

EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE MATERIALES GENÉTICOS DE *Melilotus albus* DESR. CON DIFERENTE CONTENIDO DE CUMARINA Y SU EFECTO SOBRE LA ALIMENTACIÓN DE *Colias lesbia* (LEPIDOPTERA: PIERIDAE)

ZABALA, J. M.¹; MARINONI, L.¹; RIBERO, G.¹;

SANCHEZ, R.¹ & DEL VALLE, E.^{1,2}

RESUMEN

Melilotus albus es una especie leguminosa naturalizada en la Argentina y valorada como recurso forrajero. Compuestos derivados de la cumarina se encuentran en cantidades significantes en esta especie generando, en algunos casos, problemas nutricionales. En la presente investigación se evaluó en materiales con diferente contenido de cumarina: a) parámetros morfológicos relacionados con el vigor de planta y b) el consumo foliar por parte de *Colias lesbia*. Los resultados obtenidos indican que el contenido de cumarina no estaría relacionado con las diferencias encontradas entre materiales para los parámetros morfológicos. Los materiales con mayores niveles de cumarina tuvieron un efecto disuasivo sobre el consumo foliar. Por otro lado, las hojas de los materiales de *M. albus* fueron menos consumidas que las de alfalfa cuando se ofrecieron de manera simultánea. La información generada en este trabajo será tomada en cuenta en el desarrollo de un programa de mejoramiento para reducción del contenido de cumarina sin comprometer la tolerancia a plagas en *M. albus*.

Palabras claves: *Melilotus albus*, cumarina, *Colias lesbia*.

ABSTRACT

Agronomic evaluation of genetic materials of *Melilotus albus* Desr. with different content of coumarin and its effect on *Colias lesbia* (Lepidoptera: Pieridae) feeding.

Melilotus albus is a naturalized legume in Argentina and is recognized as a species with great potential to be used as forage source. Coumarin derivatives are found in significant amounts in this species. This study was designed to evaluate the effect of materials with different coumarin content on: a) morphological traits associated with plant vigour and b) leaf feeding of *Colias lesbia*.

1.- Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: jmzabala@fca.unl.edu.ar

2.- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

Manuscrito recibido el 18 de agosto de 2015 y aceptado para su publicación el 26 de febrero de 2016.

The results show that coumarin content would not be associated with morphological differences between materials. Materials with high levels of coumarin had a deterrent effect on leaf feeding. Furthermore, leaves of all materials of *M. albus* were rejected when they were offered together with leaves of alfalfa. The information generated in this study will be useful to design a breeding program to reduce the coumarin content without decreasing pest tolerance in *M. albus*.

Key words: *Melilotus albus*, coumarin, *Colias lesbia*.

INTRODUCCIÓN

La producción ganadera extensiva en el centro norte de Argentina utiliza como fuente principal de forrajes los pastizales naturales, debido a que los cultivares adaptados a zonas de producción ganadera son escasos, en particular de leguminosas. Actualmente, esto es más significativo debido al desplazamiento de la producción ganadera hacia zonas con suelos salinos e inundables. En ambientes tropicales y subtropicales, la adopción de especies leguminosas ha permitido aumentar la calidad de la dieta animal y la disponibilidad de nitrógeno edáfico (5; 16; 28; 29; 32; 35).

Melilotus albus Desr. es una especie leguminosa con formas anuales o bienales originaria de Eurasia, alógama, autocompatible (43) y naturalizada en la Argentina (46). En EEUU y Canadá fue utilizada como especie forrajera y mejoradora de suelos, pero fue decayendo su uso a partir de la década de 1960 en concordancia con la aparición de los fertilizantes químicos y el uso de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (37). En Australia, se están realizando trabajos de evaluación forrajera en especies del género para ambientes salinos (6; 29; 33), reconociendo a *M. albus* como una de las especies más promisorias, en particular algunos materiales colectados en Argentina (8).

En Argentina, la forma anual es valorada como recurso forrajero por su rusticidad y calidad (4; 9; 10; 26; 30), adaptándose al cultivo en diversos tipos de suelo (pH entre 4,8-8,2) y clima (precipitaciones desde los 500 mm anuales). A pesar de su importancia, son pocos los trabajos de colecta, conservación y mejoramiento en esta especie (41; 45). En el país comenzó la difusión de esta especie a través de un cultivar anual inscripto por el INTA en 1954, creado por los Ingenieros Agrónomos Serrano y Echeverría, denominado El Domador MAG (11; 24). Los trabajos de mejoramiento fueron discontinuados y en la actualidad existen inscriptos solamente dos cultivares (22). Se encuentran en proceso de inscripción dos nuevos cultivares, propiedad de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y cuyo obtentores pertenecen al Programa de Documentación, Conservación y Valoración de la Flora Nativa de la UNL (PRODOCOVA). Estos dos materiales fueron utilizados en este estudio.

Dentro de los aspectos a trabajar a futuro está el desarrollo de cultivares con reducido contenido de cumarina. La presencia de cumarina en *M. albus* trae aparejado limitaciones en su uso debido a: a) la disminución de la palatabilidad inicial cuando se ofrece por primera vez como forraje en pie (9; 37) y b) la producción, a partir de la cumarina,

de un compuesto tóxico para el ganado (dicumarol) cuando se henifica en condiciones húmedas (9; 37).

