aldrich Chemical Company, Inc. Los compuestos F, C, S y V son naturales de los hospederos de *Sitophilus granarius* (los cuales se definirán como "compuestos del maíz"), en tanto que los restantes no lo son (estos últimos se definirán como "compuestos raros").



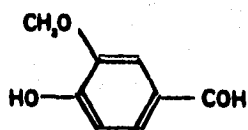
a) Acido trans-ferúlico (F)



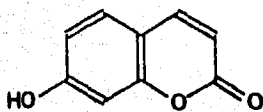
b) Acido para-cumárico (C)



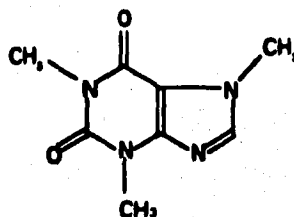
c) Acido sinápico (S)



d) Acido vainílico (V)



f) Cafeína (CA)



e) Umbeliferona (UM)

Figura 3. Estructura molecular de los compuestos utilizados en el experimento.

Los compuestos utilizados en las pruebas se ofrecieron individualmente y en mezclas. Las mezclas fueron las siguientes:

1. Mezclas con dos compuestos: (i) F+C, (ii) F+S y (iii) F+V.
2. Mezclas con cuatro compuestos: (i) F+C+S+V, (ii) F+C+S+UM y (iii) F+C+S+CA.
3. Mezcla con seis compuestos: F+C+S+V+UM+CA.

Se utilizaron seis concentraciones en las dietas: 0.0 (tratamiento sin MS), 0.05, 0.5, 1.0, 2.5 y 5 mg de MS por g de almidón. La concentración total de metabolitos secundarios en cada dieta fue la misma tanto para las mezclas como para los compuestos individuales. En las mezclas se colocaban los MS en cantidades iguales hasta obtener la concentración deseada.

Los compuestos y las mezclas fueron incorporados a la dieta disueltos en etanol absoluto, excepto la cafeína, para la cual se utilizó agua destilada debido a su alta polaridad. A la dieta sin compuestos también se le añadió el etanol. Posteriormente, las dietas fueron colocadas en cajas de Petri dentro de un refrigerador a 4° C hasta evaporarse el etanol (aproximadamente 12 h). Al secarse el almidón se añadió agua destilada (la cafeína se incorporó en este paso). Los tratamientos fueron colocados nuevamente en cajas de Petri dentro del refrigerador (durante 36 h) en donde el agua se evaporó hasta obtener un porcentaje de humedad entre 12 y 14 por ciento, logrando así la solidificación del almidón. Posteriormente, las dietas se partieron en pedazos de 0.8 X 0.5 X 0.5 cm aproximadamente y estos trozos constituyeron las simulaciones de semillas o tabletas.

3.3. Montaje de las unidades experimentales.

El experimento se llevó a cabo dentro de 3 unidades experimentales, que se denominarán "arenas". Estas fueron cajas construidas con láminas de estireno de 33 x 27 x 6 cm, dentro de las cuales se colocaron compartimentos de aluminio de 3 x 1.5 x 1.5 cm. En cada compartimento se colocaron 9-15 tabletas de cada dieta artificial hasta llegar a un peso aproximado de 0.824 ± 0.5 g. Cada dieta (66 en total) se replicó tres veces en cada arena. De cada dieta se tomaron tres muestras para medir el porcentaje de humedad que contenían. El total de compartimentos por arena fue de $198 = [13 \text{ (mezclas + compuestos)} \times 5 \text{ (dosis)} + 1 \text{ (tratamiento sin compuestos)}] \times 3 \text{ (tres repeticiones)}$. La distribución de los compartimentos dentro de cada unidad experimental se hizo aleatoriamente, de manera que cada uno tuviera una exposición igual a los insectos.

3.4. Experimento y toma de datos.

El experimento se llevó a cabo dentro de un cuarto cerrado con 25 °C. La temperatura se controló con un termostato integrado a un calentador comercial. Cada arena fue colocada en un recipiente de plástico sellado. Dentro de cada uno de los recipientes se colocó una mezcla de sales de cloruro y nitrato de sodio para obtener 70 % de humedad relativa y se adaptó una bomba para hacer circular el aire (ver Winston & Bates, 1960). Antes de colocar a los animales en las cajas, se homogeneizó la humedad en los tratamientos en las tres arenas haciendo circular aire durante tres días.

Se colocaron 150 animales en cada una de las tres arenas. Los insectos permanecieron dentro de las arenas a 25 ± 2 °C, 70% de humedad relativa y completa obscuridad durante cinco días. Posteriormente, las arenas fueron colocadas dentro de un refrigerador a 8 °C para detener la actividad de los insectos.

Se procedió a contar el número de huevos y medir el porcentaje de dieta consumida en cada compartimiento. Para el registro del número de huevos se siguió la técnica de Urrelo y Wright (1989). El porcentaje consumido se calculó utilizando el peso seco inicial y el peso seco final: % consumido= $(100(\text{peso seco inicial} - \text{peso seco final}) / \text{peso seco inicial})$. El peso seco inicial se obtuvo con el peso húmedo inicial de la dieta en cada compartimiento y el porcentaje de humedad del tratamiento. El peso seco final de la dieta por compartimiento se obtuvo a través del filtrado del almidón disuelto que se obtuvo después del conteo de huevos. El filtrado se hizo a través de dos filtros Whatman No. 5 de 9 cm de diámetro previamente secados y pesados, colocados en un embudo Buchner. La muestra se filtró en dos ocasiones, utilizando dos filtros nuevos en el segundo filtrado. Los filtros se secaron en un horno a 50 °C junto con el almidón. Los filtros se pesaron inmediatamente después del secado.

3.5. Análisis de los datos.

Se analizaron las respuestas de *Sitophilus granarius* en función de la concentración y el tipo de compuestos secundarios en las dietas mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías con control único. Se realizaron

comparaciones múltiples con la prueba de Ryan-Eynot-Gabriel-Welsch de rango múltiple para diseños desbalanceados (Sokal & Rolph, 1981) para el análisis de los efectos principales. Posteriormente, para poner a prueba las hipótesis, se realizaron contrastes ortogonales. Estos análisis se realizaron con el programa estadístico CSS (Statistica, 1991). Tanto el ANDEVA como los contrastes ortogonales se realizaron bajo un modelo lineal con suma de cuadrados tipo III para datos desbalanceados (Méndez, 1991).

