

9



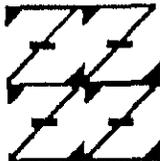
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**RESPUESTA DE HONGOS ACARREADOS EN SEMILLAS
DE MAÍZ A MEZCLAS DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE CEREALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

YOLANDA MAGDALENA GARCÍA RODRÍGUEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HAY QUE
DE MASISTRA MEXICANA

DIRECTOR: FRANCISCO J. ESPINOSA GARCÍA

MÉXICO, D.F.

277297

ABRIL, 2000.



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.

AGRADECIMIENTOS

A Francisco Espinosa por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él y por todo el apoyo que me dio. Siempre le agradeceré su comprensión y confianza, pero sobre todo su paciencia.

A mis maestros Gerardo Cruz, Marisela Arteaga, Manuel Rico y Rosalva García por la revisión de este trabajo y sus valiosas sugerencias. Muchas gracias por su comprensión y amabilidad.

A C.O.N.A.C.Y.T. (Proyecto 4720-N9406) por el financiamiento parcial de esta investigación.

A la M. en C. Rebeca Martínez Flores quien identificó a los hongos. Muchas gracias por su colaboración y su amabilidad. También agradezco a la Dra. Genoveva García Aguirre quien facilitó su laboratorio y su personal para la identificación de los hongos.

A la UNAM, por todas las oportunidades que me brindó a lo largo de la carrera y por hacer posible este trabajo.

A mis compañeros Polo, Graciela, Alba, Euler, Lupita y Edgar, quienes hicieron el trabajo más fácil y a quienes les pedí ayuda en más de una ocasión. Muchas gracias por su amistad.

A H. Humberto, Hugo, Sergio y Leonor por todos esos días en que me apoyaron incondicionalmente y me comprendieron como nadie. Gracias por su amor.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Teoría de la defensa vegetal	6
2.2 Mezclas de metabolitos secundarios	8
2.3 Los metabolitos secundarios y los hongos patógenos	9
2.4 Sistema de estudio	10
2.4.1 <i>Fusarium graminearum</i>	10
2.4.2 <i>Fusarium moniliforme</i>	10
2.4.3 <i>Fusarium oxysporum</i>	11
2.4.4 <i>Phoma herbarum</i>	11
2.4.5 <i>Penicillium oxalicum</i>	12
2.4.6 Ácidos fenólicos	12
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivo Particular	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Colecta y cultivo de organismos	15
5.1.1 Aislamiento de los hongos	15
5.1.2 Identificación de los hongos	15
5.1.3 Pruebas de solubilidad de metabolitos secundarios	15
5.2 Preparación de medios de cultivo	16
5.3 Experimentos y toma de datos	17

5.3.1 Experimentos individuales	17
5.3.2 Experimentos simultáneos con cinco especies de hongos	17
5. 4. Análisis de resultados	18
6. RESULTADOS	20
6.1 Experimentos individuales	20
6.1.1 <i>Fusarium graminearum</i>	21
6.1.2 <i>Fusarium moniliforme</i>	24
6.1.3 <i>Fusarium oxysporum</i>	28
6.1.4 <i>Phoma herbarum</i>	31
6.1.5 <i>Penicillium oxalicum</i>	34
6.2 Experimentos con los cinco hongos	41
6.2.1 Experimento con concentración baja	41
6.2.2 Experimento con concentración alta	43
6.2.3 <i>Penicillium oxalicum</i>	48
7. DISCUSIÓN	54
7.1 Hipótesis de mayor diversidad y concentración de metabolitos secundarios como mejor defensa	54
7.2 Efecto diferencial de los hongos	55
7.3 CONCLUSIONES	57
8. REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Efecto de la concentración de MS en <i>Fusarium graminearum</i>	21
Fig. 2 Interacción tipo de compuesto y concentración en <i>Fusarium graminearum</i>	21
Fig. 3 Interacción concentración y el número de compuestos en <i>Fusarium graminearum</i>	23
Fig. 4 Efecto de la concentración de MS en <i>Fusarium moniliforme</i>	25
Fig. 5 Interacción tipo de compuesto y concentración en <i>Fusarium moniliforme</i>	25
Fig. 6 Interacción concentración y número de compuestos en <i>Fusarium moniliforme</i>	27
Fig. 7 Interacción número de compuestos y concentración en <i>Fusarium moniliforme</i>	27
Fig. 8 Efecto de la concentración de MS en <i>Fusarium oxysporum</i>	30
Fig. 9 Interacción tipo de compuesto y concentración en <i>Fusarium oxysporum</i>	30
Fig. 10 Interacción concentración y número de compuestos en <i>Fusarium oxysporum</i>	32
Fig. 11 Interacción número de compuestos y concentración en <i>Fusarium oxysporum</i>	32
Fig. 12 Efecto de la concentración de MS en <i>Phoma herbarum</i>	35
Fig. 13 Interacción tipo de compuesto y concentración en <i>Phoma herbarum</i>	35
Fig. 14 Efecto de la concentración de MS en <i>Penicillium oxalicum</i>	37
Fig. 15 Interacción tipo de compuesto y concentración en <i>Penicillium oxalicum</i>	37
Fig. 16 Interacción concentración y número de compuestos en <i>Penicillium oxalicum</i>	39
Fig. 17 Interacción número de compuestos y concentración en <i>Penicillium oxalicum</i>	39
Fig. 18 Interacción tipo de compuesto y especie de hongo a concentración baja en <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	43
Fig. 19 Interacción entre tipo de compuesto y especie de hongo a concentración alta en <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	43
Fig. 20 Interacción número de compuestos y especie de hongo a dosis baja en <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	47

Fig. 21 Interacción número de compuestos y especie de hongo a dosis alta en <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	47
Fig.22 Efecto del número de compuestos a concentración baja en <i>Penicillium oxalicum</i>	51
Fig.23 Efecto del tipo de compuesto a concentración alta en <i>Penicillium oxalicum</i>	51
Fig.24 Efecto del número de compuestos a concentración baja en <i>Penicillium oxalicum</i>	52
Fig. 25 Efecto del número de compuestos a concentración en <i>Penicillium oxalicum</i>	52

TABLA 16. ANDEVA del efecto del número de compuestos y la concentración en <i>Penicillium oxalicum</i>	38
TABLA 17. Resumen de los ANDEVAs realizados para cada especie	40
TABLA 18. ANDEVA del efecto del tipo de compuesto y tipo de hongo concentración baja en <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	41
TABLA 19. Efecto de las mezclas de MS, a concentración baja, en <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	42
TABLA 20. ANDEVA del efecto del tipo de hongo y el número de compuestos a concentración baja en <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	43
TABLA 21. ANDEVA del efecto del tipo de compuesto y tipo de hongo, a concentración alta en <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Phoma herbarum</i>	43
TABLA 22. Efecto de las mezclas, a concentración alta, en <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>Phoma herbarum</i>	46
TABLA 23. ANDEVA del efecto del tipo de hongo y el número de compuestos en <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , y <i>Phoma herbarum</i>	46
TABLA 24. ANDEVA del efecto del tipo de compuestos, a concentración alta, en <i>Penicillium oxalicum</i>	48
TABLA 25. Efecto de las mezclas en <i>Penicillium oxalicum</i>	49
TABLA 26. ANDEVA del efecto del número de compuestos, a concentración alta, en <i>Penicillium oxalicum</i>	49
TABLA 27. ANDEVA del efecto del tipo de compuestos, a concentración alta en <i>Penicillium oxalicum</i>	50
TABLA 28. ANDEVA del efecto del número de compuestos, a concentración alta, en <i>Penicillium oxalicum</i>	50

RESUMEN

Se investigó la función de la diversidad de los metabolitos secundarios en la defensa vegetal contra los hongos y se exploró la función de esta diversidad química en la respuesta de hongos con diferente grado de especialización en gramíneas.

La hipótesis que se probó es que una mayor diversidad y concentración de metabolitos secundarios en tejidos vegetales provee una mejor defensa contra hongos que una diversidad y concentración bajas. Para probar la hipótesis se expusieron cinco especies de hongos a un gradiente de diversidad y concentración de metabolitos secundarios analizando el efecto del tipo y número de compuestos.

Los hongos fueron expuestos *in vitro*, primero por separado y después simultáneamente, a cinco ácidos fenólicos (ferúlico, cafeico, *p*-cumárico, vainillico y sinápico) que se encuentran en las semillas de las gramíneas. Estos compuestos fueron incorporados al medio de cultivo individualmente y como mezclas de dos, tres, cuatro y cinco compuestos, en tres concentraciones.

El efecto del tipo y número de ácidos fenólicos se estudió sobre las respuestas de crecimiento de cinco especies de hongos con diferente grado de especialización como patógenos de gramíneas y acarreados en semillas de maíz: *Fusarium graminearum*, especialista en semillas de gramíneas; *Fusarium moniliforme*, especialista en tallos y semillas de gramíneas; *Fusarium oxysporum*, generalista de varios cultivos; *Phoma herbarum*, saprobio de varios cultivos y *Penicillium oxalicum*, saprobio del suelo y de restos de plantas.

Los resultados que apoyaron la hipótesis de la diversidad y la concentración de metabolitos secundarios como mejor defensa fueron: la inhibición del crecimiento de *F. moniliforme* en el ensayo individual con mezclas de tres y cinco compuestos a concentración alta; de *F. oxysporum* en el ensayo individual con mezclas de tres y cinco compuestos a concentración media; de *P. oxalicum* en el ensayo individual con mezclas de dos, tres y cuatro compuestos a concentración alta; de los hongos *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* en el ensayo simultáneo, con mezclas de tres, cuatro y cinco compuestos a concentración alta.

El efecto de la concentración de los ácidos fenólicos fue de inhibición en el crecimiento de todos los hongos, sin embargo el efecto de la diversidad de los ácidos fenólicos mostró estar en función de la concentración y del grado de especialización de la especie de hongo. Las mezclas diversas en concentración baja inhibieron muy poco a todas las especies, mientras que en concentración alta la inhibición fue mayor, pero no en todas las especies de hongos estudiadas. En las especies con mayor especialización en las gramíneas, la inhibición de los ácidos fenólicos aislados fue mayor que la de algunas mezclas. En las especies con menor especialización, todas las mezclas fueron tan inhibitoras como los compuestos aislados más activos.

Se concluye que los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, vainillico, cafeico y sinápico, actuando sólo a dosis altas pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum* en los granos de maíz.

Los resultados sugieren que el aumento en la diversidad química de las mezclas aumenta la inhibición del crecimiento de los hongos *in vitro* cuando la concentración de la mezcla en el medio de cultivo es alta. Así mismo sugieren que esta diversidad química

puede tener un efecto diferente en el consumidor de acuerdo a su grado de especialización al hospedero: a menor grado de especialización el efecto es mayor.

1. INTRODUCCION

Las plantas son atacadas a lo largo de su vida por numerosos y diversos consumidores: mamíferos, insectos, bacterias y hongos entre otros. Estas presiones selectivas han generado diferentes patrones defensivos en las plantas: morfológicos, físicos, químicos, nutricionales, fenológicos, de asociación con otras plantas u otros organismos. Se les ha atribuido a los factores químicos, los metabolitos secundarios, un papel muy importante en la defensa de las plantas contra sus consumidores (Ehrlich & Raven, 1964; Kubo & Hanke, 1985; Rhoades, 1979).

Los metabolitos secundarios están presentes en todas las plantas y parecen no tener un papel intrínseco en los procesos fisiológicos de éstas (Bernays & Chapman, 1994). Se encuentran normalmente en los tejidos vegetales como mezclas por lo que los consumidores pueden ser afectados diferencialmente por compuestos individuales o por sus combinaciones (Berenbaum, 1988; Espinosa-García & Langenheim, 1991). Además de su participación en la resistencia vegetal contra herbívoros y patógenos (Bernays & Chapman, 1994; Ehrlich & Raven, 1964; Fenny, 1976 Schultz, 1988), se les ha asociado con diferentes interacciones ecológicas: fenómenos alelopáticos, interacciones mutualistas de plantas con otros organismos (Turlings & Berney, 1998), interacciones de herbívoros con el tercer nivel trófico (Coley & Kursar, 1998) y resistencia contra factores abióticos (Bernays & Chapman, 1994; Cates, 1996).

Los trabajos que sustentan la teoría de la defensa química han explorado el papel de los metabolitos secundarios bajo diferentes perspectivas: el efecto de una sustancia en particular, el de un grupo de sustancias, o bien el de mezclas de compuestos secundarios; en los consumidores de las plantas. Algunos de los trabajos con mezclas de metabolitos secundarios indican que existen compuestos más activos que otros (Berenbaum, 1988), que en ocasiones su actividad se basa en la diversidad (Berenbaum, *et al* 1991), que la acción de las mezclas es dependiente de la dosis (Berenbaum *et al.*, 1991; Espinosa-García y Langenheim, 1991) y que la efectividad de los compuestos contra cierto grupo de consumidores puede ser ineficaz contra otros (Kubo & Hanke, 1985). Actualmente existe poca evidencia que pruebe si un compuesto individual o una mezcla es lo que determina la resistencia en las plantas contra un herbívoro o un patógeno con cierto grado de especialización (Berenbaum & Zangerl, 1993).

El conocimiento de los mecanismos por los cuales la diversidad química interviene en la defensa vegetal puede tener aplicaciones prácticas importantes, por ejemplo combatir plagas y patógenos reduciendo el uso de plaguicidas en los agroecosistemas. Por una parte, la hipótesis de la diversidad química permite analizar la interacción planta-patógeno en los sistemas agrícolas y explicar porqué algunos individuos en una población soportan conjuntos de consumidores diferentes a los de otros (Espinosa-García & Langenheim, 1991). Por otra parte, las interacciones planta-herbívoro y planta-patógeno en los sistemas agrícolas son más evidentes que en los sistemas naturales, ya que en estos sistemas el equilibrio natural entre las plantas y sus consumidores se ha roto y aparecen patrones más marcados de herbivoría y de resistencia vegetal (Bradshaw & Mortimer, 1986).

En el presente estudio se intenta analizar la función de la diversidad de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas contra los hongos y explorar la función de esta diversidad química en la respuesta de cinco especies de hongos con diferente grado de especialización en gramíneas. Se expondrán cinco especies de hongos con diferente grado

de especialización como patógenos de gramíneas a un gradiente de diversidad y concentración de metabolitos secundarios comunes en estas plantas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Teoría de la defensa vegetal

La teoría de la defensa vegetal pretende explicar cómo se defienden las plantas y su susceptibilidad a ciertos grupos de consumidores. Uno de los primeros en proponer que la razón de ser de los metabolitos secundarios era la protección vegetal contra sus consumidores fue Frankel (1959). Después surgió el trabajo de Eriich & Raven (1964), que mostró una asociación de la alimentación de familias de mariposas con ciertas familias de plantas, cada una de las cuales con una serie específica de metabolitos secundarios. Estos datos les llevaron a suponer que los perfiles químicos de las plantas, así como la distribución de las mariposas era un claro resultado de coevolución. Esta hipótesis de coevolución propone que la aparición de una característica nueva en la defensa vegetal le permite a las plantas escapar de la herbivoría y sufrir una especiación múltiple. Consecutivamente propone la evolución de la contradefensa del herbívoro que le permite una nueva colonización sobre el grupo de plantas que se originó a partir de la nueva defensa (Mitter, *et al.*, 1988). Esta hipótesis es ampliamente aceptada, sin embargo no ayuda a explicar la diversidad de metabolitos secundarios en un solo tejido vegetal y su posible función.

En un contexto ecológico y evolutivo se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la presencia de compuestos secundarios en términos de defensa haciendo referencia a diferentes factores como: apariencia (Fenny, 1976; Rhoades & Cates, 1976) balance de carbono/nutrientes y disponibilidad de recursos (Bryant, *et al.*, 1983; Coley, *et al.*, 1985), defensa óptima (McKey, 1977; Rhoades, 1979), defensa neutral (Edwards, 1989), diversidad alta y mayor protección (Jones & Lawton, 1991) y de la diversidad moderada (Jones & Firn, 1991).

La hipótesis de la apariencia (Fenny, 1976; Rhoades & Cates, 1976) propone que las plantas o los tejidos vegetales varían de acuerdo a su "apariencia" para los herbívoros. Las plantas aparentes estarían defendidos por compuestos cuantitativos y las no aparentes por cualitativos. Los cualitativos son toxinas de bajo peso molecular, baratas y efectivas a bajas concentraciones contra herbívoros generalistas, pero ineficaces contra especialistas, aún en concentraciones altas, y pueden ser superados evolutivamente sin mucha dificultad. Los compuestos cuantitativos son sustancias que actúan como reductores de digestibilidad en los herbívoros; son costosos y efectivos contra especialistas y generalistas, su efecto es proporcional a la concentración, pero son difíciles de superar evolutivamente.

Se pueden enumerar varios puntos débiles de esta hipótesis: en un mismo tejido o planta se pueden encontrar simultáneamente compuestos cualitativos o cuantitativos (Grubb, 1992), se basan solamente en relaciones planta-insecto, algunos compuestos se pueden comportar tanto como toxinas como reductores de digestibilidad y algunos herbívoros responden a las toxinas de manera dependiente de la dosis.

La teoría de la defensa óptima propuesta por McKey (1974) y después refinada por Rhoades (1979) sugiere que el nivel de defensa que presente un tejido depende de su valor adaptativo. Según esta hipótesis las plantas "optimizan" la cantidad de metabolitos

de especialización como patógenos de gramíneas a un gradiente de diversidad y concentración de metabolitos secundarios comunes en estas plantas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Teoría de la defensa vegetal

La teoría de la defensa vegetal pretende explicar cómo se defienden las plantas y su susceptibilidad a ciertos grupos de consumidores. Uno de los primeros en proponer que la razón de ser de los metabolitos secundarios era la protección vegetal contra sus consumidores fue Frankel (1959). Después surgió el trabajo de Erilch & Raven (1964), que mostró una asociación de la alimentación de familias de mariposas con ciertas familias de plantas, cada una de las cuales con una serie específica de metabolitos secundarios. Estos datos les llevaron a suponer que los perfiles químicos de las plantas, así como la distribución de las mariposas era un claro resultado de coevolución. Esta hipótesis de coevolución propone que la aparición de una característica nueva en la defensa vegetal le permite a las plantas escapar de la herbivoría y sufrir una especiación múltiple. Consecutivamente propone la evolución de la contradefensa del herbívoro que le permite una nueva colonización sobre el grupo de plantas que se originó a partir de la nueva defensa (Mitter, *et al.*, 1988). Esta hipótesis es ampliamente aceptada, sin embargo no ayuda a explicar la diversidad de metabolitos secundarios en un solo tejido vegetal y su posible función.

En un contexto ecológico y evolutivo se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la presencia de compuestos secundarios en términos de defensa haciendo referencia a diferentes factores como: apariencia (Fenny, 1976; Rhoades & Cates, 1976) balance de carbono/nutrientes y disponibilidad de recursos (Bryant, *et al.*, 1983; Coley, *et al.*, 1985), defensa óptima (McKey, 1977; Rhoades, 1979), defensa neutral (Edwards, 1989), diversidad alta y mayor protección (Jones & Lawton, 1991) y de la diversidad moderada (Jones & Firn, 1991).

La hipótesis de la apariencia (Fenny, 1976; Rhoades & Cates, 1976) propone que las plantas o los tejidos vegetales varían de acuerdo a su "apariencia" para los herbívoros. Las plantas aparentes estarían defendidos por compuestos cuantitativos y las no aparentes por cualitativos. Los cualitativos son toxinas de bajo peso molecular, baratas y efectivas a bajas concentraciones contra herbívoros generalistas, pero ineficaces contra especialistas, aún en concentraciones altas, y pueden ser superados evolutivamente sin mucha dificultad. Los compuestos cuantitativos son sustancias que actúan como reductores de digestibilidad en los herbívoros; son costosos y efectivos contra especialistas y generalistas, su efecto es proporcional a la concentración, pero son difíciles de superar evolutivamente.

Se pueden enumerar varios puntos débiles de esta hipótesis: en un mismo tejido o planta se pueden encontrar simultáneamente compuestos cualitativos o cuantitativos (Grubb, 1992), se basan solamente en relaciones planta-insecto, algunos compuestos se pueden comportar tanto como toxinas como reductores de digestibilidad y algunos herbívoros responden a las toxinas de manera dependiente de la dosis.

La teoría de la defensa óptima propuesta por McKey (1974) y después refinada por Rhoades (1979) sugiere que el nivel de defensa que presente un tejido depende de su valor adaptativo. Según esta hipótesis las plantas "optimizan" la cantidad de metabolitos

secundarios destinados a un tejido, en relación al costo-beneficio de la asignación de recursos a su defensa. Esta hipótesis supone que la defensa es costosa, pues se utilizan recursos que podían destinarse al crecimiento y la reproducción. Rhoades (1979) sugiere que el costo de la defensa de una estructura no debe de ser mayor al costo de la pérdida de la misma.

Bryant, *et al.*, 1983, proponen la hipótesis del balance de carbono-nitrógeno, según la cual la defensa química estará en función del medio en que la planta se desarrolle. En ambientes ricos en luz y pobres en nutrientes, particularmente nitrógeno, las plantas serán capaces de tener fotosintatos excedentes, por lo que su principal defensa será con compuestos secundarios basados en carbono: terpenos y fenoles. De manera contraria, las plantas que crecen en suelos ricos en nutrientes tendrían mayor cantidad de compuestos secundarios con estructura química basada en nitrógeno: alcaloides, aminoácidos no protéicos, compuestos cianogénicos.

La hipótesis de la disponibilidad de recursos propuesta por Coley, *et al.*, (1985), afirma que las plantas que crecen en sitios pobres en recursos (luz, agua, nutrientes) tienen pocas posibilidades de recuperarse de una defoliación parcial. Por lo tanto, tendrán que invertir mucho en defensas, particularmente en defensas no móviles, que no se reabsorben ni se sintetizan continuamente y tampoco desaparecen de plantas senescentes. Por otra parte, las plantas que crecen en ambientes ricos en recursos y que pueden recuperarse rápidamente de una defoliación parcial invertirán poco en defensas y estas serán móviles, rápidas de sintetizar y de eliminar (alcaloides, terpenos).