El fenotipo ausencia de cumarina ha sido transferido a *M. albus* por medio de cruzamientos con otras especies de *Melilotus* que no acumulan el compuesto (37). A partir de esos cruzamientos interespecíficos fueron desarrollados diferentes genotipos experimentales con solo trazas de cumarina. Además se determinó que existe un gen mayor responsable de la acumulación de cumarina es Cu/cu, siendo los genotipos sin cumarina los recesivos cucu (13). Por otro lado, dentro de la especie se ha encontrado que existe variación de tipo cuantitativa para el carácter, desarrollándose en Australia un cultivar con bajo contenido de cumarina (cv “Jota”) a partir de materiales colectados en Argentina (42). Este cultivar produce un 50% menos de cumarina en el forraje que su material originario. En comparaciones realizadas por Trigg (42), el cv jota contiene 2947 (+454) mg/kg MS de cumarina, mientras que el material original del programa de mejoramiento y el cv Domador MAG poseen 5201 (+1813) y 4737 (+943) mg/kg MS de cumarina, respectivamente. En Argentina no existen en el mercado cultivares con baja cumarina. Tampoco existen estudios donde se analice la performance agronómica de materiales con diferente contenido de cumarina, ni de su efecto sobre las plagas más comunes.

Los antecedentes en relación a la asociación entre contenido de cumarina y producción de forraje en el género *Melilotus*, han sido contradictorios. Se han encontrado evidencias que la reducción en el contenido de cumarina afecta el vigor de planta (12). Sin embargo, Smith (36) no encontró diferencias en vigor de planta entre materiales con diferente contenido de cumarina.

Por otro lado, los compuestos fenólicos como la cumarina actúan como defensa de las plantas ante la herbivoría (40), por lo que es probable que los materiales con menor contenido de cumarina sean más atacados por plagas que los materiales con mayor contenido de cumarina.

En el presente trabajo se evaluó, en materiales de *M. albus* con diferente contenido de cumarina: a) parámetros morfológicos relacionados con el vigor de planta y b) el consumo foliar por parte de larvas de *Colias lesbia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales analizados

Se evaluaron 6 materiales de *Melilotus albus*.

1.- Cultivar Munay (desarrollado por el PRODOCOVA de la UNL): con contenido de cumarina de 4604 ppm (+678) mg/Kg MS. Material mejorado por mayor crecimiento invernal. Posee menor capacidad de rebrote que el cultivar Yachay. Cultivar en proceso de inscripción.

2.- Cultivar Yachay (desarrollado por el PRODOCOVA de la UNL): con contenido de cumarina de 5202 ppm (+979) mg/Kg MS. Mayor capacidad de rebrote. Posee menor producción invernal que Munay. Cultivar en proceso de inscripción.

3.- Cultivar Jota (desarrollado en Australia, proveniente del South Australian Research and Development Institute. Genetic Resource Centre): contenido de cumarina de 2947 (+454) mg/Kg MS.

4. Línea homocigota experimental N46 (PI 557503) (proveniente de North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, Ames, Estados Unidos): sin cumarina, genotipo cucu.

5.- Línea homocigota experimental N49 (PI 557506) (proveniente de North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, Ames, Estados Unidos): con cumarina, genotipo CUCU, isolínea de N46 con la única diferencia en el gen Cu/cu. Contenido de cumarina 4291 ppm (+-873).

6.- R30. Población natural colectada en los Bajos Submeridionales (Ruta Provincial 30, Provincia de Santa Fe): contenido de cumarina 6129 ppm (+-989).

El contenido de cumarina de los materiales N46, N49 y Jota fueron provistos por las instituciones que remitieron el material. La evaluación del contenido de cumarina en los materiales Munay, Yachay y R30 se realizó por HPLC (15 muestras por material).

Evaluación del contenido de cumarina por HPLC

Preparación de las muestras: Las muestras secas de material vegetal fueron trituradas con una procesadora de mano tipo mulinex hasta lograr un tamaño de 0,5 cm de largo. Se procesaron completamente sin distinguir entre hojas y tallos.

Extracción de cumarina: A una masa de aproximadamente 1 g se le agregó 25,00 mL de agua destilada a temperatura ambiente, se sonicó durante 10 minutos y posteriormente se llevó a un agitador a 200 rpm durante 25 minutos (3).

Determinación HPLC: Dicha solución se trasvasó a tubos de centrifuga para ser centrifugados a 500 rpm por 5 minutos. Luego fue filtrada con filtro de 0,45 μ m.

Preparación del testigo: Se prepararon soluciones estándares de cumarina (5, 50, 100, 200 ppm) a partir de la solución madre (1000 ppm) preparada a partir de Cumarina 99,9% Cicarelli. Como la solubilidad en

agua es muy pequeña, directamente se solubilizo en la fase móvil.

Equipo HPLC y condiciones utilizadas:
Equipo: Konik 500B, con Horno para control de Temperatura, con sistema cuaternario de solventes y detector UV Linear UVis 200 de longitud de onda variable. Software Konikrom Tm Chromatography Data System Version 6.5. Columna: C18- RP (250 x 4 mm), 0,5 nm diámetro de poro. La temperatura de la columna fue estabilizada a 40°C, el volumen de inyección fue de 20 μ L y la señal cromatográfica fue obtenida a una longitud de onda de 254 nm.

Fase móvil: Metanol/Acetonitrilo/agua (25/25/50; todos los solventes son grado HPLC). La separación de la cumarina fue lograda en forma isocrático con un flujo de 1mL por minuto, en donde la cumarina eluyó en un tiempo de 3,5 minutos.