Para el ANDEVA, los datos se agruparon en cuatro concentraciones (tratamiento sin MS: 0.0 mg/g, baja: 0.05 y 0.5 mg/g, media: 1.0 y 2.5 mg/g y alta: 5 mg/g). La agrupación de las concentraciones se hizo debido a que en un ANDEVA realizado sin la agrupación, la distribución de los residuales no presentó distribución normal y no hubo homogeneidad en las varianzas. En el análisis se trabajó con el promedio obtenido de las tres réplicas por tratamiento de cada arena. Se trabajó con los promedios para que cada réplica fuera independiente (Zar, 1984), ya que posiblemente la respuesta de los insectos fue influenciada por el arreglo de los tratamientos dentro de cada unidad experimental. Se generaron así tres réplicas ($n=3$, un promedio de cada unidad experimental) para cada tratamiento (cuarenta tratamientos en total). El ANDEVA se realizó entonces con un diseño de 4×14 con algunas celdas vacías. El factor concentración con cuatro niveles: cero, baja, media y alta y el factor tipo de compuesto o mezcla definida como "tipo de mezcla" con catorce niveles: cero, seis compuestos individuales, tres mezclas de dos, tres de cuatro y una de seis compuestos.

IV. RESULTADOS.

4.1. Metabolitos secundarios y oviposición.

No se encontró correlación entre la oviposición y el consumo ($r= 0.053$; $p=0.559$), por lo que los datos fueron analizados por separado para cada caso. Los datos para la oviposición y para el porcentaje consumido mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, Cochran y Bartlett (Zar, 1984). Los residuales de las dos variables mostraron normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y con la prueba gráfica de los residuales observados contra los esperados (Zar, 1984).

El número de huevos puestos por *Sitophilus granarius* fue afectado significativamente por la concentración de compuestos secundarios, por el tipo de mezcla, aunque no por la interacción entre los dos factores (Tabla 1). La R^2 del modelo fue de 0.5832.

Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de la concentración sobre la respuesta de oviposición de *Sitophilus granarius* se muestran en la tabla 2. Se encontró las tabletas con concentraciones cero, baja y media fueron significativamente menos ovipositadas que aquellas con concentraciones altas y que las tabletas con concentraciones cero, baja y media no difirieron significativamente en el número de huevos ovipositados (Fig. 4). Los resultados de la comparación múltiple para el efecto tipo de mezcla sobre la respuesta de oviposición de *S. granarius* se muestran en la tabla 3.

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza de dos vías con control único para evaluar el efecto de la concentración y el tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el número de huevos ovipositados por *Sitophilus granarius* en tabletas que simulaban semillas.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	p
Concentración	2	10.3116	19.4490	< 0.001
Tipo de Mezcla	12	1.3323	2.5128	< 0.01
Interacción	24	0.8559	1.6144	0.058
Error	80	0.5302		

Tabla 2. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto de la concentración de metabolitos secundarios sobre el número de huevos ovipositados por *Sitophilus granarius* en tabletas que simulaban semillas. Los promedios agrupados con la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con letras distintas sí (g.l.= 80; alfa= 0.05).

Agrupación.	Promedio del número de huevos.	N	Concentración.
A	2.778	3	CERO (0.0 mg/g)
A	2.271	39	BAJA (0.05-0.5 mg/g)
A	2.136	39	MEDIA (1.0-2.5 mg/g)
B	1.320	39	ALTA (5.0 mg/g)

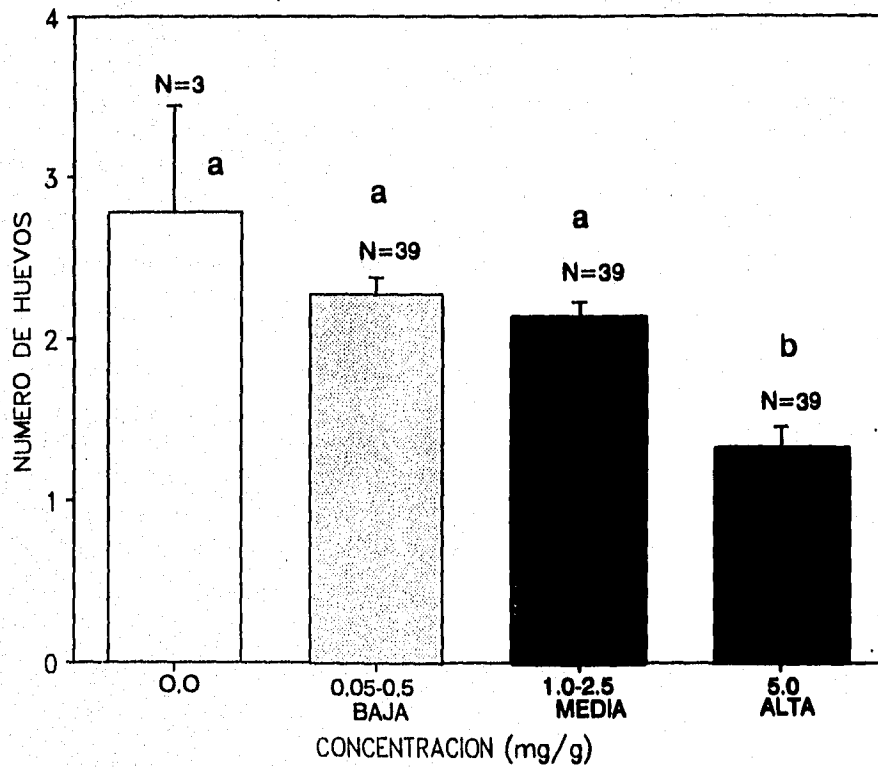


Figura 4. Efecto de la concentración de metabolitos secundarios sobre el número de huevos puestos por *Sitophilus granarius*. Cada barra es el promedio de N réplicas + 1 error estándar. Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el número de huevos ovipositados por *Sitophilus granarius* en tabletas que simulaban semillas. Los promedios agrupados con la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con letras distintas sí (g.l.= 80; alfa= 0.05). Compuestos: F=ácido ferúlico, S=ácido sinápico, C=ácido cumárico, V=ácido vainílico, UM= umbeliferona, CA=cafeína, mezcla de los seis compuestos=SEX, 0= sin compuestos).