Por otra parte Edwards (1989) propone la hipótesis de la defensa neutral, la cual considera que solamente unos cuantos compuestos son efectivos en la defensa vegetal contra insectos y el resto son neutrales. Dentro de la resistencia neutral se cuentan características como la dureza de las hojas o la presencia de taninos, características que pueden tener múltiples funciones, tanto fisiológicas como de resistencia al ataque de microorganismos y de animales. Según esta hipótesis las plantas con mayor proporción de defensa neutral serían las más primitivas, y las que presenten mayor defensa química serán las más recientes. Un punto interesante del trabajo de Edwards, es que la evidencia que se tiene sugiere que los metabolitos secundarios han cambiado muy poco a través del tiempo. La evidencia bioquímica utilizada por Edwards, indica que si bien los cambios bioquímicos que permiten a una planta entrar en una nueva zona adaptativa pueden darse, son menos comunes de lo que sugiere la teoría de la coevolución de Ehrlich & Raven.

Por otra parte Grubb (1992), considera que el estudio de la defensa vegetal no puede basarse en una sola característica o estrategia defensiva. Este autor propone que la teoría general de la defensa vegetal debe considerar varios aspectos: la historia de la planta, la presencia histórica de herbívoros en la zona, la disponibilidad de recursos, el valor nutricional de la planta en relación con sus vecinas así como otros tipos de defensa, no solamente la defensa química.

Todas estas hipótesis tratan de explicar la asignación de recursos a la defensa, sin embargo no explican adecuadamente la diversidad química (Espinosa-García, en prensa). Algunos autores como Jones & Lawton, en 1991 y Jones & Firns en 1991; han analizado teóricamente la diversidad de los metabolitos secundarios y su papel en la defensa, aunque sin considerar el papel de la asignación de recursos.

La diversidad de los metabolitos secundarios en las plantas se ha relacionado generalmente con la presión que ejercen los consumidores sobre las plantas. Una suposición muy difundida es que una diversidad de metabolitos secundarios alta provee

mayor protección contra los consumidores (Berenbaum, 1985; Kubo y Hanke, 1985; Jones y Firms, 1991; Jones y Lawton, 1991). Jones & Lawton (1991) proponen cuatro hipótesis para explicar la diversidad de consumidores de una planta y su relación con la diversidad de metabolitos secundarios. La primera, la defensa diversa, predice una correlación negativa entre la diversidad química de la planta y la riqueza de consumidores que sustenta, suponiendo que varios compuestos son más difíciles de superar que uno o dos. La segunda, la barrera bioquímica, predice una baja diversidad de insectos en plantas con compuestos poco usuales, argumentando que sus tasas de colonización deben de reducirse en el tiempo a causa de químicos nuevos. La tercera, la química común según la cual una planta con alta diversidad química aumenta la posibilidad de compartir, al menos, algunas clases de compuestos con otras especies, facilitando el intercambio de hospedero entre los herbívoros. La cuarta, escape de los enemigos, la cual predice un mayor número de especies de insectos en plantas con una química rara. Argumentan que muchos enemigos naturales de los insectos herbívoros utilizan características químicas de la planta para localizar a su presa.

Para probar estas hipótesis Jones y Lawton (1991), examinaron reportes sobre la diversidad química de las especies de la familia Umbelliferae y sobre las comunidades de insectos que las consumen. Encontraron una débil correlación entre las umbelíferas con mayor diversidad química y una comunidad mayor de herbívoros. Estos datos apoyan la hipótesis de la química común. Por otra parte, no encontraron correlación entre la química rara en estas plantas y la riqueza de especies de insectos. Estos datos fueron obtenidos a partir de información bibliográfica, lo que implica que deben de ser tomados con reserva y que la hipótesis aún requiere ser probadas.

Por otra parte Jones y Firms en 1991, plantean la hipótesis de la diversidad moderada, en donde proponen que solo una parte de la diversidad de metabolitos secundarios en las plantas tienen actividad efectiva contra herbívoros y patógenos, mientras que el resto de los metabolitos secundarios son inocuos. Jones y Firms (1991) sugieren que las plantas que pueden producir muchos compuestos estarán mejor defendidas porque su mayor probabilidad de producir compuestos activos es mayor. Por otra parte proponen que los compuestos inactivos pueden conservarse debido a que sus costos de producción son bajos, pues es común que los metabolitos secundarios compartan rutas de biosíntesis entre ellos. Sin embargo, esta hipótesis se sustenta en estudios farmacéuticos y agroquímicos, en los que se buscan compuestos de alta actividad biológica, que no necesariamente implica actividad en interacciones ecológicas. Es decir, la baja actividad contra patógenos de humanos o plagas agrícolas; no implica necesariamente la falta de actividad contra consumidores de las plantas (Espinosa-García, 1998). Además los compuestos se prueban individualmente y fuera del contexto donde actúan (Kubo & Hanke, 1985). Se requiere pues, evidencia directa que pruebe o rechace esta hipótesis.

2.2 Mezclas de metabolitos secundarios

Las hipótesis de la defensa química pretenden generalizar algunos patrones observados en las interacciones planta-herbívoro y planta-patógeno, para explicar el papel defensivo de los compuestos secundarios en las plantas, los costos de la defensa vegetal y las restricciones del metabolismo secundario respecto a la disponibilidad de recursos en el ambiente. Existen diversos estudios que intentan explicar los factores que determinan la defensa química, bajo diferentes perspectivas: el efecto de una sustancia en particular, el de

un grupo de sustancias, el de mezclas de compuestos secundarios así como el efecto de la diversidad química sobre diferentes consumidores. Algunos de los trabajos con mezclas de metabolitos secundarios indican que existen compuestos más activos que otros (Berenbaum, 1988), que en ocasiones su actividad se basa en la diversidad (Berenbaum, *et al.*, 1991), o bien que la acción de las mezclas es dependiente de la dosis (Berenbaum *et al.*, 1991; Espinosa-García y Langenheim, 1991).

Recientemente se ha encontrado evidencia que sugiere que la diversidad de las mezclas de metabolitos secundarios tiene efectos que varían con su concentración. Castellanos y Espinosa-García (1997), reportan que mezclas diversas de compuestos secundarios en concentraciones bajas son atractivas para insectos mientras que en concentraciones medias o altas son adversas.

Por otra parte, se ha sugerido que la efectividad de los compuestos secundarios contra cierto grupo de consumidores puede ser ineficaz contra otros, por lo que la diversidad química de las plantas podría determinar la diversidad de los consumidores actuando como una defensa "multifacetas" (Kubo & Hanke, 1985). Por ejemplo, se ha reportado que la diversidad de los compuestos secundarios puede retardar la velocidad de colonización de las semillas por comunidades complejas de microorganismos del suelo y que este efecto puede estar en función de la concentración de los metabolitos secundarios (Bonfil, 1995).

Los efectos de los compuestos secundarios y sus mezclas sobre los consumidores también pueden tener consecuencias evolutivas tanto en las plantas como en sus consumidores. Por ejemplo, la diversidad química dentro de la población puede evitar o retardar la adaptación de los herbívoros a todas las sustancias defensivas de una población de plantas (Pimentel & Belloti 1976).

2.3 Los metabolitos secundarios y los hongos patógenos

Los metabolitos secundarios involucrados en la defensa vegetal (terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, acetogénicos, aminoácidos no protéicos, péptidos, glucósidos, etc.) pueden actuar como tóxicos generalizados, como venenos para sistemas específicos o bien como reductores de digestibilidad de proteínas o de carbohidratos; en animales, bacterias u hongos. Existe una diversidad cualitativa y cuantitativa de metabolitos secundarios que afecta a los consumidores de las plantas (Langenheim, 1994) y que se presenta entre especies, poblaciones, individuos, incluso dentro de una misma planta, como respuesta a factores bióticos y abióticos. Se consideran tres clases principales de compuestos secundarios: fenólicos, nitrogenados y terpenos. Dentro de los compuestos fenólicos, destacan los fenoles simples, los flavonoides, las quinonas y los taninos (Bernays & Chapman, 1994).

Existen diferentes estudios con mezclas de fenoles y su papel en la resistencia vegetal contra hongos patógenos. Por ejemplo, en un estudio realizado por Adesanya *et al.*, en 1986, sobre la toxicidad de diversos flavonoides en *Aspergillus niger* y *Cladosporium cucumerium*, se encontró que los flavonoides interactúan con las propiedades lipofílicas de las membranas celulares de los hongos. Esta interacción puede actuar en la porosidad de la membrana, inhibir ciertas enzimas o afectar el ADN de transcripción. Ellos sugieren que cada flavonoide pueda tener un efecto antifúngico diferente en función de los grupos sustituyentes de su anillo aromático (hidroxi, metil, y metoxi).

En otro estudio realizado por Weidenbörner, *et al.*, en 1989, en cual se probó la actividad antifúngica *in vitro* de diez isoflavonoides con diferentes sustituyentes en sus

anillos aromáticos, sobre siete especies del género *Aspergillus*; se encontró que los hongos pueden variar su susceptibilidad a los isoflavonoides en función del grupo y número de sustituyentes en el anillo aromático. Weidenbörner, *et al.*, 1989, encontraron que dos grupos hidroxilos en el anillo aromático de los isoflavonoides fueron suficientes para inhibir el crecimiento de algunos hongos del género *Aspergillus*. También observaron que el compuesto que mostró mayor efecto de inhibición, en concentración alta, inhibió el crecimiento de todos los hongos. Ellos proponen que la suma de grupos polares y la posición de los sustituyentes en la molécula determina la actividad fungistática.

En los estudios anteriormente descritos se probó la actividad de los compuestos solos. En 1998, Silva, *et al.*, probaron el efecto *in vitro* de cinco flavonas y sus mezclas con una flavona insustituída y una flavonona, a diferentes concentraciones, sobre cinco especies del género *Fusarium* colonizadoras de granos. Observaron que las mezclas de algunos flavonoides inhibían más el crecimiento de los hongos que los compuestos solos en todas las dosis, especialmente en las altas. Ellos sugieren que la actividad antifungistática de los flavonoides (dependiendo del número, tipo y localización de sustituyentes) puede aumentar por un efecto sinérgico de los compuestos al mezclarse.

Además de la toxicidad de los compuestos fenólicos como compuestos solos o en mezclas, se ha sugerido que la oxidación de estos compuestos (por procesos enzimáticos realizados por los hongos como mecanismos de detoxificación), puede producir compuestos nuevos que actúen directamente como tóxicos en los hongos o bien inhiban indirectamente su crecimiento dificultando la disponibilidad de nutrientes (Dowd, *et al.*, 1997).

2.4 Sistema de estudio

2.4.1 *Fusarium graminearum* Schwabe (Deuteromycetes: Moniliaceae)

Hongo de campo que causa la pudrición de la mazorca de maíz y la roña del trigo, avena y cebada. En el maíz se localiza preferentemente en el tejido epidérmico de los granos de maíz (Fischer, *et al.*, 1992), en donde se encuentran concentraciones altas de los ácidos fenólicos (Arnason, *et al.*, 1992).

Las colonias de *F. graminearum* en el medio papa-dextrosa-agar (PDA) crecen rápidamente y presentan un micelio blanco abundante con apariencia algodonosa. En pocos días el reverso de la colonia presenta un color rojo brillante en el agar (Moreno, 1988). Cuando se desarrolla en condiciones de baja temperatura (otoño, invierno), *F. graminearum* puede formar una micotoxina, la zearalenona, que causa desórdenes en los órganos reproductores en los cerdos, infertilidad y aborto (Moreno, 1988).

Este hongo se caracteriza por presentar macroconidios largos y clamidosporas. No presenta microconidios. Cuando presenta esclerocios éstos son de color rosa pálido, púrpura o rojo intenso. Los macroconidios más abundantes presentan cinco septos. El color de la colonia puede ser rosa, rosa pálido, rosa-gris, rojo o café, carmín y en ocasiones amarillo (Moreno, 1988).

2.4.2 *Fusarium moniliforme* Schwabe (Deuteromycetes: Moniliaceae)

Hongo con amplia distribución e importancia económica; entre sus principales hospederos se encuentran el maíz, el arroz, la caña de azúcar y el plátano, a los que

ocasiona ahogamiento, pudriciones y marchitez foliar entre otras enfermedades (Romero, 1993). En el maíz causa infección en los tallos de las plantas y puede llegar hasta la base de los granos, donde causa pudrición de la mazorca en puntos dispersos. En condiciones de almacenamiento crece en los orificios hechos por gusanos e insectos que atacan la mazorca. Para desarrollarse requiere grandes contenidos de humedad, por lo que en un almacenamiento normal interrumpe su desarrollo. Sin embargo, si el maíz no es desgranado y las mazorcas se almacenan húmedas, este hongo continúa su crecimiento (Moreno, 1988).

Esta especie es productora de varias micotoxinas: zearalenona, moniliformina y fusarina. Se ha encontrado que el ácido fusárico inhibe la acción de las enzimas de destoxificación en insectos herbívoros (Dowd, 1989).

F. moniliforme se caracteriza por tener coloración rosa y grandes esporas: macroconidios curvos y microconidios ovoides en cadenas. Los macroconidios son producidos por esporodoquios o en micelio aéreo, y los más abundantes presentan tres septos. Las colonias son de color blanco, durazno, crema pálido, violetas o lilas. Su aspecto es pulverulento (Moreno, 1988).

2.4.3 *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyder & Hansen (Deuteromycetes: Moniliaceae)

Especie del género *Fusarium* con la mayor distribución e importancia económica. Los cultivos de tomate, papa, chícharo, cebolla, col, rábano, pepino, melón, sandía, plátano, café, tabaco, algodón, lino, son algunos de sus numerosos hospederos. En el maíz se localiza preferentemente en el tejido epidérmico de los granos de maíz (Fischer, *et al.*, 1992). *F. oxysporum* es un excelente habitante del suelo, por lo que una vez establecido ahí permanece indefinidamente (Romero, 1993). Existen estudios que muestran que *F. oxysporum* tiene potencial antagonístico contra nemátodos parásitos de plantas (Hallman & Sinhora, 1996).

Este hongo causa marchitez vascular en sus hospederos y produce micotoxinas: zearaleona, moniliformina (Moreno, 1988). La especie está integrada por formas especiales asociadas a determinados cultivos. En la mayoría de los casos de marchitez del cultivo se han encontrado individuos o variedades resistentes al patógeno, las cuales han servido para el desarrollo de variedades resistentes (Romero, 1993).

F. oxysporum se caracteriza por presentar conidioforos hialinos, simples; hifas cortas o no bien diferenciadas; macroconidios con cuatro septos y microconidios elípticos unicelulares. Los clamidosporos son globosos, solitarios y de color café (Watanabe, 1994).

2.4.4 *Phoma herbarum* Westened. (Deuteromycetes: Sphaeropsidaceae) (=*P. urticares*, *P. oleracea*, *P. violacea*, *P. pigmentivora*, *P. hibernica* y *P. lignicola*)

El género *Phoma* se encuentran ampliamente distribuido y usualmente se presenta como patógeno en muchas plantas, tanto herbáceas como leñosas. Su actividad patógena está considerablemente restringida a los cultivos de cereales y pastos (Zillinsky, 1984). Este género se caracteriza por presentar picnidios negros, globosos, los cuales pueden estar inmersos en el tejido hospedante o desarrollarse superficialmente, provistos de un ostiolo corto. Sus conidioforos son simples y los conidios pequeños, unicelulares, hialinos ovales o

alargados. Los clamidosporos son solitarios, de color café oscuro y granulados (Watanabe, 1994).

Las especies del género *Phoma* se observan frecuentemente como invasores secundarios en hojas y brácteas florales de los cereales durante la etapa de maduración (Zillinsky, 1984). Se han registrado 1600 formas de este hongo, las cuales tienen hospederos en abundancia: plátano, remolacha, cítricos, tomate, hule, achiote, apio, espárrago, etc. (Romero, 1993).

Las especies huésped de *Zea mays* son *Phoma americana*, *P. terrestris* y *P. zeicola* (Farr, et al., 1989). *Phoma herbarum* se considera un hongo saprobio (Farr, et al., 1989).

2.4.5 *Penicillium oxalicum* Currie & Thom (Deuteromycetes: Moniliaceae)

El género *Penicillium* incluye hongos de almacén y de campo: las especies consideradas de almacén requieren contenidos de humedad de alrededor del 20%, en los cereales que invaden. Estos hongos pueden crecer a temperaturas muy bajas (-2°C). Algunos de ellos son considerados toxígenos, por su capacidad de producir micotoxinas (patulina, ocratoxina, citrinina, ácido penicílico, islanditoxina, rubratoxinas).

Las especies de éste género reducen el poder germinativo de las semillas almacenadas. Las colonias tienen un micelio de aspecto polvoso de color verde o azul verdoso. Los conidióforos son largos, septados ramificados cerca del ápice en uno, dos o más verticilos, que le dan apariencia de cepillos. Los conidios se forman en cadenas (Moreno, 1988).

Penicillium oxalicum, generalmente existe en la naturaleza como saprobio en el suelo y en restos de plantas (Farr, et al, 1989), pero bajo ciertas condiciones puede llegar a ser un parásito y causar infecciones en plantas de maíz (moho azul del maíz) y tizón de plántulas de sorgo (Romero, 1993).

2.4.6 Ácidos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos secundarios que se caracterizan por presentar un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos tienen propiedades ácidas, son ligeramente solubles en agua y tienden a formar puentes de hidrógeno con otras moléculas, incluyendo metabolitos secundarios (Waterman & Mole, 1994). Incluyen taninos, flavonoides, quinonas y fenoles simples. A este último grupo pertenecen los ácidos fenólicos (Herrman, 1989).

Los principales ácidos fenólicos que se encuentran en los granos del maíz, trigo, cebada, arroz y avena son los ácidos: trans-ferúlico, *p*-cumárico, sinápico, vainillico y caféico. 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 (Herrman, 1989; Sen, et al., 1994).

Los compuestos fenólicos se han relacionado con la resistencia de las plantas a herbívoros y patógenos (Waterman & Mole, 1994), por ejemplo, se ha reportado una correlación positiva entre la concentración total de compuestos fenólicos, en los granos de diferentes variedades de maíz, y su resistencia contra el consumo de *Sitophilus zeamais* (Serratos, et al., 1987). Además se ha sugerido que los ácidos ferúlico y trans-*p*-cumárico pueden afectar la sobrevivencia y el desarrollo de las larvas de *Sitophilus zeamais* y *Prostephanus truncatus* dos plagas del grano de maíz, y que este efecto puede aumentar al

mezclar ambos compuestos (Sen, *et al.*, 1994). Por otra parte se ha reportado que el ácido tánico puede inhibir la transmisión del virus de mosaico del tabaco y que las fitoalexinas pueden tener un efecto fungicida (Adesanya, *et al.*, 1986).

También se ha sugerido que la resistencia de coníferas a insectos descortezadores y hongos patógenos puede estar relacionada con compuestos fenólicos, especialmente con fenoles simples en su rol de mezclas. Se ha propuesto que los fenoles simples pueden tener un mayor efecto que los taninos en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos, así como el efecto de sus mezclas puede aumentar el efecto de inhibición a concentraciones que ocurren naturalmente en los pinos, en el crecimiento *in vitro* de hongos patógenos, aún de especies muy especializadas (Hemingway, *et al.*, 1977).

3. HIPÓTESIS

Una mayor diversidad y concentración de metabolitos secundarios proveen una mejor defensa a las semillas de maíz contra el ataque de los hongos que una diversidad y concentración bajas.

La hipótesis se probó analizando el efecto de la variación en el tipo, número y concentración de cinco ácidos fenólicos, comunes en gramíneas; sobre el crecimiento *in vitro* de cinco hongos, acarreados en semillas de maíz y con diferente grado de especialización como patógenos de cereales: *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Investigar la función de la diversidad de los metabolitos secundarios en la defensa vegetal contra hongos

4.2 Objetivo Particular

Explorar la función de la diversidad de los metabolitos secundarios en la respuesta de hongos patógenos con diferentes grado de especialización en gramíneas.

3. HIPÓTESIS

Una mayor diversidad y concentración de metabolitos secundarios proveen una mejor defensa a las semillas de maíz contra el ataque de los hongos que una diversidad y concentración bajas.

La hipótesis se probó analizando el efecto de la variación en el tipo, número y concentración de cinco ácidos fenólicos, comunes en gramíneas; sobre el crecimiento *in vitro* de cinco hongos, acarreados en semillas de maíz y con diferente grado de especialización como patógenos de cereales: *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Investigar la función de la diversidad de los metabolitos secundarios en la defensa vegetal contra hongos

4.2 Objetivo Particular

Explorar la función de la diversidad de los metabolitos secundarios en la respuesta de hongos patógenos con diferentes grado de especialización en gramíneas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECTA Y CULTIVO DE ORGANISMOS

5.1.1. Aislamiento de los hongos

Se prepararon medios de cultivo de agar (A) y de agar-sal (AS) para aislar a algunos de los hongos que atacan a los granos de maíz cacahuacintle. Para preparar los medios A se agregaron 1.7 g de agar en 100 ml de agua. A los medios AS se les agregó 0.4 g de cloruro de sodio para inhibir la germinación de los granos de maíz. Ambos fueron esterilizados a 15 libras de presión y 120 ° C por 20 minutos. Estos medios fueron vaciados a cajas Petri de 9 cm de diámetro en condiciones estériles y refrigerados durante 24 horas (Moreno, 1988).

Se tomaron 55 granos de maíz y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 3 min. Enseguida se enjuagaron dos veces con agua estéril, quitando el exceso por decantación. Se sembraron 10 granos de maíz por caja Petri y se incubaron a 25°C durante 7 días (Moreno, 1988). Después de 5 días se observaron colonias de cinco hongos diferentes. Para identificarlos, se sembraron en cajas Petri que contenían como medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Este medio se preparó agregando 3.9 g de PDA de la marca Bioxon en 100 ml de agua y fué esterilizado a 15 libras de presión y 120°C durante 20 minutos.

5.1.2 Identificación de los hongos

Las especies de los hongos fueron identificadas en el Laboratorio de Micología del Instituto de Biología, UNAM, por la M. en C. Rebeca Martínez Flores.

Las especies se identificaron como: *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyder & Hansen, *Phoma herbarum* Westened y *Penicillium oxalicum* Currie & Thom.