Evaluación de parámetros morfológicos

La siembra fue realizada entre el 21 y 29 de marzo de 2013 en el jardín experimental Juan Donnet de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral. Se evaluaron 30 plantas por material dispuestas en un diseño completamente aleatorizado, sumando una totalidad de 180 plantas. Semillas de todos los materiales evaluados se escarificaron manualmente (con papel de lija) y se sembraron en macetas plásticas de 3 L, las cuales contenían una mezcla de arena y tierra común (1:1). Las macetas se dispusieron bajo media sombra y se regaron con intervalos frecuentes de 5 a 7 días. El nacimiento fue homogéneo, aproximadamente a los 7-10 días de sembradas. Se realizó el desmalezado en forma manual. Las plantas fueron trasplantadas a los 40 días de sembradas.

Al momento del trasplante realizaron las siguientes mediciones:

- Altura (cm).
- Número de hojas.

Luego del trasplante, las plantas fueron cortadas aproximadamente a los 47-50 días. En ese momento se evaluaron los siguientes parámetros:

- Altura de planta (cm).
- Número de hojas.
- Peso seco de hoja (mg). Promedio de 5 hojas.
- Producción de biomasa seca (foliar y de tallo) (g).

A los 30 días del corte se evaluaron los siguientes parámetros:

- Número y longitud (cm) de ramificaciones basales (por debajo de los 4 cm).
- Altura de planta en plena floración (todas las plantas con un brote floral) (cm).

Las variables fueron analizadas estadísticamente en el paquete estadístico InfoStat (7) a través de un análisis de la varianza para determinar las diferencias existentes entre materiales evaluados. Las diferencias de medias fueron evaluadas a través de un test de Tukey ($p < 0,05$). Debido a las diferencias genéticas entre los materiales Munay, Yachay, Jota, R30 (poblaciones) y N46 y N49 (líneas homocigotas), se analizaron las diferencias entre estos dos grupos por separado.

Ensayos de preferencia

Para la evaluación de la preferencia se realizaron dos ensayos de consumo por parte de larvas de *Colias lesbia*. Esta especie es la principal plaga defoliadora de alfalfa en la región pampeana Argentina (1). Debido a que *Melilotus albus* se siembra en regiones donde existen lotes de alfalfa, es probable que la plaga afecte al cultivo. Por ello, optamos por estudiar la preferencia alimentaria de esta especie.

Ensayo de preferencia individual

La población de larvas de *C. lesbia* utilizada fue recolectada mediante el uso de redes de arrastre, en un campo con pastura de alfalfa en los alrededores de la localidad de Esperanza. Se aseguró que las mismas no estén parasitadas o enfermas y se corroboró que su actividad alimentaria sea normal en cámara de cría de insectos. Las larvas fueron colocadas en envases plásticos transparentes, circulares, con tapa, de 7 cm de altura por 8,5 cm de diámetro. Los envases fueron colocados boca abajo en estantes (o sea con la tapa hacia abajo). En la parte superior se realizó un orificio y se adhirió una malla de plástico para permitir el intercambio gaseoso.

El material vegetal fue sembrado el 10 de enero de 2014. Cuando las plantas alcanzaron aproximadamente 15 cm de altura se cortaron las hojas para emplearlas posteriormente en los ensayos de preferencia.

A los insectos, previamente sometidos a ayuno durante 24 hs, se les suministró 1 hoja trifoliada de cada uno de los materiales. Cada repetición estuvo representada por un envase con una larva y una hoja trifoliolada de *M. albus*. Se realizaron 13 repeticiones de cada material. Las hojas se colocaron con un trozo de algodón humedecido en el pecíolo para evitar su desecación. Se permitió que las larvas permanezcan 20 horas en las unidades experimentales en una cámara con 25°C (± 1) de temperatura y 55% HR (± 4). Inmediatamente se determinó el grado de defoliación de las hojas en los distintos materiales de *M. albus*. El grado de defoliación se calculó a partir del área foliar consumida, a través del porcentaje consumido con respecto al área inicial de los folíolos. Para lo anterior se dispuso del software Image J (20).

La variable porcentaje de área foliar consumida fue analizada a través del test estadístico no paramétrico H de Kruskal-Wallis (7).

Ensayo de preferencia de a pares

Se realizó la comparación de preferencia entre plantas de algunos de los materiales de *M. albus* y entre plantas de *Medicago sativa* y *M. albus*. Las características del experimento fueron similares a la del ensayo de preferencia individual, con la diferencia de que a las larvas se les suministraron hojas de materiales con diferente contenido de cumarina, incluido un material de alfalfa. Se analizaron los siguientes tratamientos:

- Jota y Alfalfa (baja cumarina vs. testigo alfalfa).
- N46 y Alfalfa (sin cumarina vs. testigo alfalfa).
- N49 y Alfalfa (alta cumarina vs. testigo alfalfa).
- N46 y N49 (sin cumarina vs. alta cumarina).
- Munay y Jota (alta cumarina vs. baja cumarina).

La variable porcentaje de área foliar consumida fue analizada estadísticamente en el paquete estadístico InfoStat (7) a través de un test T de muestras apareadas. En el caso que no se cumplió la hipótesis de normalidad de las diferencias apareadas, se realizó el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras apareadas.

RESULTADOS

Mediciones en el momento de trasplante y en el corte

En relación a la evaluación de parámetros morfológicos al momento del trasplante, entre los materiales N46 y N49 existieron diferencias significativas en altura de planta, mientras que no hubo diferencias en el número de hojas (Fig. 1a y c). Entre los materiales Munay, Yachay, Jota y R30 existieron diferencias significativas para las variables altura de plantas y número de hojas (Fig. 1b y d).