Agrupación.	Promedio del número de huevos.	N	Tipo de mezcla.
A	2.778	3	0
B A	2.611	9	UM
B A C	2.393	9	CA
B A C	2.152	9	F+C
B A C	2.093	9	F+C+S+UM
B A C	2.074	9	S
B A C	2.056	9	F+S
B A C	1.952	9	C
B A C	1.785	9	V
B A C	1.778	9	F+V
B A C	1.704	9	SEX
B A C	1.556	9	F
B C	1.481	9	F+C+S+V
C	1.185	9	F+C+S+CA

Al hacer los contrastes ortogonales (pruebas de hipótesis) se encontró que las tabletas con seis compuestos con concentración alta fueron significativamente menos ovipositadas que el grupo formado por las tabletas con uno, dos y cuatro compuestos con la misma concentración ($F= 5.973$; g.l.= 1,80; $p < 0.05$). Las tabletas con uno, dos

y cuatro compuestos con concentraciones altas no difirieron significativamente entre si en el número de huevos ovipositados ($F= 0.4562$; g.l.= 2,80; $p> 0.05$). Asimismo, las tabletas con seis MS fueron significativamente menos ovipositadas que las tabletas sin compuestos ($F= 16.90$, g.l.= 1,80; $p< 0.001$). Al comparar el número de huevos puestos sobre las tabletas con seis MS con concentraciones altas y medias contra el número de huevos ovipositados sobre el grupo de tabletas con uno, dos y cuatro compuestos con las mismas concentraciones no se encontró diferencias significativas ($F= 0.9872$, g.l.= 1,80; $p> 0.05$). El grupo de tabletas con seis MS con concentraciones alta y media fue significativamente menos ovipositado que las tabletas sin MS ($F= 6.7062$; g.l.= 1,80; $p< 0.05$), en cambio, al considerar las tres concentraciones de MS, el número de huevos puestos sobre las tabletas con los seis compuestos no difirió significativamente del número de huevos ovipositados sobre las tabletas sin compuestos (Tabla 3). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el número de huevos puestos sobre las tabletas con uno y dos MS y el número de huevos puestos sobre las tabletas sin compuestos (Tabla 3). El número de huevos ovipositados sobre las tabletas con cuatro MS considerando las tres concentraciones de MS sí difirió significativamente del número de huevos puestos sobre las tabletas sin compuestos ($F= 7.2280$; g.l.= 1,80; $p< 0.01$). En la Fig. 5 se muestra el efecto de la concentración y el número de MS sobre el número de huevos puestos por *S. granarius*.

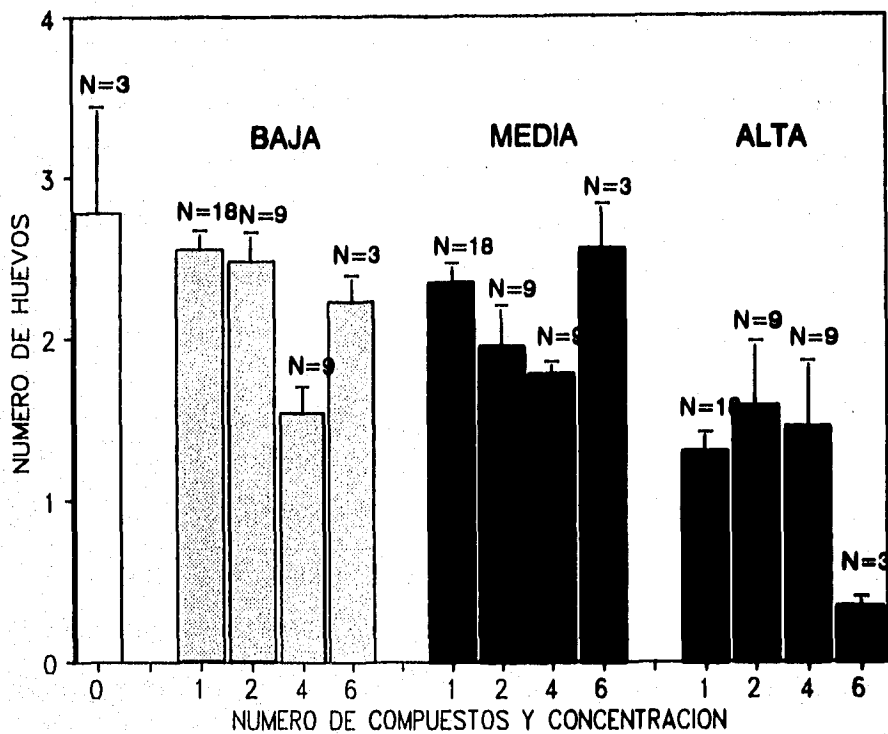


Figura 5. Efecto de la concentración y el número de metabolitos secundarios sobre el número de huevos puestos por *Sitophilus granarius*. Cada barra es el promedio de N réplicas + 1 error estándar. Concentración: baja: 0.05-0.5 mg/g, media: 1.0-2.5 mg/g, alta 5.0 mg/g.

Se comparó el número de huevos puestos en las tabletas con concentraciones altas de umbeliferona y cafeína de manera individual, con el conjunto de dietas con un solo compuesto del maíz y las tabletas sin MS. El conjunto de tabletas con un MS del maíz fue significativamente menos ovipositado que las tabletas con la umbeliferona ($F= 6.7621$; g.l.= 1,80; $p < 0.05$) e igualmente ovipositado que las tabletas con cafeína ($F= 0.0559$, g.l.= 1,80; $p > 0.05$). El conjunto de tabletas con un MS del maíz y la cafeína de manera individual fueron significativamente menos ovipositados que las tabletas sin MS ($F= 12.5742$; g.l.= 1,80, $p < 0.05$) y ($F= 8.9416$, g.l.= 1,80; $p < 0.05$) respectivamente. En cambio, las tabletas con la umbeliferona de manera individual fueron igualmente ovipositadas que las tabletas sin MS ($F= 0.5588$; g.l.= 1,80; $p > 0.05$). En la Fig. 6 se muestra el efecto de la concentración de la umbeliferona, la cafeína y el conjunto de los MS del maíz de manera individual sobre la oviposición de *Sitophilus granarius*. Se comparó el número de huevos puestos entre los cuatro tratamientos con un solo compuesto de maíz en las concentraciones altas de MS y no se encontraron diferencias significativas ($F= 0.5123$, g.l.= 3,80; $p > 0.05$).

Se comparó también el número de huevos puestos sobre las tabletas con concentraciones altas de MS que incluían cuatro compuestos. Las tabletas con los cuatro MS del maíz fueron igualmente ovipositadas que las cuartetas con la umbeliferona ($F= 2.8292$; g.l.= 1,80; $p < 0.05$) y que las cuartetas con la cafeína ($F= 1.2574$; g.l.= 1,80; $p > 0.05$). Las cuartetas con los compuestos del maíz fueron significativamente menos ovipositadas que las tabletas sin MS ($F= 5.9028$; g.l.= 1,80; $p < 0.05$) y ($F= 12.6092$; g.l.= 1,80; $p < 0.001$) respectivamente. En cambio, la oviposición sobre la cuarteta con umbeliferona ni difirió significativamente de la

oviposición sobre las tabletas sin MS ($F= 0.5588$, $g.l.= 1,80$; $p>0.05$). En la Fig. 7 se muestra el número de huevos puestos por *Sitophilus granarius* en función de las tres cuartetas en las tres concentraciones utilizadas.