5.1.3 Pruebas de solubilidad de metabolitos secundarios (MS)

Para poder incorporar los metabolitos secundarios al medio de cultivo se tuvieron que realizar ensayos de solubilidad con varios disolventes, evitando que los hongos resultaran afectados por el disolvente. Primero se probó con etanol y acetona: la cantidad mínima de etanol y acetona para disolver 1.0 mg de los ácidos fenólicos (1ml y 0.5ml respectivamente) fue adicionada a 10ml de PDA, para preparar los medios de cultivo. Cada tratamiento se realizó con tres repeticiones. Posteriormente se sembraron las cinco especies de hongos en PDA, PDA/etanol y PDA/ acetona. Se tomó una porción circular de 4 mm de diámetro con un sacabocado, de cada uno de los hongos y se sembró en los tres medios de cultivo. Los cultivos se incubaron a 25°C por 5 días (Silva, *et.al*, 1998). Se midió el diámetro de las colonias. Los resultados mostraron que el etanol inhibía fuertemente el crecimiento de todos los hongos y que la acetona modificaba la apariencia de *F. moniliforme* y *F. oxysporum*, e inhibía el crecimiento de los demás hongos.

También se experimentó la solubilidad de los metabolitos secundarios con tween-20. Con cuatro gotas de esta solución de ácidos grasos los ácidos fenólicos (ferúlico, caféico, vainillíco, sináptico, *p*-cumárico)se solubilizaron en 10 ml de agua. Se procedió a preparar

los medios de cultivo con PDA: a 30 ml de PDA se les agregó 10 ml de agua estéril con 4 gotas de tween-20 y se vaciaron en cajas de Petri. Se prepararon dos repeticiones de cada tratamiento y un blanco (PDA más tween-20). Se sembraron en cada tratamiento porciones cilíndricas de 4 mm de diámetro, tomadas del borde de las colonias. Se incubaron a 25°C por cinco días y se midió el crecimiento de los hongos (Silva, *et al.*, 1998). No se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos testigo.

Para cada hongo se sembraron once colonias en medio de cultivo malta-agar (MA), preparados con 10 g de malta y 10 g de agar por litro de agua, y se incubaron a 25°C.

5.2 Preparación de medios de cultivo

Para estudiar las respuestas de crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum*, a la diversidad química se utilizaron medios de cultivo a los que se les incorporó cinco ácidos fenólicos. Estas respuestas fueron primero estudiadas en cinco ensayos independientes, uno para cada especie, para seleccionar los tratamientos que causaban mayor inhibición y hacer después un ensayo simultáneo con todos los hongos.

Los medios de cultivo se prepararon con PDA: para 100 ml de medio se agregaron 3.9 g de PDA en 100 ml de agua destilada mezclando perfectamente y esterilizando a 20 lb de presión y 120° C por 15 minutos (Moreno, 1988). A estos medios de cultivo se les agregaron ácidos fenólicos solos y mezclados.

Los ácidos fenólicos utilizados fueron:

- Ácido caféico (C; ácido 3,4-dihidroxicinámico)
- Ácido ferúlico (F; ácido 4-hidroxi-3metoxicinámico)
- Ácido *p*-cumárico (P; ácido 4-hidroxicinámico)
- Ácido sinápico (S; ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)
- Ácido vainílico (V; ácido 4-hidroxi-3metoxibenzoico)

En los ensayos independientes las combinaciones de estos compuestos en la mezcla (Tabla 1) se escogieron al azar y fueron:

- Mezclas con dos compuestos: **CF, CV, PS, VS**
- Mezclas con tres compuestos: **CPF, CVS, PVF, VFS**
- Mezclas con cuatro compuestos: **CPVS, FCVS, PCFS, PVSF**
- Mezcla con cinco compuestos: **CPVSF**

Se utilizaron tres concentraciones para cada tratamiento: 0 (sin MS) 0.5, 2.5 y 5.0 mg de MS por ml de PDA y un testigo. La concentración total de metabolitos secundarios en cada medio de cultivo fue la misma tanto para las mezclas como para los compuestos individuales. En las mezclas se agregaban los MS en cantidades iguales hasta obtener la concentración deseada. Los tratamientos sin MS se usaron como testigos para comparar el crecimiento.

Los compuestos y las mezclas fueron incorporados al medio de cultivo disueltos en agua. Se tomaron 9 ml de la solución de PDA en un matraz Erlenmeyer a los que se les agregó 1ml de agua estéril con 4 gotas de tween-20 y la cantidad de MS para cada tratamiento. Esta mezcla se calentó en baño María agitando el matraz suavemente para facilitar la disolución de los compuestos secundarios. Una vez disuelta la mezcla se vació en cinco tubos de ensayo, uno por repetición, cada uno con 2 ml de medio. Se taparon con algodón y se acomodaron horizontalmente en una charola con una pequeña inclinación. Una vez que el PDA gelificó, se refrigeraron a 8°C durante 7 días. Para cada tratamiento

(18) había tres dosis, cada una con cinco repeticiones. El tratamiento testigo para cada experimento contaba con quince repeticiones.

5.3 Experimentos y toma de datos

5.3.1 Experimentos individuales

Se realizaron cinco experimentos, uno para cada especie utilizando las cepas que crecían en malta-agar como medio de cultivo. El diseño experimental fue factorial: tipo de mezcla por concentración (18x3), arreglado completamente al azar.

Para sembrar los hongos se tomaron porciones cilíndricas de 4 mm de diámetro, cortados con un sacabocado, y se acomodaron con una espátula hasta el fondo de los tubos, que contenían los tratamientos. Los tubos se taparon con algodón, papel aluminio y parafilm. Se incubaron a 25°C en condiciones de obscuridad, durante siete días (Silva, *et al.*, 1998). Después de siete días se midió en milímetros el crecimiento longitudinal de los hongos y se expresaron estos datos como proporción del crecimiento con respecto al testigo.

5.3.2 Experimentos simultáneos con cinco especies de hongos

Las respuestas de crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum* en los cinco ensayos independientes, mostraron los tratamientos que causaban mayor inhibición en todos los hongos. Esto permitió planear un experimento simultáneo eliminando tratamientos (Tabla 1). El diseño experimental fue factorial: tipo de hongo x tipo de mezclas (5X11), arreglado completamente al azar.

Los tratamientos seleccionados fueron:

Compuestos individuales: P, V, S, F
Mezclas con dos compuestos: VS, PS
Mezclas con tres compuestos: VSF, PVF
Mezclas con cuatro compuestos: PCFS, PVSF
Mezcla con cinco compuestos: CPVSF

En este experimento se aumentó el número de repeticiones a ocho, en vez de cinco. El número de tratamientos con sus repeticiones (980) implicaba mucho tiempo para sembrar; por lo que se optó por dividir este experimento en dos. En el primer experimento se utilizó una concentración baja (0.5 mg/ml de PDA). En el segundo se utilizó una concentración alta (5.0 mg/ml de PDA). En ambos se preparó un tratamiento sin MS que sirvió como testigo para comparar el crecimiento. Los tratamientos se prepararon usando el método antes descrito. En los dos experimentos, para cada tratamiento (11) había una dosis, cada una con ocho repeticiones.

Se utilizaron cepas de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum*, que crecían en MA como medio de cultivo y se sembraron en los tratamientos con sus repeticiones, utilizando el método antes mencionado. Se incubaron a 25°C en condiciones de obscuridad, durante siete días. Se midió el crecimiento longitudinal de cada uno de los hongos, expresando los resultados como la proporción del crecimiento con respecto al testigo.

Los tratamientos sembrados con *Penicillium oxalicum*, en los dos últimos experimentos se contaminaron con esporas del mismo hongo, de forma tal que los cultivos presentaban un crecimiento disperso que imposibilitaba la medición. Se procedió a pesar sus hifas para

TABLA 1. Tratamientos utilizados en los experimentos individuales y simultáneos (*).

Tratamiento	Compuestos individuales y sus mezclas
1	ácido cafeico C
2	ácido p-cumárico P *
3	ácido vainílico V*
4	ácido sinápico S*
5	ácido ferúlico F*
6	ácidos cafeico, p-cumárico, vainílico, sinápico y ferúlico CPVSF*
7	ácidos cafeico, p-cumárico, vainílico y sinápico CPVS
8	ácidos p-cumárico, vainílico, sinápico y ferúlico PVSF*
9	ácidos ferúlico cafeico, vainílico, sinápico FCVS
10	ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico PCFS*
11	ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico CPF
12	ácidos p-cumárico, vainílico y ferúlico PVF*
13	ácidos vainílico, ferúlico y sinápico VFS*
14	ácidos cafeico, vainílico y sinápico CVS
15	ácidos cafeico, y vainílico CV
16	ácidos cafeico y ferúlico CF
17	ácidos p-cumárico y sinápico PS*
18	ácidos vainílico y sinápico VS*

Los tratamientos sembrados con *Penicillium oxalicum*, en los dos últimos experimentos se contaminaron con esporas del mismo hongo, de forma tal que los cultivos presentaban un crecimiento disperso que imposibilitaba la medición. Se procedió a pesar sus hifas para medir el efecto de las mezclas de MS en el crecimiento del hongo. Para ello se derritió el medio de cultivo con el hongo en baño María durante 15 min y se filtró con un embudo Büchner. Los filtrados se hicieron a través de papel Whatman No. 4 de 9 cm de diámetro previamente secado y pesado para después secarlos en un horno a 80°C durante 24 horas y finalmente pesarlos. La proporción de peso de las hifas para cada tratamiento y repetición se calculó utilizando el peso de los filtros de los tratamientos testigo.

5.4 Análisis de resultados

Se analizaron las respuestas de crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F.moniliforme*, *F. oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum* a mezclas de metabolitos secundarios, en función de la concentración y del tipo de compuestos en la mezcla mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías.

Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de t-Tukey para analizar el efecto del tipo compuesto sobre el crecimiento de los hongos.

También se analizaron las respuestas en función del número de MS y de la concentración presentes en el medio de cultivo mediante otro análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías.

Estos análisis se realizaron con el programa Statistica (CSS 1993).

6. RESULTADOS

6.1. Experimentos individuales

6.1.1 *Fusarium graminearum*

Los datos de crecimiento con respecto al testigo, no mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, Cochran y Barlett, aún después de su transformación. Así mismo las medias y las varianzas no mostraron correlación. Además, los residuales mostraron normalidad con la prueba gráfica de los residuales observados contra los esperados. Por lo anterior los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías (Sokal & Rohlf, 1969).

El crecimiento de *Fusarium graminearum* fue afectado significativamente por el tipo de compuesto, la concentración y la interacción de ambas variables (Tabla 2).

TABLA 2. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de compuesto y la concentración sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum*.

EFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	17	0.0039	6.8657	< 0.000001
Concentración	2	0.0636	109.3293	< 0.000001
Interacción	34	0.0027	4.7663	< 0.000001
Error	188	0.0005		

La variación en el crecimiento de *F. graminearum* es explicada por la concentración de MS en un 90%, 5% por el tipo de compuesto, 4% por la interacción y el resto por el error. Al hacer una comparación múltiple del efecto de la concentración sobre el crecimiento, se observó que en los medios de cultivo con concentración alta de MS, *F. graminearum* creció menos que en medios con concentraciones media y baja (Fig. 1). Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de tipo de compuesto sobre el crecimiento de *F. graminearum* se muestran en la Tabla 2. Al hacer comparaciones múltiples se encontró que el grupo C inhibió el crecimiento de *F. graminearum* entre un 32% y un 13%; este grupo incluye compuestos individuales (V, P), pares (PS), tercias (VSF, CVS) y cuartetos (CPVS, PVSF). Al comparar estas respuestas a las mismas concentraciones no se encontraron diferencias significativas entre sí, aunque si difieren significativamente del resto de los grupos de mezclas ($F = 4.74$; $p < 0.00001$). La interacción tipo de compuesto y concentración, solo explicó en un 4% la variación en el crecimiento de *F. graminearum* (Fig.2), sin embargo, fué altamente significativa. Esto se puede explicar porque las respuestas al ácido vainílico (V), sinápico (S) y a las mezclas CPVS y PVF difieren del resto. El ácido sinápico y la mezcla CPVS estimularon el crecimiento a concentración baja e inhibieron el crecimiento a concentración media, pero a concentración alta el efecto de inhibición disminuyó. El efecto total del ácido sinápico fue de estimulación y el de la mezcla CPVS de inhibición (Tabla 3).

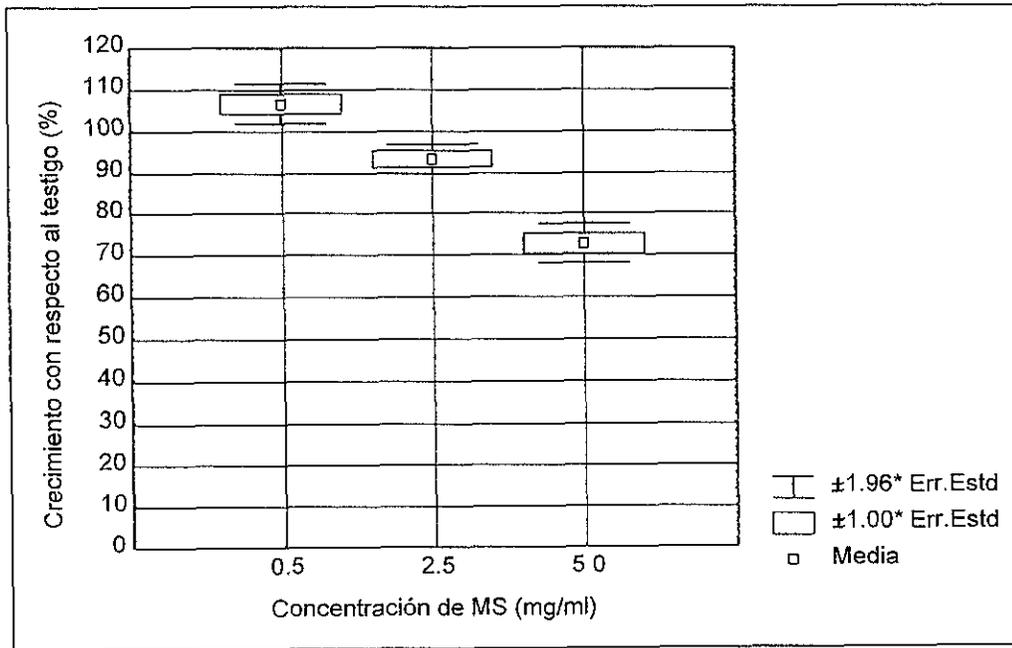


Fig. 1. Efecto de la concentración de MS sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum* $F(2,188)= 113.43$; $p<0.0001$.

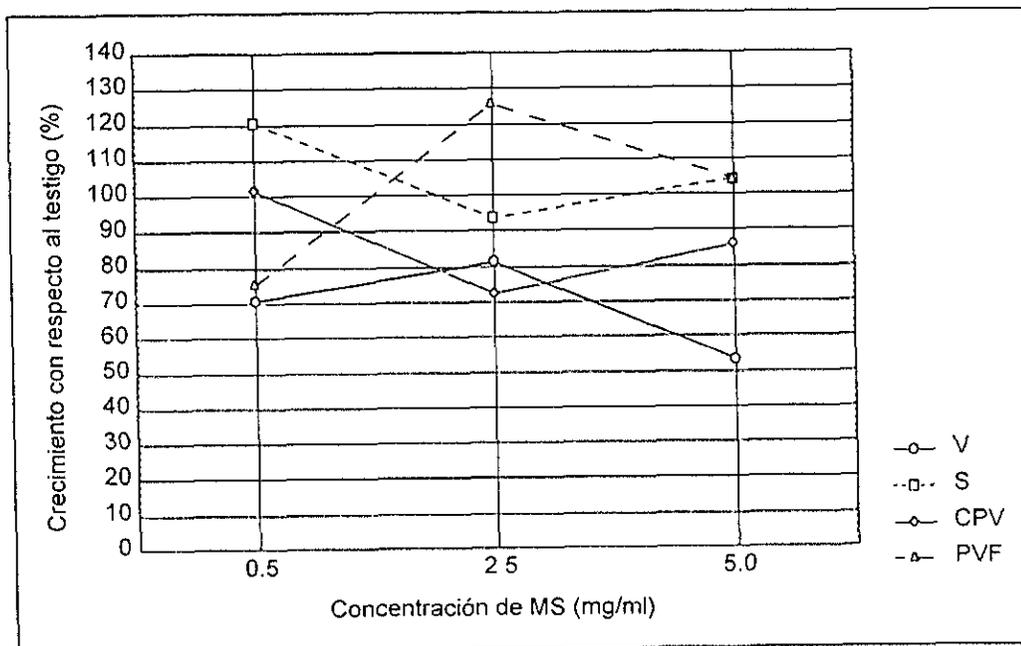


Fig. 2. Efecto de la interacción entre el tipo de compuesto y su concentración en el crecimiento de *Fusarium graminearum*, $F(34, 188)=5.11$; $p<0.0001$. Sólo se muestran las interacciones que difieren significativamente del resto de los tratamientos.

TABLA 3. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum* respecto al testigo. Los promedios agrupados bajo la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con diferente letra sí (g.l=17; alfa<0.0001).

GRUPO	CRECIMIENTO % respecto al testigo	N	TIPO DE COMPUESTO
A	105.8969	5	S
A	102.2255	5	CPF
A	101.4295	5	PVF
A	101.0429	5	VS
A B	97.1540	5	C
A B	95.6985	5	PCFS
A B	95.5848	5	CPVSF
A B	94.1521	5	CF
A B	90.8545	5	F
A B	89.0351	5	CV
A B C	86.5335	5	CPVS
A B C	83.9864	5	CVS
A B C	82.9630	5	PS
B C	82.9630	5	PVSF
B C	80.5068	5	VFS
C	77.5049	5	P
C	68.2261	5	V

La mezcla PVF estimuló el crecimiento del hongo a concentración media y alta. Su efecto total fue de estimulación (Fig. 2). El ácido vainílico (V) disminuyó el efecto de inhibición a concentración media. Sin embargo, su efecto total fue de inhibición (Tabla 3).

El crecimiento de *F. graminearum* fué afectado por la concentración y por la interacción de ésta con el número de compuestos (Tabla 4). La concentración explica en un 89% y la interacción en un 7% la variación en la respuesta de crecimiento de *F. graminearum*. El número de compuestos fue irrelevante en su influencia sobre el crecimiento del hongo. Esto ocurrió a pesar de que el efecto de la concentración de los metabolitos secundarios en el crecimiento de *F. graminearum*, fue mayor en los tratamientos con uno, dos y cuatro compuestos (Fig.3).

TABLA 4. Resultados del análisis de varianza de dos vías de para evaluar el efecto del número de metabolitos secundarios y su concentración en el crecimiento de *Fusarium graminearum*.

EFFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Concentración	2	0.0399	34.9425	< 0.0001
Número de compuestos	4	0.0007	0.6398	0.6346
Interacción	8	0.0032	2.8967	0.0043
Error	227	0.0011		

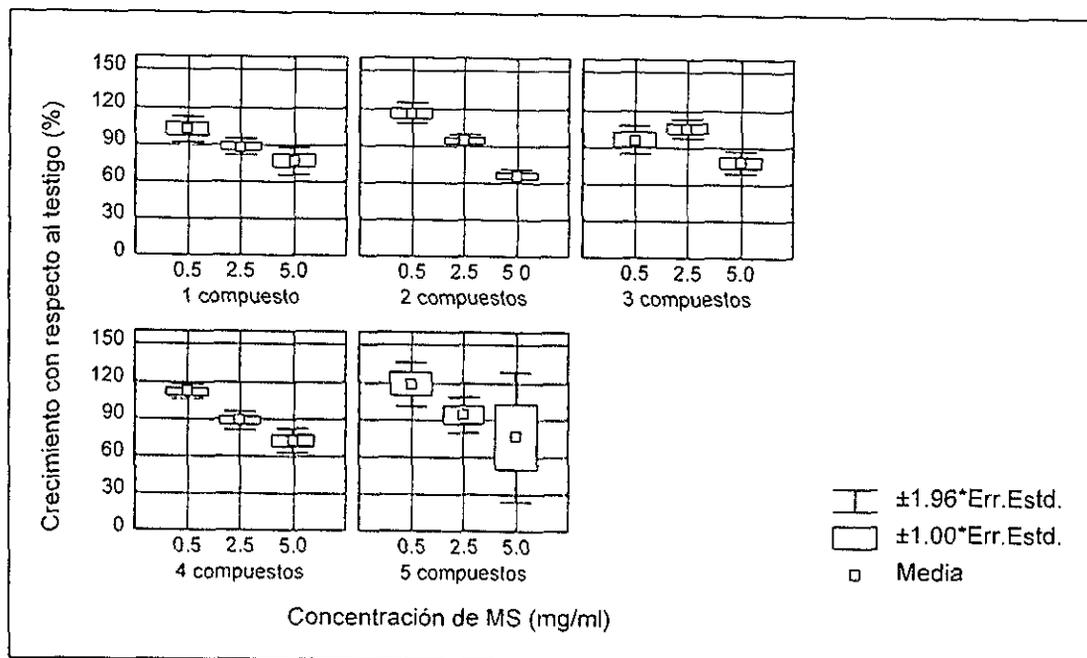


Fig. 3. Efecto de la interacción entre la concentración y el número de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Fusarium graminearum* $F(8,227) = 2.9$; $p < 0.0043$.

6.1.2 *Fusarium moniliforme*

Los datos de crecimiento con respecto al testigo, no mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, Cochran y Barlett. Las medias no mostraron correlación con las varianzas. Los residuales mostraron normalidad en la prueba gráfica de valores observados contra los esperados.

La respuesta de crecimiento de *F. moniliforme* fue afectada significativamente por el tipo de compuesto, dosis y la interacción de ambas (Tabla 5). El 92 % de la variación en el crecimiento del hongo, es explicada por la concentración y el 6% por el tipo de compuesto; 2% por la interacción de las dos variables y el resto por el error. Los resultados de la comparación múltiple del efecto de la concentración de MS en el medio de cultivo sobre el crecimiento de *F. moniliforme*, mostraron que al aumentar ésta el crecimiento del hongo disminuyó (Fig. 4).

TABLA 5. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de compuesto y su concentración sobre el crecimiento de *Fusarium moniliforme*.

EFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	17	0.0685	72.333	< 0.001
Concentración	2	1.0863	1146.358	< 0.001
Interacción	34	0.02427	25.536	< 0.001
Error	194	0.0009		

Los resultados de la comparación múltiple del efecto del tipo de compuesto en el medio de cultivo sobre el crecimiento de *F. moniliforme*, se muestran en la Tabla 6. El grupo F solo incluye a un compuesto individual, el ácido *p*-cumárico (P), el cual inhibió el crecimiento de *F. moniliforme* hasta en un 63%. Este grupo es seguido por el grupo E que incluye un par (PS). Después está el grupo D que incluye una cuarteta (PVSF), tercias (CPF, PVF) un par (VS) y compuestos individuales (ácidos vainillico y ferúlico). Al comparar las respuestas de los grupos a las mismas concentraciones no se encontraron diferencias significativas entre sí, aunque si difieren significativamente entre grupos ($F=25.24$; $p<0.00001$). La interacción tipo de compuesto-concentración sólo explica en un 2% la variación en el crecimiento de *F. moniliforme*, sin embargo es altamente significativa. Esto puede explicarse por el efecto de la mezcla PS que fue diferente del resto: *F. moniliforme* mostró mayor inhibición con esta mezcla a dosis medias, pero esta inhibición disminuyó considerablemente al aumentar la concentración (Fig. 5). El efecto total de la mezcla PS fue de inhibición del 33% (Tabla 4).

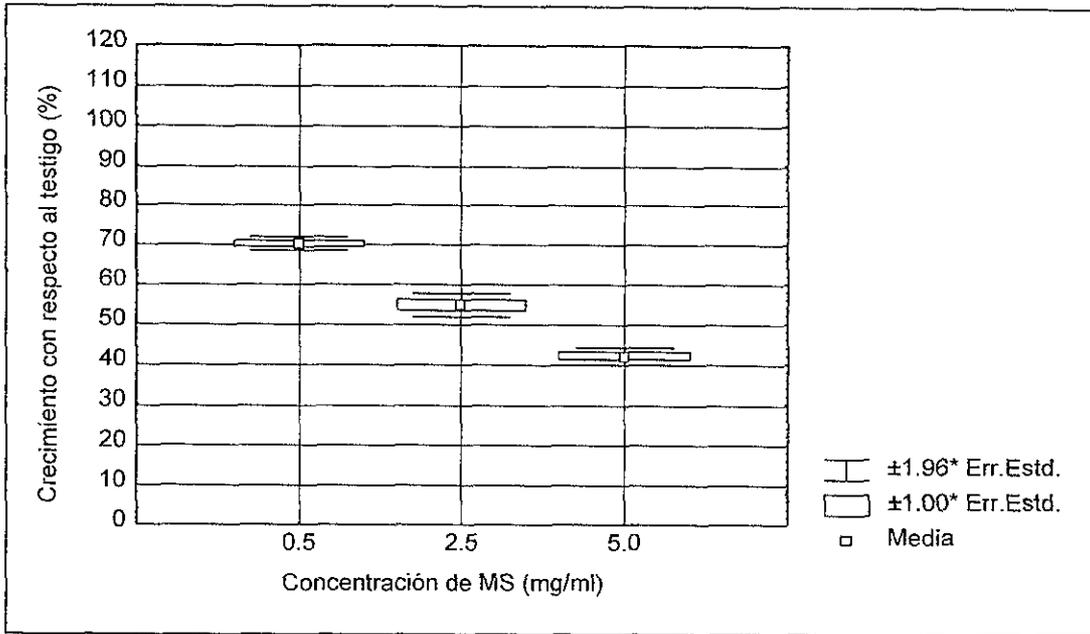


Fig. 4. Efecto de la concentración de MS en el crecimiento de *Fusarium moniliforme* $F(2,194) = 1189.2; p < 0.0001$.

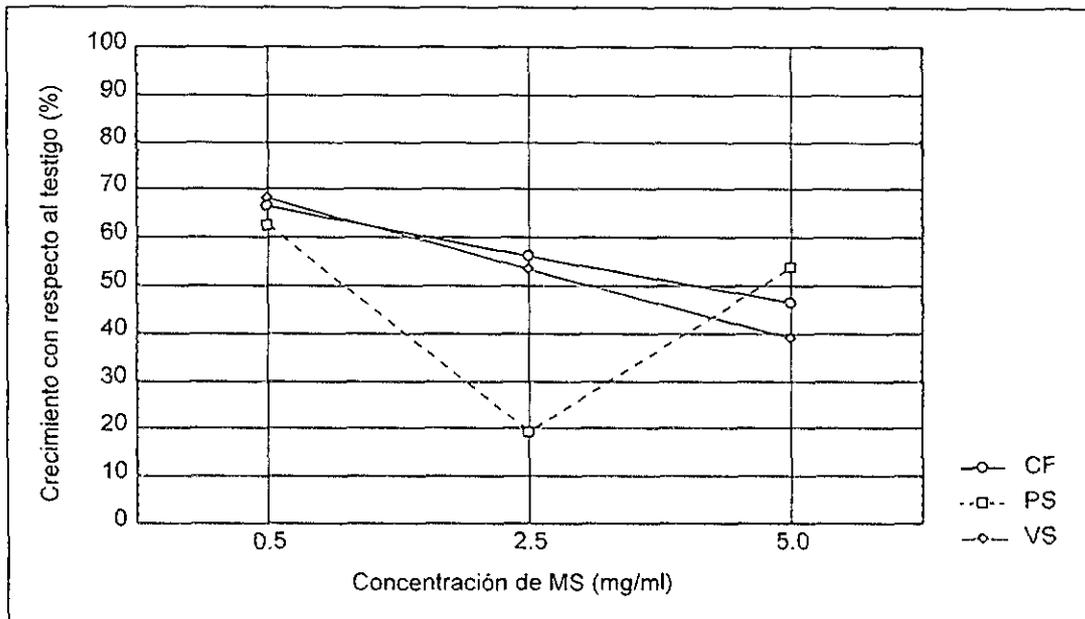


Fig. 5. Efecto de la interacción entre el tipo de compuesto y su concentración en el crecimiento de *Fusarium moniliforme*, $F(34,194) = 22.08; p < 0.0001$. Se muestran dos tratamientos con la tendencia general y el tratamiento (PS) que difiere significativamente del resto.

TABLA 6. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de compuesto de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de *Fusarium moniliforme* respecto al testigo. Los promedios agrupados bajo la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con diferente letra sí (g.l.=17; alfa<0.0001)

GRUPO	CRECIMIENTO % respecto al testigo	N	TIPO DE COMPUESTO
A	86.88	5	CPVS
A	86.06	5	CV
A	85.98	5	C
A B	80.87	5	VFS
B	80.82	5	PCFS
B	80.20	5	CVS
B C	78.74	5	S
B C	77.15	5	CF
C	76.92	5	CPVSF
C	76.21	5	FCVS
C D	75.87	5	CPF
C D	75.21	5	PVF
D	74.92	5	VS
D	73.38	5	F
D	72.01	5	PVSF
D	71.89	5	V
E	67.05	5	PS
F	57.59	5	P

El crecimiento de *F. moniliforme* fue afectado significativamente por la concentración (93%), el número de compuestos (3%) y la interacción de ambas variables (2%) (Tabla 7). El aumento en la concentración de metabolitos secundarios causó inhibición del crecimiento de *F. moniliforme* (Fig. 6). La inhibición en mezclas de dos compuestos a concentración media no fue diferente que a concentración alta. Los tratamientos con uno, tres y cinco compuestos mostraron una mayor inhibición del crecimiento de *F. moniliforme*, que los tratamientos con dos y cuatro compuestos (Fig. 7).

TABLA 7. Resultados de análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número de metabolitos secundarios y su concentración en el crecimiento de *Fusarium moniliforme*.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	p
Concentración	2	0.8474	104.3541	< 0.000001
Número de compuestos	4	0.0307	3.7905	0.005245
Interacción	8	0.0222	2.7375	0.006640
Error	233	0.0081		

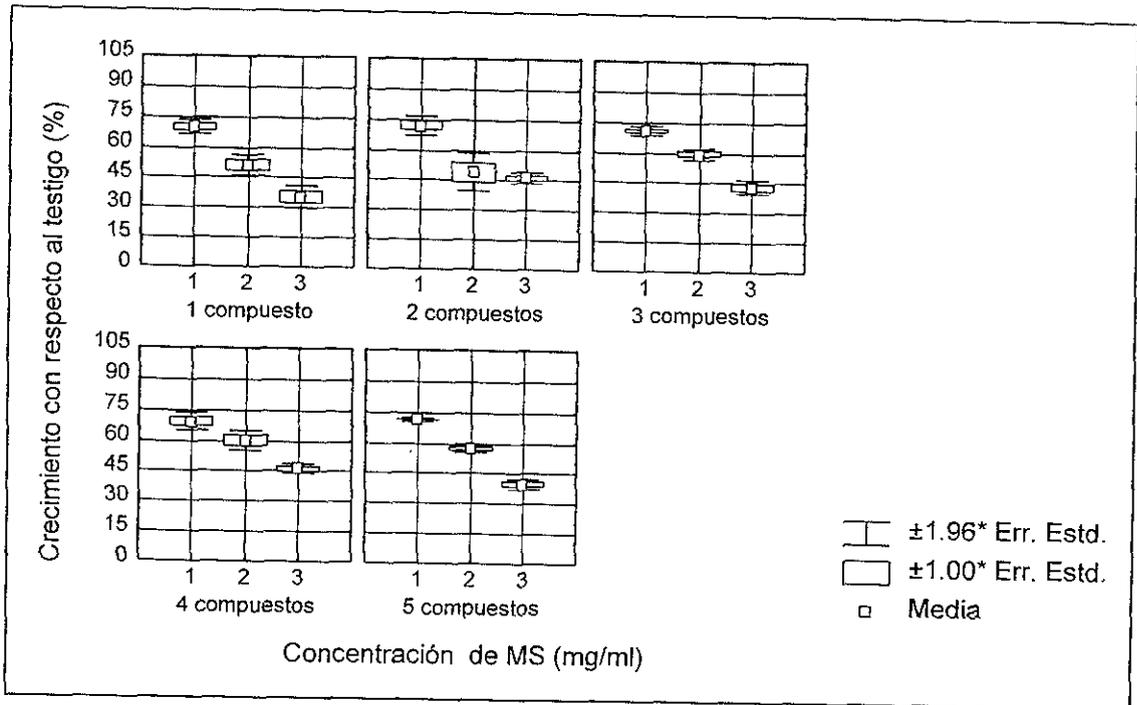


Fig. 6. Efecto de la interacción entre la concentración y el número de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Fusarium moniliforme* $F(8,233) = 2.7$; $p < 0.006$.

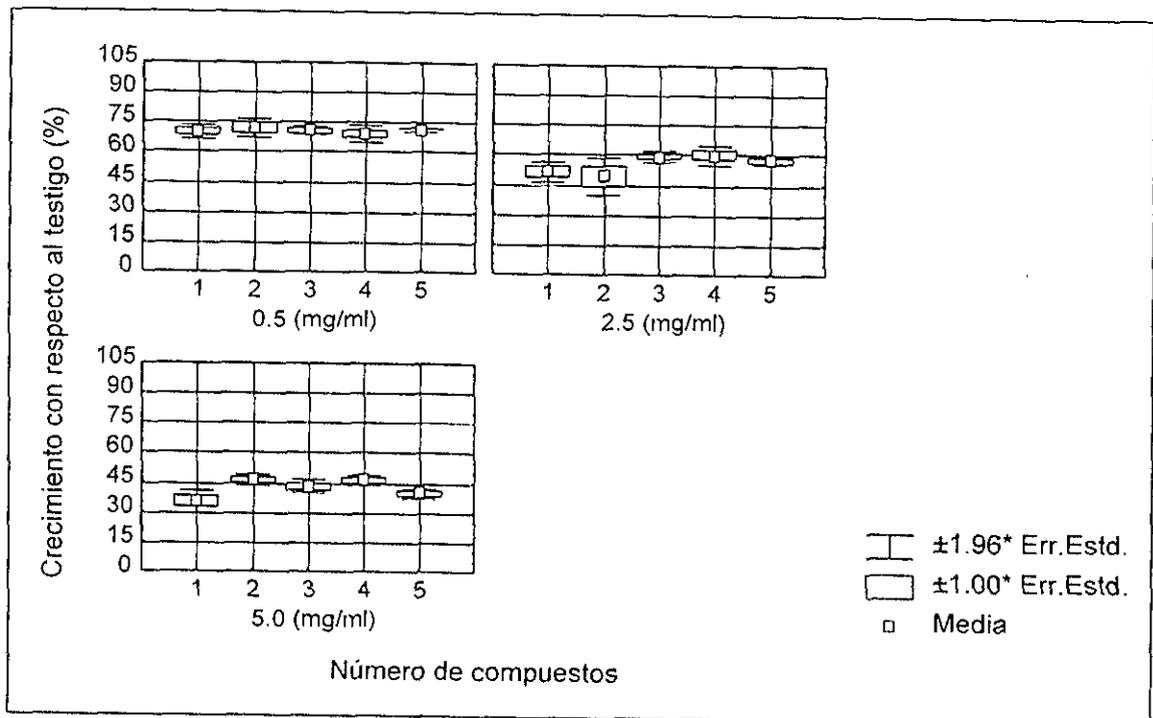


Fig. 7. Efecto de la interacción entre el número de metabolitos secundarios y su concentración en el crecimiento de *Fusarium moniliforme* $F(8,233) = 2.7$; $p < 0.006$.

6.1.3 *Fusarium oxysporum*

Los datos de crecimiento con respecto al testigo, mostraron homogeneidad de varianzas con la prueba de Hartley; pero no con las de Cochran y Barlett. Sin embargo las medias no mostraron correlación con las varianzas. Además los residuales mostraron normalidad en la prueba gráfica de valores observados contra los esperados.

El crecimiento de *Fusarium oxysporum* fue afectado significativamente por el tipo de compuesto, dosis y la interacción de ambas (Tabla 8). El 85 % de la variación en la respuesta del crecimiento del hongo, es explicada por la concentración, el 9% por el tipo de compuesto, el 6% por la interacción de las dos variables y el resto por el error. Los resultados de la comparación múltiple del efecto de la concentración de MS en el medio de cultivo sobre el crecimiento de *F.oxysporum*, muestran que el aumento en la concentración de MS inhibió el crecimiento del hongo (Fig. 8). Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de tipo de compuesto sobre el crecimiento de *F. oxysporum* se muestran en la Tabla 7. Las comparaciones entre el tipo de compuesto, mostraron que el grupo D que inhibió entre un 45% y un 32% el crecimiento de *F. oxysporum*, incluye pares (CF, PS), tercias (CVS, PVF), cuartetos (FCVS, PVSF) y la quinteta (CPVSF). Al comparar estas respuestas a las mismas concentraciones no se encontraron diferencias significativas entre sí, aunque si difieren significativamente de los otros grupos de mezclas ($F=122.28$; $p<0.00001$).

TABLA 8. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto de la concentración y el tipo de compuesto en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

EFEECTO	g. l.	C.M.	F	P
Tipo de compuesto	17	0.1183	175.944	< 0.001
Concentración	2	1.1506	1711.125	< 0.001
Interacción	34	0.0822	122.276	< 0.001
Error	199	0.0006		

La interacción entre el tipo de compuesto y su concentración sólo explica en un 6% la variación en el crecimiento de *F. oxysporum*, sin embargo, es altamente significativa. Esto puede explicarse porque las respuestas al efecto del ácido sinápico (S) y las mezclas VFS y CVS difieren significativamente del resto. La mezcla VFS inhibió fuertemente el crecimiento a concentración media y este efecto disminuyó en la concentración alta. La mezcla CVS inhibió el crecimiento a concentración alta en la misma proporción que en la concentración media. Por otra parte el ácido sinápico (S) inhibió fuertemente el crecimiento a concentración baja y media; pero a concentración alta esta inhibición disminuyó considerablemente (Fig. 9).

El crecimiento de *F. oxysporum* mostró ser afectado significativamente por la concentración (83%), el número de compuestos (7%) y la interacción de ambas variables

TABLA 9. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* respecto al testigo. Los promedios agrupados bajo la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con diferente letra sí (g.l=17; alfa<0.00001)

GRUPO	CRECIMIENTO % respecto al testigo	N	TIPO DE COMPUESTO
A	85.04	5	CPVS
A	84.61	5	P
A B	82.91	5	C
B	81.31	5	CV
B	79.55	5	PCFS
B	79.31	5	VFS
	76.69	5	S
C	74.77	5	VS
C	71.58	5	V
C	69.62	5	CPF
C D	68.27	5	CF
D	67.62	5	FCVS
D	66.30	5	PS
D	66.02	5	CVS
D	64.34	5	CPVSF
D	57.72	5	PVF
D	55.55	5	PVSF

(9%) (Tabla 11). El aumento en la concentración de los metabolitos secundarios inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Fig.10). El número de metabolitos secundarios en la mezcla tuvo un efecto diferente en el crecimiento de *F. oxysporum* a diferentes concentraciones (Fig. 11). A concentración baja los tratamientos con mezclas de tres compuestos inhibieron más el crecimiento. Al aumentar la concentración, las mezclas de tres y cinco inhibieron más el crecimiento del hongo que los tratamientos con uno, dos y cuatro compuestos. Sin embargo a concentración alta, ésta y no el número de compuestos inhibió el crecimiento del hongo pues todas las mezclas mostraron un efecto similar (Fig. 11).

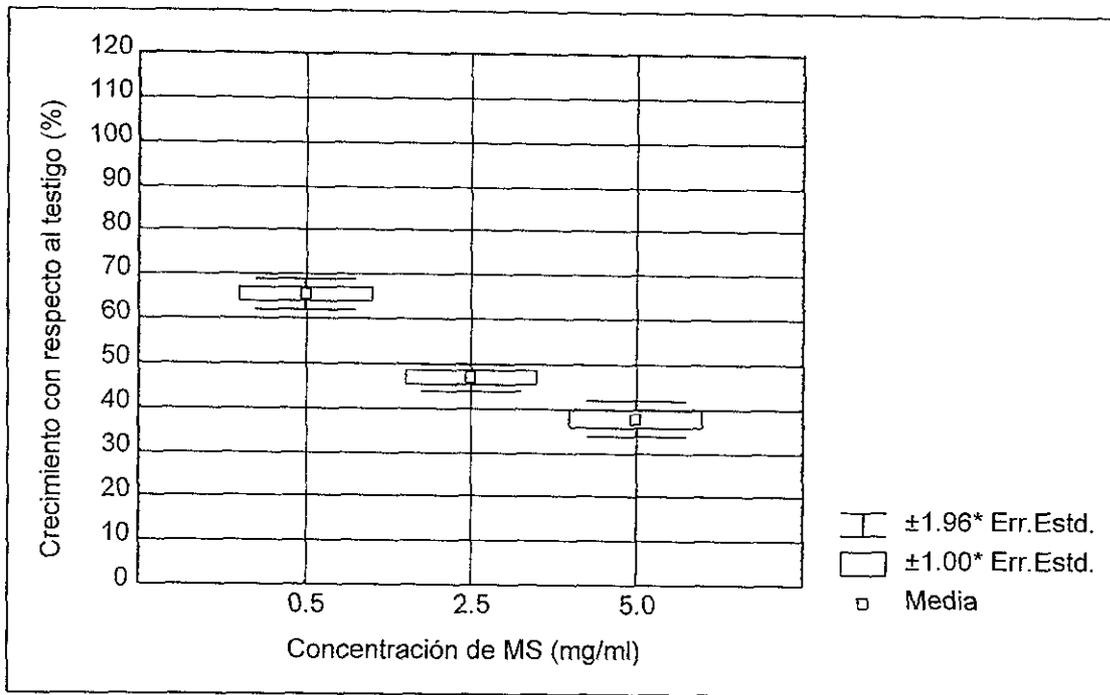


Fig. 8. Efecto de la concentración de MS en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* $F(2,199)=1819.59$; $p<0.0001$

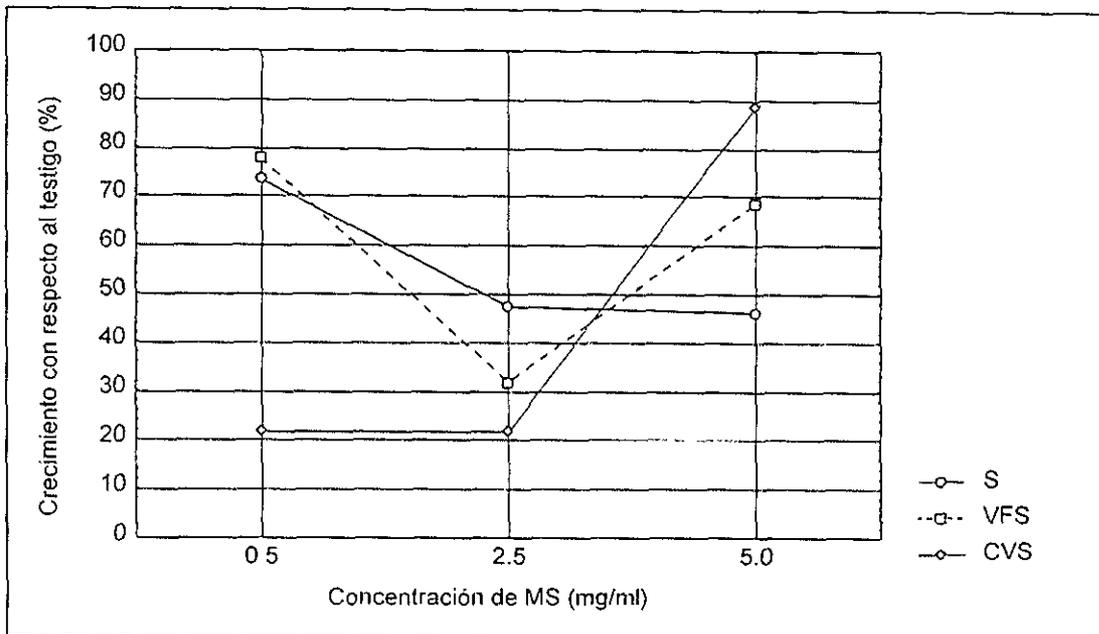


Fig. 9. Efecto de la interacción entre el tipo de compuesto y su concentración en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. $F(34,199)=126.04$; $p<0.0001$. Sólo se muestran los tratamientos que difieren significativamente de la tendencia general.