Las mediciones realizadas al momento del corte, mostraron que los materiales N46 y N49 no se diferenciaron estadísticamente en ninguna de las variables analizadas (Fig. 2). Cabe destacar que al momento del corte ambos materiales se encontraban en inicio de floración, por lo que las estructuras reproductivas se sumaron al peso de tallo. No se las pesó por separado ya que no representaban más de 2% del peso del tallo.

Al momento del corte los materiales Jota, Munay, Yachay y R30 se diferenciaron estadísticamente en todas las variables analizadas (Fig. 3), con excepción del peso de tallo (Fig. 3 e).

Mediciones luego del corte

No existieron diferencias estadísticas entre los materiales N46 y N49 en el número y longitud de las ramificaciones basales a los 30 días del corte (Fig. 4 a y c), como así tampoco en la altura en plena floración (Fig. 4 e).

Los materiales Jota, Munay, Yachay y R30 se diferenciaron estadísticamente en el número y longitud de ramificaciones basales a los 30 días del corte (Fig. 4 b y d) y en la altura de planta en plena floración (Fig. 4f).

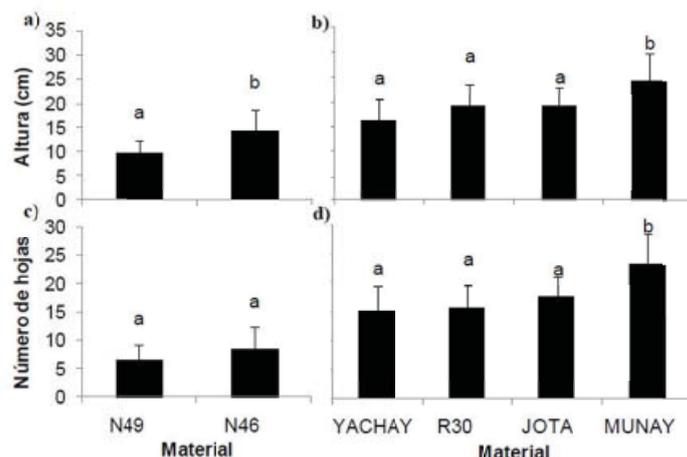


Fig. 1: Valores promedios y desvíos estándar de los materiales de *Melilotus albus* analizados a los 40 días de la siembra para las variables: a y b) altura de plantas; c y d) número de hojas. Por el tipo de material se analizaron por separado los materiales N46 (sin cumarina) y N49 (con cumarina) y los materiales Munay, Yachay, R30 y Jota (este último con la mitad del contenido normal de cumarina). Medias con una letra común no son significativamente diferentes en el test de Tukey ($p < 0,05$).

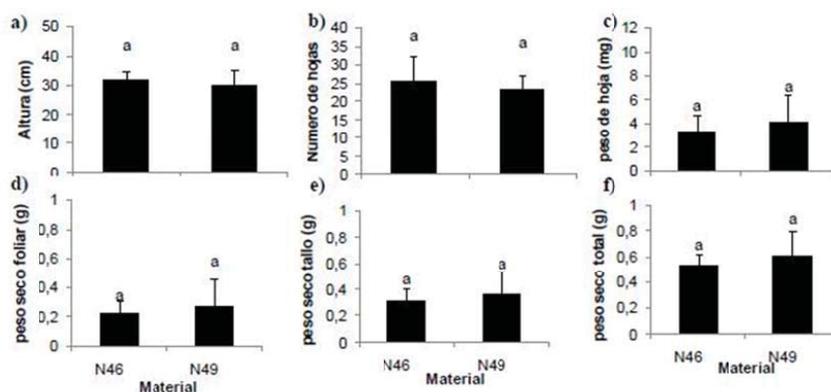


Fig. 2: Valores promedios y desvíos estándar de los materiales de *Melilotus albus* N46 (sin cumarina) y N49 (con cumarina), analizados al momento del corte: a) altura de plantas (cm); b) número de hojas; c) peso de hoja (mg, promedio de 5 hojas); d) peso seco foliar por planta (g); e) peso seco tallo por planta (incluye estructuras reproductivas); f) peso seco total por planta. Medias con una letra común no son significativamente diferentes en el test de Tukey ($p < 0,05$).

Ensayo de preferencia individual

Existieron diferencias significativas entre materiales en cuanto al porcentaje de defoliación. Las larvas optaron por consumir preferentemente los materiales con reducido contenido de cumarina (N46 y Jota) (Fig. 5). No existieron diferencias significativas entre los demás materiales en cuanto al porcentaje de defoliación, el cual se puede considerar bajo.

Ensayo de preferencia de pares

En cuatro de los cinco tratamientos no se pudo cumplir con los requisitos del test T de muestras apareadas. Se evidenció claramente que entre materiales de *M. albus* y alfalfa las larvas siempre prefirieron las plantas de esta última. Cuando las larvas podían optar por materiales de *M. albus* con diferente contenido de cumarina, éstas prefirieron los materiales con menor cantidad de la misma, es decir el cultivar Jota (nivel intermedio de cumarina) y N49 (sin cumarina) (Fig. 6).

