

GROWTH INHIBITORY EFFECT OF EXTRACTS FROM *Reynoutria* sp. PLANTS AGAINST *Spodoptera littoralis* LARVAE

EFECTO INHIBITORIO DEL CRECIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS DE *Reynoutria* sp. CONTRA LARVAS DE *Spodoptera littoralis*

Roman Pavela^{1*}, Naděžda Vrchotová² and Božena Šerá²

¹Crop Research Institute. Drnovská 507. 161 06 Prague 6. Czech Republic (pavela@vurv.cz). ²Institute of Systems Biology and Ecology AS CR, v.v.i. Branišovská 31. 370 05 České Budějovice. Czech Republic.

ABSTRACT

Laboratory studies were conducted to determine the effects of methanolic extracts from three *Reynoutria* species on feeding, development and mortality of larvae *S. littoralis*. The extracts of all three *Reynoutria* species did not reveal feeding deterrence in the *Spodoptera littoralis* larvae. However they significantly decreased the larvae growth and the efficiency of conversion of the ingested and digested food. Conversion of the ingested food was lower, when compared with control larvae. The use of food provoked prolongation of the larvae development and chronic toxicity. Even if extracts of all three plant species were effecting the larvae mortality with the same results (LC_{50} ranged from 0.5 to 1 mg g⁻¹ in all extracts), the impact on growth inhibition in the larvae varied. The most efficient extract was *R. ×bohemica* interspecific hybrid (LC_{50} was 1.24 mg g⁻¹), then the extract of *R. japonica* (LC_{50} of 6.72 mg g⁻¹), and the least efficient was the *R. sachaliensis* extract (LC_{50} of 9.48 mg g⁻¹).

Key words: *Reynoutria*, *Spodoptera littoralis*, growth inhibition, botanical insecticides, toxicity test, plant extracts.

INTRODUCTION

Due to the increasing problem with resistance, impacts on non-target organisms and residue in food, associated with the use of toxic synthetic insecticides, it is needed to develop ecologically safer botanical insecticides. The search for plants with novel insecticidal constituents is very intensive. Among the plant families studied (Asteraceae, Lamiaceae, Meliaceae, Piperaceae, Rutaceae) crude extracts compounds have shown toxicity (Pavela, 2006), antifeedant activity (Wheeler and Isman, 2001; Sadek, 2003; Pavela, 2004a), presence of insect growth regulators (Akhtar and Isman, 2004; Pavela, 2004b; Pavela, 2005), oviposition deterrence (Dimock and Renwick, 1991;

RESUMEN

Se realizaron estudios en laboratorio para determinar los efectos de extractos metanólicos de tres especies de *Reynoutria* sobre alimentación, el crecimiento y la mortalidad de larvas de *S. littoralis*. Ninguno de los extractos de las especies de *Reynoutria* mostró disuasión alimentaria en las larvas de *Spodoptera littoralis*. Sin embargo, sí provocaron una disminución significativa en el crecimiento de larvas, así como en la eficiencia de conversión del alimento ingerido y digerido. La conversión de alimento ingerido fue menor comparada con las larvas testigo. El uso de alimento ocasionó prolongación del crecimiento de larvas, así como toxicidad crónica. Aunque los extractos de las tres especies de plantas afectaron la mortalidad de las larvas de manera similar (LC_{50} varió entre 0.5 y 1 mg g⁻¹ en todos los extractos), el impacto en la inhibición del crecimiento de las larvas varió. El extracto más eficiente fue el híbrido inter-específico *R. bohemica* (LC_{50} de 6.72 mg g⁻¹), seguido por el extracto *R. japonica* (LC_{50} de 6.72 mg g⁻¹); el menos eficiente fue el extracto *R. sachaliensis* (LC_{50} de 9.48 mg g⁻¹).

Palabras clave: *Reynoutria*, *Spodoptera littoralis*, inhibición del crecimiento, insecticidas botánicos, prueba de toxicidad, extractos de planta.

INTRODUCCIÓN

Debido al creciente problema de resistencia a los impactos en los organismos no destinatarios y a los residuos en los alimentos, aunado con el uso de insecticidas sintéticos tóxicos, es necesario desarrollar insecticidas botánicos ecológicamente más seguros. La búsqueda de plantas con constituyentes insecticidas novedosos es muy intensa. Entre las familias de plantas estudiadas (Asteraceae, Lamiaceae, Meliaceae, Piperaceae, Rutaceae), los compuestos de extractos crudos han mostrado toxicidad (Pavela, 2006), actividad antialimentaria (Wheeler e Isman, 2001; Sadek, 2003; Pavela, 2004a), presencia de reguladores de crecimiento de insectos (Akhtar e Isman, 2004; Pavela, 2004b; Pavela, 2005), disuasión de la oviposición (Dimock y Renwick, 1991; Zhao *et al.*,

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: July, 2007. Approved: May, 2008.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 42: 573-584. 2008.

Zhao *et al.*, 1998), suppression of calling behaviour (Khan and Saxana, 1986) and reduction of fecundity and fertility (Pavela *et al.*, 2005). Such a wide variety of effects provides potential alternatives for the use of conventional insecticides.

Some other promising families, e.g. Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae and Polygonaceae, have documented antifungal, antiviral, and antibacterial properties (Inoue *et al.*, 1992; Konstantinidou-Doltsinis and Schmitt, 1998). Aqueous and ethanolic plant extracts from the Giant Knotweed (*Reynoutria sachalinensis*), protect greenhouse-grown cucumbers, tomatoes and begonias from powdery mildew fungi (Herger *et al.*, 1988; Neuhaus and Pallut, 1992). These plants contain biologically active compounds, such as catechin, epicatechin, chlorogenic acid, caftaric acid and quercetin derivatives, resveratrol and their derivatives (Vrchotová *et al.*, 2004, 2005a and b; Vastano *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Extracts from *Reynoutria* showed allelopathic, antifungal, antioxidant and antiviral effects (Inoue *et al.*, 1992; Konstantinidou-Doltsinis and Schmitt, 1998; Daayf *et al.*, 2000). Anthraquinones from *Reynoutria* sp. also act estrogenically (Zhang *et al.*, 2006). Nevertheless, the insecticidal effect of extracts from *Reynoutria* sp. has not been tested.

The Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), is a major pest on cotton (*Gossypium herbaceum*), corn (*Zea mays* L.), peanuts (*Arachis hypogea*), vegetables, soybean (*Glycine max*) and other plants cultivated in Egypt, as well as in Mediterranean and Middle East countries (Champion *et al.*, 1977; Ahmad, 1988). The fact that the insect infests more than 87 host plants, from 40 plant families (Brown and Dewhurst, 1975), makes it an example of a serious polyphagous pest. The aim of this work was to present the effects of methanolic extracts from three *Reynoutria* species on feeding activity, development and mortality of *S. littoralis*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and its extraction

In Central Europe, the genus *Reynoutria* is represented by *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (Syn.: *Polygonum sachalinense* F. Schmidt, *Pleuropterus sachalinensis* (F. Schmidt) H. Gross, *Tinaria sachalinensis* (F. Schmidt) Janchen), *Reynoutria japonica* (Houttuyn) Ronse Decraene (Syn.: *Pleuropterus cuspidatus* H. Gross; *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zuccarini; *Reynoutria henryi* Nakai; *Tinaria japonica* (Houttuyn) Hedberg), and their hybrid *Reynoutria* × *bohemica* Chrtek & Chrtková (Syn.: *Fallopia* × *bohemica* (Chrtek & Chrtková) J. P. Bailey;

1998), supresión de la conducta de llamado (Khan y Saxana, 1986) y reducción en la fecundidad y la fertilidad (Pavela *et al.*, 2005). Una variedad de efectos tan amplia como esta, proporciona alternativas potenciales para el uso de insecticidas convencionales.