TABLA 10. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número y la concentración de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

EFEECTO	g. l.	C.M.	F	p
Concentración	2	0.8560	51.4200	< 0.000001
Número de compuestos	4	0.0674	4.0522	0.003379
Interacción	8	0.0937	5.6328	< 0.000001
Error	238	0.0166		

6.1.4 *Phoma herbarum*

Los datos de crecimiento con respecto al testigo, mostraron homogeneidad de varianzas con la prueba de Hartley; pero no con las de Cochran y Barlett. Sin embargo las medias no mostraron correlación con las varianzas. Además los residuales mostraron normalidad en la prueba gráfica de valores observados contra los esperados.

El crecimiento de *Phoma herbarum*. mostró ser afectado significativamente por el tipo de compuesto, la concentración y la interacción de ambas (Tabla 11). El 91 % de la variación en la respuesta del crecimiento del hongo, es explicada por la concentración y el 7% por el tipo de compuesto, el 1.5% por la interacción de las dos variables y el resto por el error.

Al hacer una comparación múltiple del efecto de la concentración sobre el crecimiento de *P. herbarum*, se observó que en medios de cultivo con concentraciones altas de MS, el hongo creció menos que en medios con concentraciones medias y bajas de MS (Fig. 12). Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de tipo de compuesto sobre el crecimiento de *Phoma herbarum* se muestran en la Tabla 11. Estas comparaciones mostraron que el grupo de mezclas D que mostró mayor inhibición del crecimiento de *P. herbarum* (más del 35%), incluye solo a un compuesto individual: el ácido ferúlico (F). El grupo de mezclas que le sigue C, inhibió el crecimiento entre un 27% y un 17%. Este grupo incluye compuestos individuales: ácidos *p*-cumárico y vainillico (P,V), mezclas con dos (CF), con tres (CPF, PVF,VFS), con cuatro (PCFS,PVSF,FCVS) y con cinco compuestos (CPVSF). Al comparar las respuestas de los grupos de mezclas a las mismas concentraciones no se encontraron diferencias significativas entre sí, aunque si difieren significativamente entre grupos ($F=5.64$; $p<0.0001$). En el todas las mezclas del grupo C, se encuentra presente el compuesto que por si solo mostró mayor inhibición: el ácido ferúlico (Fig. 13).

La interacción tipo de compuesto y su concentración, sólo explica en un 6% la variación en el crecimiento de *Phoma herbarum*, sin embargo, es altamente significativa. Esto se debe a que las respuestas al efecto del ácido sinápico, ferúlico y la mezcla PVF difieren significativamente del resto (Fig. 13). El ácido sinápico y la mezcla PVF disminuyeron el efecto de inhibición del crecimiento de *Phoma herbarum* a concentración media pero a concentración alta este efecto de inhibición aumentó. El efecto total fue de inhibición (Tabla 12).

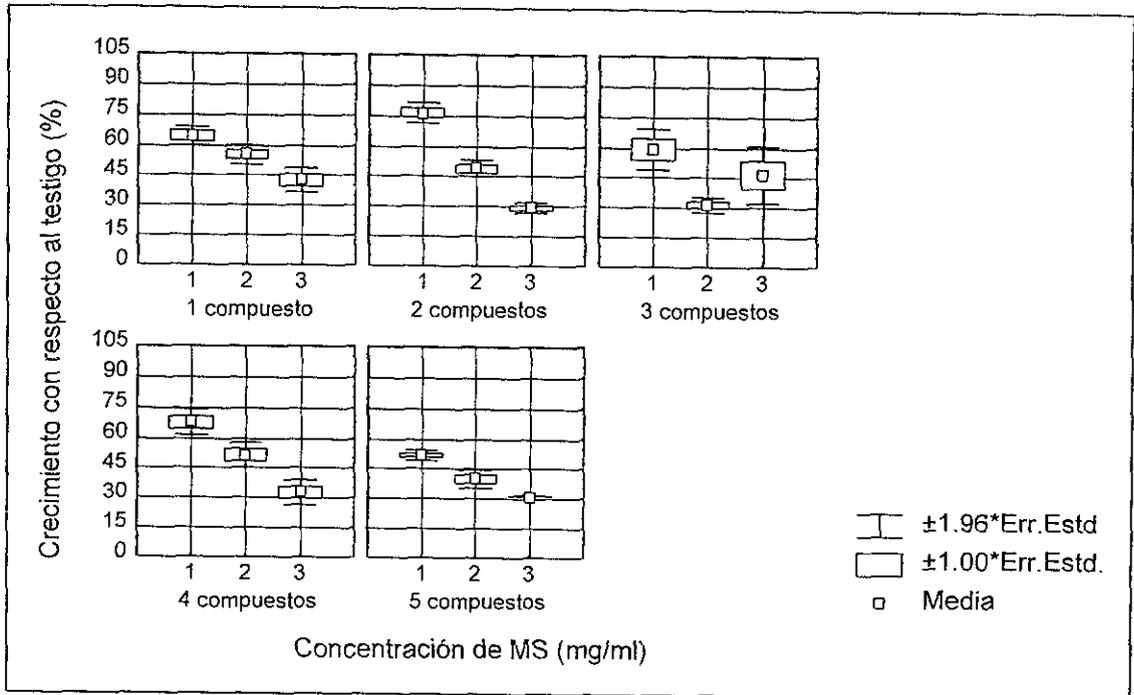


Fig. 10. Efecto de la interacción entre la concentración y el número de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* $F(8,238)= 5.63$; $p<0.00001$.

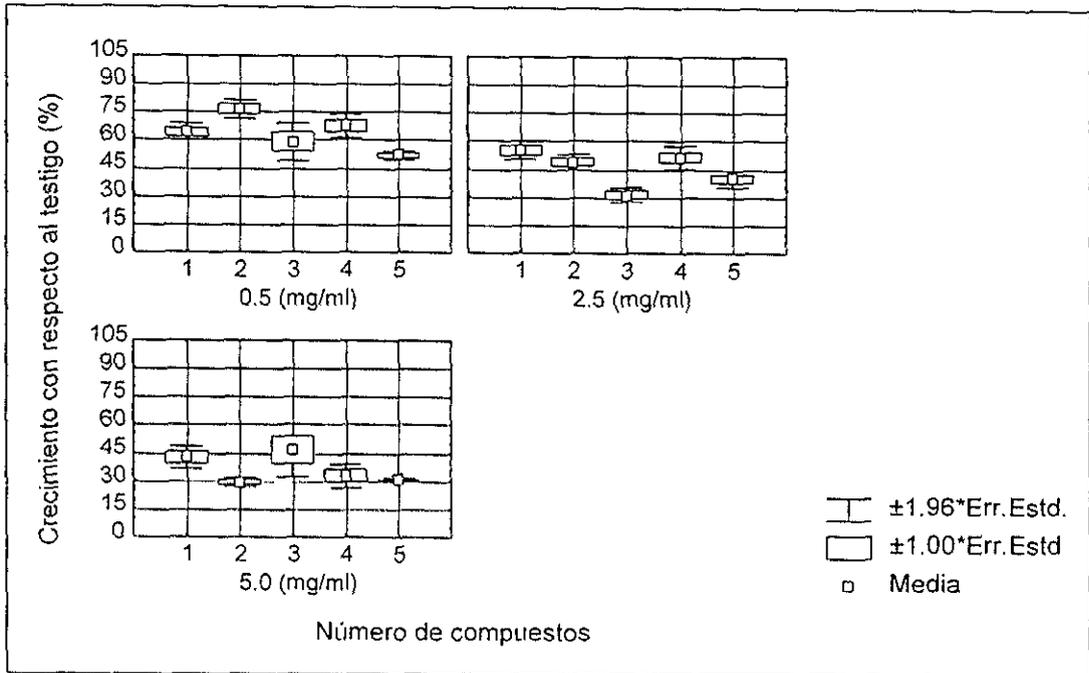


Fig. 11. Efecto de la interacción entre el número de metabolitos secundarios y su concentración, en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* $F(8,238)= 5.63$; $p<0.00001$.

TABLA 11. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto la concentración y el tipo de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Phoma herbarum*.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	17	0.0739	26.8130	< 0.000001
Concentración	2	0.9838	356.5510	< 0.000001
Interacción	34	0.0155	5.6396	< 0.000001
Error	184	0.0027		

El ácido ferúlico (F) inhibió drásticamente el crecimiento de *Phoma herbarum* al aumentar la concentración, en contraste con el resto de las mezclas que aunque inhibieron el crecimiento al aumentar la concentración, lo hicieron en forma gradual (Fig.13).

El crecimiento de *Phoma herbarum* fué afectado significativamente por la concentración. El número de compuestos y la interacción con la concentración, no mostraron efecto significativo sobre su crecimiento (Tabla 13).

TABLA 12. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de *Phoma herbarum* respecto al testigo. Los promedios agrupados bajo la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con diferente letra sí (g.l=17; alfa<0.0001)

GRUPO	CRECIMIENTO % respecto al testigo	N	TIPO DE COMPUESTO
A	95.14	5	S
A	94.01	5	VS
A	92.41	5	CVS
A	91.81	5	CPVS
A B	90.51	5	C
B	87.97	5	PS
B	87.44	5	CV
B C	83.42	5	CPVSF
B C	82.90	5	V
C	82.90	5	VFS
C	82.36	5	PVF
C	81.09	5	P
C	80.54	5	FCVS
C	79.17	5	PVSF
C	78.83	5	CPF
C	77.90	5	PCFS
C	77.65	5	CF
D	64.45	5	F

TABLA 13. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número y la concentración de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Phoma herbarum*.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	p
Concentración	2	0.7303	70.5690	< 0.00001
Número de compuestos	4	0.0124	1.2009	0.31127
Interacción	8	0.0074	0.7189	0.62474
Error	223	0.0103		

6.1.5 *Penicillium oxalicum*

Los datos de crecimiento con respecto al testigo, mostraron homogeneidad de varianzas con la prueba de Hartley; pero no con las de Cochran y Barlett. Sin embargo las medias no mostraron correlación con las varianzas. Además los residuales mostraron normalidad en la prueba gráfica de valores observados contra los esperados.

La respuesta de crecimiento de *Penicillium oxalicum* fue afectada significativamente por el tipo de compuesto, la concentración y la interacción de ambas (Tabla 14). El 66% de la variación en el crecimiento del hongo, es explicada por la concentración, el 22% por el tipo de compuesto, el 12% por la interacción de las dos variables y el resto por el error. La comparación múltiple del efecto de la concentración sobre el crecimiento de *Penicillium oxalicum*, mostró que los medios de cultivo con concentraciones altas de MS, inhibieron el crecimiento del hongo (Fig. 15).

Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de tipo de compuesto sobre el crecimiento de *Penicillium oxalicum* se muestran en la Tabla 15. Esta comparación mostró que el grupo de mezclas G que inhibió el crecimiento de *P. oxalicum* (más del 73%) solo incluye una cuarteta (PCFS). Es seguido por el grupo F que inhibió el crecimiento hasta en un 65% y que incluye una mezcla de cuatro (FCVS) y de dos compuestos (VS, CF). Después está el grupo E que incluye un par (CF) y dos tercias (CPF, CVS) y que disminuyó el crecimiento entre un 65 % y un 56 %. Al comparar las respuestas de los grupos de mezclas a las mismas concentraciones no se encontraron diferencias significativas entre sí, aunque si difieren significativamente entre grupos ($F=39.96$; $p<0.0001$).

La interacción entre el tipo de compuesto y su concentración explica en un 12% la variación en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*. El efecto de los ácidos caféico y vainílico (C, V) y las mezclas, CPVSF, FCVS, VFS y PS fueron diferentes del resto (Fig. 16). Los ácido caféico y vainílico y las mezclas CPVSF, VSF inhibieron más el crecimiento a concentración media que a alta. La mezcla PS inhibió más el crecimiento a concentración baja que a media y alta. La mezcla FCVS inhibió marcadamente el crecimiento a concentraciones baja y alta, pero a concentración media esta inhibición disminuyó considerablemente (Fig. 16).

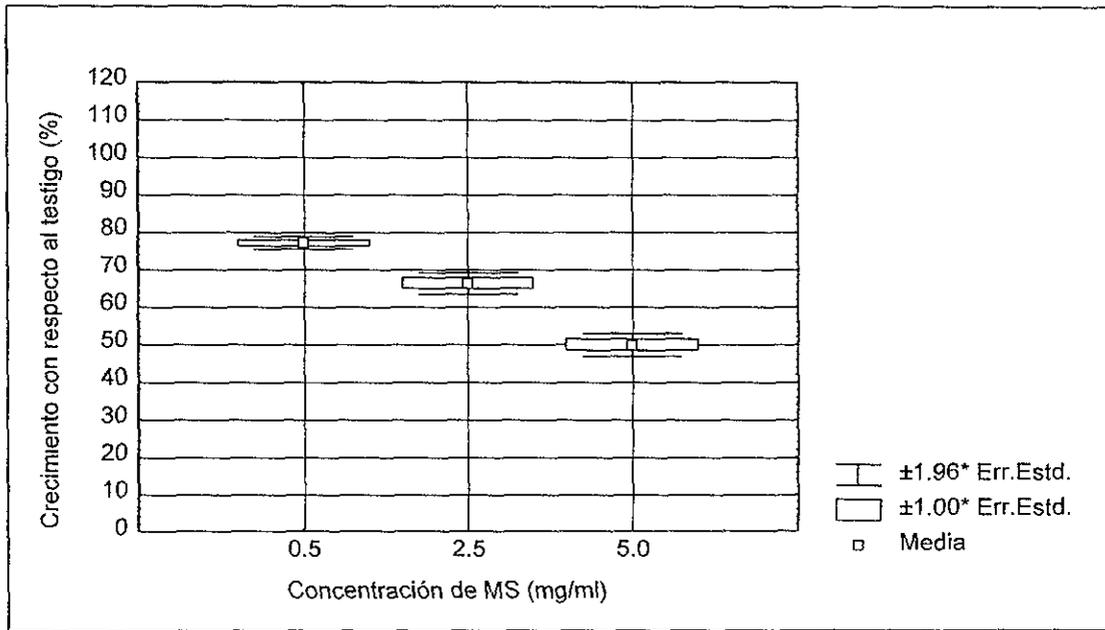


Fig. 12. Efecto de la concentración de MS en el crecimiento de *Phoma herbarum*, $F(2,184)=318.02$; $p<0.0001$.

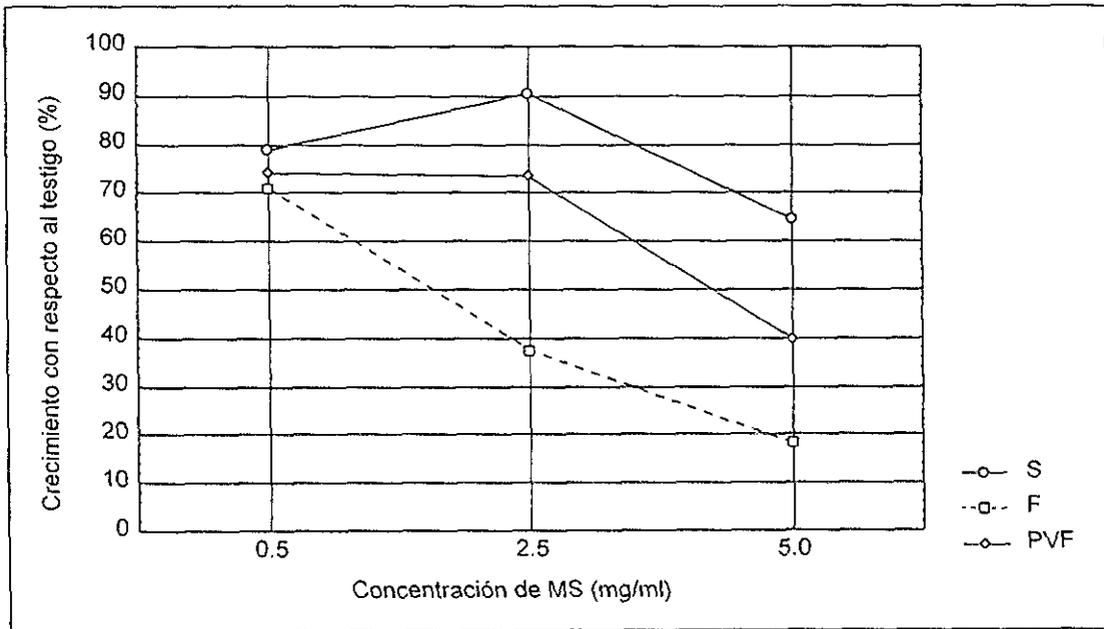


Fig. 13. Efecto de la interacción entre el tipo de compuesto y su concentración en el crecimiento de *Phoma herbarum* $F(34,184)= 5.72$; $p<0.00001$. Se muestran dos tratamientos (S, PVF) con la tendencia general y el tratamiento (F) que fué significativamente diferente del resto.

TABLA 14. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número y la concentración de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*.

EFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	17	0.0111	73.0883	< 0.001
Concentración	2	0.0331	217.8649	< 0.001
Interacción	34	0.0060	39.9602	< 0.001
Error	202	0.0001		

TABLA 15. Resultados de la comparación múltiple para evaluar el efecto del tipo de mezcla de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de *Penicillium oxalicum* respecto al testigo. Los promedios agrupados bajo la misma letra no difieren significativamente, mientras que aquellos con diferente letra sí (g.l=17; alfa<0.000)

GRUPO	CRECIMIENTO % respecto al testigo	N	TIPO DE COMPUESTO
A	74.07	5	S
A B	70.69	5	C
A B	66.51	5	CPVS
B	63.72	5	CPVSF
B	63.25	5	V
B	63.25	5	P
C	64.06	5	PVF
C D	57.09	5	PVSF
C D	55.34	5	PS
D	52.09	5	VFS
D	52.32	5	CV
D	51.04	5	F
D E	50.69	5	CVS
D E	48.25	5	CPF
E F	43.72	5	CF
F	42.32	5	FCVS
F	35.00	5	VS
G	26.97	5	PCFS

El crecimiento de *Penicillium oxalicum* mostró ser afectado significativamente por el número de compuestos, la concentración y la interacción de ambos (Tabla 16). El 32 % de la variación en el crecimiento de *P. oxalicum* es explicada por la concentración, el 42% por el número de compuestos y el 23% por la interacción. El aumento en la concentración inhibió el crecimiento de *P. oxalicum*, excepto en los tratamientos con dos y cinco compuestos. Las mezclas pares no mostraron un efecto significativamente

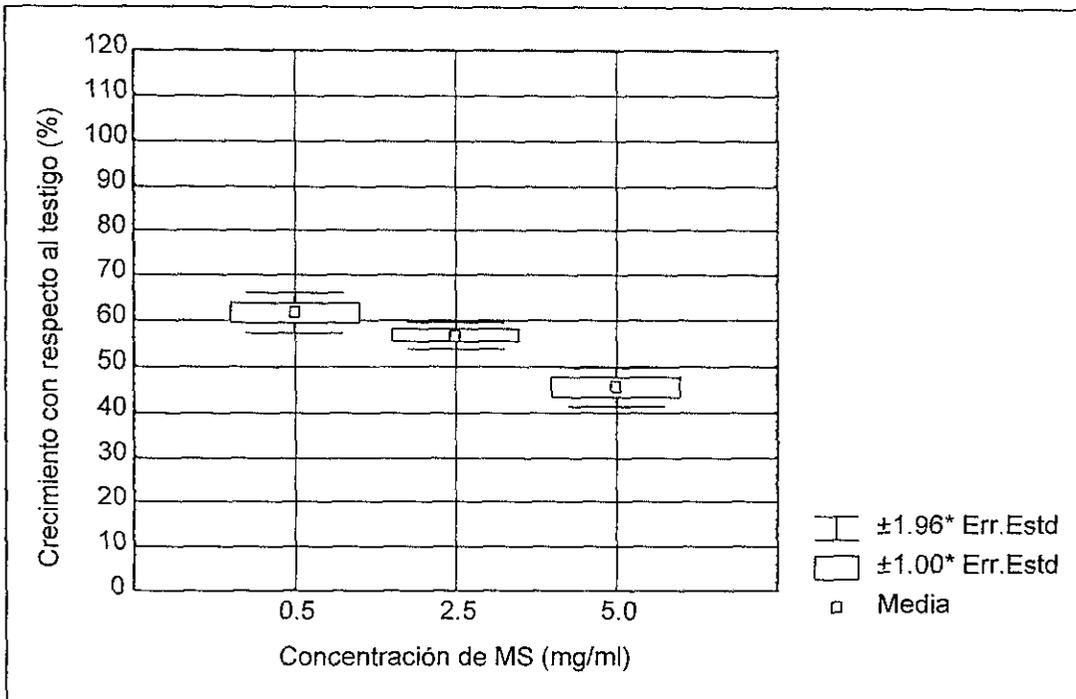


Fig. 14. Efecto de la concentración de MS sobre el crecimiento de *Penicillium oxalicum*, $F(2,202)=208.14$; $p<0.0001$).