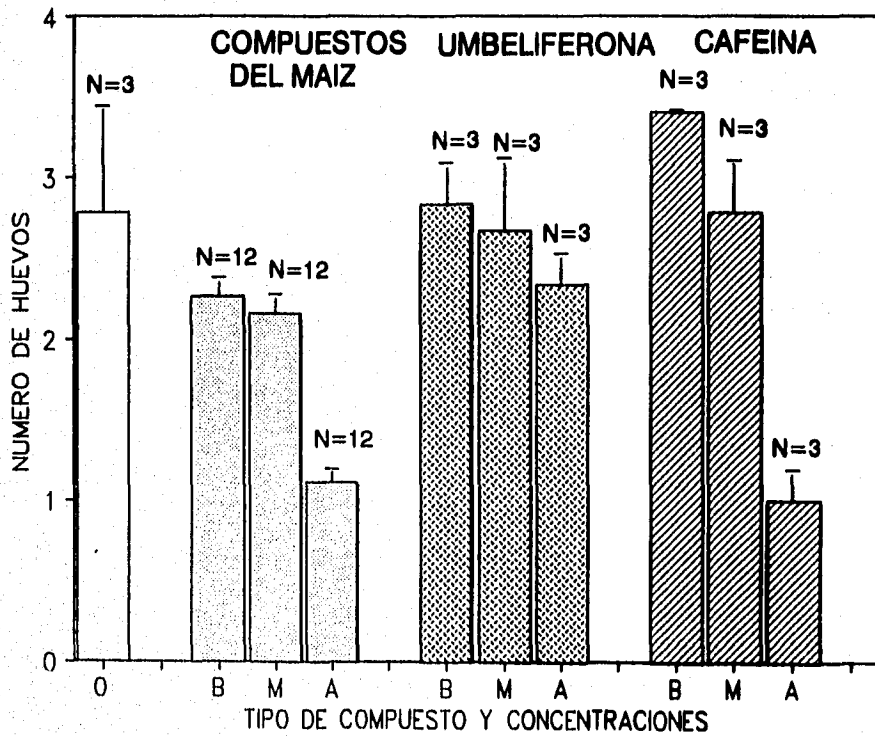


Figura 6. Efecto de la concentración y el tipo de metabolitos secundarios sobre el número de huevos puestos por *Sitophilus granarius*. Cada barra es el promedio de N réplicas + 1 error estándar. Concentración: B: baja, 0.05-0.5 mg/g; M: media, 1.0-2.5 mg/g; A: alta, 5.0 mg/g) Los compuestos del maíz utilizados fueron los ácidos ferúlico, cumárico, sinápico y vainílico.

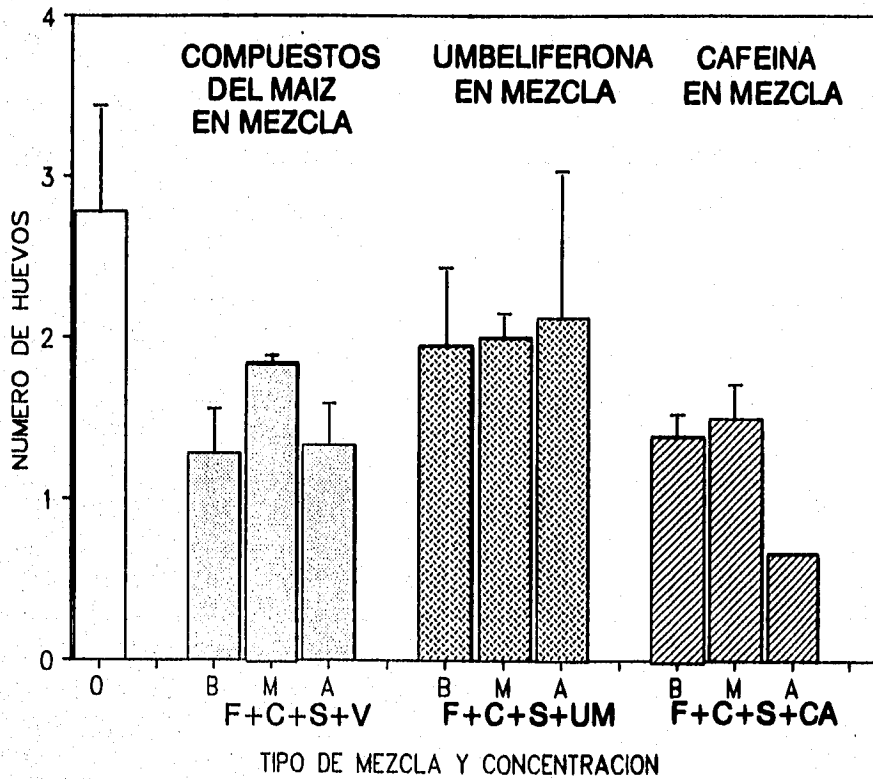


Figura 7. Efecto de la concentración y el tipo mezclas de cuatro metabolitos secundarios sobre el número de huevos puestos por *Sitophilus granarius*. Cada barra es el promedio de N=3 réplicas + 1 error estándar. Concentración: B: baja, 0.05-0.5 mg/g; M: media, 1.0-2.5 mg/g; A: alta, 5.0 mg/g. Compuestos: F: ácido ferúlico, C: ácido cumárico, S: ácido sinápico, V: ácido vainílico, UM: umbeliferona, CA: cafeína.

4.2. Metabolitos secundarios y consumo.

El consumo de las tabletas, fue afectado significativamente por el tipo de mezcla, pero no por la concentración de compuestos ni por la interacción entre los dos factores (Tabla 4). La R^2 del modelo fue de 0.5035. Los resultados de la comparación múltiple para el efecto tipo de mezcla sobre la respuesta de oviposición de *S. granarius* se muestran en la tabla 5.

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza de dos vías con control único para evaluar el efecto la concentración y el tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el consumo de tabletas que simulaban semillas por *Sitophilus granarius*.

EFFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Concentración	2	0.4965	1.3659	0.2610
Tipo de Mezcla	12	1.0317	2.8384	< 0.01
Interacción	24	0.5345	1.47	0.1035
Error	80	0.3635		

Tabla 5. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el consumo por *Sitophilus granarius* en tabletas que simulaban semillas. Los promedios agrupados con la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con letras distintas sí (g.l.= 80; alfa= 0.05). Compuestos: F=ácido ferúlico, S=ácido sinápico, C=ácido cumárico, V=ácido vainílico, UM= umbeliferona, CA=cafeína, mezcla de los seis compuestos=SEX, 0=sin compuestos).