Otras familias prometedoras como Annonaceae, Apicaceae, Asteraceae, Lamiaceae y Polygonaceae, han mostrado propiedades antifúngicas, antivirales y antibacteriales (Inoue *et al.*, 1992; Konstantinidou-Doltsinis y Schmidt, 1998). Los extractos acuosos y etanólicos provenientes de *Reynoutria sachalinensis* (Chiliyo, Sangrina, Hierba de Santa María, entre otras especies) protegen a los pepinos, tomates y begonias de invernadero del oidio (o moho blanco, cenizo) (Herger *et al.*, 1988; Neuhaus y Pallut, 1992). Estas plantas contienen componentes biológicamente activos tales como catequina, epicatequina, ácido clorogénico, derivados del ácido caftarico y de quercetina, resveratrol y sus derivados (Vrchotová *et al.*, 2004, 2005a y b; Vastano *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Los extractos de *Reynoutria* mostraron efectos alelopáticos, antifúngicos, antioxidantes y antivirales (Inoue *et al.*, 1992; Konstantinidou-Doltsinis y Schmitt, 1998; Daayf *et al.*, 2000). Las antraquinonas de *Reynoutria* sp. también actúan estrogénicamente (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha evaluado el efecto insecticida de los extractos de *Reynoutria* sp.

El gusano del algodón de Egipto, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga severa en algodón (*Gossypium herbaceum*), maíz (*Zea mays* L.), cacahuates (*Arachis hypogea*), vegetales, frijol soya (*Glycine max*) y otras plantas que se cultivan en Egipto, así como en países del Mediterráneo y el Medio Oriente (Champion *et al.*, 1997; Ahmad, 1988). El hecho de que este insecto infeste más de 87 plantas huéspedes de 40 familias de plantas (Brown y Dewhurst, 1975) es un ejemplo de peste polífaga severa. El propósito de este estudio fue investigar los efectos de los extractos metanólicos de tres especies de *Reynoutria* en la actividad alimentaria, el desarrollo y la mortalidad de *S. littoralis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y material de la planta

En Europa Central el género *Reynoutria* está representado por *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (Syn.: *Polygonum sachalinense* F. Schmidt, *Pleuropterus sachalinensis* (F. Schmidt) Janchen), *Reynoutria japonica* (Houttuyn) Ronse Decraene (Syn.: *Pleuropterus cuspidatus* H. Gross; *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zuccarini; *Reynoutria henryi* Nakai; *Tinaria japonica* (Houttuyn) Hedberg), y sus híbridos *Reynoutria* × *bohemica* Chrtek & Chrtková (Syn.: *Fallopia* × *bohemica* (Chrtek & Chrtková) J. P. Bailey;

Polygonum×bohemicum (Chrtek & Chrtková) Zika & Jacobson; *Reynoutria×vivax* auct. non J. Schmitz & K. J. Strank).

The leaves of all three Knotweeds were collected in September 2005 in the area of the permanent research plot located in České Budějovice, the Czech Republic. Leaves were dried at laboratory temperature; the material was pulverized and extracted with use of a 100% pure methanol for 45 min (ratio:leaves:methanol; 1:3.5). After centrifugation the sediment was washed three times in methanol (1:1 ratio). Supernatants were collected and filtered through filter papers. Methanol was eliminated with the flow of nitrogen. The final dry extract yield was 15.8, 15.8 and 11.6% for *R. japonica*, *R.×bohemica* and *R. sachalinensis*.

Test insects

These were obtained from a population of *S. littoralis*, fed with artificial insect diet (Stonefly Industries, Bryan, TX, USA). The colonies were reared at 25 ± 1 °C and 16:8 (L:D) photoperiod.

Bioassays

The test substances were incorporated into the artificial insect diet as follows: 0 (control); 0.23, 0.47; 0.94; 1.88; 3.76 and 7.5 mg g⁻¹. Assay diets (100 g) containing plant extracts were prepared as in the following example: diet containing 7.5 mg g⁻¹ of the extract was prepared from 750 mg of the test substance dissolved in 2 ml of the solvent carrier (MeOH), which was spilled with a pipette into 75 mL of water; after dissolution, 25 g of dry diet was put into the liquid, the solvent was evaporating in a fume hood for 1 h; then, the final diet was refrigerated (4 °C).

Effects of plant extracts on larval development and survival

Newly hatched larvae (n=50) were placed in Petri dishes (24 cm diameter), fed *ad libitum* the diet containing the concentrations of the extract, and their mortality was recorded. As they grew up, they were divided in several dishes to prevent crowdedness. The length of larval period was calculated and pupae (approximately 24 h old) were weighed.

Effects of crude extract on food consumption and utilization

Larvae reared on a control diet were weighed after the fourth molt (<24 h), and placed individually in glass tubes (30 mm diameter; 100 mm long). They were fed controlled amounts of food containing 0 (control), 0.23, 0.94; 3.76 and 7.5 mg g⁻¹ of the extract (n=30 for each concentration) and were feed 3 d, which is a period a little shorter than instar duration. Fifth instar larvae were chosen for the test because the feeding activity was more or less steady throughout this stadium, whereas sixth instar larvae may stop feeding before the completion of the 3 d experiment.

At the end of the experiment, the larvae were weighed and their faeces and uneaten food were dried and weighed. Fresh weights of faeces and consumed food were determined from dry weight vs.

Polygonum×bohemicum (Chrtek & Chrtková) Zika & Jacobson; *Reynoutria×vivax* auct. Non J. Schmitz & K. J. Strank).

En septiembre de 2005 se recolectaron las hojas de las especies de *Reynoutria* en el área de la parcela permanente de investigación (monitoreo) ubicada en České Budejovice, República Checa. Las hojas se secaron a la temperatura del laboratorio; se usó metanol puro al 100% por 45 min para pulverizar y extraer el material (proporción: hojas: metanol; 1:3.5). Después del centrifugado el sedimento se enjuagó tres veces en metanol (proporción 1:1). Los sobrenadantes se recolectaron y filtraron con filtros de papel. El metanol se eliminó con el flujo de nitrógeno. El rendimiento final de extracto seco en *R. Japonica*, *R.×bohemica* y *R. sachalinensis* fue 15.8, 15.8 y 11.6%.

Insectos de ensayo

Se obtuvieron de una población de *S. littoralis* y se les alimentó con dieta artificial para insectos (Stonefly Industries, Bryan, TX, USA). Las colonias se criaron a 25 ± 1 °C y con un fotoperiodo de 16:8 (L:O).

Bioensayos

Las sustancias para el ensayo se incorporaron a la dieta artificial de la siguiente manera: 0 (testigo); 0.23, 0.47; 0.94; 1.88; 3.76 y 7.5 mg g⁻¹. Las dietas (100 g) a base de extractos de planta se prepararon como en el siguiente ejemplo: la dieta con 7.5 mg g⁻¹ de extracto se preparó a partir de 750 mg de la sustancia prueba disuelta en 2 ml del acarreador de solventes (MeOH), el cual se vertió con una pipeta en 75 mL de agua; después de la disolución se agregaron 25 g de dieta seca al líquido; el solvente se evaporó en una campana de extracción durante una h y, posteriormente, la dieta final se refrigeró (4 °C).

Efectos de los extractos de plantas en el desarrollo y supervivencia de las larvas

Las larvas recién incubadas (n=50) se colocaron en cajas de Petri (24 cm de diámetro), se alimentaron *ad libitum* con la dieta a base de concentraciones del extracto, y se registró su mortalidad. A medida que crecieron, se dividieron en varias cajas para evitar aglomeraciones. Se calculó la duración del periodo larvar y se pesaron las pupas (de aproximadamente 24 h de edad).