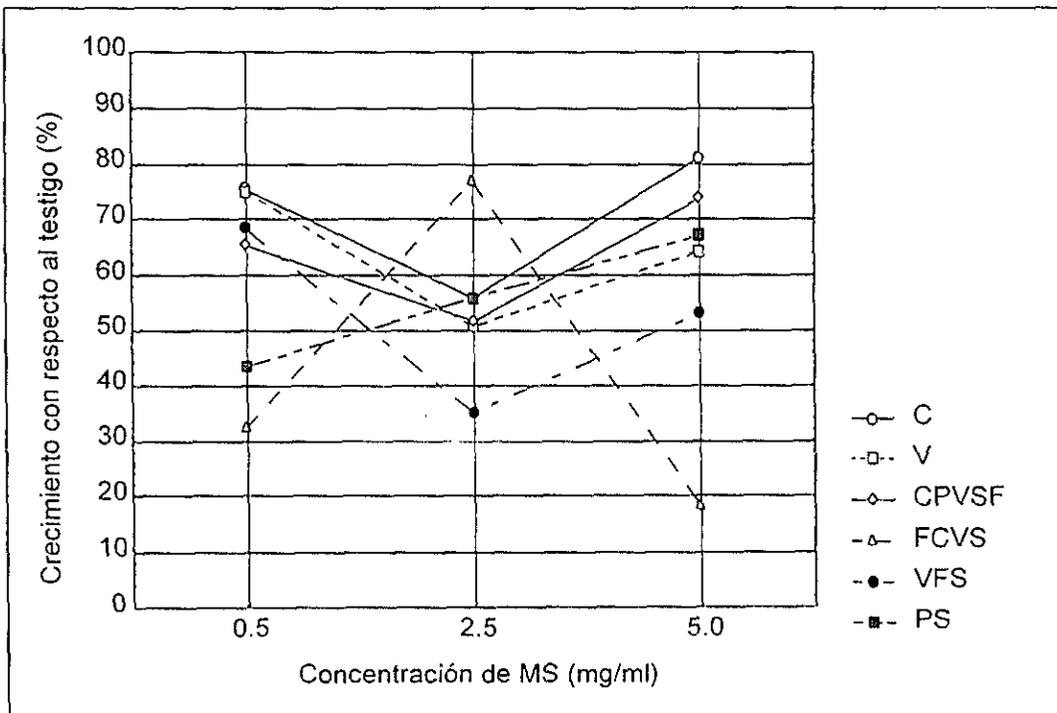


Fig. 15. Efecto de la interacción entre el tipo de compuesto y su concentración en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*, $F(34,202)= 42.51$; $p<0.0001$. Sólo se muestran los tratamientos que difieren significativamente de la tendencia general.

El crecimiento de *Penicillium oxalicum* mostró ser afectado significativamente por el número de compuestos, la concentración y la interacción de ambos (Tabla 16). El 32 % de la variación en el crecimiento de *P. oxalicum* es explicada por la concentración, el 42% lo es por el número de compuestos y el 23% por la interacción. El aumento en la concentración inhibió el crecimiento de *P. oxalicum*, excepto en los tratamientos con dos y cinco compuestos. Las mezclas pares no mostraron un efecto significativamente diferente al aumentar la concentración. Por otra parte, la mezcla de cinco compuestos mostró mayor inhibición a concentración media (Fig. 16).

El efecto del número de compuestos en las mezclas mostró ser significativamente diferente a concentraciones alta y baja. Las de dos y cuatro compuestos a concentración baja, inhibieron más el crecimiento de *P. oxalicum* (Fig. 17). A concentración media todas las mezclas mostraron un efecto similar, sin importar el número de compuestos en ellas. Sin embargo, a concentración alta el número de compuestos aumentó la inhibición del crecimiento, excepto en los tratamientos con cinco compuestos que fueron similares a los tratamientos con un sólo compuesto (Fig. 17).

TABLA 16. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número y la concentración de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*.

EFECTO	g.l.	C.M.	F	P
Concentración	2	0.0145	13.0541	< 0.000004
Número de compuestos	4	0.0187	16.7344	< 0.000001
Interacción	8	0.0103	9.2943	< 0.000001
Error	241	0.0011		

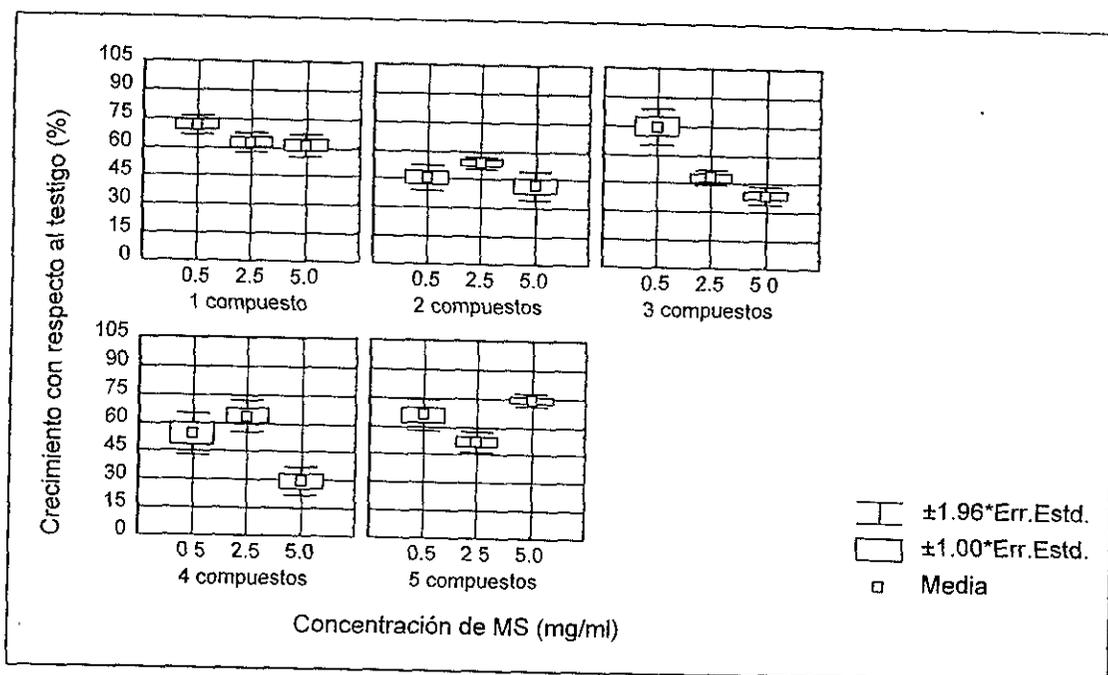


Fig. 16. Efecto de la interacción entre la concentración y el número de metabolitos secundarios en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*, $F(8,241)=9.99$; $p<0.0001$.

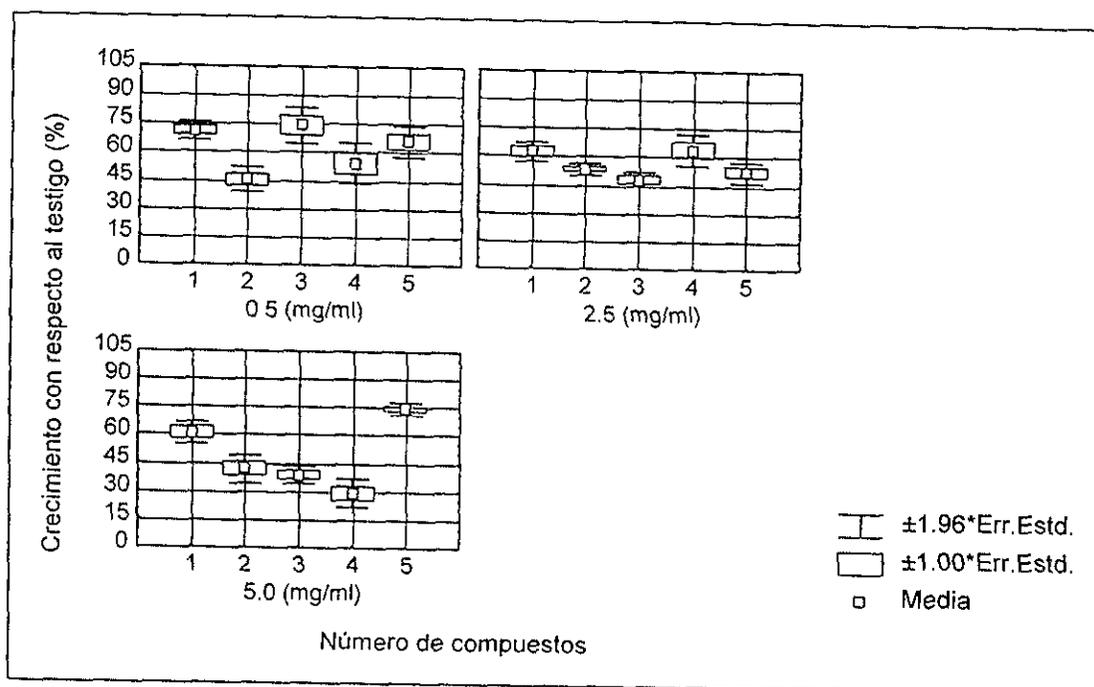


Fig. 17. Efecto de la interacción entre el número de metabolitos secundarios y su concentración en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*, $F(8,241)=9.99$; $p<0.0001$.

Los resultados de estos experimentos individuales muestran que la concentración tuvo un efecto determinante en la inhibición del crecimiento del micelio de todos los hongos.

Los resultados también muestran una susceptibilidad diferencial de los hongos a los ácidos fenólicos y sus mezclas; así para *Fusarium graminearum* tanto compuestos solos como mezclas mostraron mayor efecto de inhibición y un compuesto solo así como algunas mezclas mostraron efecto de estimulación. Para *Fusarium moniliforme* y *Phoma herbarum* compuestos individuales (los ácidos *p*-cumárico y ferúlico respectivamente) mostraron mayor efecto de inhibición que el resto de los tratamientos. En el caso de *Penicillium oxalicum* una mezcla de cuatro compuestos resultó ser el tratamiento con mayor efecto de inhibición. En cambio para *Fusarium oxysporum*, la mayoría de las mezclas resultaron más inhibitoras que los compuestos solos (Tabla 17).

El efecto del número de compuestos en la mezcla también refleja una susceptibilidad diferencial de los hongos: para *P. oxalicum* y *F. moniliforme* el número de compuestos en la mezcla mostró aumentar el efecto de inhibición pero sólo a dosis altas. En cambio, para *F. graminearum* y *P. herbarum* no mostró un efecto de inhibición significativamente diferente. Por otra parte, para *F. oxysporum* el número de compuestos no mostró una tendencia clara a diferentes concentraciones (Tabla 17).

Tabla 17. Resumen de los análisis de varianza realizados para cada especie. Los porcentajes representan la cantidad de variación explicada por las variables y sus interacciones. El tipo y número de compuestos más inhibidores son el resultado de las comparaciones múltiples. En el último renglón se indica si los resultados se ajustan con la hipótesis de mayor diversidad menor crecimiento.

VARIABLE	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
Concentración (C)	90 %	92 %	85%	91 %	66 %
Tipo de compuesto (TC)	5 %	6 %	9%	7 %	22 %
Interacción (C-TC)	4 %	2%	6 %	1.5%	12 %
Tipo de compuesto o mezcla más inhibitor	P,V,PS,VSF, CVS,CPVS, PVSF	P	CF, PS, CVS, PVF,FCVS, PVSF, CPVSF	F	PCFS
Número de Compuestos (NC)	no significativo	3 %	7 %	no significativo	42 %
Concentración (C)	89 %	93 %	83%	99 %	32 %
Interacción (NC-C)	7 %	2%	9%	no significativo	23 %
Número de compuestos más inhibitor	no significativo	1,3,5	3,5	1	4
¿CONCUERDA CON LA HIPÓTESIS?	NO	NO	SI	NO	SI

6. 2. Experimentos simultáneos

6.2.1 Experimento con concentración baja

Los resultados de crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* a baja concentración con respecto al testigo, mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, pero no con las de Cochran y Barlett. Sin embargo, las medias no mostraron correlación con las varianzas. Los residuales mostraron normalidad con la prueba gráfica de los residuales observados contra los esperados. Por lo anterior los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías.

El crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, mostró ser afectado significativamente por el tipo de compuesto, el tipo de hongo y la interacción de ambas variables (Tabla 18). La variación en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, es explicada por el tipo de compuesto en la mezcla en un 20%, por el tipo de hongo en un 71 %, por la interacción en un 8% y el resto por el error.

TABLA 18. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de metabolito secundario y el tipo de hongo, a 0.5mg/ml, en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum*

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	10	0.002534	62.9148	< 0.001
Tipo de hongo	3	0.008844	219.5964	< 0.001
Interacción	30	0.000940	23.3412	< 0.001
Error	304	0.000040		

Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de tipo de compuesto sobre el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* a concentración baja, se muestran en la Tabla 18. Los tratamientos que inhibieron más el crecimiento de *F. graminearum* fueron: los ácidos *p*-cumárico, sinápico y la mezcla PS. Para *F. moniliforme* fue el ácido *p*-cumárico, seguido del ácido ferúlico; para *F. oxysporum* la mezcla VS y para *Phoma herbarum*: los ácidos *p*-cumárico, sinápico y la mezcla PS; seguidos de del ácido sinápico y la mezcla PVF.

La interacción entre el tipo de compuesto y la especie de hongo, a concentración baja (0.5mg/ml) sólo explica en un 8% la variación en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F.oxysporum* y *Phoma herbarum* (Fig. 18), sin embargo es altamente significativa ($F=22.82$; $p<0.001$). Esto puede explicarse porque las respuestas a los tratamientos difieren de acuerdo a la especie de hongo. Los tratamientos que mostraron mayor inhibición en general fueron: los ácidos *p*-cumárico, vainíllico, sinápico, y las

mezclas PS, PVF. El ácido *p*-cumárico inhibió más el crecimiento de *F. moniliforme* y de *Phoma herbarum*; los ácidos vainílico y sinápico (V y S) inhibieron más el crecimiento de *Phoma herbarum*; la mezcla PS el de *F.graminearum* y de *P. herbarum* y la mezcla PVF el de *P. herbarum* y el de *F.graminearum* (Tabla 19).

Las respuestas de crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum* a concentración baja, fueron afectadas significativamente por el número de compuestos, el tipo de hongo y la interacción de ambas variables (Tabla 20). La variación en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, es explicada por el número de compuestos en un 33%, por el tipo de hongo en un 60 %, por la interacción en un 5% y el resto por el error. El aumento en el número de metabolitos secundarios presentes en la mezcla disminuyó el efecto de la inhibición en *F. graminearum*, *F. moniliforme* y *Phoma herbarum*, a concentración baja (Fig. 20). En el caso de *F.graminearum* y *Phoma herbarum* a partir de tres compuestos en la mezcla disminuyó el efecto de inhibición. El crecimiento de *F. moniliforme* fue menos inhibido a partir de dos compuestos en la mezcla. En contraste con los otros hongos, *Fusarium oxysporum* no mostró un patrón claro de inhibición con diferente número de compuestos en la mezcla (Fig. 20).

TABLA 19. Efecto de las mezclas de MS a 0.5 mg/ml de PDA, en el crecimiento del micelio de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum*.

MEZCLA	<i>F.graminearum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. herbarum</i>
P	-23.5	-30.7	-17.1	-32.4
V	-18.8	-13.6	-10.9	-28.3
S	-26.1	-9.3	-10.9	-34.8
F	-5.5	-20.9	-11.6	-16.6
VS	-11.9	-7.3	-29.1	-22.3
PS	-26.6	-10.9	-13.9	-35.2
VSF	-14.2	-8.9	-8.9	-24.3
PVF	-16.5	-7.3	-10.9	-26.3
PCFS	-7.3	-11.3	-8.6	-18.2
PVSF	-9.6	-6.3	-19.5	-20.2
CPVSF	-2.7	-2.3	-12.3	-14.1

% de inhibición (-) o estimulación (+) en comparación con el tratamiento control
 Los porcentajes en negrita no son significativamente diferentes (g.l. = 30; p<0.001) por especie de hongo

TABLA 20. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de hongo y el número de compuestos en el medio de cultivo, a 0.5mg/ml de PDA, en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*

EFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de hongo	3	0.007537	60.28965	< 0.000001
Número de compuestos	4	0.004213	33.70017	< 0.000001
Interacción	12	0.000661	5.28424	< 0.000001
Error	328	0.000125		

6.2.2 Experimento con concentración alta.

Los resultados de crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, a concentración alta con respecto al testigo, no mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, Cochran y Barlett. Sin embargo, las medias y las varianzas no mostraron correlación. Los residuales mostraron normalidad con la prueba gráfica de los residuales observados contra los esperados. Por lo anterior los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías. Las respuestas de crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, fueron afectadas significativamente por el tipo de compuesto, el tipo de hongo y la interacción de ambas variables (Tabla 21). La variación en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum* es explicada por el tipo de compuesto en un 76%, por el tipo de hongo en un 15 %, por la interacción en un 9% y el resto por el error.

TABLA 21. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de metabolitos secundarios y el tipo de hongo, a 5.0mg/ml, en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*

EFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	10	0.343101	209.1703	< 0.000001
Tipo de hongo	3	0.067262	41.0059	< 0.000001
Interacción	30	0.040293	24.5647	< 0.000001
Error	303	0.001640		

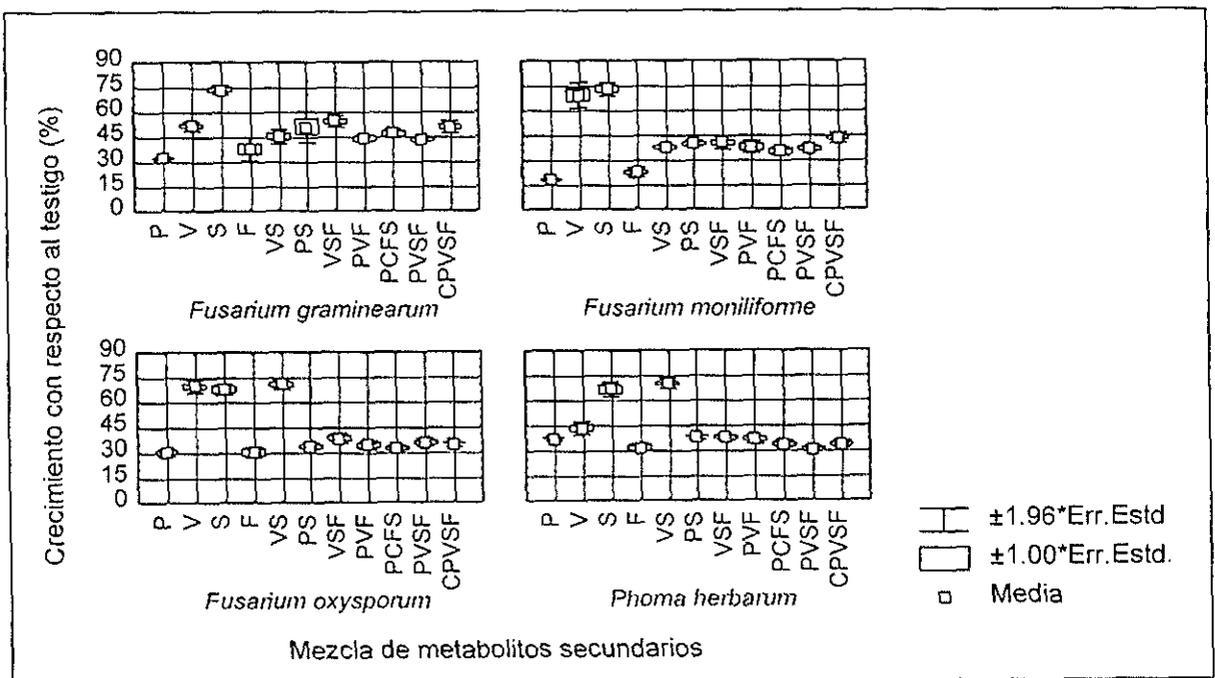
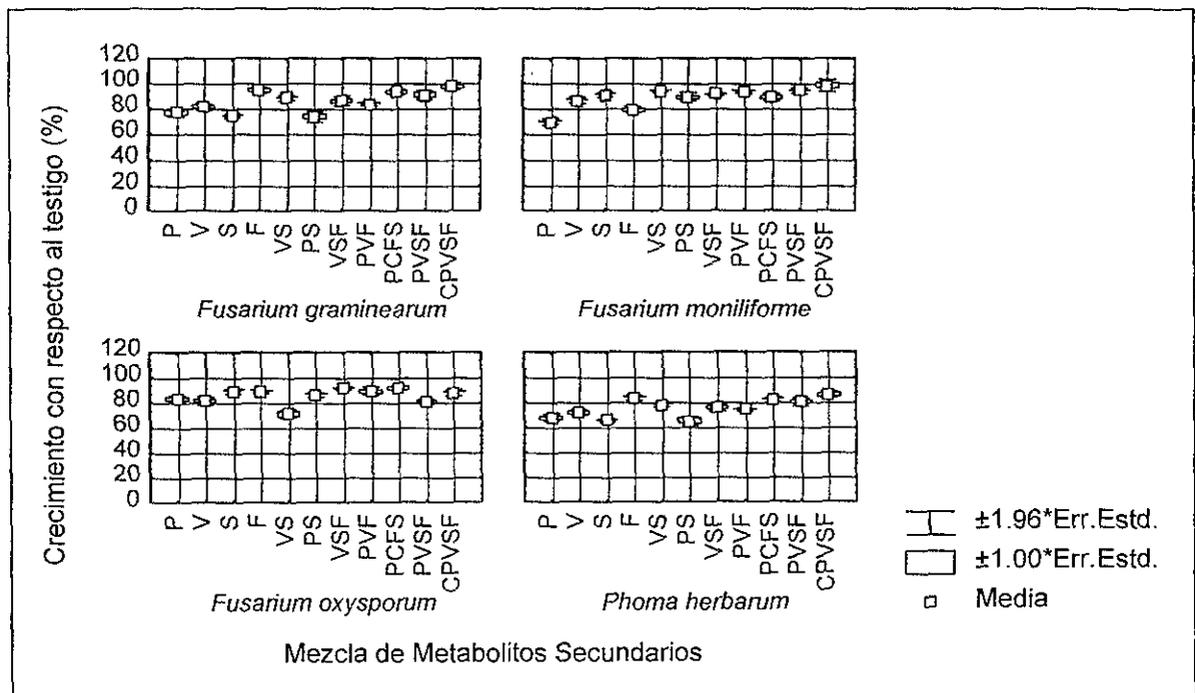


Fig. 19. Efecto de la interacción entre el tipo de metabolitos secundarios en la mezcla y la especie de hongo, a concentración alta (5.0 mg/ml), en el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* $F(30,303)= 24.56$; $p<0.0001$.

Los resultados de la comparación múltiple para el efecto de tipo de compuesto sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* a concentración alta, se muestran en la Tabla 22. Los ácidos *p*-cumárico y ferúlico fueron los tratamientos que inhibieron fuertemente el crecimiento de todos los hongos. Para *F. oxysporum*, además de estos compuestos las mezclas PS, VSF, PCFS, PVSF y CPVSFVS también resultaron muy inhibitorias. Para *Phoma herbarum* el ácido vainílico y todas las mezclas también mostraron inhibir fuertemente el crecimiento.