Agrupación.	Promedio del porcentaje consumido.	N	Tipo de mezcla.
A	6.431	9	V
B A	6.199	9	F+S
B A	5.955	9	F+C
B A	5.991	9	F+V
B A	5.990	9	CA
B A	5.896	9	UM
B A	5.793	9	S
B A C	5.712	9	F+C+S+UM
B A C	5.695	9	F
B A C	5.669	9	F+C+S+CA
B A C	5.589	9	C
B C	5.296	9	F+C+S+V
C	5.197	9	SEX
C	4.743	3	O

Al analizar el efecto de la diversidad de MS en las dietas artificiales sobre el consumo de *Sitophilus granarius*, se encontró que las tabletas con seis MS fueron significativamente menos consumidas que el grupo formado por aquellas con uno, dos y cuatro MS ($F= 9.8957$; g.l.= 1,80; $p< 0.01$). Las tabletas con seis MS fueron igualmente consumidas que las tabletas con cuatro MS, mientras que las tabletas con seis MS fueron significativamente menos consumidas que las tabletas con dos y un MS, (Tabla 5) y ($F= 10.4711$, g.l.= 1,80; $p< 0.01$) respectivamente. Se encontró que las tabletas con cuatro y seis compuestos no difirieron significativamente en el consumo al compararlas con las tabletas sin MS (Tabla 5), mientras que aquellas con

uno y dos compuestos fueron significativamente más consumidas que las tabletas sin compuestos, ($F= 10.4485$; g.l.= 1,80 ; $p < 0.01$) y tabla 5 respectivamente. En la Fig. 8 se muestra el consumo por *S. granarius* sobre las tabletas con cero, uno, dos, cuatro y seis compuestos.

Al analizar la tabla 5 también se encontró que el consumo sobre el grupo de tabletas con los MS del maíz individuales no difirió significativamente del consumo sobre las tabletas con la umbeliferona y con la cafeína individualmente. El consumo sobre las tabletas sin MS fue significativamente menor que el consumo sobre el grupo de tabletas con los MS del maíz ($F= 9.7959$; g.l.= 1,80; $p < 0.05$) individualmente y que sobre las tabletas con la umbeliferona y con la cafeína de manera individual (Tabla 5).

Se compararon los consumos sobre las tabletas con las tres cuartetas de MS y no se encontraron diferencias significativas entre éstos (Tabla 5). Sin embargo, aunque las diferencias no fueron significativas, las tabletas con la mezcla de los cuatro compuestos del maíz fueron menos consumidas que las tabletas con las otras dos cuartetas (Tabla 5).

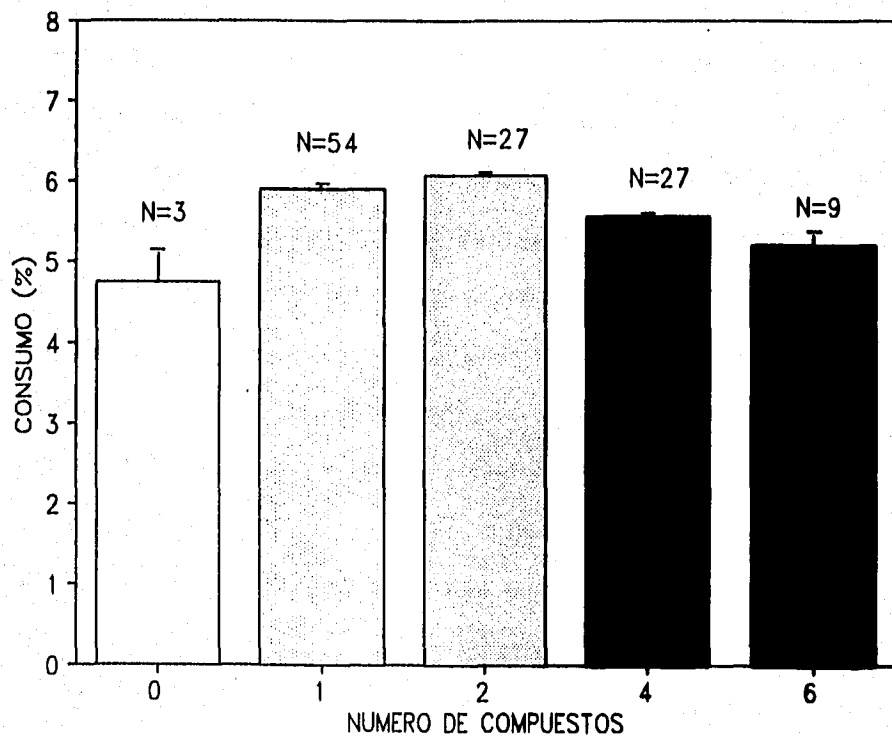


Figura 8. Efecto del número de metabolitos secundarios sobre el consumo por *Sitophilus granarius*. Cada barra es el promedio de porcentajes consumidos de N réplicas + 1 error estándar.

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

5.1 Hipótesis de la diversidad y concentración de metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos que apoyan la hipótesis de la diversidad y concentración de MS como mejor defensa fueron (1) la oviposición por *Sitophilus granarius* fue significativamente menor sobre las tabletas con la mezcla de seis MS en la concentración alta que sobre las tabletas con uno, dos y cuatro MS en la misma concentración, mientras que no se encontraron diferencias al disminuir la concentración de los MS; (2) al aumentar la concentración de MS en las tabletas con la mezcla de seis compuestos sí disminuyó significativamente el número de huevos puestos por *S. granarius* con respecto a las tabletas sin compuestos; (3) las tabletas con las mezclas de cuatro y seis MS no generaron un efecto estimulante sobre la respuesta alimenticia del insecto, mientras que las mezclas con uno y dos compuestos sí la generaron.

Los resultados obtenidos con la respuesta de oviposición que apoyan la hipótesis de la química diversa muestran que tuvo que haber un efecto de la concentración para que la diversidad funcionara en la resistencia de las tabletas. Al considerar las tres concentraciones, las tabletas con cuatro MS fueron significativamente menos ovipositadas que las tabletas sin MS. El efecto negativo de las mezclas de cuatro compuestos sobre la oviposición de los insectos aparentemente se generó debido a que los compuestos presentes en las cuartetos siempre están en mayor concentración que en la sexteta. Si este fuera el caso, la mezcla de seis MS en las tabletas actuó negativamente sobre la oviposición de *Sitophilus granarius* por

arriba de un umbral de percepción en los insectos. Una explicación alternativa, aunque no excluyente en términos de la concentración, es que en este trabajo solamente se probaron algunas combinaciones de compuestos en las mezclas, y la sexteta incluye todas las combinaciones posibles. Es factible que alguna combinación particular de compuestos dentro de la sexteta fue la que generó la respuesta negativa sobre la oviposición de *S. granarius*.