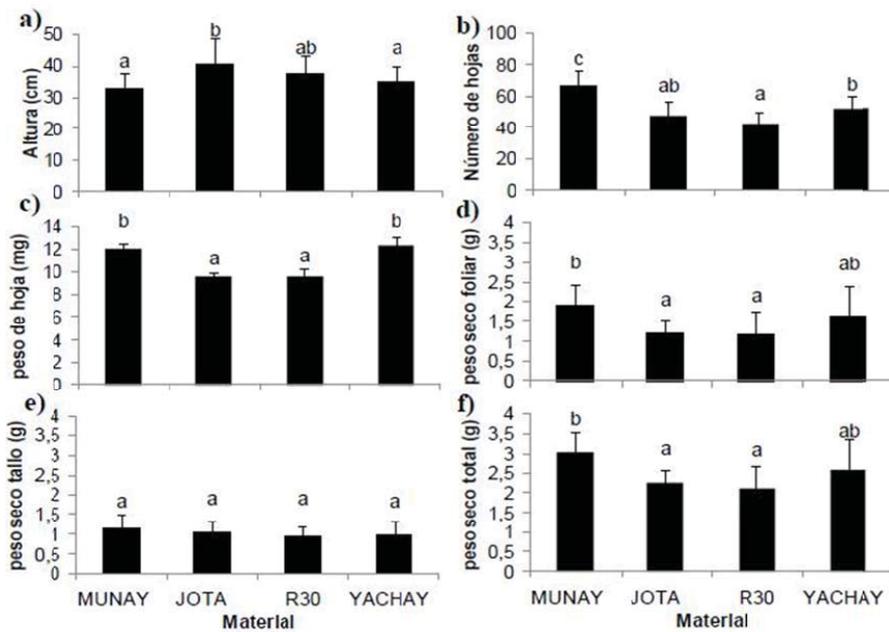


Fig. 3: Valores promedios y desvíos estándar de los materiales de *Melilotus albus*, Munay, Jota, R30 y Yachay al momento del corte: a) altura de plantas (cm); b) número de hojas; c) peso de hoja (mg, promedio de 5 hojas); d) peso seco foliar por planta (g); e) peso seco tallo por planta; f) peso seco total por planta. Medias con una letra común no son significativamente diferentes en el test de Tukey ($p < 0,5$).

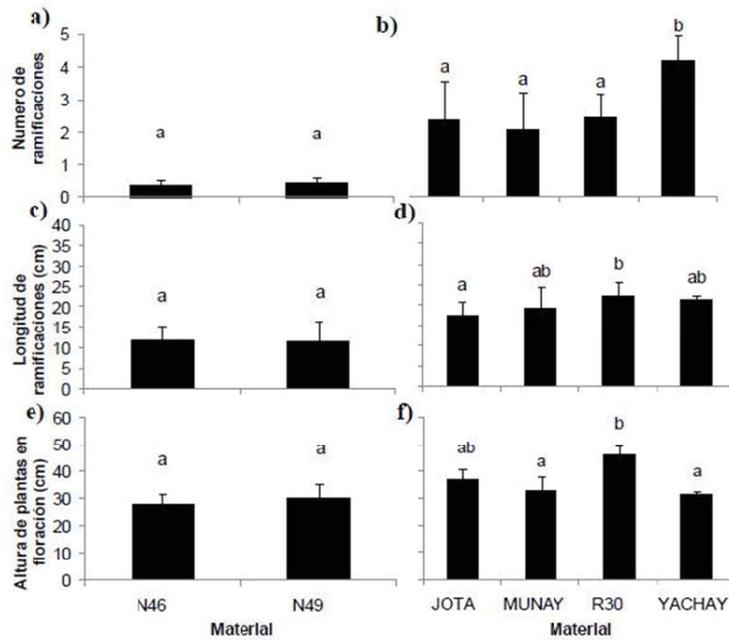


Fig. 4: Valores promedios y desvíos estándar de los materiales de *Melilotus albus* analizados a los 30 días del corte para las variables: a y b) número de ramificaciones basales; c y d) longitud de las ramificaciones basales; e y f) altura de plantas a floración. Por el tipo de material se analizaron por separado los materiales N46 (sin cumarina) y N49 (con cumarina) y los materiales Munay, Yachay, R30 y Jota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes en el test de Tukey ($p < 0.05$).

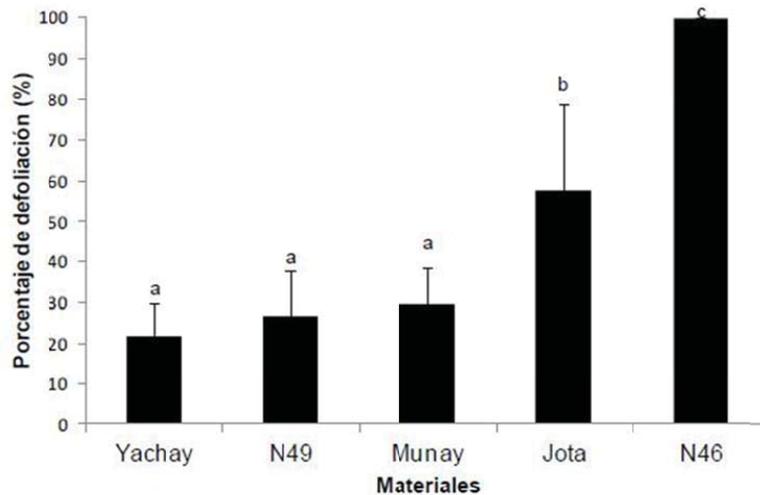


Fig. 5: Porcentaje de defoliación (medias y desvíos estándar) de los materiales de *Melilotus albus* por larvas de *Colias lesbia*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes en la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