La interacción entre el tipo de compuesto y la especie de hongo, a concentración alta (5.0mg/ml) sólo explica en un 9% la variación en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* (Fig.19). Sin embargo es altamente significativa. Esto puede atribuirse a que las respuestas de crecimiento a los tratamientos difieren significativamente de acuerdo a la especie de hongo ($F=24.39$; $p<0.0001$).

La inhibición del crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* como respuesta a los ácidos *p*-cumárico y ferúlico no difiere significativamente entre sí (Tabla 22). Sin embargo, el ácido vainílico mostró mayor efecto de inhibición en *P. herbarum* y *F. graminearum*. La respuesta de *F. moniliforme* y de *F. oxysporum* a la acción del ácido vainílico no fue significativamente diferente entre sí (Fig. 19). Por otra parte, la mezcla CPVSF inhibió más el crecimiento de *F. oxysporum* y el de *P. herbarum*. *F. graminearum* y *F. moniliforme* mostraron menor inhibición bajo el efecto de esta mezcla (Fig. 19). *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y de *Phoma herbarum* mostraron una inhibición similar bajo el efecto de las mezclas PS, VSF, PCFS, PVSF (Fig. 19). La mezcla PVF tuvo el mismo efecto de inhibición en los cuatro hongos.

La respuesta de crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, fue afectada significativamente por el número de compuestos, el tipo de hongo y la interacción de ambas variables (Tabla 23). La variación en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*, es explicada por el número de compuestos en un 47%, por el tipo de hongo en un 36 %, por la interacción en un 11% y el resto por el error.

Al aumentar el número de compuestos secundarios en el medio de cultivo a concentración alta, disminuyó el crecimiento de *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*. La inhibición del crecimiento de *F. graminearum* y *F. moniliforme* no mostró diferencias significativas al aumentar el número de compuestos (Fig. 21). El crecimiento de *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* fue más inhibido con mezclas de tres, cuatro y cinco compuestos. Sin embargo, el efecto con las mezclas de cuatro compuestos no difiere significativamente del efecto con las mezclas con cinco compuestos (Fig. 21).

TABLA 22. Efecto de las mezclas en el crecimiento del micelio a 5.0 mg/ml de PDA, de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum*

MEZCLA	<i>F.graminearum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Phoma herbarum</i>
P	-68.2	-81.9	-69.9	-63.2
V	-48.8	-30.9	-30.8	-57.1
S	-26.8	-27.4	-32.4	-34.0
F	-62.4	-77.4	-69.9	-68.4
VS	-55.1	-62.4	-29.7	-30.4
PS	-49.3	-60.2	-66.4	-62.3
VSF	-45.8	-59.7	-62.0	-62.8
PVF	-56.6	-62.4	-66.1	-69.9
PCFS	-53.2	-65.0	-68.3	-66.4
PVSF	-57.1	-63.3	-64.5	-69.6
CPVSF	-49.3	-57.1	-65.6	-66.4

% de inhibición (-) o estimulación (+) en comparación con el tratamiento control
 Los porcentajes en negrita no son significativamente diferentes (g.l.= 30; p<0.0001) por especie de hongo

TABLA 23. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de hongo y el número de compuestos en el medio de cultivo, a dosis alta, en el crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, y *Phoma herbarum*.

EFFECTO	g.l.	C.M.	F	P
Tipo de hongo	3	0.080725	5.9099	< 0.000546
Número de compuestos	4	0.105517	7.8415	< 0.000005
Interacción	12	0.025801	1.9174	0.031581
Error	327	0.013456		

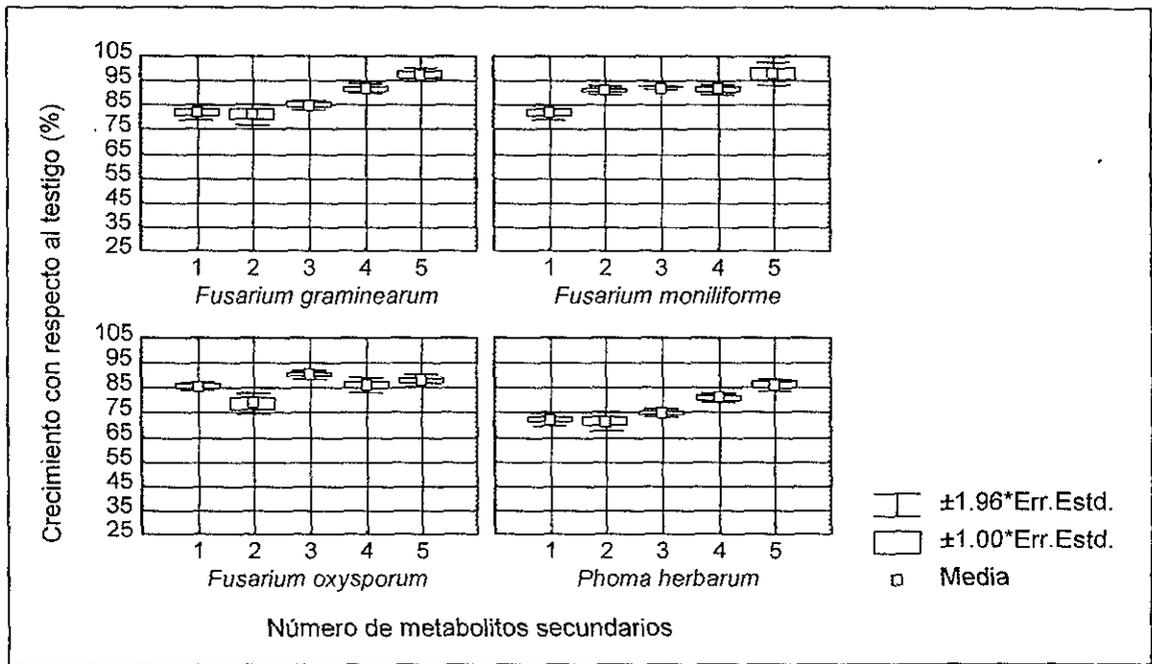


Fig. 20. Efecto de la interacción entre el número de metabolitos secundarios en la mezcla y la especie de hongo, a dosis baja (0.5 mg/ml), en el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* $F(12,328)= 5.28$; $p<0.00001$.

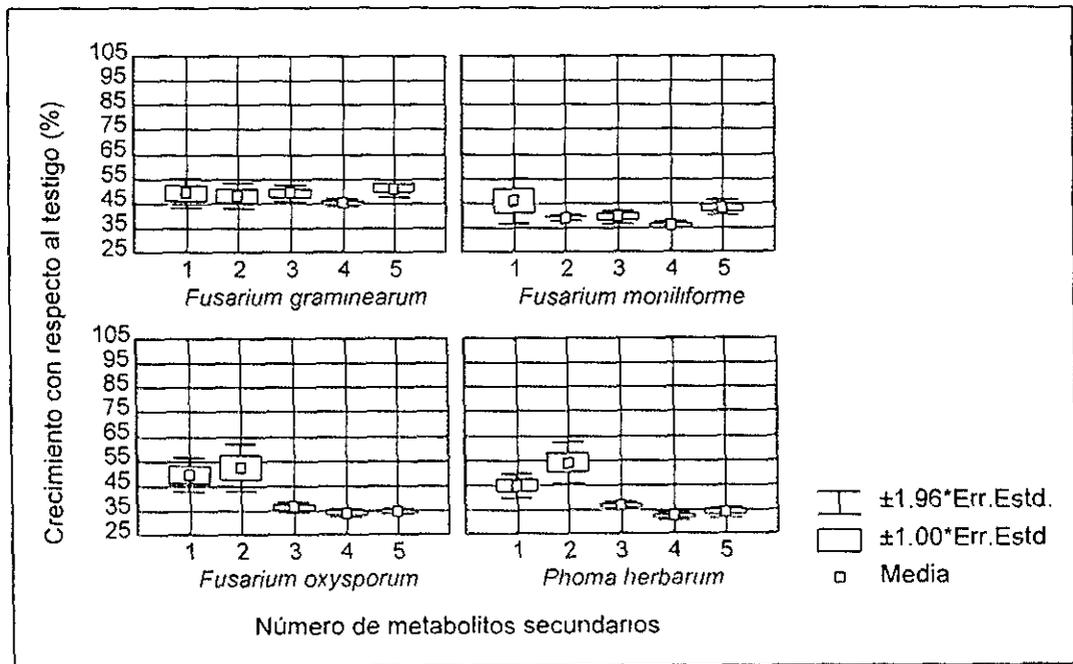


Fig. 21. Efecto de la interacción entre el número de metabolitos secundarios en la mezcla y la especie de hongo, a dosis alta (5.0 mg/ml), en el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *Phoma herbarum*, $F(12,327)= 1.92$; $p<0.0316$

6.2.3. *Penicillium oxalicum*

Los resultados de crecimiento de *Penicillium oxalicum* a concentración baja con respecto al testigo, no mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, Cochran y Barlett. Sin embargo, las medias y las varianzas no mostraron correlación. Los residuales mostraron normalidad con la prueba gráfica de los residuales observados contra los esperados. Por lo anterior los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías.

La respuesta de crecimiento de *Penicillium oxalicum* a concentraciones bajas fue afectada significativamente por el tipo de compuesto (Tabla 24). La variación en el crecimiento de *P. oxalicum* es explicada por el tipo de compuesto en un 96%, y 4% por el error. Los resultados de la comparación múltiple del tipo de compuesto mostraron a los ácidos *p*-cumárico y sinápico y las mezclas PVF, PCFS, PVSF como los tratamientos con mayor efecto de inhibición sobre *P. oxalicum*. Las respuestas al efecto de estos tratamientos no difieren significativamente entre sí, aunque si lo hacen con el resto de los tratamientos ($F=38.42$; $p<0.0001$) (Tabla 25).

TABLA 24. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de metabolitos secundarios, a 0.5 mg/ml en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*.

EFECTO	g.l.	C.M.	F	p
Tipo de compuesto	10	0.019117	28.11603	< 0.000001
Error	76	0.000680		

El crecimiento de *P. oxalicum* fue afectado significativamente por el número de compuestos (Tabla 26). La variación en el crecimiento de *P. oxalicum* es explicada por el número de compuestos en un 98% y 2% por el error. El aumento en el número de compuestos en la mezcla a concentración baja, aumentó el efecto de inhibición en los tratamientos que incluían tres y cuatro compuestos secundarios. Al aumentar a cinco el número de MS presentes en la mezcla el efecto de inhibición disminuyó (Fig. 24).

Los resultados de crecimiento de *Penicillium oxalicum* a concentraciones altas con respecto al testigo, no mostraron homogeneidad de varianzas con las pruebas de Hartley, Cochran y Barlett. Sin embargo, las medias y las varianzas no mostraron correlación. Los residuales mostraron normalidad con la prueba gráfica de los residuales observados contra los esperados. Por lo anterior los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías.

La respuesta de crecimiento de *Penicillium oxalicum* a concentración alta fue afectada significativamente por el tipo de compuesto (Tabla 27). La variación en el crecimiento de *Penicillium oxalicum* es explicada por el tipo de compuesto en un 98%, y 2% resto por el error. Los resultados de la comparación múltiple del efecto del tipo de compuesto en la mezcla sobre el crecimiento, mostraron que los ácidos scrúlico, *p*-cumárico, vainíllico y la mezcla PVF inhibieron mas el crecimiento de *P. oxalicum*. Estas respuestas no difieren significativamente entre sí ($F=60.99$; $p<0.0001$), aunque si lo hacen con el resto de los tratamientos (Tabla 25).

TABLA 25. Efecto de las mezclas en el crecimiento del micelio de *Penicillium oxalicum* a concentración baja y alta.

MEZCLA	Experimento 1 0.5 mg/ml PDA	Experimento 2 5.0 mg/ml PDA
P	-6.2	-59.8
V	-67.5	-72.9
S	-74.2	-10.2
F	-18.5	-68.9
VS	-40.4	-16.2
PS	-9.8	-14.5
VSF	-40.4	-33.1
PVF	-58.7	-55.2
PCFS	-58.1	-30.4
PVSF	-59.6	-47.7
CPVSF	-29.5	-38.1

% de inhibición (-) o estimulación (+) en comparación con el tratamiento control
 Los porcentajes en negrita no son significativamente diferentes entre sí (g.l.= 30; p<0.0001)

La respuesta de crecimiento de *P. oxalicum* a concentración alta fue afectada significativamente por el número de compuestos (Tabla 28). La variación en el crecimiento de *P. oxalicum* es explicada por el número de compuestos en un 92% y en un 8% por el error. La mayor inhibición del crecimiento de *P. oxalicum* se observó con compuestos solos (alrededor del 50%). Las mezclas con dos compuestos fueron las que menos inhibieron el crecimiento del hongo. Las mezclas con tres, cuatro y cinco compuestos actuaron en un modo similar.

TABLA 26. Resultados del el análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número de compuestos a 0.5 mg/ml, en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	p
Número de compuestos	4	0.11351	4.174109	< 0.001788
Error	82	0.002408		

TABLA 27. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tipo de metabolitos secundarios, a 5.0 mg/ml en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	P
Tipo de compuesto	10	0.017059	68.19892	< 0.0000001
Error	77	0.000250		

TABLA 28. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del número de compuestos en el medio de cultivo, a 5.0 mg/ml, en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*.

EFEECTO	g.l.	C.M.	F	P
Número de compuestos	4	0.016315	10.86935	< 0.0000001
Error	83	0.001501		

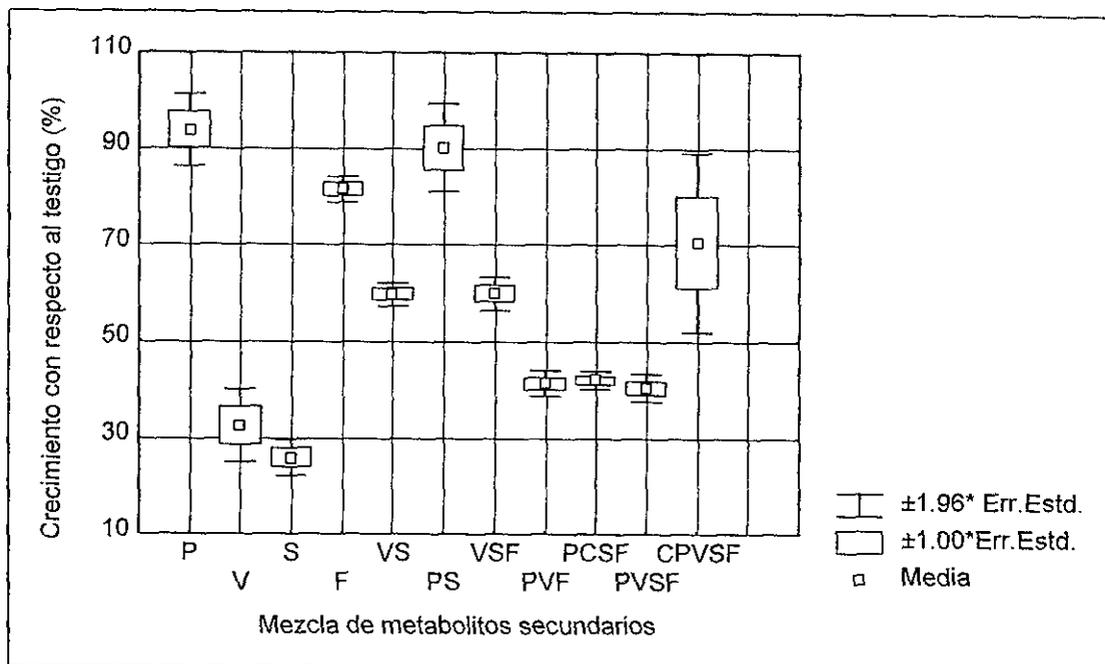


Fig. 22. Efecto del el tipo de compuesto en la mezcla, a concentración baja (0.5 mg/ml), en el crecimiento de *Penicillium oxalicum* $F(10, 76) = 28.12$; $p < 0.00001$.

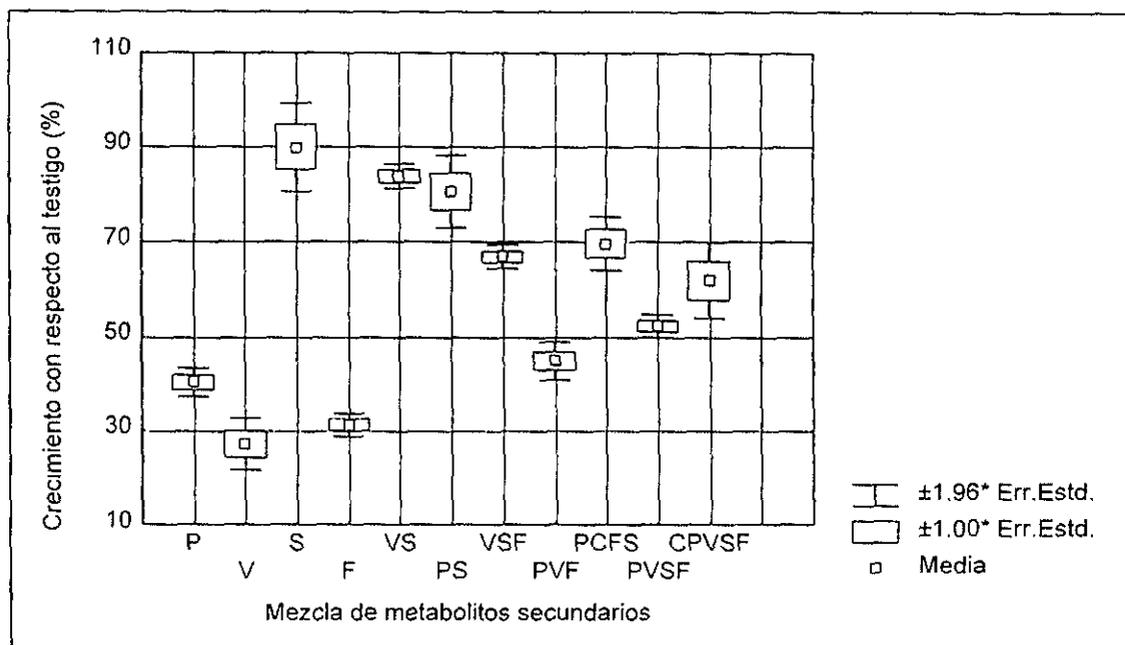


Fig. 23. Efecto del tipo de compuesto en la mezcla, a concentración alta (5.0 mg/ml), en el crecimiento de *Penicillium oxalicum*, $F(10, 77) = 68.2$; $p < 0.0001$.

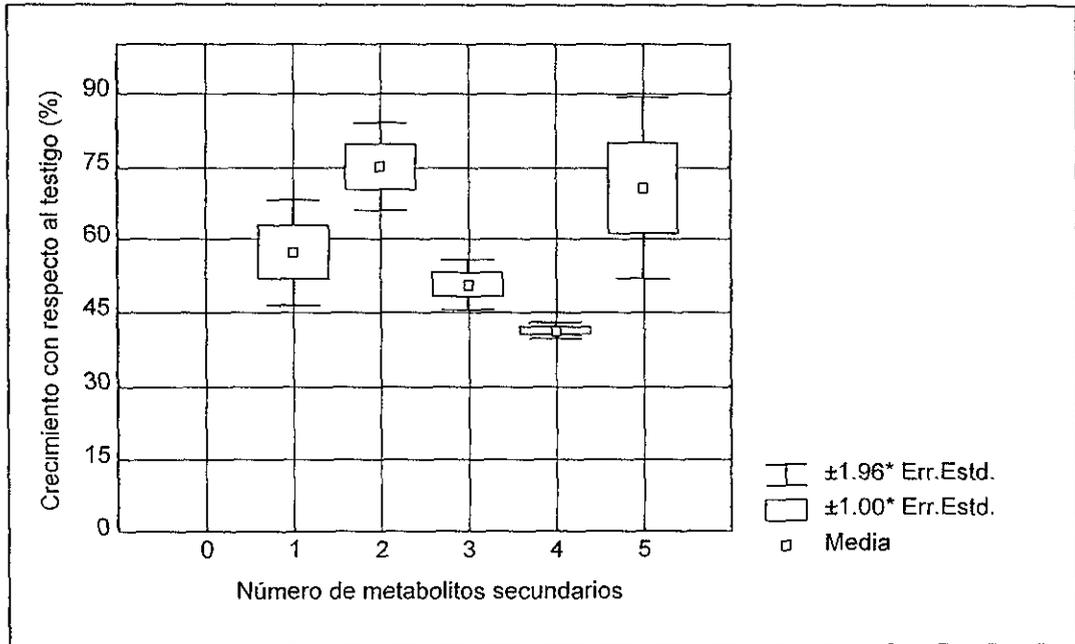


Fig. 24. Efecto del número de compuestos secundarios en la mezcla, a concentración baja (0.5 mg/ml), en el crecimiento de *Penicillium oxalicum* $F(4,82)= 4.71$; $p<0.0018$.

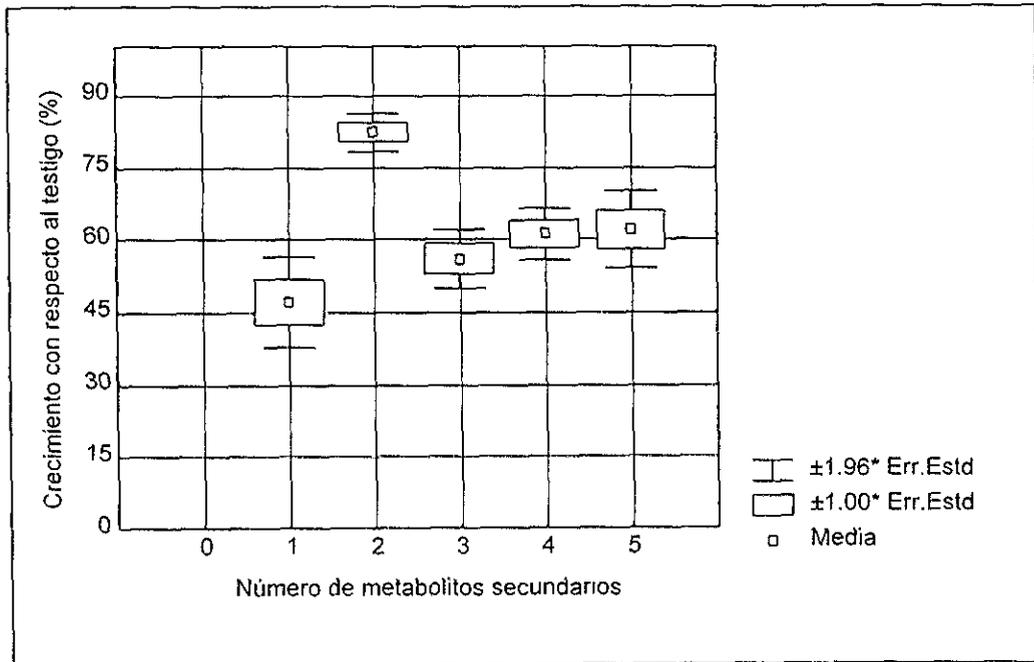


Fig. 25. Efecto del número de compuestos secundarios en la mezcla, a concentración baja (0.5 mg/ml), en el crecimiento de *Penicillium oxalicum* $F(4,83)= 10.87$; $p<0.00001$.