Ninguno de los tratamientos inhibió el consumo de *Sitophilus granarius* al compararlos con el consumo sobre el tratamiento sin MS. Este resultado no va de acuerdo con el que se esperaba. El consumo en *Sitophilus granarius* fue estimulado por la presencia de los compuestos de forma individual y por las mezclas de dos MS. Adams & Bernays (1978) encontraron que algunos compuestos fenólicos (incluidos los ácidos ferúlico, para-cumárico y vainílico) no fueron repelentes sobre el consumo de *Locusta migratoria* cuando fueron utilizados individualmente en concentraciones similares a las utilizadas en este trabajo. Incluso algunos de los compuestos fenólicos que utilizaron (incluidos los ácidos fenólicos mencionados anteriormente de manera individual) resultaron ligeramente estimulantes sobre la preferencia alimenticia de los insectos cuando se compararon los consumos en estos contra el consumo sobre el control. En cambio, en forma de mezcla, los compuestos sí disminuyeron significativamente el consumo de *L. migratoria*. Los resultados obtenidos con la respuesta de consumo de *S. granarius* sobre las mezclas con cuatro y seis MS, cuando se compararon con los consumos sobre las mezclas con uno y dos compuestos, apoyan los resultados obtenidos por Adams & Bernays.

La ausencia de un efecto negativo esperado al incrementar la concentración de

los MS sobre la respuesta de consumo de *Sitophilus granarius* no apoya completamente la hipótesis de la diversidad y concentración de MS. Este resultado puede deberse a diferentes causas. Serratos *et al.* (1987) reportan que el consumo en individuos adultos de *Sitophilus zeamais* fue inhibido significativamente por una concentración de 0.3 mg/g con respecto al control y Adams & Bernays (1978) mencionan en el estudio referido anteriormente, que en concentraciones mayores a las que utilizaron, los compuestos fenólicos de manera individual sí llegan a generar efectos inhibitorios sobre la respuesta de consumo de *Locusta migratoria*. Es posible que *S. granarius* simplemente tolere más a los compuestos fenólicos utilizados. Sen *et al.* (1994a) mencionan que algunos compuestos fenólicos pueden ser benéficos para algunos insectos. Debido a que en este trabajo no se midió el desempeño en los insectos, la posibilidad de que los compuestos fenólicos de forma individual puedan ser benéficos para *Sitophilus granarius*, no se puede descartar.

El efecto negativo de la concentración de MS sobre la oviposición de *Sitophilus granarius* va de acuerdo con lo que se esperaba y con los resultados obtenidos en diversos trabajos realizados con otras especies de insectos. Por ejemplo, Classen *et al.* (1990) encontraron una correlación negativa entre la concentración del ácido trans-ferúlico en semillas de diferentes variedades de maíz y el número de huevos puestos por *Sitophilus zeamays*. También encontraron que la concentración de los compuestos tiene una correlación negativa con la sobrevivencia de las larvas. Por otro lado, Sen *et al.* (1994a) encontraron que la concentración del ácido para-cumárico, del ácido trans-ferúlico y la concentración de mezclas con los dos compuestos afectan negativamente la sobrevivencia y el peso de larvas de *S. zeamays* y *Prostephanus*

truncatus. En general, el efecto negativo de la concentración de MS en la respuesta de oviposición de los insectos fitófagos, se ha asociado a los costos de desintoxicación de los compuestos por las larvas (Lindroth, 1991).

5.2. Hipótesis de la química extraña.

No se encontró ningún resultado que apoyara esta hipótesis. Los resultados obtenidos con la oviposición sobre las tabletas que contenían umbeliferona tanto individualmente como en la cuarteta incluso fueron opuestos a los esperados. El número de huevos puestos en los dos casos no difirió del número de huevos sobre el tratamiento sin compuestos. Además, las tabletas de con los MS del maíz de manera individual en la concentración alta fueron significativamente menos ovipositadas que aquellas con la umbeliferona de manera individual en la misma concentración. Al parecer la umbeliferona está actuando como antagonista dentro de las mezclas y aparentemente *Sitophilus granarius* no la percibe cuando se encuentra individualmente en las tabletas. Los resultados con la umbeliferona muestran que este compuesto no generó ninguna respuesta sobre la oviposición de los adultos, sin embargo pudiera haber un efecto sobre las larvas. Se ha visto que en especies de plantas introducidas similares a las nativas, un cambio pequeño en los compuestos en las plantas, pueden no generar un efecto repelente sobre la conducta de oviposición de los insectos nativos, aunque sí generar un efecto negativo sobre el desempeño de las larvas (Rodman & Chew, 1980). Es posible que el efecto negativo de la cafeína y la falta de efecto de la umbeliferona sobre la oviposición de *Sitophilus granarius* se deba a que la cafeína es un MS muy diferente a los encontrados en los hospederos de estos insectos. Sin embargo esto solamente puede saberse haciendo más experimentos con otro tipo de compuestos. Para la respuesta de consumo, la umbeliferona fue estimulante individualmente y su efecto fue similar al de la cafeína. Contrario a lo que se esperaba con la hipótesis del compuesto extraño, el consumo sobre las tabletas con la mezcla

de los MS del maíz fue la cuarteta menos consumida de las tres.

Las tabletas con los MS del maíz de forma individual se agruparon como "compuestos del maíz" para compararlos con los dos "compuestos extraños" y así poner a prueba la hipótesis de la química rara planteada en este trabajo. Sin embargo con el agrupamiento se pierden las diferencias que cada compuesto tiene sobre *Sitophilus granarius*. Las diferencias entre los MS del maíz se aprecian en los resultados con las dos respuestas (Tablas 3 y 5). Berenbaum *et al.*, (1989) mencionan la importancia de considerar el papel de las pequeñas diferencias entre MS dentro de una misma familia química y dentro de los hospederos de los herbívoros en la resistencia de las plantas. Las diferencias entre los MS del maíz de forma individual sobre las respuestas de *S. granarius* pueden deberse a que algunos compuestos son percibidos por el insecto a menores concentraciones que otros. El ácido trans-ferúlico es el ácido fenólico más abundante en el maíz (Arnason *et al.*, 1992) y además se ha visto que éste tiene un efecto negativo sobre las larvas de *S. zeamais* en las concentraciones utilizadas en este experimento (Sen *et al.*, 1994a).

En este trabajo los resultados obtenidos se deben al menos en parte, a la concentración y al tipo de compuestos y mezclas elegidas, así como a las variables de respuesta utilizadas, lo cual va de acuerdo con lo que algunos autores mencionan. Bernard *et al.* (1990) argumentan que el tipo de metabolitos secundarios vegetales y las mezclas de estos elegidas para estudiar la resistencia química contra un herbívoro son importantes en determinar los resultados. De igual forma, Adams & Bernays (1978) y Boufalís & Pellisier (1994) argumentan que las variables de respuesta elegidas también son importantes.