Efectos del extracto crudo en el consumo y uso de alimento

Las larvas criadas con una dieta testigo se pesaron después de la cuarta muda (cambio de estadio) (<24 h) y se colocaron individualmente en tubos de vidrio (30 mm diámetro; 100 mm longitud). Se alimentaron con cantidades controladas de comida con 0 (control), 0.23, 0.94; 3.76 y 7.5 mg g⁻¹ del extracto (n=30 en cada concentración) durante 3 d, un periodo ligeramente más corto que la duración del instar. Para la prueba se eligieron larvas del quinto instar debido a que la actividad alimenticia fue más o menos estable

fresh weight curves. The nutritional indices: relative consumption rate (RCR), relative grown rate (RGR), efficiency of conversion of ingested food (ECI), efficiency of conversion of digested food (ECD) and approximate digestibility (AD) were calculated as follows:

$RCR = I/BaT$; $RGR = B/BaT$; $ECI = (B/I) \times 100$; $ECD = [B/(I-F)] \times 100$; and $AD = [(I-F)/I] \times 100$, where I = weight of food consumed; Ba = arithmetic mean of insect weight during the experiment; T = feeding period (d); B = change in body weight; F = weight of faeces during the feeding period (Waldbauer, 1968; Farrar *et al.*, 1989).

The test of extracts with antifeedant properties

The antifeedant activity of crude extracts against the larvae (3rd instar) was evaluated through no-choice and choice tests using an artificial diet disc. The test was performed by placing one control and one treated diet disc (for choice test) or two treated diet disc (for no-choice test), containing 0.23, 0.94; 3.76 and 7.5 mg extracts per g fresh diet. The diet discs (2.5 cm diameter; 8 mm thick) were placed in a plastic Petri disc area (9 cm diameter); the distance between discs was about 2 cm.

Twenty larvae were placed in the middle of each dish and there were 4 replicates for each treatment. After 72 h, the remnants of diet discs were collected and dried separately at 70 °C to a constant weight. The amount of consumed food was calculated from the initial fresh weight and the dry weight of each disc, using a standard curve of the relation between fresh weight and dry weight of different sized dish pieces.

The feeding deterrence index (FDI) was calculated as:

$$FDI = [(C-T)/(C+T)] \times 100$$

where, C and T are the control and treated diet disc consumed by the insect.

Experimental conditions and statistical analysis

The experiments were carried out at 25±1 °C, 65-72% RH and 16:8 (L:D) photoperiod. All of them were repeated four times using larvae from different generations. The results were evaluated by ANOVA and Turkey's honest significant difference (HSD) test (p≤0.05). The mortality of larvae and pupae, and growth inhibitory effect (RGR indexes) in each replicate was determined for *S. littoralis*. The lethal doses (LD₅₀) were calculated using the Spearman-Kärber method with Abbot correction (Hamilton *et al.*, 1977).

RESULTS

Effects of plant extracts on larval development and survival

When the neonate larvae were fed diet containing different concentrations of the extracts from all tested

en ese estadio, mientras que el sexto ínstar larvar puede dejar de alimentarse antes de que finalice el experimento de 3 d.

Al final del experimento las larvas se pesaron, y sus heces y el alimento no ingerido se secaron y pesaron. Los pesos frescos y el alimento ingerido se determinaron a partir de curvas de peso seco vs. peso fresco. Los índices nutricionales: de consumo relativo (RCR), de crecimiento relativo (RGR), eficiencia en la conversión de la comida ingerida (ECI), eficiencia en la conversión de la comida digerida (ECD), y digestibilidad aproximada (DA) se calcularon de la siguiente manera:

$RCR = I/BaT$; $RGR = B/BaT$; $ECI = (B/I) \times 100$; $ECD = [B/(I-F)] \times 100$; and $AD = [(I-F)/I] \times 100$, donde I = peso del alimento consumido; Ba = media aritmética del peso del insecto durante el experimento; T = periodo de alimentación (d); B = cambio en el peso corporal; F = peso de las heces durante el periodo de alimentación (Waldbauer, 1968; Farrar *et al.*, 1989).

La prueba de extractos con propiedades antialimentarias

La actividad antialimentaria de los extractos crudos sobre las larvas (3^{er} ínstar) se evaluó mediante pruebas sin y con opción con un disco de dieta artificial. Para realizar la prueba se colocaron un testigo y un disco de dieta tratado (para la prueba con opción), o dos discos tratados (para la prueba sin opción) que contenían 0.23, 0.94; 3.76 y 7.5 mg de extractos por g de dieta fresca. Los discos de dieta (2.5 cm de diámetro; 8 mm de grosor) se colocaron en un disco de Petri de plástico de 9 cm de diámetro; la distancia entre los discos fue de aproximadamente 2 cm.

Se colocaron 20 larvas en el centro de cada disco y se hicieron 4 repeticiones por tratamiento. Después de 72 h, los remanentes de los discos de dieta se recolectaron y se secaron por separado a 70 °C a peso constante. La cantidad de alimento consumido se calculó a partir del peso fresco inicial y del peso seco de cada disco, mediante una curva estándar de la relación entre el peso fresco y el peso seco de los fragmentos de distintos tamaños del plato.

El índice de disuasión alimentaria (FDI) se calculó como:

$$FDI = [(C-T)/(C+T)] \times 100$$

donde, C y T son el testigo y el disco de dieta tratado consumidos por el insecto.

Condiciones experimentales y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron a 25±1 °C, 65-72% RH y a un fotoperiodo de 16:8 (L:O). Todos se repitieron cuatro veces usando larvas de distintas generaciones. Los resultados se evaluaron con A de V y con la prueba de la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey (p≤0.05). Se determinó la mortalidad de las larvas y las pupas (crisálidas) y el efecto inhibitorio del crecimiento (EIC) en cada repetición en *S. littoralis*. Las dosis letales (LD₅₀) se calcularon con el método Spearman-Kärber con la corrección de Abbot (Hamilton *et al.*, 1977).

plant species, the larval period increased due to the extract concentration. The shortest larval period (160 d) was observed for the control group, while the longest period (34.33 and 32.23 d) was that of larvae fed on diet containing 3.76 mg g⁻¹ of the extract of *R. ×bohemica* and *R. sachaliensis*, and 26.40 d for larvae fed 1.88 mg g⁻¹ of the extract of *R. japonica* (Tables 1-3). The larval period for the larvae fed 7.5 mg g⁻¹ (for all tested extracts) and 3.75 mg g⁻¹ of extract *R. japonica* was not obtained, as no larvae survived to pupation. Significant increase (p≤0.05) of larval period was caused by diets containing 0.23 mg g⁻¹ or more (in addition to extract of *R. japonica*). Survival, calculated at the end of larval period, depended on the concentration of the extracts in the food: 97% of larvae fed on control diet; total survival until the hatching of adults was over 92%.

RESULTADOS

Efectos de los extractos de planta en el desarrollo y la supervivencia larvar

Cuando se alimentó a las larvas neonatas con una dieta que contenía diferentes concentraciones de los extractos de todas las especies de plantas evaluadas, el periodo larvar se incrementó debido a la concentración del extracto. El periodo larvar más corto (16 d) fue el del grupo testigo y los más largos (34.33 y 32.23) fue de las larvas alimentadas con dieta que contenía 3.76 mg g⁻¹ de extracto de *R. ×bohemica* y *R. sachaliensis*, y 26.40 d para las alimentadas con 1.88 mg g⁻¹ de extracto de *R. japonica* (Cuadros 1-3). El periodo larvar de las larvas alimentadas con 7.5 mg g⁻¹ (para todos los extractos evaluados) y 3.75 mg g⁻¹ de extracto de

Table 1. The effect of crude extract of *R. japonica* plants, incorporated in diet, on larval development and survival of *S. littoralis*. Cuadro 1. El efecto del extracto crudo de las plantas de *R. japonica*, incorporado a la dieta, en el desarrollo y la supervivencia larvar de *S. littoralis*.