Los resultados de estos experimentos simultáneos, al igual que los resultados de los ensayos individuales, muestran que la concentración de metabolitos secundarios solos o en mezclas fue determinante en la inhibición del crecimiento de todos los hongos.

Los resultados del experimento a dosis baja indican que los compuestos solos a concentración baja mostraron ser ligeramente más inhibidores que las mezclas. Las mezclas por su parte mostraron un efecto más homogéneo que los compuestos solos principalmente en *F. moniliforme*. Por otra parte *F. graminearum* al igual que en los ensayos previos, resultó ser el hongo menos susceptible y *P. herbarum* el más susceptible. También se observó que el número de compuestos secundarios en la mezcla disminuyó el efecto de inhibición, excepto para *F. oxysporum* en el cual no se observó un patrón claro de inhibición respecto al aumento de número de compuestos en la mezcla.

En el caso de *Penicillium oxalicum*, los compuestos individuales resultaron ser más inhibidores que las mezclas y a diferencia de los otros hongos las mezclas mostraron un efecto de inhibición más heterogéneo, por ejemplo la mezcla PS fue poco inhibidora cuando para los otros hongos fue muy inhibidora. El número de compuestos no mostró un patrón claro de inhibición.

Los resultados del experimento a dosis alta indican que los compuestos solos tuvieron un efecto de inhibición más heterogéneo, que las mezclas. Sin embargo dos compuestos solos (ácidos ferúlico y *p*-cumárico) resultaron ser efectivos contra los cuatro hongos. Las mezclas, en cambio mostraron un efecto más homogéneo de inhibición en todos los hongos. El hongo menos susceptible fue *F. graminearum* y el más susceptible, considerando también a *Penicillium oxalicum*, fue *Phoma herbarum*. El número de compuestos, a diferencia del experimento a dosis baja, aumentó el efecto de inhibición en *F. oxysporum* y *Phoma herbarum*. En *F. graminearum* y *F. moniliforme* no se observó este efecto.

En el caso de *Penicillium oxalicum*, los compuestos individuales mostraron un efecto de inhibición mayor en comparación con las mezclas. Al igual que el resto de los hongos los compuestos solos que mostraron mayor efecto de inhibición fueron el ácido ferulico y *p*-cumarico, aunque también el ácido vainílico. Las mezclas, al igual que los resultados del experimento con dosis baja, mostraron un efecto heterogéneo. El número de compuestos en la mezcla no aumentó el efecto de inhibición sin embargo algunas mezclas resultaron ser tan inhibidoras como los compuestos solos.

7. DISCUSIÓN

7.1 Hipótesis de mayor diversidad y concentración de MS como mejor defensa

Los resultados de los experimentos individuales y simultáneos apoyaron parcialmente la hipótesis ya que mostraron que la concentración de los ácidos fenólicos, solos o mezclados fue el factor más importante en la inhibición de todos los hongos, aún cuando el tipo y número de compuestos en la mezcla también afectaron el crecimiento de las cinco especies. Estos efectos fueron menores pero diferenciales en función del grado de especialización del hongo. La diversidad química a concentración baja disminuyó el efecto de inhibición en todos los hongos y a concentración alta lo aumentó, pero sólo en ciertos hongos. El efecto de inhibición de los ácidos fenólicos como compuestos solos fue mayor que el de algunas mezclas en los hongos especialistas. En el hongo generalista y en los saprobios las mezclas mostraron ser tan inhibitorias como los compuestos más activos.

Los resultados que apoyan la hipótesis de la diversidad y concentración de metabolitos secundarios como mejor defensa son la inhibición del crecimiento de: *F. moniliforme* en el ensayo individual con mezclas de tres y cinco compuestos a concentración alta; de *F. oxysporum* en el ensayo individual con mezclas de tres y cinco compuestos a concentración media; de *P. oxalicum* en el ensayo individual con mezclas de dos, tres y cuatro compuestos a concentración alta; de los hongos *F. oxysporum* y *Phoma herbarum* en el ensayo simultáneo, con mezclas de tres, cuatro y cinco compuestos a concentración alta.

La inhibición del crecimiento de *P. oxalicum* en el ensayo simultáneo con mezclas de tres y cuatro ácidos fenólicos en concentraciones bajas, apoyan parcialmente la hipótesis.

Los resultados con *F. graminearum* y *F. moniliforme* en los ensayos individuales que mostraron un efecto de inhibición de los compuestos solos fué similar al obtenido con las mezclas de tres y cinco compuestos a dosis altas. Esto no va de acuerdo con lo que se esperaba. Es posible que para estas especies lo que determina la inhibición, después de la concentración, es el tipo de compuesto en la mezcla y no el número de compuestos en ella. Se ha reportado que además de las interacciones entre los compuestos en una mezcla, el tipo de metabolitos secundarios y su concentración relativa puede afectar diferencialmente a los consumidores de una planta (Espinosa-García y Langenheim, 1991).

El efecto de inhibición de los compuestos solos similar al de las mezclas, en *Phoma herbarum*, en el ensayo individual aún en concentraciones altas, no resultó como se esperaba. Es posible que para este hongo el efecto de la concentración de los metabolitos secundarios tenga un efecto mayor que el de la diversidad. Se ha sugerido que la actividad de algunos compuestos es dependiente de la dosis, por ejemplo, Langenheim (1994) reporta que el óxido de cariofileno, compuesto muy reactivo y de amplio espectro contra hongos y lepidopteros generalistas mostró tener un efecto dependiente de la dosis. Estos resultados también pueden atribuirse a que el número de repeticiones fue insuficiente para detectar el efecto de las mezclas en el crecimiento de *P. herbarum*, ya que en los experimentos simultáneos que incluían mayor número de repeticiones, el número de compuestos en la mezcla modificó el efecto de inhibición, en función de la concentración.

En los experimentos simultáneos el número de compuestos en la mezcla a concentración baja, disminuyó el efecto de inhibición en los hongos *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme* y *Phoma herbarum*; y mostró un patrón de inhibición poco claro en *F. oxysporum* y *Penicillium oxalicum*. Esto no va de acuerdo con nuestras predicciones, pues

esperabamos que la diversidad de los compuestos secundarios mostrara un efecto de inhibición en el crecimiento de los hongos, independientemente de la concentración. Sin embargo se ha sugerido que las mezclas de metabolitos secundarios pueden tener efectos que varían en función de la concentración (Berenbaum *et al.*, 1991; Espinosa-García y Langenheim, 1991). Espinosa *et. al.*, (1993) reportan que concentraciones altas de aceites esenciales inhiben el crecimiento de *Pleuroplaconema sp.*, endófito de *Sequoia sempervirens*; mientras que concentraciones bajas pueden estimular su crecimiento. También se ha reportado que algunos de los ácidos fenólicos que se encuentran de forma natural en el floema de las coníferas, a concentraciones bajas, pueden estimular el crecimiento *in vitro* de *Ceratocystis ranaculosis*, patógeno de *Pinus taeda*; mientras que a concentraciones altas inhiben su crecimiento (Hemingway, *et al.*, 1996). Castellanos y Espinosa-García, en 1997 reportan que dietas artificiales con mezclas diversas de metabolitos secundarios a bajas concentraciones, fueron atractivas al consumo de *Sitophilus granarius*, mientras que dietas con concentraciones altas o medias fueron repulsivas. Es posible que los hongos puedan utilizar a los compuestos secundarios en pequeñas concentraciones como una fuente de energía para crecer (Cates, *et al.*, 1996) o bien como una señal de reconocimiento de su hospedero (Rhoades, 1985).

Los resultados del experimento simultáneo a concentración alta que muestran la inhibición del crecimiento de *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *P. herbarum* y *P. oxalicum*, por efecto de los ácidos p-cumárico y ferúlico como compuestos individuales, sugieren que estos compuestos son muy activos tanto solos como en mezcla contra las cinco especies. Estos resultados apoyaron la hipótesis de la diversidad moderada, sin embargo no es posible sugerir que la corroboren ya que sólo se probó el efecto de un número reducido de compuestos secundarios de las gramíneas sobre algunos consumidores de estas plantas.

7.2 Efecto diferencial en los hongos

Las respuestas de crecimiento de los cinco hongos tanto en los experimentos individuales, como en los simultáneos mostraron una susceptibilidad diferencial de los hongos a los ácidos fenólicos y sus mezclas. En los ensayos individuales compuestos solos y mezclas mostraron mayor efecto de inhibición en *Fusarium graminearum*, incluso un compuesto y algunas mezclas mostraron un efecto de estimulación. En *Fusarium moniliforme* y *Phoma herbarum* los compuestos solos, mostraron mayor efecto de inhibición que las mezclas. En *Penicillium oxalicum* una mezcla de cuatro compuestos resultó ser el tratamiento con mayor efecto de inhibición. En cambio en *Fusarium oxysporum* la mayoría de las mezclas resultaron más inhibitorias que los compuestos solos. Se ha reportado en algunos hongos patógenos de maíz (*Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Phoma medicaginis*) susceptibilidad diferencial a quinonas estables y a sus mezclas con compuestos precursores y con productos de su oxidación enzimática (Dowd, *et al.*, 1997).

Los resultados de los experimentos simultáneos mostraron que las especies especialistas en gramíneas, *F. graminearum* y *F. moniliforme*, fueron menos susceptibles a las mezclas de ácidos fenólicos a altas concentraciones en comparación con el hongo generalista *F. oxysporum* y los saprobios *P. herbarum* y *P. oxalicum*. Esta baja susceptibilidad de *F. graminearum* y *F. moniliforme* parece indicar que estas especies están más adaptadas como patógenos a las gramíneas y que *P. herbarum* y *P. oxalicum* no son patógenos de

este hospedero. Se ha reportado que diferentes compuestos relacionados biosintéticamente pueden tener efectos diferentes en consumidores especialistas y en generalistas (Bowers & Puttick, 1988). Por ejemplo Cates, *et al.* 1996, reportan mayor inhibición *in vitro* con ácidos fenólicos en concentraciones altas, para *Ophiostoma minus* hongo generalista en comparación con *Ceratocystis ranaculosis*, hongo especialista en *Pinus taeda*.

El efecto de los compuestos individuales a concentración alta en los cinco hongos mostró un gradiente más amplio que el efecto de las mezclas. Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico inhibieron el crecimiento de los cinco hongos, en cambio los ácidos vainillico y sinápico aumentaron su efecto de inhibición al mezclarse, aún sobre los hongos más resistentes, *F. graminearum* y *F. moniliforme*. Estos resultados sugieren que estos compuestos pueden tener efectos sinérgicos al mezclarse. Se ha reportado que mezclas de fenoles simples pueden aumentar el efecto de inhibición en el crecimiento *in vitro* de hongos patógenos de coníferas, aún en especies muy especializadas (Hemingway, *et al.*, 1977). Así mismo, Silva, *et al.*, en 1998 reportan que algunos flavonoides al mezclarse pueden aumentar el efecto de inhibición en el crecimiento *in vitro* de hongos patógenos de gramíneas. Se ha sugerido que los metabolitos secundarios pueden interactuar y generar efectos de resistencia aditivos o sinérgicos contra los consumidores de las plantas (Berebaum & Zangerl, 1993; Jones & Firn, 1991), por ejemplo, algunos hongos endófitos de *Sequoia sempervirens* fueron inhibidos por una acción aditiva de los monoterpenos que se encuentran en mezclas en las hojas de esta conífera (Espinosa García & Langeheim, 1991).

Estos resultados de susceptibilidad diferencial parecen sugerir que la protección de las semillas de gramíneas contra varios consumidores con diferente grado de especialización, puede ser mejor con mezclas de metabolitos secundarios que con compuestos solos ya que las respuestas de los hongos a los compuestos solos fueron más heterogéneas que las respuestas a las mezclas. Algunos autores han sugerido que la diversidad química en las plantas puede actuar como una defensa multifacetas contra sus consumidores (Kubo & Hanke, 1985). Por otra parte, las mezclas aumentaron la actividad de algunos compuestos aun sobre los hongos más resistentes.

Aun cuando las mezclas no mostraron una actividad mayor que los compuestos solos en los hongos especialistas, *Fusarium graminearum* y *F. moniliforme*, es posible que estos hongos pudieran verse afectados en generaciones sucesivas. Se ha sugerido que mezclas de compuestos secundarios podrían retardar la adaptación de los consumidores a su hospedero (Pimentel & Belloti, 1976; Berenbaum & Zangerl, 1993) debido a que son más difíciles de superar evolutivamente que los compuestos individuales.

8. CONCLUSIONES

Los resultados apoyaron parcialmente la hipótesis: el efecto de la concentración de los ácidos fenólicos, solos o en mezclas, fue de inhibición del crecimiento de todos los hongos, sin embargo el efecto de la diversidad de ácidos fenólicos mostró estar en función de la concentración y del grado de especialización de los hongos en las gramíneas.

Los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, vainílico, caféico, sinápico a dosis altas pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Phoma herbarum* y *Penicillium oxalicum*.

La mayor actividad de los ácidos fenólicos como compuestos solos en los hongos especialistas, *F. graminearum* y *F. moniliforme*; y la actividad de las mezclas similar a la de los compuestos más activos en los hongos más generalistas, incluso saprobios; sugiere que la diversidad química puede tener un efecto diferente en los hongos patógenos especialistas que en los hongos generalistas.

El efecto de la diversidad química en la actividad de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de los hongos *in vitro*, menor inhibición a dosis baja y mayor inhibición a dosis alta, sugiere que el efecto de la diversidad de compuestos secundarios puede actuar en los consumidores en función de la concentración.

En este trabajo sólo se probó que los principales ácidos fenólicos presentes en las semillas de las gramíneas disminuyen el crecimiento de varios hongos que pueden estar asociados a estas plantas, pero no se probó la actividad fungicida de estos compuestos secundarios.

7. REFERENCIAS

- Adesanya, S.A., O'Neill, M. J., Roberts, M.F., 1986. Structure-related fungitoxicity of isoflavonoids. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **29**: 95-103.
- 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., Mihm, J.1992. Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects *Prostephanus trunacatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch.). **J. Stored Prod. Res.**, **2**: 119-126.
- Berenbaum, M.R, 1985. Brementown revisited: interactions among allelochemicals in plants. **Recent Advances in Phytochemistry** **19**: 139-169.
- Berenbaum, M.R, 1988. Allelochemicals in insect-microbe-plant-interactions: Agrtns provocateurs in coevolutionary arms race. Pp.97-124. En: Barbosa, P. & Lentourneau, D.K. (eds.). **Novel Aspects of Insect-Plant Interactions**. John Wiley & Sons. New York.
- Berenbaum, M.R, 1991, Nitao, J.K. Zangerl, L. 1991. Adaptative significance of furanocoumarin diversity in *Pastinaca sativa* (Apiaceae). **Journal Chemical Ecology** **17**: 207-215.
- Berenbaum, M.R., Zangerl, A.R. 1993. Furacoumarin metabolis in *Papilo polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance. **Oecologia** **95**: 30-375.
- Bernays, E. A., 1988. Evolution of feeding behavior in insect herbivores. **BioScience** **48**: 35-44.
- Bernays, E.A. and Chapman, R. F. 1994. **Host Plant Selection by Phytophagous Insects**. Chapman & Hall. New York. 312 pp.
- Bonfil, S. H. 1995. **Efecto de la diversidad de metabolitos secundarios sobre la degradación de semillas artificiales en un suelo agrícola**. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Bradshaw, T., Mortimer, M., 1986. Evolution in communities. En Kikkawa, J., D. J. Anderson (eds.) **Comunity Ecology**. Patterns and process. Blackwell Scientific Publications Oxford: 309-341
- Bryant, J.P.; Chapin, F.S. III, Klein, D.R., 1983. Carbon/nutirent balance of boreal plants in relation to vretebrate herbivory. **Oikos** **40**: 357-368
- Castellanos, I. & Espinosa-García, F.J., 1987. Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. **Biochemical Systematics and Ecology** **25**: 591-602.

- Cates, R.G. 1996. The role of mixtures and variation in the production of terpenoids in conifer-insect-pathogen interactions. pp. 180-215. En: Romeo, J.T., Saunders, J.A., Barbosa, P. (eds). **Recent Advances in Phytochemistry**. Plenum Press. New York.
- Coley, P.D., & Kursar, T.A., 1998. Herbivoría, defensas vegetales y enemigos naturales en bosques tropicales. **Manuscrito inédito**.
- Coley, P.D., Bryant, J.P., Chapin, F.S., 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science 230**: 895-899.
- CSS.1993. **Statistica**. Statsoft, Inc. New York.
- Dowd, P.F., 1989. Fusaric A secondary fungal metabolite that synergizes toxicity of cooccurring host allelochemical to the corn earworm, *Heliothis zea* (Lepidoptera). **Journal of Chemical Ecology 15**: 249-254.
- Dowd, P.F., Duvick, J.P., Rood, T. 1997. Comparative toxicity of allelochemicals and their enzymatic oxidation products to maize fungal pathogens, emphasizing *Fusarium graminearum*. **Natural toxins 5**: 180-185.
- Edwards, P.J. 1989. Insect herbivory and plant defence pp: 141-145. En: Grubb, P.J. y Whittaker, J. B. (eds.) **Toward a More Exact Ecology**. Blackwell Scientific Publications.
- Espinosa-García, F.J., Langenheim, J.L., 1991. Effects of sabinene and γ -terpinene from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. **Biochemical Systematics and Ecology 8**: 643-650.
- Erilch, P.R. & Raven, P.H. 1964. Butterflies and Plants. A study in coevolution. **Evolution 18**: 586-608.
- Farr., D.F.; Bills, F. Gerald, Bills.; Chamuris, G.P.; Rossman, A.Y., 1989. **Fungi on plants and plant products in the United States**. APS Press. Minesota, USA. 1252 pp.
- Fenny, 1976. Plant apparency and chemical defense. **Recent Advances in Phytochemistry 10**: 1-40.
- Fisher, P.J., Petrini, O., Lappin. S.H.M., 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytol. 122**: 229-305.
- Frankel, G.S., 1959. The raison d'être of secondary plant substances. **Science 129**: 1466-1470.
- Grubb, P.J. 1992. A positive distrust in simplicity: lessons from plant defense and from competition among plants and among animal. **Journal of Ecology 80**: 585-610.
- Hallman, J., Sikora, R.A., 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodos and soil borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology 102**: 155-162.

- Hemingway, R.W., McGraw, G.W., Barras, S. 1977. Polyphenols in *Ceratocystis minus* infected *Pinus taeda*: Fungal metabolites, phloem and xylem phenols. **Agri. Food Chem. 25**: 717-722.
- Herns, D. A., Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. **The Quarterly Review of Biology 67**: 238-355.
- Herrman, K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Review in Food Science and Nutrition 28**: 315-347.
- Jones, C. G., Firn, R.D. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. **Phil. Trans. R. Soc. London B 333**: 273-280.
- Jones, C. G., Lawton, J.H. 1991. Plant chemistry and insect species richness of british umbellifers. **Journal of Animal Ecology 60**: 767-777.
- Kubo, I., Hanke, F.J. 1985. Multifaceted chemically based resistance in plants. **Recent Advances in Phytochemistry 19**: 171
- Langenheim, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology 20**: 1223-1280.
- McKey, D. 1977. The distribution of secondary compounds within plants. Pp:55-133. En: Rosental, G. A. Y Janzen, D.H. (eds.) **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**. Academic Press, Nueva York, USA.
- Mitter, C. Farrell, B. and Wieman, 1988. The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification?. **American Naturalist 132**: 107-128
- Moreno, M.E., 1988. **Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados**. UNAM. México. 109 pp.
- Pimentel, D. & Belloti, A. 1976. Parasite -host population systems and genetic stability. **American Naturalist 110**: 887-888.
- Rhoades, D.F., 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. pp:3-54. En: Rosental, G. A. Y Janzen, D. H. (eds.) **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**. Academic Press, Nueva York, USA.
- Rhoades, D.F., Cates, R.G., 1976. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. **Recent Advances in Phytochemistry 10**: 168-213.
- Romero, C.S., 1993. **Hongos fitopatógenos**. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 347 pp.

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

Sen, A. Bergvinson, D., Arnason, J.T., Atkinson, J., 1994. Role of phenolic acid amides in resistance of maize towards *Sitophilus zeamais* and *Prostephanus truncatus*. **Manuscrito inédito**.

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

Silva, A.M.S., Weidenbörner, M., Cavaleiro, J.A.S., 1998. Growth control of different *Fusarium* species by selected flavones and flavonoid mixtures. **Mycol. Res.** **102**: 638-640.

Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1969. **Biometria**. Ed. H. Blume. Madrid, España. 832. pp.

Turlings, T.C.J. & Berney, B. 1998. Efectos de los metabolitos secundarios vegetales en el comportamiento y desarrollo de avispas parasitoides. **Manuscrito inédito**.

Watanabe, T., 1994. **Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species**. CRC Press, Inc. Florida, USA. 411 pp.

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

Weidenbörner, M., Hindorf, H., Chandra, H.J., Tsotsonos, P., Egge, H. 1989. Antifungal activity of isoflavonoids storage fungi of the genus *Aspergillus*. **Phytochemistry** **28**: 3317-3319.

Zillinsky, F.J., 1984. **Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño: Una guía para su identificación**. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, El Batán, México. 141 pp.