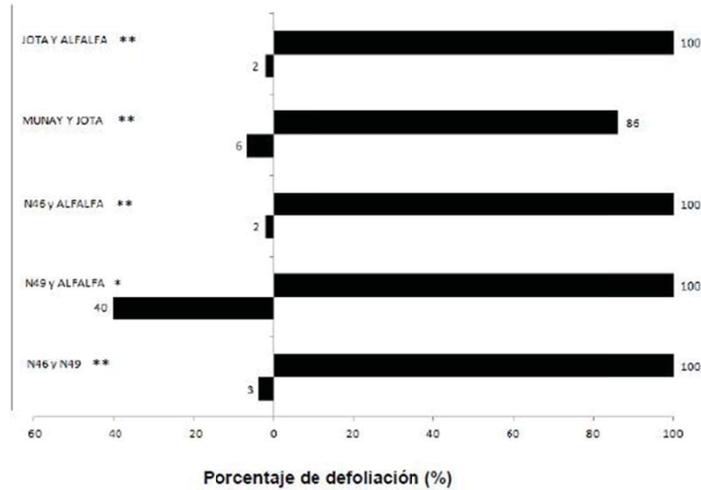


Fig. 6: Valores promedios de consumo (en %) de larvas de *Colias lesbia* en tratamientos de a pares: Jota y Alfalfa, Munay y Jota, N46 y Alfalfa, N49 y Alfalfa, N46 y N49. Tratamientos con * mostraron diferencias significativas en el Test T de muestras apareadas ($p < 0,05$). Tratamientos con ** mostraron diferencias significativas en el test de Wilcoxon de muestras apareadas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En relación al ensayo a campo, no existieron evidencias de que el contenido de cumarina esté relacionado con las diferencias encontradas entre los materiales para las variables analizadas. Esto indicaría que el contenido de cumarina no afectaría parámetros relacionados con el vigor de las plantas, su crecimiento o desarrollo. Los antecedentes indican que la acumulación de metabolitos secundarios de plantas no está relacionada con cambios significativos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (34).

Los materiales N46 y N49 no mostraron diferencias en ninguna de las variables analizadas. Al ser dos isolíneas que se diferencian solamente por el gen de cumarina, la no existencia de diferencias morfológicas, indicaría que el contenido de cumarina no afectaría el comportamiento agronómico de

estos materiales. Con respecto a los materiales Jota, Munay, Yachay y R30, las diferencias encontradas en las variables analizadas no se correlacionaron con su contenido de cumarina. El material Jota (con aproximadamente la mitad del contenido de cumarina que los demás materiales) no mostró ninguna reducción significativa en los parámetros evaluados, con respecto a los demás materiales, mostrando en algunos casos valores superiores a aquellos (por ej. altura al momento del corte). Estos datos concuerdan con lo mencionado por Trigg (42), quien expresó que el cv. Jota con bajo contenido de cumarina (50% con respecto al material original) no mostró disminución significativa del vigor de planta. Sin embargo, Goplen (12) estudió agronómicamente isosintéticas (poblaciones con base genética común que difieren en un carácter) de formas bianuales de *M. albus* con diferente contenido de cumarina y determinó que la

población con bajo contenido (1% de cumarina con respecto al de alto contenido) tuvo menor vigor de plántula, producción de forraje y de semilla que los de alto contenido. Sin embargo no pudo explicar por qué la ausencia de cumarina produce una disminución general del vigor. Por otro lado Smith (36) indica que el cv. Denta de *M. albus* bianual y de bajo contenido de cumarina (con similar contenido de cumarina que las poblaciones estudiadas por Goplen (12)) poseen un vigor similar al de los materiales con altos niveles de cumarina.

Los datos del ensayo de preferencia indican que el contenido de cumarina afecta el consumo por parte de *Colias lesbia*. Diversos metabolitos secundarios de plantas, entre los que se encuentran los derivados de la cumarina, han sido citados como mecanismos de defensa en contra de insectos (19; 27). En particular se ha encontrado que los derivados de la cumarina, tienen efecto disuasivo (2; 15; 38; 39; 44) o de inhibidores del crecimiento (23; 25; 31).

Nuestros resultados coinciden con los de Gorz *et al.* (14) quienes expusieron plantas con alta y baja concentración de cumarina a ejemplares adultos de tres especies del género *Epicauta* (bicho moro). Los materiales con altos niveles de cumarina tuvieron un efecto disuasivo sobre las tres especies (consumo de hojas menor al 25%), mientras que los materiales baja cumarina no (más del 95% de las hojas consumidas). Existen también antecedentes de efectos disuasivo de *M. albus* en pulgones (18). Sin embargo Howe y Gorz (17) encontraron que especies de *M. albus* con altos y bajos niveles de cumarina muestran igual efecto disuasivo sobre una especie de pulgón (*Aphis medicaginis*). En nuestro caso, el material de *M.*

albus con la mitad de concentración normal de cumarina fue más efectivo en su efecto disuasivo si se lo compara con material sin cumarina. Pero por otro lado fue menos efectivo que los materiales con altos niveles de cumarina, por lo que en este ensayo habría un efecto significativo de la concentración de cumarina en el efecto disuasivo.