Plant extract (mg g ⁻¹)	Pupal weight [mg (mean ± SE)]	Larval period [day (mean ± SE)]	Larval mortality [% (mean ± SE)]	Pupal mortality [% (mean ± SE)]	Total mortality [% (mean ± SE)]
0	329.69 ± 11.39c	16.00 ± 0.22a	3.25 ± 2.36a	4.50 ± 1.73	7.75 ± 2.5a
0.23	361.81 ± 15.91c	16.63 ± 0.28ab	29.00 ± 3.37b	4.75 ± 1.26	33.75 ± 4.19b
0.47	205.79 ± 12.77b	17.15 ± 0.19bc	37.00 ± 2.45b	7.25 ± 2.22	44.25 ± 2.99c
0.94	145.53 ± 13.46a	17.63 ± 0.43c	63.75 ± 4.35c	6.50 ± 2.38	70.25 ± 3.3d
1.88	173.24 ± 14.09a	26.4 ± 0.5d	73.25 ± 6.99d	7.25 ± 2.22	80.5 ± 8.81e
3.76	-	-	100 ± 0e	-	100 ± 0f
7.5	-	-	100 ± 0e	-	100 ± 0f
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.1841	0.0001
F	136,45	632,51	415,15	1,79	282,83
Df	19	19	27	19	27

Mean values with different letters are significantly different (p≤0.05) ❖ Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos (p≤0.05)

Table 2. The effect of crude extract of *R. ×bohemica* plants, incorporated in diet, on larval development and survival of *S. littoralis*. Cuadro 2. El efecto del extracto crudo de las plantas de *R. ×bohemica*, incorporado a la dieta, en el desarrollo y la supervivencia de *S. littoralis*.

Plant extract (mg g ⁻¹)	Pupal weight [mg (mean ± SE)]	Larval period [day (mean ± SE)]	Larval mortality [% (mean ± SE)]	Pupal mortality [% (mean ± SE)]	Total mortality [% (mean ± SE)]
0	329.69 ± 11.39d	16 ± 0.22a	3.25 ± 2.36a	4.5 ± 1.73a	7.75 ± 2.5a
0.23	182.03 ± 10.21c	17.53 ± 0.36b	14.5 ± 3.32b	7.5 ± 2.89a	22 ± 4b
0.47	169.76 ± 15.24bc	18 ± 0.22b	23.75 ± 4.79bc	5.75 ± 1.5a	29.5 ± 4.2b
0.94	168.43 ± 12.79bc	18.48 ± 0.45b	32.5 ± 2.89c	6.5 ± 2.38a	39 ± 2c
1.88	146.62 ± 14.99ab	27.53 ± 1.24c	67.5 ± 6.45d	7.75 ± 2.06a	75.25 ± 8.42d
3.76	130.9 ± 9.02a	34.33 ± 0.54d	85 ± 5.77e	15 ± 5.77b	100 ± 0e
7.5	-	-	100 ± 0f	-	100 ± 0e
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0023	0.0001
F	132,37	567,66	318,88	5,80	352,30
Df	23	23	27	23	27

Mean values with different letters are significantly different (p≤0.05) ❖ Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos (p≤0.05).

Table 3. The effect of crude extract of *R. sachalinensis* plants, incorporated in diet, on larval development and survival of *S. littoralis*.**Cuadro 3. El efecto del extracto crudo de las plantas de *R. sachalinensis*, incorporado a la dieta, en el desarrollo y supervivencia larvar de *S. littoralis*.**

Plant extract (mg g ⁻¹)	Pupal weight [mg (mean ± SE)]	Larval period [day (mean ± SE)]	Larval mortality [% (mean ± SE)]	Pupal mortality [% (mean ± SE)]	Total mortality [% (mean ± SE)]
0	329.69 ± 11.39d	16 ± 0.22a	3.25 ± 2.36a	4.5 ± 1.73a	7.75 ± 2.5a
0.23	224.36 ± 12.42c	18.58 ± 0.47b	27 ± 6.27b	7.75 ± 2.06ab	34.75 ± 7.68b
0.47	165.62 ± 12.59ab	18.43 ± 0.43b	37 ± 2.16bc	7.25 ± 2.22ab	44.25 ± 4.11bc
0.94	164.01 ± 9.89ab	19.43 ± 0.43b	45.25 ± 3.77c	8.25 ± 2.36ab	53.5 ± 5.8c
1.88	173.31 ± 6.74b	26.3 ± 0.71c	64.5 ± 15.2d	7.25 ± 2.22ab	71.75 ± 14.31d
3.76	143.45 ± 8.9a	32.23 ± 0.53d	75.5 ± 4.8d	10 ± 0b	85.5 ± 4.8de
7.5			100 ± 0e		100 ± 0e
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0248	0.0001
F	171,80	640,75	92,00	3,39	81,12
Df	23	23	27	23	27

Mean values with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) ♦ Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos ($p \leq 0.05$).

The mortality of larvae fed on the diet containing 0.23, 0.47; 0.94; 1.88; 3.76 and 7.5 mg g⁻¹ of *R. japonica* was 29, 37, 64, 73, 100 and 100% (Table 1); for extract of *R. ×bohemica* was 15, 24, 33, 68, 85 and 100% (Table 2); and for extract of *R. sachalinensis* was 27, 37, 45, 65, 76 and 100% (Table 3). Significant increase ($p \leq 0.05$) of pupal mortality was caused by diets containing 3.76 mg g⁻¹ (for extract of *R. ×bohemica* and *R. sachalinensis*). The lethal concentrations (LC₅₀) value for *R. japonica*, *R. sachalinensis* and *R. ×bohemica* was 0.58, 0.80 and 1.22 mg g⁻¹ (Table 8). The body weight of pupae was significantly reduced ($p \leq 0.05$) after larval feeding on diets containing 0.23 mg g⁻¹ extract of *R. ×bohemica* (Table 2) and *R. sachalinensis* (Table 3) and 0.47 mg g⁻¹ extract of *R. japonica* (Table 1) or higher doses.

Effects of crude extracts on food consumption and utilization

The extracts of *Reynoutria* sp. reduced the nutritional indices RGR, ECI ECD and AD of the fifth instar larvae (Tables 4, 5, 6). There was a significant reduction ($p \leq 0.05$) at the doses 0.23 mg g⁻¹ or higher (in addition to AD index to extract of *R. ×bohemica*) of all extracts. The relative consumption rate (RCR) was significantly increased ($p \leq 0.05$) by doses 0.23 mg g⁻¹ or higher of the extract of *R. sachalinensis* and *R. japonica*, and by doses 3.76 mg g⁻¹ or higher of extract of *R. ×bohemica* (Table 4, 5, 6). The effective doses reduced larval growth by 50% (LC₅₀) in relation to the control: 1.24, 6.72 and 9.48 mg g⁻¹ for *R. ×bohemica*, *R. japonica* and *R. sachalinensis* (Table 8).