No obstante, los resultados con la diversidad química muestran que ésta funcionó para las dos variables de respuesta elegidas y los MS utilizados. La falta de MS atrayentes es un mecanismo de resistencia (Jones & Lawton, 1991), lo cual fue el caso para la respuesta de consumo, y el tener una mezcla inhibitoria de MS sobre la respuesta de oviposición es otro mecanismo de resistencia. En cambio, para la hipótesis de la química extraña, los resultados muestran que los MS elegidos y/o las variables de respuesta utilizadas en este trabajo no apoyan la hipótesis.

En este trabajo se encontró que al incrementar el número de MS en la mezcla, la probabilidad de que haya un compuesto o mezcla efectiva contra un herbívoro aumenta, pero también la probabilidad de que haya un posible compuesto antagónico, como aparentemente fue el caso con la umbeliferona sobre la respuesta de oviposición de *Sitophilus granarius*.

REFERENCIAS.

- Adams, C. M. y Bernays, E. A.. 1978. The effect of combinations of deterrents on the feeding behaviour of *Locusta migratoria*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 23: 101-109.
- Arnason, J. T., Gale, J., Conilh de Beyssac, B., Sen, A., Miller, S. S., Philogene, B. J. R., Lambert, J. D. H., Fulcher, R. G., Serratos, A. y Mihm, J. 1992. Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects, *Prostephanus truncatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch.). **Journal of Stored Products Research** 28: 119-126.
- Barbosa, P. y Letourneau, D. K. 1988. En: Barbosa, P. y Letourneau, D. K. (eds.). **Novel Aspects of Insect-Plant Interactions**. John Wiley and Sons, Nueva York.
- Berenbaum, M. 1985. Brenttown revisited: interactions among chemicals in plants. **Recent Advances in Phytochemistry** 19:107-138.
- Berenbaum, M. y Seigler, D. 1992. Biochemicals: engineering problems for natural selection. pp: 89-121. En: Roitberg, B. D. y Isman, M. B. (eds.). **Insect Chemical Ecology**. Chapman and Hall, New York.
- Berenbaum, M. R., Zangerl, A. R. y Lee, K. 1989. Chemical barriers to adaptation by a specialist herbivore. **Oecologia** 80: 501-506.
- Berenbaum, M. R. y Zangerl, A. R. 1993. Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance. **Oecologia** 95: 370-375.
- Bernard, C. B., Arnason, J. T., Philogene, B. J. R., Lam, J. y Waddell, T. 1990. *In vivo* effect of mixtures of allelochemicals on the life cycle of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 57: 17-22.
- Bernays, E. A. 1991. Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the grasshopper *Schistocerca americana*. **Journal of Chemical Ecology** 17: 2519-2526.
- Bernays, E. A. y Chapman, R. F. 1994. **Host-Plant Selection by Phytophagous Insects**. Chapman & Hall, Nueva York. 312 pp.
- Boufalas, A. y Pellisier, F. 1994. Allelopathic effects of phenolic mixtures on respiration of two spruce mycorrhizal fungi. **Journal of Chemical Ecology** 20: 2283-2289.
- Cates, R. G. y Redak, R. A.. 1988. Variation in the terpene chemistry of Douglas-Fir and its relationship to western spruce budworm success. pp: 317-344. En: Spencer, K. C. (ed.).

Chemical Mediation of Coevolution. Academic Press, INC, San Diego.

Classen, D., Arnason, J. T., Serratos, J. A., Lambert, J. D. H., Nozzolillo, C. y Philogene, B. J. R. 1990. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT'S collections. **Journal of Chemical Ecology** 16: 301-315.

Coley, P. D., Bryant, J. P. y Chapin, F. S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science** 230: 895-899.

CSS: Statistica. 1991. Statsoft Inc., Nueva York.

Cushman, J. H., Rashbrook, V. K. & Baettie, A. J. 1994. Assessing benefits to both participants in a lycaenid-ant association. **Ecology** 75:1031-1034.

Dethier, V. G. 1980. Evolution of receptor sensitivity to plant substances with special reference to deterrents. **American Naturalist** 115: 45-66.

Dirzo, R. 1984. Herbivory: a phyto-centric overview. pp: 141-145. **En:** Dirzo, R. y Sarukhán, J. (eds.). **Perspectives in Plant-Population Ecology.** Sinauer.

Edwards, P. J. 1989. Insect herbivory and plant defence. pp: 275-293. **En:** Grubb, P. J. y Whittaker, J. B. (eds.). **Toward a More Exact Ecology.** Blackwell Scientific Publications.

Espinosa-García, F. J. y Langenheim, J. H. 1991. Effects of sabinene and α -terpinene from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. **Biochemical Systematics and Ecology** 19: 643-650.

Espinosa-García, F. J. 1995. Plant variability and chemical defense (Manuscrito inédito).

Feeny, P.P. 1976. Plant apparency and chemical defense. **Recent Advances in Phytochemistry** 10: 1-40.

Glendinning, J. I. y Slansky, F. 1994. Interactions of allelochemicals with dietary constituents-effects on detergency. **Physiological Entomology** 19: 173-186.

Grubb, P. J. 1992. 1992. A positive distrust in simplicity: lessons from plant defences and competition among plants and among animals. **Journal of Ecology** 80: 585-610.

Harborne, J. B. 1984. **Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** Chapman and Hall. 288 pp.

Harborne, J. B. 1993. **Introduction to Ecological Biochemistry.** Academic Press, San Diego. 318 pp.

Harms, D. A. y Mattson, W. J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. **The Quarterly**

Review of Biology 67:283-355.

Herrman, K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition 28: 315-347.**

Jermey, T. 1984. Evolution of insect/host plant relationships. **American Naturalist 124: 609-630.**

Jones, C. G. y Finn, R. D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. pp.:273-280. **En: The Evolutionary Interactions of Animals and Plants: Proceedings of a Royal Society Discussion Meeting Held on 27 and 28 February 1991. The Royal Society of London, Londres.**

Jones, C. G. y Lawton, J. H. 1991. Plant chemistry and insect species richness of british umbellifers. **Journal of Animal Ecology 60: 767-777.**

Karban, R. 1992. Plant Variation: its effects on populations of herbivorous insects. pp: 195-215. **En: Fritz, R. S. y Simms, E. L. (eds.). Plant Resistance to Herbivores and Pathogens. University of Chicago Press, Chicago.**

Kennedy, G. G. y Barbour, J. D. 1992. Resistance variation in natural and managed systems. pp: 13-41. **En: Fritz, R. S. y Simms, E. L. (eds.). Plant Resistance to Herbivores and Pathogens. University of Chicago Press, Chicago.**

Langenheim, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology 20:1223-1280.**

Lindroth, R. L. 1991. Differential toxicity of plant allelochemicals to insects: roles of enzymatic detoxication systems. pp: 1-33. **En: Bernays, E. (ed.). Insect Plant Interactions. CRC Press, Florida.**

Méndez, I. 1991. **Modelos Estadísticos Lineales en la investigación Comparativa. Instituto de Investigaciones en Matemáticas aplicadas y en Sistemas U.N.A.M., Mexico D.F.**

Namkoong, G. 1991. Maintaining genetic diversity in breeding for resistance in forest trees. **Annual Review of Phytopathology 29: 325-342.**

McKey, D. 1977. The distribution of secondary compounds within plants. pp: 55-133. **En: Rosenthal, G. A. y Janzen, D. H. (eds.). Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Academic Press, Nueva York.**

Mole, S. 1994. Trade-offs and constraints in plant-herbivore defense theory: a life-history perspective. **Oikos 71: 3-12.**

Phillips, T. W., Jiang, X. L., Burkholder, W. E., Phillips, J. K. y Tran, H. Q. 1992. Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae). **Journal of Chemical Ecology** 19: 723-734.