En el ensayo de preferencia de a pares, cuando se compararon materiales de diferente contenido de cumarina, siempre los de menor contenido fueron más consumidos. Cuando se compararon materiales de *M. albus* con alfalfa, todos los materiales de *M. albus* (incluidos los de baja y sin cumarina) fueron menos consumidos que la alfalfa, una especie comúnmente atacada por *C. lesbia*. Esto es un resultado muy interesante, es probable que otros compuestos secundarios puedan estar acumulándose en materiales con bajo/nulo contenido de cumarina y tengan el mismo efecto negativo sobre las plagas. No existen antecedentes de estudios de otros compuestos secundarios, a parte de la cumarina, con efecto disuasivo en *M. albus*. Se deberá analizar a futuro si otros metabolitos secundarios presentes en dichos materiales podrían estar acumulándose en esta especie, y tener un efecto negativo sobre el consumo de diferentes tipos de plagas.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por un Proyecto CAI+D UNL, convocatoria 2011.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ARAGÓN, J. Y IMWINKELRIED, J. M.** 2007. Manejo integrado de plagas de la alfalfa. En: Basigalup D. H. (Ed.). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA, Buenos Aires. Argentina. p. 165-198.
2. **BASUKRIADI, A. Y WILKINS, R. M.** 2014. Oviposition deterrent activities of *Pachyrhizus erosus* seed extract and other natural products on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Insect Science* 14: 244.
3. **BOURGAUD, F.; POUTARAU, A.; PUCKERT, A.** 1994. Extraction of coumarins from plant material (Leguminosae). *Phytochemical Analysis*. 5: 127-132.
4. **BRUNO, O.A.; FOSSATI, J.L.; PANIGATTI, J.; GAMBAUDO P. Y QUAINO, O.R.** 1982. Intersiembra de trébol de olor de flor blanca sobre grama rhodes en los Bajos Submeridionales, Santa Fe. INTA, EEA Rafaela. Informe Técnico N° 11. 17 pp.
5. **CLEM, R.L. Y HALL, T.J.** 1994. Persistence and productivity of tropical pasture legumes on three cracking clay soils (Vertisols) in north-eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34:161-171.
6. **DEAR, B.S.; REED, K. Y CRAIG, A.D.** 2008. Outcomes of the search for new perennial and salt tolerant pasture plants for southern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 578-588.
7. **DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. Y ROBLEDO C.W.** InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
8. **EVANS, P.M. Y KEARNEY, G.A.** 2003. *Melilotus albus* Medic is productive and regenerates well on saline soils neutral to alkaline reaction in the high rainfall zone of south-western Victoria. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 43: 349-355.9.
9. **FERRARI, L. Y MADDALONI, J.** 2001. Trébol de olor blanco y Trébol de olor amarillo. En: Forrajeras y Pasturas del Ecosistema Templado Húmedo Argentino. En INTA-UNZ (eds). Buenos Aires. Argentina. p. 303-315.
10. **FOSSATI, J. Y LEÓN, R.J.** 1978. Incorporación de especies forrajeras en campos naturales del norte santafesino. INTA, EEA Rafaela. Boletín de Divulgación Técnica N° 8.24 pp.
11. **FOSSATI, J.; BRUNO, O. Y ROMERO L.** 1984. Épocas de siembra de trébol de olor de flor blanca (*Melilotus albus*, Medik).
12. **GOPLEN, B.P.** 1969. Forage yield and other agronomic traits of high- and low-coumarin isosynthetics of sweetclover. *Crop Science* 9: 477-480.
13. **GORZ, H.J. Y HASKINS, F.A.** 1969. Absence of dominance of the Cu gene in influence of *o*-Hydroxycinnamic Acid content in *Melilotus albus*. *Crop Science* 9: 79-81.
14. **GORZ, H.J.; HASKINS, F.A. Y MANGLITZ, G.R.** 1972. Effect of Coumarin and Related Compounds on Blister Beetle Feeding in Sweetclover. *Journal of Economic Entomology* 65: 1632-1635.
15. **GUPTA, P.D. Y THORSTEINSON, A.J.** 1960. Food plant relationships of the diamondback moth (*Plutella maculipennis* (Curt.)) II. Sensory regulation of oviposition of the adult female. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 3: 305-314.
16. **GUTTERIDGE, R.C. Y SHELTON, H.M.** 1998. The Role of Forage Tree Legumes in Cropping and Grazing Systems. En: Ross C.; Gutteridge y Shelton H (Eds), Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. Trop. Grass. Soc. of Australia Inc. St Lucia. Queensland. P 3-11.
17. **HOWE, W.L. Y GORZ, H.J.** 1960. Feeding preferences of the cow pea aphid among species of *Melilotus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 53: 696-697.