R. japonica no se completó, debido a que ninguna larva sobrevivió a la pupación. El periodo larvar se alargó significativamente ($p \leq 0.05$) con dietas que contenían 0.23 mg g⁻¹ o más (además del extracto de *R. japonica*). La supervivencia, calculada al final del periodo larvar, dependió de la concentración de los extractos en los alimentos: 97% de las larvas alimentadas con la dieta testigo; la supervivencia total hasta la incubación de adultos fue de más de 92%. La mortalidad de las larvas alimentadas con dieta que contenía 0.23, 0.47, 0.94; 1.88, 3.76 y 7.5 mg g⁻¹ de *R. japonica* fue de 29, 37, 64, 73 100 y 100% (Cuadro 1); para el extracto de *R. ×bohemica* de 15, 24 33, 68, 85 y 100% (Cuadro 2); y para el extracto de *R. sachalinensis* de 27, 37, 45, 65, 76 y 100% (Cuadro 3). La mortalidad pupal aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) con dietas que contenían 3.76 mg g⁻¹ (de extracto de *R. ×bohemica* y *R. sachalinensis*). El valor de las concentraciones letales (LC₅₀) de *R. sachalinensis* y *R. ×bohemica* fue de 0.58, 0.80 y 1.22 mg g⁻¹ (Cuadro 8). El peso del cuerpo de las pupas disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) tras la alimentación de las larvas con dietas que contenían 0.23 mg g⁻¹ de extracto de *R. ×bohemica* (Cuadro 2) y *R. sachalinensis* (Cuadro 3) y 0.47 mg g⁻¹ o más de extracto de *R. japonica*.

Efectos de los extractos crudos en el consumo y la utilización del alimento

Los extractos de *Reynoutria* sp. redujeron los índices nutricionales EIC, ECI y DA del quinto instar larvar (Cuadros 4, 5, 6). Hubo una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en las dosis de 0.23 mg g⁻¹ o más (además del índice DA en el extracto de *R. ×bohemica*) de todos los extractos. El RCR se incrementó significativamente

Table 4. The effect of different doses of *Reynoutria* sp. crude extracts on the feeding behaviour of 5th instars *S. littoralis* larvae in choice or no-choice tests.**Cuadro 4.** El efecto de diferentes dosis de extractos crudos de *Reynoutria* sp. en el comportamiento alimentario del quinto instar de las larvas de *S. littoralis* en pruebas de opción y no-opción.

Plant extract (mg g ⁻¹)	<i>R. japonica</i>		<i>R. ×bohemica</i>		<i>R. sachalinensis</i>	
	Choice [FDI (%)] [†]	No-choice [FDI (%)]	Choice [FDI (%)]	No-choice [FDI (%)]	Choice [FDI (%)]	No-choice [FDI (%)]
0.23	1.79 ± 26.04	4.66 ± 3.79a	-0.98 ± 8.41	5.44 ± 6.24	-11.28 ± 4.17	-1.37 ± 7.86a
0.94	7.67 ± 8.22	11.05 ± 8.91ab	-20.2 ± 20.32	18.01 ± 3.99	-4.08 ± 7.99	15.49 ± 8.86b
3.76	16.65 ± 10.99	22.93 ± 5.81b	-26.18 ± 10.44	18.74 ± 5.99	-6.04 ± 7.92	7.86 ± 8.76ab
7.5	24.12 ± 11.86	22.67 ± 5.57b	-10.59 ± 12.6	18.59 ± 9.41	-16.78 ± 14.73	15.71 ± 5.71b
P	0.2554	0.0031	0.1000	0.0404	0.2790	0.0308
F	1,54	8,21	2,61	3,78	1,44	4,17
Df	15	15	15	15	15	15

[†] Mean feeding deterrence index (±SE), numbers present the deterrent (positive numbers) and preference (negative numbers) effect. Mean values with different letter are significantly different (p≤0.05) ✧ Índice promedio de disuasión alimentaria (±SE), los números muestran el efecto disuasivo (números positivos) y de preferencia (números negativos). Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos (p≤0.05).

Table 5. The effect of crude extract of *R. japonica* plants incorporated into larval diet on food consumption and utilization (mean±SE) by *S. littoralis* larvae. The extracts were in the diet for 10 d.**Cuadro 5.** El efecto del extracto crudo de las plantas de *R. japonica*, incorporado a la dieta larvar, en el consumo y la utilización de alimento (promedio±SE) en las larvas de *S. littoralis*. Los extractos estuvieron presentes en la dieta durante 10 d.

Plant extract (mg g ⁻¹)	RCR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	RGR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)
0	17.29 ± 0.83a	4.73 ± 0.22d	27.01 ± 0.71d	39.53 ± 2.15d	68.84 ± 2.61c
0.23	22.05 ± 1.39c	3.74 ± 0.44c	17.99 ± 1.72c	28.55 ± 3.39b	74.18 ± 3.56d
0.94	26.92 ± 1.79e	3.25 ± 0.54b	11.28 ± 1.33a	20.61 ± 2.68a	52.37 ± 7.7b
3.76	20.68 ± 0.73b	3.23 ± 0.39b	15.52 ± 1.57b	33.25 ± 2.21c	47.57 ± 5.72a
7.5	25.25 ± 1.26d	2.6 ± 0.2a	10.95 ± 2.72a	19.8 ± 1.47a	48.43 ± 3.34a
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
F	272,90	129,38	426,94	348,21	186,80
Df	149	149	149	149	149

RCR, relative consumption rate (mg mg⁻¹ body weight day⁻¹); RGR, relative growth rate; ECI, efficiency of conversion of ingested food; ECD, efficiency of conversion of digested food; AD, approximate digestibility. Mean values with different letter are significantly different (p≤0.05) ✧ ICR, índice de consumo relativo (mg mg⁻¹ peso corporal día⁻¹); RGR, índice de crecimiento relativo; ECI, eficiencia en la conversión del alimento ingerido; ECD, eficiencia en la conversión de alimento digerido; DA, digestibilidad aproximada. Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos (p≤0.05).

The antifeeding activity of extracts

Strong deterrent effects of extracts against larvae *S. littoralis* were not observed (Table 7). There was a direct relationship between doses of tested extracts and feeding deterrence. In the choice test the larvae preferred the control food. Even if differences between single concentrations were not significant, it seems that the concentration of extracts stimulated intake of the food. The highest food attractiveness (24.12%) was for the highest test dose (7.5 mg g⁻¹) in the *R. japonica* extract. In the no-choice test there was a deterrent effect.

(p≤0.05) con dosis de 0.23 mg g⁻¹ o más de extracto de *R. sachalinensis* y *R. japonica*, y con dosis de 3.76 mg g⁻¹ o más de extracto de *R. ×bohemica* (Cuadros 4, 5, 6). Las dosis efectivas disminuyeron el crecimiento larvar en 50% (LC₅₀) en relación con el control: 1.24, 6.72 y 9.48 mg g⁻¹ en *R. ×bohemica*, *R. japonica* y *R. sachalinensis* (Cuadro 8).

La actividad antialimentaria de los extractos

No se observó ningún efecto de disuasión importante de los extractos sobre las larvas de *S. littoralis* (Cuadro 7). Hubo una relación directa entre las dosis

Table 6. The effect of crude extract of *R. ×bohemica* plants incorporated into larval diet on food consumption and utilization (mean±SE) by *S. littoralis* larvae. The extracts were present in artificial diet for 10 days.

Cuadro 6. El efecto del extracto crudo de las plantas de *R. bohemica*, incorporado a la dieta larvar, en el consumo y la utilización de alimento (promedio±SE) en las larvas de *S. littoralis*. Los extractos estuvieron presentes en la dieta durante 10 d.