Pierce, N. E. & Elgar, M. A. 1987. The influence of ants in host-plant selection by *Jalmenus evagoras*, a myrmecophilous lycaenid butterfly. **Behavioural Ecology and Sociobiology** 16: 209-222.

Pimentel, D. y Bellotti, A. C. 1976. Parasite-host population systems and genetic stability. **The American Naturalist** 110: 877-888.

Rausher, M. D. 1992. Natural Selection and the evolution of plant-insect interactions. En: Roitberg, B. D. y Isman, M. B. (eds.). **Insect Chemical Ecology**. Chapman Hall, Nueva York.

Rhoades, D. F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. pp: 3-54. En: Rosenthal, G. A. y Janzen, D. H. (eds.). **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**. Academic Press, Nueva York.

Rhoades, D. F. y Cates, R. G. 1976. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. **Recent Advances in Phytochemistry** 10: 168-213.

Rodman, J. E. y Chew, F. S. 1980. Phytochemical correlates of herbivory in a community of native and naturalized Cruciferae. **Biochemical Systematics and Ecology** 8: 43-50.

Rosenthal, G. A. y Janzen, D. H. 1979. En: Rosenthal, G. A. y Janzen, D. H. (eds.). **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**. Academic Press, Nueva York.

Schultz, J. C. 1988. Many factors influence the evolution of herbivore diets, but plant chemistry is central. **Ecology**. 69: 896-897.

Sen, A., Miller, S. S., Arnason, J. T. y Fulcher, R. G. 1991. Quantitative determination by high performance liquid chromatography and microspectrofluorimetry of phenolic acids in maize grain. **Phytochemical Analysis** 2: 225-229.

Sen, A., Bergvinson, D., Arnason, J. T. y Atkinson, J. 1994a. Role of phenolic acid amides in the resistance of maize towards *Sitophilus zeamais* and *Prostephanus truncatus* (Manuscrito Inédito).

Sen, A., Bergvinson, D., Miller, S., Atkinson, J., Fulcher, G. y Arnason, T. 1994b. Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids and phenolic acid amides in maize kernels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 42: 1879-1883.

Serratos, A., Arnason, J. T., Nozzolillo, C., Lambert, J. D. H., Philogene, B. J. R., Fulcher, G., Davidson, K., Peacock, L., Atkinson, J. y Morand, P. 1987. Factors contributing to resistance of exotic maize populations to maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Journal of Chemical Ecology** 13: 751-762.

Sifuentes, J. A. 1977. **Plagas de los Granos Almacenados y su Control**. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, SARH. Folleto de divulgación no. 68, México.

Simms, E. L. y Rausher, M. D. 1987. Costs and benefits of plant resistance to herbivory. **American Naturalist** 130: 570-581.

Singh, D. N. y McCain, F. S. 1963. Relationship of some nutritional properties of the corn kernel to weevil infestation. **Crop Science** 259: 261.

Sinha, R. N. 1984. Effects of weevil (Coleoptera: Curculionidae) infestation on abiotic and biotic quality stored wheat. **Journal of Economic Entomology** 77: 1483-1488.

Smiley, J. T., Horn, J. N. y Rank, N. E. 1985. Ecological effects of salicin at three trophic levels: new problems from old adaptations. **Science** 230: 649-651.

Snyder, M. A. 1992. Selective herbivory by albert's squirrel mediated by chemical variability in ponderosa pine. **Ecology** 73: 1730-1741.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. 1981. **Biometry**. W. H. Freeman, San Francisco.

Strong, D. R. y Levin, D. A. 1975. Species richness of the parasitic fungi of british trees. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 72: 2116-2119.

Tuomi, J. 1992. Toward integration of plant defence theories. **Trends in Ecology and Evolution** 7: 365-367.

Urrelo, R. y Wright, V. F. 1989. Influence of susceptible and resistant maize accessions on the development of *Sitophilus zeamais* Mostch. (Coleoptera, Curculionidae) with initial feeding in specific kernel areas. **Journal of the Kansas Entomological Society** 62: 32-43.

Urrelo, R. y Wright, V. F. 1989. Oviposition performance of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) on resistant and susceptible maize accessions. **Journal of the Kansas Entomological Society** 62: 23-31.

Visser, J. H. 1984. **Differential sensory perceptions of plant compounds by insects**.

Waterman, P. G. y Mole, S. 1994. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Blackwell Scientific Publications, Neva York. 238 pp.

Whitehead, D. R. 1987. Weevils (Curculionidae, Coleoptera). pp: 767-770. En: Gorham, J. R. (ed.). **Insect and Mite pests in Foods: an Illustrated Key.** USDA, Ag. Handbook no. 655.

Wilhoit, L. R. 1992. Evolution of herbivore virulence to plant resistance: influence of variety mixtures. pp: 91-119. En: Fritz, R. S. y Simms, E. L. (eds.). **Plant Resistance to Herbivores and Pathogens.** University of Chicago Press, Chicago.

Winston, P. W. y Bates, D. H. 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology** 41: 232-237.

Zar, J. H. 1984. **Biostatistical Analysis.** Prentice-hall, Nueva York. 708pp.

FE DE ERRATAS.

Pg. 24

La estructura de f) corresponde a la umbeliferona y la estructura de e) corresponde a la cafeína.

Pg. 28

Dice: (Sokal & Rolph, 1981).

Debe decir: (Sokal & Rohlf, 1981).

Pg. 49

Dice: Barbosa, P. y Letourneau, D.K. 1988. En: Barbosa, P. y Letourneau, D.K. (eds.). **Novel Aspects of Insect-Plant Interactions. John Wiley and Sons, Nueva York.**

Debe decir: Barbosa, P. 1988. **Natural Enemies and Herbivore-Plant Interactions: Influence of Plant Allelochemicals and Host Specificity pp: 201-229 En: Barbosa, P y Letourneau, D.K. (eds.). **Novel Aspects of Insect-Plant Interactions.** John Wiley and Sons, Nueva York.**