18. **HSIAO, H.** 1969. Chemical basis of host selection and plant resistance in oligophagous insects. *Entomologia Exp. Appl.* 12: 777-788.
19. **IBANEZ, S.; GALLET, C. Y DESPRÉS, L.** 2012. Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. *Toxins* 4: 228-243.
20. **IMAGEJ** (Versión 1.44p) <http://imagej.nih.gov/ij/> (Software de procesamiento de imágenes). USA. National Institutes of Health. Nolf, E (2003).
21. **INASE.** 2005. Boletín Oficial de la República Argentina, Año CXIII, Nro 30797, pág 15.
22. **INASE.** 2015. Catálogo Nacional de Cultivares. En: <http://www.inase.gov.ar/consultaGestion/gestiones> (acceso 14/08/15).
23. **JACKSON, D.M. Y BOHAC, J.R.** 2007. Resistance of sweet potato genotypes to adult Diabrotica beetles. *Journal Economic Entomology* 100: 566–572.
24. **KUGLER, W.; MORO, M. Y JOSIFOVICH, J.** 1964. Catálogo de cultivares de plantas agrícolas Argentinas. Colección Agropecuaria del INTA. Buenos Aires. Argentina. 334 p.
25. **LAMPERT, E.C.; ZANGERL, A.R.; BERENBAUM, M.R. Y ODE, P.J.** 2011. Generalist and specialist host-parasitoid associations respond differently to wild parsnip (*Pastinaca sativa*) defensive chemistry. *Ecol. Entomol.* 36: 52–61.
26. **MADDALONI, J.** 1986. Forage production on saline and alkaline soils in the humid region of Argentina. *Reclamation and Revegetation Research* 5: 11-16.
27. **MAZID M.; KHAN T.A. Y MOHAMMAD, F.** 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3: 232-249.
28. **MUIR, J.P.; PITMAN, W.D. Y FOSTER, J.L.** 2011. Sustainable, low-input, warm-season, grass–legume grassland mixtures: mission (nearly) impossible? *Grass and Forage Science* 66: 301–315.
29. **NICHOLS, P.; LOI, A.; NUTT, B.J.; EVANS, P.M., CRAIG, A.D.; PENGELLY, B.C.; DEAR, D.S.; LLOYD, D.L.; REVELL, C.K.; NAIR, N.R.; EWING, M.A.; HOWIESON, J.G.; AURICHT, G.A.; HOWIE, J.H.; SANDRAL, G.A.; CARR, S.J.; DE KONING, C.T.; HACKNEY, B.F.; CROCKER, G.J.; SNOWBALL, R.; HUGHES, S.J.; HALL, E.J.; FOSTER, K.J.; SKINNER, P.W.; BARBETTI, M.J.; YOU, M.P.** 2007. New annual and short-lived perennial pasture legumes for Australian agriculture-15 years of revolution. *Field Crops Research* 104:10-23.
30. **PANIGATTI, J.L.** 1974. Manejo de *Melilotus alba* para asegurar la resiembra natural. INTA, EEA Rafaela. Boletín Interno de Divulgación N° 29, 13p.
31. **PETERSON, J.K.; HARRISON, H.F.; JACKSON, D.M. Y SNOOK, M.E.** 2001. Biological activities and contents of scopolin and scopoletin in sweetpotato clones. *Horticulture Science* 36: 927–930.
32. **ROCHON, J.J.; DOYLE, C.J.; GREEF, J.M.; HOPKINS, A.; MOLLE, G.; SITZIA, M.; SCHOLEFIELD, D.; SMITH, C.J.** 2003. Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass and Forage Science* 59: 197–214.
33. **ROGERS, M.E.; COLMER, T.D.; FROST, K.; HENRY, D.; CORNWALL, D.; HULM, E.; DERETIC, J.; HUGHES, S.R. Y CRAIG, A.D.** 2008. Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. *PlantSoil* 304: 89-101.
34. **ROSENTHAL G.A. Y BERENBAUM M.R.** 1992. Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. Vol II Ecological and evolutionary processes. Rosenthal G.A. y Berenbaum M.R. (eds.). Academic Press. San Diego. EEUU. 493 p.

35. **SHELTON, H.M.; S. FRANZEL Y PEETERS, M.** 2005. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success. *Tropical Grassland* 39: 198-209.
36. **SMITH, W. K.** 1964. Denta Sweetclover. *Crop Science* 4: 666-667
37. **SMITH, W.K. Y GORZ, H.L.** 1965. Sweetclover improvement. *Advances in Agronomy* 17: 163-231.
38. **STEVENSON, P.C.; SIMMONDS, M.S.J.; YULE, MA.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; IRWIN, D. Y LEGG, M.** 2003. Insect Antifeedant Furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. *Phytochemistry* 63 (1): 41-46.
39. **TABASHNIK, B.E.** 1985. Deterrence of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) oviposition by plant compounds. *Environmental Entomology* 14: 575-578.
40. **TAIZ, L. Y ZEIGER, E.** 1998. Plant Defenses: Surface protectants and secondary metabolites. En L. Taiz and E. Zeiger (eds.) *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. EEUU. p.347-377.
41. **TRAVERSO, J., BABINEC, F. Y TROIANI, H.** 2005. Caracterización y agrupación de entradas por compatibilidad de caracteres fenotípicos en el género *Melilotus*. , EEA Anguil. Informe Técnico N 64. INTA. 16 p.
42. **TRIGG, P.** 2004. *Melilotus albus* (Sweetclover) 'Jota'. *Plant Varietal Journal* 17: 127-128.
43. **TURKINGTON, R.A.; CAVERS, P.B. Y REMPEL, E.** 1978. The biology of Canadian weeds. 29. *Melilotus alba* Desr and *M. officinalis* (L.) Lam. *Canadian Journal of Plant Science* 49: 1-20.
44. **VERA, N.; POPICH, S.; LUNA, L.; CRAVERO, R.; SIERRA, M. G. Y BARDÓN, A.** 2006. Toxicity and synergism in the feeding deterrence of some coumarins on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemical & Biodiversity* 3: 21-26.
45. **ZABALA, J.M.; SCHRAUF G.; BAUDRACCO J.; GIAVEDONI J.; QUAINO O. Y RUSH P.** 2012. Selection for late-flowering and greater number of basal branches increases the leaf dry matter yield in *Melilotus albus* Desr. *Crop and Pasture Science* 63: 370-376.
46. **ZULOAGA, F.O. Y MORRONE, O.** 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la república Argentina. II. Dicotyledoneae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 74: 1-269.