Plant extract (mg g ⁻¹)	RCR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	RGR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)
0	17.29 ± 0.83a	4.73 ± 0.22d	27.01 ± 0.71d	39.53 ± 2.15d	68.84 ± 2.61c
0.23	28.21 ± 1.9ab	3.25 ± 0.38c	13.5 ± 0.83c	21.13 ± 1.19c	69.95 ± 3.16c
0.94	31.96 ± 1.34ab	2.38 ± 0.54b	10.75 ± 1.04b	18.54 ± 2.12b	51.75 ± 3.45b
3.76	39.59 ± 57.37b	2.39 ± 0.14b	10.22 ± 0.6b	18.11 ± 1.69b	49.24 ± 3.77a
7.5	32.35 ± 2.22ab	1.73 ± 0.45a	5.04 ± 1.22a	9.36 ± 1.33a	49.01 ± 2.51a
P	0.0199	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
F	3,02	285,14	2487,91	1231,78	347,96
Df	149	149	149	149	149

RCR, relative consumption rate (mg mg⁻¹ body weight day⁻¹); RGR, relative growth rate; ECI, efficiency of conversion of ingested food; ECD, efficiency of conversion of digested food; AD, approximate digestibility. Mean values with different letter are significantly different (p≤0.05) ❖ ICR, índice de consumo relativo (mg mg⁻¹ peso corporal día⁻¹); RGR, índice de crecimiento relativo; ECI, eficiencia en la conversión del alimento ingerido; ECD, eficiencia en la conversión de alimento digerido; DA, digestibilidad aproximada. Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos (p≤0.05).

Table 7. The effect of crude extract of *R. sachalinensis* plants incorporated into larval diet on food consumption and utilization (mean±SE) by *S. littoralis* larvae. The extracts were in diet for 10 d.

Cuadro 7. El efecto del extracto crudo de las plantas de *R. sachalinensis*, incorporado a la dieta larvar, en el consumo y la utilización de alimento (promedio±SE) en las larvas de *S. littoralis*. Los extractos estuvieron presentes en la dieta durante 10 d.

Plant extract (mg g ⁻¹)	RCR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	RGR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)
0	17.29 ± 0.83a	4.73 ± 0.22e	27.01 ± 0.71e	39.53 ± 2.15e	68.84 ± 2.61b
0.23	20.43 ± 1.05b	4.29 ± 0.31d	20.75 ± 0.9d	31.86 ± 1.57d	74.75 ± 3.72c
0.94	27.22 ± 1.29d	3.48 ± 0.26c	15.78 ± 1.63c	27.49 ± 2.45c	52.77 ± 3.19a
3.76	25.9 ± 1.35c	3.16 ± 0.32b	13 ± 1.38b	24.07 ± 2.45b	55.98 ± 10.48a
7.5	31.22 ± 1.68e	2.9 ± 0.33a	9.92 ± 0.77a	18.29 ± 1.36a	52.55 ± 6.65a
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
F	568,28	209,79	1052,46	460,93	84,14
Df	149	149	149	149	149

RCR, relative consumption rate (mg mg⁻¹ body weight day⁻¹); RGR, relative growth rate; ECI, efficiency of conversion of ingested food; ECD, efficiency of conversion of digested food; AD, approximate digestibility. Mean values with different letter are significantly different (p≤0.05) ❖ ICR, índice de consumo relativo (mg mg⁻¹ peso corporal día⁻¹); RGR, índice de crecimiento relativo; ECI, eficiencia en la conversión del alimento ingerido; ECD, eficiencia en la conversión de alimento digerido; DA, digestibilidad aproximada. Valores promedio con letras diferentes son estadísticamente distintos (p≤0.05).

DISCUSSION

Even if extracts of the three *Reynoutria* species did not affect the feeding deterrence of the *Spodoptera littoralis* larvae, they significantly decreased the larval growth and the efficiency of conversion of the ingested and digested food. Conversion of the ingested food was mostly minor, compared to the control group. The low utilization of food caused prolongation of the larval development and chronic toxicity. Even if extracts of the three plant species were influencing the larval mortality with the same effects (LC₅₀ was 0.5 to 1 mg g⁻¹ in all extracts), the impact on growth inhibition of larvae varied. The most efficient extract

de los extractos evaluados y la disuasión alimentaria. En la prueba de opción las larvas optaron por el alimento control. Aun cuando las diferencias entre las concentraciones por separado no fueron significativas, parece que la concentración de extractos estimuló la ingesta de alimento. La mayor atracción hacia el alimento (24.12%) fue para la dosis de evaluación más elevada (7.5 mg g⁻¹) en el extracto de *R. japonica*. En la prueba sin opción hubo un efecto disuasivo.

DISCUSIÓN

Aun cuando los extractos de las tres especies de *Reynoutria* no afectaron la disuasión alimentaria de

Table 8. Insecticidal effects of crude plants extracts on *S. littoralis* larvae.
Cuadro 8. Efectos insecticidas de los extractos crudos de planta sobre las larvas de *S. littoralis*.

	LC ₅₀	CI95	EC50	CI95
<i>R. sachalinensis</i>	0.80	0.62-1.05	9.48	6.66-13.50
<i>R. japonica</i>	0.58	0.47-0.72	6.72	2.38-18.96
<i>R. × bohemica</i>	1.22	1.03-1.45	1.24	0.56-2.78

was the *R. × bohemica* intespecific hybrid (LC₅₀ 1.24 mg g⁻¹), then the extract of *R. japonica* (LC₅₀ 6.72 mg g⁻¹), and the least efficient was the extract from *R. sachalinensis* (LC₅₀ 9.48 mg g⁻¹). Generally, larval growth inhibition is caused by the antifeedant effect which decreased food ingestion or even prevented feeding.

Both the ECI and ECD decrease was proportional to the extract concentration increase; however, the feeding deterrence index was not determined. ECI is an overall measure of an insect's ability to utilize the ingested food for growth: a drop in ECI indicates that more food is being metabolized for energy and less is being converted to body substance (*i.e.*, growth). ECD also decreases as the proportion of digested food metabolized for energy increases. Decreasing ECI and ECD values indicate that ingested *Reynoutria* sp. extract also elicit some chronic toxicity.

Similar results were also seen with hirtin and *T. connaroides* extract when tested against *Peridroma saucia* (hirtin and extract) and *S. litura* (extract) (Xie *et al.*, 1994; Wheeler and Isman, 2001). Extracts of methylalcohol may contain an array of substances which probably could make the artificial diets for polyfagous moths larvae (vitamins, chlorophyll). Furthermore, they also contain extracts of substances which may reduce growth, even they are not considered as antifeedants (Caroll *et al.*, 2006).

Ghumare and Mukherjee (2005) found that *S. litura* larvae exhibited preference for food contained (α)-pinene, (β)-pinene, alphamethrin, D-limonene, and cineole, even though they showed negative effects on the growth of *S. litura* larvae. Taste aversion has been described as an adaptive specialization of learning, which possibly should provide polyphagous species with an adaptive advantage (Ratcliffe *et al.*, 2003). Besides, contrary to the hypothesis that generalists should develop aversion to toxic substances on palatable plants, *Spodoptera littoralis* as well as *S. litura* (Ghumare and Mukherjee, 2005) do not exhibit the food aversion shown by certain slugs, caterpillars or grasshoppers (Gelperin, 1975; Dethier, 1980; Bernays and Lee, 1988; Behmer *et al.*, 1999).

las larvas de *Spodoptera littoralis*, sí redujeron significativamente el crecimiento larvar y la eficiencia de conversión del alimento ingerido y digerido. En su mayor parte, la conversión del alimento ingerido fue menor comparado con el grupo testigo. El uso mínimo de alimento ocasionó prolongación del desarrollo larvar y toxicidad crónica. Aunque la influencia de los extractos de las tres especies de plantas produjo los mismos efectos en la mortalidad larvar (LC₅₀ fue de 0.5 a 1 mg g⁻¹ en todos los extractos), el impacto en la inhibición del crecimiento de las larvas varió. El extracto más eficiente fue el híbrido interespecífico de *R. × bohemica* (LC₅₀ 1.24 mg g⁻¹), seguido por el de *R. japonica* (LC₅₀ 6.72 mg g⁻¹) y, finalmente, por el de *R. sachalinensis* (LC₅₀ 9.48 mg g⁻¹). Por lo general, la inhibición en el crecimiento larvar es consecuencia del efecto antialimentario, el cual redujo la ingesta de alimento o, incluso, impidió la alimentación.

La disminución, tanto de ECI como de ECD fue proporcional al incremento en la concentración del extracto; sin embargo, no se determinó el índice de disuasión alimentaria. ECI es una medida general para evaluar la habilidad que tiene un insecto para utilizar el alimento ingerido en pro de su crecimiento: un descenso en ECI indica que la mayor parte del alimento se está metabolizando para generar energía y que la menor parte se está transformando en sustancia corporal (esto es, crecimiento). ECD también disminuye a medida que la proporción del alimento digerido que es metabolizado para generar energía aumenta. Los valores descendentes de ECI y ECD indican que el extracto de *Reynoutria* sp. ingerido provoca también cierta toxicidad crónica.

Se observaron resultados similares con hirta y extracto de *T. Connaroides* al evaluarse contra *Peridroma saucia* (hirta y extracto) y *S. litura* (extracto) (Xie *et al.*, 1994; Wheeler e Isman, 2001). Los extractos de alcohol metílico pueden contener una variedad de sustancias, las cuales probablemente podrían configurar dietas artificiales para larvas de polillas polífagas (vitaminas, clorofila). Además, también contienen extractos de sustancias que reducen el crecimiento, aunque no se consideran antialimentadores (Caroll *et al.*, 2006).

Ghumare y Mukherjee (2005) observaron que *S. litura* mostró preferencia por alimentos que contenían (α)-pineno, (β)-pineno, alfametrín, D-limoneno y cineolo, aun cuando éstos mostraron efectos negativos en el desarrollo de larvas *S. litura*. La aversión al sabor se ha descrito como una especialización adaptativa de aprendizaje, la cual podría generar especies polífagas con ventaja adaptativa (Ratcliffe *et al.*, 2003). Además, contrario a la hipótesis de

The leaves of Knotweeds species contain many biologically active compounds: catechin, epicatechin, chlorogenic acid, caftaric acid, derivatives of caffeic acid and many derivatives of quercetin (Vrchotová *et al.* 2004, 2005 a, b). The contents of phenolic compounds from ground parts of these species are very different; some phenolic compounds (Vrchotová *et al.*, 2004) are summarized in Table 9. The fresh aerial parts of *R. sachalinensis* contain quinones, for example emodin (72 mg kg⁻¹ fresh weight), physcion (22 mg kg⁻¹) (Inoue *et al.*, 1992).

Even if trials of the studied extracts were not performed, it is probable, based on previously performed analysis, other possible impacts of some substances on the *Spodoptera larvae* as reported by other authors. For example, Lindroth and Peterson (1988) showed that rutin and quercetin cause some mortality and rutin reduced growth rates consumption and digestion efficiency of larvae *Spodoptera eridania*. For isoflavonoids tested in combinations with chlorogenic acid, the combinations containing judaicin and maackiain were most active, and chlorogenic acid enhanced the antifeedant activity of isoflavonoids against *Helicoverpa armigera* (Simmonds and Stevenson, 2001). In our extracts there were several phenolic compounds and their numerous glycosides. Besides the so far known substances, they contain leaves and their extracts, and a large number of unknown substances. We have to focus on determining the substances which are part of the shoot parts of plant because the main interest is focused on the under-ground plant organs for the content of stilbens (resveratrol and transresveratrols), which is not present in the shoot of plants. It is probable that some of the phenolic substances, or their compounds, may significantly decrease phytophagous of the plants.

CONCLUSION

The *Reynoutria* extracts directly affected the growth and, in higher doses, caused chronic toxicity of *Spodoptera littoralis* larvae. Besides this direct impact, the extracts from these plants may indirectly increase its insecticidal effectiveness if they applied onto the plants directly. These extracts may elicitate several phenolic substances of a defensive characters with

que las generalistas podrían desarrollar aversión a sustancias tóxicas en plantas paladeables, ni *Spodoptera littoralis* ni *S. litura* (Ghumare y Mukherjee, 2005) muestran la aversión al alimento que presentan ciertos babosos, orugas o grillos (Gelperin, 1975; Dethier, 1980; Bernays y Lee, 1988; Behmer *et al.*, 1999).

Las hojas de especies de *Reynoutria* contienen muchos componentes activos biológicamente: catequina, epicatequina, ácido clorogénico, ácido caftarico, derivados de ácido cafeínico y muchos derivados de quercetina (Vrchotová *et al.*, 2004, 2005 a, b). Las cantidades de compuestos fenólicos de las partes terrestres de estas especies son muy diferentes; en el Cuadro 9 se muestran algunos compuestos fenólicos (Vrchotová *et al.*, 2004). Las partes aéreas frescas de *R. sachalinensis* contienen quinonas, como emodina (72 mg kg⁻¹ peso fresco) y fisición (22 mg kg⁻¹) (Inoue *et al.*, 1992).

Aunque no se hicieron ensayos de los extractos estudiados parece, con base en análisis realizados previamente, que otras sustancias ejercen cierto impacto en las larvas de *Spodoptera*, como lo reportan otros autores. Por ejemplo, Lindroth y Peterson (1988) observaron que rutina y quercetina causaron mortalidad y que rutina redujo los índices de eficiencia de consumo y digestión de las larvas de *Spodoptera eridania*. En el caso de los isoflavonoides evaluados en combinaciones con ácido colinérgico, las combinaciones que contenían judaicin y maackiain fueron las más activas y el ácido clorogénico mejoró la actividad anti-alimentaria de los isoflavonoides contra *Helicoverpa armigera* (Simmonds y Stevenson, 2001). Nuestros extractos contenían varios compuestos fenólicos así como sus abundantes glucósidos. Además de dichas sustancias, contienen hojas y sus extractos, así como un gran número de sustancias desconocidas. Debemos enfocarnos en establecer cuáles son las sustancias presentes en los vástagos (brotes) de la planta ya que el interés (beneficio) principal se centra en los órganos subterráneos de la planta por el contenido de estilbeno (resveratrol y transresveratrol), el cual no está presente en el vástago (brote) de las plantas. Algunas de las sustancias fenólicas, o sus compuestos, podrían reducir significativamente la presencia de fitófagos en las plantas.

Table 9. Content of phenolic compounds in leaves of *Reynoutria* species (mg kg⁻¹ dry mass).

Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos en hojas de especies de *Reynoutria* (mg kg⁻¹ masa seca).

Plant	Catechin	Epicatechin	Chlorogenic acid	Caftaric acid	Total quercetin
<i>R. japonica</i>	373	1394	2839	4342	4914
<i>R. ×bohemica</i>	452	816	1342	4254	640
<i>R. sachalinensis</i>	946	1707	207	249	4721

the plants, which may increase the total effectiveness of the agents. Nevertheless, it is probable that the *Reynoutria* sp. extracts, used in plant protection due to their fungicidal effects, may significantly reduce the number of pests.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this research was sponsored by the MSMT funding no. 1P05ME764, MSMT OC D28.001 and from the Research Intention Program of ISBE AS CR AV0Z60870520.

LITERATURE CITED

- Ahmad, T.R. 1988. Field studies on sex pheromone trapping of cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boid.) (Lep., Noctuidae). J. Appl. Ent. 105: 212-215.
- Akhtar, Y., and M. B. Isman. 2004. Comparative growth inhibitory and antifeedant effect of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect species. J. Appl. Ent. 128: 32-38.
- Behmer, S. T., D. D. Elias, and E. A. Bernays. 1999. Post-ingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of unsuitable sterols in a generalist grasshopper. J. Exp. Biol. 202: 739-748.
- Bernays, E. A., and J. C. Lee. 1988. Food aversion learning in the phytophagous grasshopper *Schistocerca americana*. Physiol. Entomol. 13: 131-137.
- Brown, E. S., and C. F. Dewhurst. 1975. The genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Africa and Near East. Bull. Ent. Res. 65: 221-262.
- Caroll, M. J., E. A. Schmelz, R. L. Meagher, and P. E. A. Teal. 2006. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. J. Chem. Ecol. 32: 1911-1924.
- Champion, D. G., B. W. Brettany, J. B. McGinnigle, and L. R. Tailor. 1977. The distribution and migration of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), in relation to meteorology on Cyprus, interpreted from maps of pheromone trap samples. Bull. Ent. Res. 64: 339-363.
- Daayf, F., M. Ongena, R. Boulanger, I. L. Hadrami, and R. R. Bélanger. 2000. Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. J. Chem. Ecol. 26: 1579-1593.
- Dethier, V. G. 1980. Food -aversion learning in two polyphagous caterpillars, *Diacrisia virginica* and *Estigmene congrua*. Physiol. Entomol. 5: 321-325.
- Dimock, M. B., and J. A. A. Renwick. 1991. Oviposition by flied populations of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) deterred by extract of a wild crucifer. Environ. Entomol. 20: 802-806.
- Farrar, R. R., J. D. Barbour, and G. G. Kenedy. 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. Ann. Entomol. Soc. Am. 82: 593-598.
- Gelperin, A. 1975. Rapid food-aversion learning by a terrestrial mollusk. Science 189: 567-570.
- Ghumare, S. S., and S. N. Mukherjee. 2005. Absence of food aversion learning in the polyphagous noctuid, *Spodoptera litura* (F.) following intoxication by deleterious chemicals. J. Insect Behav. 18: 105-114.
- Hamilton, M. A., R. C. Russo, and R. V. Thurston. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7): 714-719. Correction (1978), 12: 417.

CONCLUSIONES

Los extractos de *Reynoutria* tuvieron un impacto directo en el crecimiento y, en mayor medida, causaron toxicidad crónica en las larvas de *Spodoptera littoralis*. Además de dicho impacto, los extractos de estas plantas pueden incrementar indirectamente su efectividad insecticida si se aplican directamente sobre las plantas. Estos extractos pueden generar distintas sustancias fenólicas de caracteres defensivos con las plantas, las cuales pueden incrementar la efectividad total de los agentes. No obstante, parece que los extractos de *Reynoutria* sp. utilizados en la protección de plantas por sus efectos fungicidas, reducen significativamente el número de plagas.

—Fin de la versión en español—



- Herger, G., F. Klingauf, D. Mangold, E.H. Pommer, and M. Scherer. 1988. Efficacy of extracts of *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (Polygonaceae), against fungal diseases, especially powdery mildews. Nach. Deut. Pflanz. 40: 56-60.
- Inoue, M., H. Nishimura, H.H. Li, and J. Mizutani. 1992. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* Fr Schm (Polygonaceae). J. Chem. Ecol. 18: 1833-1840.
- Khan, Z. R., and R. C. Saxana. 1986. Effect of steam distillate extracts of resistant and susceptible rice cultivars on behaviour of *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae). J. Econ. Entomol. 79: 928-935.
- Konstantinidou-Doltsinis, S., and A. Schmitt. 1998. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. Crop Protec. 17: 649-656.
- Lindroth, R.L., and S. S. Peterson. 1988. Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larva. Oecologia. 75: 185-189.
- Neuhaus, W., and W. Pallut. 1992. Modellversuche zur Bekämpfung des Echten Mehltaus (*Oidium lycopersicum* Cooke et Masee) der Tomate sowie Einfluß von Pflanzenstärkungsmitteln. Mitteilung aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin Dahlem. 286: 193.
- Pavela, R. 2004a. The effect of ethanol extracts from plants of the family Lamiaceae on Colorado Potato Beetle adults (*Leptinotarsa decemlineata* SAY). Sci. Lett. 27: 195-203.
- Pavela, R. 2004b. Insecticidal activity of certain medicinal plants. Fitoterapia 75(7-8): 745-749.
- Pavela, R. 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larva of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia 76: 691-696.
- Pavela, R. 2006. Insecticidal activity of essential oils against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. J. Essent. Oil-B. P. 9: 99-106.
- Pavela, R., J. Harmatha, M. Bárnet, and K. Vokáč. 2005. Systemic effects of phytoecdysteroids on the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). Eur. J. Entomol. 102: 647-653.
- Ratcliffe, J. M., M. B. Fenton, and B. G., Jr. Galef. 2003. An exception to the rule: Common vampire bats do not learn taste aversions. Anim. Behav. 65: 385-389.

- Sadek, M. M. 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J. Appl. Ent.* 127: 396-404.
- Simmonds, M. S. J., and P. C. Stevenson. 2001. Effects of isoflavonoids from Cicer on larvae of *Helicoverpa armigera*. *J. Chem. Ecol.* 27: 965-977.
- Vastano, B. C., Y Chen, N. Q. Zhu, C. T. Ho, Z. Y. Zhou, and R. T. Rosen. 2000. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 253-256.
- Vrchotová, N., B. Šerá, J. Tříška, E. Dadáková, and S. Kužel. 2004. Phenolic compounds in the leaves of *Reynoutria* Houtt. genus. *In: Hoikkala, A. and Soidinsalo (eds). Polyphenols communications 2004, XXII. International Conference on Polyphenols, 25-28 August, Helsinki, Finland.* pp: 811-812.
- Vrchotová, N., B. Šerá, and J. Tříška. 2005a. Dominant phenolic compounds in ruderal species of *Reynoutria* and *Impatiens*. - 13th EWRS Symposium, Bari - Italy, 19. - 23. June 2005, abstract No. 030, full text on CD.
- Vrchotová, N., B. Šerá, J. Tříška, E. Dadáková, and S. Kužel. 2005b. Biologically active compounds as possible cause of invasibility of knotweeds (spp.) from eastern Asia. *In: Alford, D. V. and G. F. Backhaus (eds). 2005 BCPC Symposium proceedings No. 81, Plant protection and plant health in Europe: Introduction and spread of invasive species, Page Bros, Norwich.* pp: 289-290.
- Waldbauer, G. P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect. Physiol.* 5: 229-288.
- Wheeler, D. A., and M. B. Isman. 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extracts against the larvae of *Spodoptera litura*. *Ent. Exp. Apl.* 98: 9-16.
- Xie, Y. S., M. B. Isman, P. Gunning, S. MacKinnon, J. T. Arnason, D. R. Taylor, P. Sanchez, C. Hasbun, and G. H. N. Towers. 1994. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and limonoid hirtin against lepidopteran larvae. *Biochem. System. Ecol.* 22: 129-136.
- Yang, F., T. Zhang, and I. Yoichiro. 2001. Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr., A.* 919: 443-448.
- Zhang, C., X. Zhang, Y. Zhang, Q. Xu, H. Xiao, and X. Liang. 2006. Analysis of estrogenic compounds in *Polygonum cuspidatum* by bioassay and high performance liquid chromatography. *J. Ethnopharmacol.* 105: 223-228.
- Zhao, B., G. G. Grant, D. Langevin, and L. MacDonald. 1998. Detering and inhibiting effects of quinolizidine alkaloids on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) oviposition. *Environ. Entomol.* 27: 984-992.